

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成26年度実施計画書

平成26年 7月24日

共同研究代表者

所属機関・部局 京都大学・大学院理学研究科

職・氏名 教授・杉山 弘

1. 研究課題名 (和文) 完全長ヒトテロメア突出末端の構造のダイナミクスとサブドメインの安定性

(英文) Population Dynamics and Subdomain Stability of Folded Species in the Full-length Overhang Region of Human Telomeres

2. 共同研究実施期間

平成26年10月1日～平成29年9月30日(3年)

5. 共同研究参加者

(1) 日本側参加者* (代表者を除く)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
遠藤 政幸	京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点 特定拠点准教授	生物有機化学、DNA ナノ構造体の設計・構築および高速原子力間顕微鏡による四重鎖構造の観測
板東 俊和	京都大学・大学院理学研究科 准教授	生物有機化学、DNA 合成
朴 昭映	京都大学・大学院理学研究科 助教	生物有機化学、DNA 合成、コンピュータを用いた計算科学的アプローチ
THANGAVEL,Vaijayanthi	時間雇用研究員	生物有機化学、CD 測定
Li Yue	京都大学・大学院理学研究科 博士課程学生	生物有機化学、DNA 合成、CD 測定

* 新規の共同研究で申請書から新たに参加者を追加する場合、または、継続の共同研究で前年度から新たに参加者を追加する場合は、追加する参加者に (新) のマークをつけてください。

(2) 米国側参加者* (代表者を含む**)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
○Hanbin Mao	ケント州立大学・准教授	生物物理学、光ピンセット法の技術開発
Deepak Koirala	ケント州立大学・博士課程学生	生物物理学、光ピンセットによる構造の確認, PAGE, CD 測定

* 継続の共同研究で前年度から新たに参加者を追加する場合は、追加する参加者に (新) のマークをつけてください。

** 米国側代表者の氏名の前に、「○」のマークをつけてください。

6. 本年度実施計画の概要

- ※ 申請書の内容を踏まえて、日本語にて記入してください。
- ※ 経費との関連がわかるように具体的に記入してください。

AFMを用いたテロメラーゼの直接観察と、四重鎖結合性リガンドの特異的結合性評価

研究代表者の研究室では、“DNAフレーム”を用いて、四重鎖構造の直接観測の技術開発を進めている。この“DNAフレーム”技術を用いて、DNAナノ構造体内に存在するテロメア DNAフラグメントが形成するG-四重鎖構造について解析研究を進める。これらの技術には様々な塩基配列を有する核酸オリゴマーが必要不可欠であり、受注、もしくは、研究室での合成によって準備する。特に、四重鎖構造(もしくは、三重鎖構造)を形成している際のG-四重鎖結合性リガンドの結合力の強さや、結合している配列特異性をAFMによって一分子レベルで観測する。加えて、上記の観察系を次世代シーケンサーによる配列特異性解析に応用することによって、四重鎖結合性リガンドの特異的な結合性について網羅的に評価する。THANGAVEL氏は各種四重鎖結合性リガンドが与えるDNA構造への影響をCD測定によって分光学的に評価する予定である。

長鎖テロメア1本鎖領域内における四重鎖結合性リガンドの効果

四重鎖形成におけるメカニズムの解析結果によって、テロメア配列内の高次構造の熱力学的分布は注意深く調べる必要があると考える。その解析のために、研究代表者の研究室で開発した“DNA フレーム”を用いる1分子解析技術によって、テロメア配列内の高次構造の熱力学的分布をも直接可視化する。

具体的には、これまで前例のないより大きな DNA フレームの中に、長鎖テロメア1本鎖領域を内包することによって、直接観察する系を構築する。例えば、ビオチン標識化したPDCをこの系に加えれば、おそらくPDCは特異的にテロメア四重鎖に結合しその構造を強く安定化させるだろう。さらにストレプトアビジンを添加することで、ビオチンラベル化しているリガンド=PDCの存在、すなわち、四重鎖の存在の分布がAFM測定によってリアルタイムで直接観察できるようになると予想する。この分布のパターンやダイナミクスは、様々な温度やイオン濃度といった条件によって変化すると考えられる。コントロールとして四重鎖を形成しないランダム配列を持つ1本鎖DNAをフレーム内に並べて起こる現象を比較する。

この実験により得られるマイカ表面上のAFMイメージを比較することによって、マイカ表面が与える影響を差し引いた真の四重鎖形成を確認する。結果として、このAFMからの解析アプローチとMao研究室の光ピンセットによる解析アプローチによって、テロメア配列内の高次構造の熱力学的分布が実験的に立証されることが期待される。Li Yue氏は研究室で合成した特殊なDNAを用いて、Mao研究室で光ピンセットによる測定実験を行う予定である。

7. 本年度経費総額 13,200 千円

(単位：千円)

研究経費							業務委託手数料
設備備品費	消耗品費	旅費等		人件費・謝金等	その他経費	外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税*	
		国内旅費	外国旅費				
0	9,000	0	1,000	1,500	300	200	1,200

* 外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税を本経費から支出しない場合は、その理由等を「外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税」欄に記入してください。

* 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。

- ・平成23年度以前の採択課題・・・2,000万円/年(うち事務委託手数料は、研究経費に対し10%以内)
- ・平成24年度以降の採択課題・・・研究経費1,500万円/年に、研究経費に対し10%以内の事務委託手数料を加えた額

翌年度所要見込額	翌々年度所要見込額	3年度後所要見込額
16,500	13,200	6,600

左の欄は該当する場合のみ記入してください。
(単位：千円)

* 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。

- ・平成23年度以前の採択課題・・・2,000万円/年(うち事務委託手数料は、研究経費に対し10%以内)
- ・平成24年度以降の採択課題・・・研究経費1,500万円/年に、研究経費に対し10%以内の事務委託手数料を加えた額

研究計画全体必要額
49,500

2年度目以降の場合は、前年度までの執行済額も含めて記載してください。
(単位：千円)

* 研究計画全体必要額の上限は申請書記載の額とします。

8. 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費

	細目	金額 (単位：千円)	積算内訳
設備備品費		0	
	計	0	
消耗品費	AFM用カンチレバー	900	45,000円×20本
	試薬	6,100	次世代シーケンサー用試薬 2,500(千円) マイクロアレイ用試薬 2,000(千円) 有機系薬品類 600(千円) DNA合成用原料 1,000(千円)
	核酸オリゴマー	1,000	DNAフレーム、プライマーとして使用
	生物系酵素類	500	制限酵素、DNA反応性酵素等
	HPLCカラム	500	CHEMCOBOND 90,000円×2本, 40,000円×8本
	計	9,000	
人件費・謝金等	時間雇用研究員	1,500	250,000円×6ヶ月 (THANGAVEL, Vaijyanthi)
	計	1,500	
その他経費	印刷、通信、運搬費等	300	
	計	300	

備考：

- ① 細目は設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費（「通信費（切手・電話等）」「運搬費」「印刷費」等（手引8-8参照）の別に記入してください。
- ② 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、については、「積算内訳」の欄に品名または人物名、単価および数量を明記してください。

9. 交流計画

(a) 日本側参加者（代表者を含む）の国内出張計画

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
なし					

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 日本側参加者（代表者を含む）の米国への渡航計画

出張者 (氏名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
Li Yue	京都	ケント州立 大学(ケン ト市)	10月・11月 頃、1ヶ月 間	DNA合成、CD測定実験及 び打合せ	有

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 日本側参加者（代表者を含む）の米国以外の国への渡航計画*

出張者 (氏名)	出発地	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担***
なし					

* 外国出張の渡航先は原則として、米国のみを渡航先とします。ただし、当該共同研究の研究成果発表を目的とする学会等への出席や、フィールドワーク等で当該第三国へ行くことが必須である研究上の理由がある場合に限り、米国以外の国を訪問することは可能です。

** 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

*** 本経費使用予定の有無を記入すること

(d) 米国側研究者の来日計画

出張者 (氏名)	用務先	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
なし			

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」