

課題番号	LS076
------	-------

**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24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・ 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

22, 23 年度中に、核膜孔通過原理の基本的理解（研究項目 I-2）に関しては、ほぼ達成されており、両親媒性ナノペプチドの設計・最適化（研究項目 I-1）に関しても、これまでに 10 種類以上のタンパク質から両親媒性構造を抽出し、透過性を検証し、最適化に向けて順調に進んでいる。24 年度には、引き続き設計および最適化（研究項目 I-1）を継続するとともに、次の段階として、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（研究項目 II）を行う。これにより、特定の細胞をターゲットとした導入技術との融合を目指す。

2. 研究の実施状況

・**両親媒性ペプチドの最適化:** これまでに5種類の両親媒性モチーフから合計30種類以上のペプチドに関して核移行を検証した。本年度は、その中でも、i) 配列設計の自由度、ii) 調製のしやすさ(収量)、iii) 核移行効率、などの項目から候補を絞り、leucine-rich repeat (LRR)モチーフに焦点を絞って研究を遂行した。LRR は右図に示されるようにβシートとαヘリクスから構成される両親媒性モチーフである。これに、ア) ナノカプセルやタンパク質を結合させるためのシステイン残基、イ) ヘリクスに柔軟性を持たせるためのプロリン残基、ウ) 表面の性質を変化させるための荷電残基や疎水性残基を狙った位置に導入し、核内への移行効率を蛍光顕微鏡下で測定した。その結果、分子外側に疎水性残基を導入すると核内移行効率が上昇する傾向にあることを明らかにした。

top view



side view



・**細胞膜通過モジュールおよび細胞選択性モジュールの付加・検討:** これまでに報告されている膜透過性ペプチド(HIV の tat ペプチド)を両親媒性モジュールに結合し、細胞外から細胞質への取り込みを促進させる。Tat ペプチドはアルギニン残基に富むペプチド(RKKRRQRRR)であるため、両親媒性モチーフとの結合により相互機能阻害が生じる恐れがある。このため、両モチーフ間のスペーサ長さを検討しながら結合方法を検討している。現在、両親媒性ペプチドに結合させた際の膜透過能および核移行能を測定中である。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計9件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計8件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Y. Suzuki, T.A. Goetze, D. Stroebel, D. Balasuriya, <u>S.H. Yoshimura</u>, R.M. Henderson, P. Paoletti, K. Takeyasu, J.M. Edwardson (2013) Visualization of structural changes accompanying activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors using fast-scan atomic force microscopy imaging. <i>J. Biol. Chem.</i> 288(2):778-784. 2. E. Prieto, T. Kobori, <u>S.H. Yoshimura</u>, K. Takeyasu, K. Hizume (2012) Core histone charge and linker histone H1 effects on the chromatin structure of <i>Schizosaccharomyces pombe</i>. <i>Biosci. Biotech. Biochem.</i> 76(12): 2261-2266. 3. Y. Suzuki, M. Shin, A. Yoshida, <u>S.H. Yoshimura</u> and K. Takeyasu (2012) Fast microscopical dissection of action scenes played by <i>Escherichia coli</i> RNA polymerase. <i>FEBS Lett.</i> 586(19):3187-3192. 4. M. Kumeta, H. Yamaguchi, <u>S.H. Yoshimura</u>, and K. Takeyasu (2012) Karyopherin-independent spontaneous transport of amphiphilic proteins through the nuclear pore. <i>J. Cell Sci.</i> 125(Pt 21): 4979-4984. 5. <u>S.H. Yoshimura</u>, S. Khan, S. Ohno, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Hosoya, H. Maruyama, Y. Nakayama and K. Takeyasu (2012) Site-specific attachment of a protein to the end of carbon nanotube without loss of protein function. <i>Bioconj. Chem.</i> 23(7):1488-1493. 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. 8. Y. Akai, Y. Kurokawa, N. Nakazawa, Y. Tonami-Murakami, Y. Suzuki, S.H. Yoshimura, 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> 1(4): 110023. <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. <u>S.H. Yoshimura</u>, S. Otsuka, M. Kumeta, M. Taga and K. Takeyasu (2013) Intermolecular disulfide bonds among nucleoporins regulate karyopherin-dependent nuclear transport. <i>J. Cell Sci.</i> (in press)
<p>会議発表 計4件</p>	<p>専門家向け 計4件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 吉村成弘「核-細胞質間物質輸送原理の理解と DDS への応用」第 28 回日本 DDS 学会 年会ワークショップ (2012 年 7 月 4 日, 札幌) 2. 吉村成弘, 桑田昌宏, 竹安邦夫 「高大連携生命科学教育における卓越性: 理科科目横断講義の実践」日本科学教育学会第 36 回年会 (2012 年 8 月 27 日, 東京) 3. 吉村成弘「核-細胞質間物質輸送の分子基盤の理解」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 日, 福岡) 4. <u>S.Y. Yoshimura</u> “Flexible amphiphilic proteins travel through the nuclear pore complex.” 第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会 (2012 年 12 月 20 日, 淡路) <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/chrom/html
国民との科 学・技術対話 の実施状況	スーパーサイエンスハイスクール向け特別講義・実習 <ol style="list-style-type: none"> 1. 平成24年4月20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 15名 2. 平成24年6月8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 15名 3. 平成24年9月15日(大阪府立三国丘高等学校、特別講義)「ナノの目で見るバイオの世界」参加者 35名
新聞・一般雑 誌等掲載 計0件	
その他	

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されません

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	25,000,000	24,500,000	0
間接経費	25,800,000	10,950,000	7,500,000	7,350,000	0
合計	111,800,000	47,450,000	32,500,000	31,850,000	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 (未収利息を除 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	0	25,000,000	0	25,000,000	20,359,899	4,640,101	0
間接経費	10,875,000	7,500,000	0	18,375,000	0	18,375,000	0
合計	10,875,000	32,500,000	0	43,375,000	20,359,899	23,015,101	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	13,334,563	解析装置、分子生物学用試薬、ペプチド合成等
旅費	1,467,088	研究成果発表旅費(第28回日本DDS学会)等
謝金・人件費等	4,957,999	研究補助員人件費
その他	600,249	シーケンス解析等
直接経費計	20,359,899	
間接経費計	0	
合計	20,359,899	

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
サーバー	NextIO vCORE Express 2090	1	1,703,625	1,703,625	H24.5.23	京都大学
ストレージサーバ	Type 4U-XPJ2 VC95690-4UXPJ2K	1	999,600	999,600	H24.5.23	京都大学
光散乱検出器	米国Waters社製 ACQUITY UPLC ELSD w/Nebulizer	1	3,239,250	3,239,250	H24.5.30	京都大学
分光蛍光光度計	日本分光株式会社 製 FP-8300ST	1	2,657,865	2,657,865	H25.1.22	京都大学