

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	両親媒性ペプチドを用いた革新的細胞核内物質導入技術の開発
研究機関・ 部局・職名	京都大学 大学院生命科学研究科・准教授
氏名	吉村成弘

1. 当該年度の研究目的

1. 項目Ⅰ：高い核移行能を有する両親媒性ペプチドの設計・最適化・通過原理の理解

前年度に引き続き両親媒性ヘリクスモチーフの構造的特徴を網羅的に解析すると共に、それらの核移行能を顕微鏡下で観察しながら定量評価する。両親媒性ペプチドを発現・精製、もしくは合成し、これらを量子ドットやアルブミンタンパク質表面に結合させ、その核移行能を定量的に解析する。この実験結果に基づき、さらにアミノ酸置換などを行いながら、「核内移行に最も適した両親媒性構造」を見出すための最適化作業を繰り返す。また、Forster 共鳴エネルギー転移等を用いて両親媒性ヘリクスが核膜孔の内部を通過する際の構造変化を追うことにより、核膜孔通過の分子レベルでのメカニズムを明らかにする。

2. 項目Ⅱ：細胞膜通過および細胞選択性モジュールの付加および検討

この項目では、項目Ⅰで最適化した両親媒性ヘリクスモチーフに、細胞外から細胞内に分子を取り込むための細胞膜透過性ペプチドモジュールや特定の細胞種を標的とするリガンド等を付加することにより、細胞外から核内への統合的物質運搬モジュールを確立する。特に、23年度では、これまでに報告されている細胞膜透過性ペプチド(tat や penetratin など)を両親媒性ヘリクスに付加する基盤技術を確立する。

3. 研究の実施状況

項目Ⅰ：高い核移行能を有する両親媒性ペプチドの設計・最適化・通過原理の理解

タンパク質構造データベースから両親媒性モジュールを探し出し、そのリコンビナントタンパク質を大腸菌や昆虫細胞を用いて発現・精製し、それらの核膜通過能を HeLa 細胞を用いて測定した。これまでに、HEAT repeat, ARM repeat, Spectrin repeat, Leucine-rich repeat, coiled-coil を含むタンパク質を20種以上(部分断片を含む)に関して結果が得られている。特にHEAT repeat に関しては、大きな分子量にかかわらず、高い核膜通過能を示すことを見いだしている。さらに、HEAT repeat から構成されるタンパク質として有名な importin β に関しては、分子動力学計算を用いた解析により、それが核膜孔のような疎水的環境を通過する際の構造変化に関する新しい知見を得ることに成功している。HEAT repeat と spectrin repeat に関しては、その一部をアルブミンタンパク質に結合させることにより核膜孔通過能を上昇させることに成功しており、今後の最適化に向けてのシステムが整いつつある。

項目Ⅱ：細胞膜通過および細胞選択性モジュールの付加および検討

細胞膜透過性ペプチド(tat や penetratin など)を両親媒性ヘリクスに付加する基盤技術を確立するために、システイン残基を用いる系を構築している。両親媒性ペプチドのアミノ酸配列を最適化する中で、システインを含まないものを作成する。これまでに、システインを含まない spectrin repeat モチーフの断片を選出し、その末端に新たにシステインを1残基付加したものを作成した。現在、このシステインを介して tat ペプチドを結合させる技術確立に取り組んでいる。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計8件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計7件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. M. Asally, Y. Yasuda, M. Oka, S. Otsuka, <u>S.H. Yoshimura</u>, K. Takeyasu and Y. Yoneda (2011) Nup358, a nucleoporin, functions as a key determinant of the nuclear pore complex structure remodeling during skeletal myogenesis. <i>FEBS J.</i> 278(4): 610-621. 2. H. Ohno, T. Kobayashi, R. Kabata, K. Endo, T. Iwasa, <u>S.H. Yoshimura</u>, K. Takeyasu, T. Inoue and H. Saito (2011) Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle. <i>Nat. Nanotechnol.</i>, 6(2):116-120. 3. H. Maruyama, M. Shin, T. Oda, R. Matsumi, R.L. Ohniwa, T. Ito, K. Shirahige, T. Imanaka, H. Atomi, <u>S.H. Yoshimura</u> and K. Takeyasu (2011) Histone and TK0471/TrmBL2 form a novel heterogeneous genome architecture in the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus kodakarensis</i>. <i>Mol. Biol. Cell</i>, 22(3): 386-398. 4. <u>S.H. Yoshimura</u>, S. Khan, H. Maruyama, Y. Nakayama and K. Takeyasu (2011) Fluorescence labeling of carbon nanotubes and visualization of a nanotube-protein hybrid under fluorescence microscope. <i>Biomacromolecules</i> 12(4):1200-1204. 5. Y. Suzuki, J.L. Gilmore, <u>S.H. Yoshimura</u>, R.M. Henderson, Y.L. Lyubchenko and K. Takeyasu (2011) Visual analysis of concerted cleavage by type IIF restriction enzyme SfiI in subsecond time region. <i>Biophys. J.</i> 101(12): 2992-2998. 6. S. Sekiguchi, K. Niikura, Y. Mastuo, <u>S.H. Yoshimura</u>, K. Ijiri (2012) Nuclear transport facilitated by the interaction between nuclear pores and carbohydrates. <i>RSC Advances</i> 2: 1656-1662. 7. H. Maruyama, <u>S.H. Yoshimura</u>, S. Ohno, K. Nishikawa and Y. Nakayama (2012) Covalent attachment of a specific site of a protein molecule on a carbon nanotube tip. <i>J. Appl. Phys.</i> 111, 074701. <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計1件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Y. Akai, Y. Kurokawa, N. Nakazawa, Y. Tonami-Murakami, Y. Suzuki, <u>S.H. Yoshimura</u>, H. Iwasaki, Y. Shiroiwa, T. Nakamura, E. Shibata and M. Yanagida (2011) Opposing role of condensin hinge against replication protein A in mitosis and interphase through promoting DNA annealing. <i>Open Biology</i> (in press)
<p>会議発表 計5件</p>	<p>専門家向け 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 吉村成弘 「AFM で捉える DNA のかたちとうごき」株式会社 RIBM 主催 “超高速 (動画) AFM シンポジウム” (2011 年 7 月 29 日, 大阪府豊中市) 2. 吉村成弘 「両親媒性タンパク質による核膜孔通過原理の理解と応用」第 84 回生化学会大会 企画ワークショップ (2011 年 9 月 22 日, 京都市) オーガナイザとしてワークショップを企画 3. 吉村成弘 「核膜孔複合体を介した物資輸送機構の解明」第 10 回核ダイナミクス研究会 (2011 年 10 月 26 日, 札幌市) 4. <u>S.H. Yoshimura</u> “Flexible Amphiphilic Structure of Importin β is Critical for its Fast Passage through the NPC.” at EMBO Workshop on Mechanisms of Nucleocytoplasmic Trafficking (Nov. 7th, 2011, Jerusalem, Israel) 5. <u>S.H. Yoshimura</u> “How does importin beta/cargo complex overcome the NPC barrier?” 第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ(2011 年 12 月 15 日, 横浜市) <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/chrom/index.html
国民との科学・技術対話 の実施状況	<p>スーパーサイエンスハイスクール向け特別講義・実習</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 平成23年4月15日(滋賀県立膳所高等学校、特別講義)「ナノの目で見るバイオの世界Ⅰ」参加者 19名 2. 平成23年6月17日(滋賀県立膳所高等学校、特別講義)「ナノの目で見るバイオの世界Ⅱ」参加者 19名 3. 平成23年9月30日(滋賀県立膳所高等学校、特別実習)「ナノの目で見るバイオの世界・実習」参加者 14名
新聞・一般雑誌等掲載 計〇件	
その他	特になし

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	86,000,000	36,500,000	0	49,500,000	0
間接経費	25,800,000	10,950,000	0	14,850,000	0
合計	111,800,000	47,450,000	0	64,350,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未取利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	36,500,000	0	0	36,500,000	36,500,000	0	0
間接経費	10,875,000	0	0	10,875,000	0	10,875,000	0
合計	47,375,000	0	0	47,375,000	36,500,000	10,875,000	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	32,279,166	解析装置、分子生物学用試薬、ペプチド合成、等
旅費	1,217,783	研究成果発表旅費(マックスプランク生物学研究所)等
謝金・人件費等	1,082,379	研究補助員人件費
その他	1,920,672	学会参加費、電気料金等
直接経費計	36,500,000	
間接経費計	0	
合計	36,500,000	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ワークステーション	TYPE GLXA3 VC85690X-	1	584,010	584,010	H23.4.28	京都大学
高速液体クロマトグ ラフ	米国Waters社製 ACQITY UPLC H-Class Bioシステム	1	8,610,000	8,610,000	H23.6.1	京都大学
円二色分散計	日本分光株式会 社製 J-805型	1	8,908,935	8,908,935	H23.6.13	京都大学
ファイバーカップリ ングレーザーシス	エドモンド・オブティクス・ ジャパン(株)製 55879-L	1	653,100	653,100	H23.7.6	京都大学
光ファイバー出力 型レーザー発生装	昭和ファロニクス(株)製 J035LS-1G-11-11-12	1	1,392,300	1,392,300	H23.8.1	京都大学
サーバー	NextIO vCORE Express Lite	1	991,725	991,725	H24.1.11	京都大学
ストレージサーバ	Type 4U-XPJ2 VC95690-4UXPJ2K	1	893,025	893,025	H24.1.12	京都大学