

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 25 年度)**

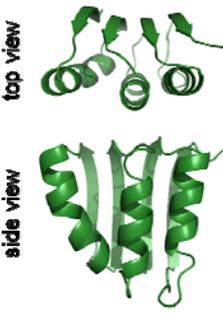
本様式の内容は一般に公表されます

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

<p>・輸送物質を封入したナノ粒子の作成とナノコンポジットカプセルの構築 (平成 25 年度) 核膜孔を通過する物質の物理的サイズの上限は約 40 nm 程度と考えられている。ここでは、様々なポリマー材料を用いて輸送物質を封入したナノ粒子を作成し、これを両親媒性ペプチドで外包することで多機能性ナノコンポジットカプセルを構築する。本申請者はすでに様々な性質のハイドロゲルの作成に関する知見を有しており、ここではこの技術を利用する。</p> <p>・封入物質の核内徐放メカニズムの探索と実用化に向けたシステム統合 (平成 25 年度) 温度感受性高分子や光応答性物質を用いて封入物質をカプセルから徐放するためのメカニズムを探索し、統合する。また、これまでの項目で得られた成果を統合し、細胞外から核内までの統合的システムを構築すると共に、実用化にむけた検討を行う。</p>
--

2. 研究の実施状況

<p>研究項目 I: 両親媒性ペプチドの最適化 昨年度は、両親媒性構造モチーフの中でも特に leucine-rich repeat (LRR)モチーフ(右図)に焦点を絞って核移行能の検証を行い、より性能の高い配列を見つけて出すことに成功した。しかしながら、運ぶ分子(粒子)のサイズが大きくなると(70 kDa 以上)、急激に核移行能が低下することが判明した(分子量 1.5 倍で、通過能が約 1/5) ため、今年度はさらに二次構造(αヘリクスとβシート)を再検討し、モチーフの構造的安定性と核移行能とを両立させる構造を見出すことに成功した。</p>	
<p>研究項目 II: 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 昨年に引き続き、膜透過性 tat ペプチド(RKKRRQRRR)を両親媒性モジュールに結合する試みを行った。まず、両親媒性モチーフのアミノ末端に上記アミノ酸配列を付加し、蛍光標識した粒子に結合させた際の細胞外から細胞内部への取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。また、核内部への取り込みを、蛍光タンパク質をコードする DNA を用いて検証し、タンパク質の発現量をもとに定量評価した。両親媒性モチーフと膜透過性ペプチドと間に機能的干渉が見られたため、それらを繋ぐスペース配列の長さや性質を検討し、電荷を持たない non-bulky なアミノ酸が適していることを明らかにした。</p>	
<p>研究項目 III: 輸送物質の封入・放出技術の統合とシステム構築・実用化 DNA および蛍光物質を含むアクリル酸溶液を攪拌しながら重合させることで、サブミクロンサイズの粒子を作成した。粒子はゲル濾過カラムで分画し、蛍光顕微鏡で確認した。さらに、このゲルにアミノ基を含むアクリル酸を混合することで、アミノ基を有するナノカプセルを作成し、両親媒性ペプチドが有するチオール基を結合させる試みを行った。その結果、効率は低いものの、この両者を共有結合することに成功した。</p>	

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 2 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> 126 (pt14): 3141-3150. 2. M. Kumeta, Y. Hirai, <u>S.H. Yoshimura</u>, T. Horigome and K. Takeyasu (2013) Antibody-based analysis reveals “filamentous vs. non-filamentous” and “cytoplasmic vs. nuclear” crosstalk of cytoskeletal proteins. <i>Exp. Cell Res.</i> 319(20): 3226-3237.
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>専門家向け 計 7 件</p> <p>吉村成弘「細胞質-核間物質輸送の分子基盤の理解と応用」東北大学農学部セミナー(2013年5月14日, 仙台)</p> <p>吉村成弘「細胞質-核間物質輸送の分子基盤の理解と応用」新学術領域研究「感染症コンピテンシー」若手交流会 招待講演 (2013年9月28日, 湘南)</p> <p>S.H. Yoshimura 「Importin β travels through the NPC via flexible amphiphilic structures」International Meeting on Mechanism of Nuclear Transport (2013年10月20日, Woods Hole)</p> <p>小西秀明、吉村成弘 「疎水性溶媒が蛍光タンパク質の蛍光特性に及ぼす影響」日本生物物理学会年会 (2013年10月30日, 京都)</p> <p>浅井賢, 吉村成弘 「蛍光タンパク質を用いた疎水性感受性プローブの作成と核膜孔複合体研究への応用」第38回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会 (2013年11月26日, 箱根)</p> <p>吉村成弘 「Importin β travels through the NPC via flexible amphiphilic structures」第36回日本分子生物学会年会 企画ワークショップ(2013年12月5日, 神戸)</p> <p>H. Konishi and S.H. Yoshimura 「Solvent-dependent shift of fluorescence properties of fluorescent proteins」(アメリカ生物物理学会年会 2014年2月19日, サンフランシスコ)</p>
<p>図書 計 0 件</p>	<p>なし</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>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>研究室のホームページ： http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/chrom/html 研究紹介動画： https://www.youtube.com/watch?v=83z2wwgfIgo</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<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. 2013年4月12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 高校生を対象に、ナノテクノロジーやナノ医療に関する講義を行った。 2. 2013年4月19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

様式19 別紙1

	<p>世界 II」 参加者 15 名 高校生を対象に、ナノテクノロジーやナノ医療に関する講義を行った。</p> <p>3. 2014 年 3 月 31 日-4 月 4 日（西大和学園、特別ラボステイ） 参加者 10 名 高校生を対象に、ナノテクノロジーやナノ医療に関する講義を行い、DNA やタンパク質を扱う実習を 5 日間にわたって行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	<p>なし</p>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25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	61,500,000	24,500,000	0	0
間接経費	25,800,000	18,450,000	7,350,000	0	0
合計	111,800,000	79,950,000	31,850,000	0	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	4,640,101	24,500,000	0	29,140,101	29,140,101	0	0
間接経費	18,375,000	7,350,000	0	25,725,000	25,725,000	0	0
合計	23,015,101	31,850,000	0	54,865,101	54,865,101	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	16,333,995	解析装置、分子生物学用試薬等
旅費	2,587,385	研究成果発表旅費(「Mechanisms of Nuclear Transport Meeting」)等
謝金・人件費等	8,220,880	研究補助員人件費
その他	1,997,841	シーケンス解析等
直接経費計	29,140,101	
間接経費計	25,725,000	
合計	54,865,101	

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
蛍光寿命測定装置	株式会社堀場製 作所製 DeltaFlex-01- NL-YS	1	8,198,400	8,198,400	H25.12.27	京都大学
ガス混合装置	株式会社トクセン 製 TK- 0003MIGM-S001	1	822,150	822,150	H26.2.14	京都大学
				0		