

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成 27 年度実施計画書

平成 27 年 2 月 23 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)

(注) 本計画書は、受託機関を通して電子データにて提出してください。

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、リガンド合成
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、蛍光測定
(新) SAHA Abhijit	時間雇用研究員	核酸化学の分子生物化学実験
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 蛍光、UV 測定、解析評価
(新) 河本 佑介	京都大学・大学院理学研究科 博士課程学生	生物有機化学、ヒトテロメア配列標的型リガンドの合成開発、機能評価
(新) 朝光 世煌	京都大学・大学院理学研究科 修士課程学生	生物有機化学、G-四重鎖標的型リガンドの合成開発、機能評価

* 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
(新) Yunxi Cui	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DNA四重鎖構造の直接観察と解析研究

申請者らの研究室では、“DNAフレーム”を用いて、DNA遺伝子配列内に存在する様々な四重鎖構造を直接観測可能にする技術の開発研究を遂行している。この“DNA フレーム”技術を応用することで、ヒテロメア配列のみならず、遺伝子プロモーター内に存在するG-rich配列が形成する特異なG-四重鎖構造についての解析を進めていく。

この“DNA フレーム”による解析を実施するために、化学修飾された様々な塩基配列の「核酸オリゴマー」がフレームの構築に不可欠であり、企業への発注、もしくは、DNA 合成機による研究室での合成により必要な量を準備する予定である。AFM 用カンチレバーも測定の際、劣化摩耗していくものであり、消耗品として計上している。

長鎖テロメア1本鎖領域に対する四重鎖結合性リガンドの AFM を用いた機能評価

四重鎖形成におけるメカニズムの熱力学的な解析結果によって、ヒ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ことが示唆された。従って、その解析のために、昨年度に引き続き、申請者の研究室の“DNA フレーム”を活用した1分子解析技術によって、ヒテロメア配列内の高次構造の熱力学的分布を直接可視化する検討をLiが進める。Liはこれらの研究成果をまとめて、学会発表、論文発表する予定である。

具体的には、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と考える。次いで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。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。

これら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。河本、Liは各々の研究に光ピンセット技術の活用を進めるため、Mao氏の研究室に渡航する予定である。

ヒテロメア二本鎖構造に対する結合性リガンドの特異的結合機能評価

ヒテロメア構造は、細胞の増殖、複製に関連しており、四重鎖構造研究においても興味深い研究対象である。ヒテロメア二本鎖構造に対する結合性リガンドの開発は、ヒテロメア構造、機能解析において重要な役割を果たすことが期待される。

申請者らの研究室で、ヒテロメア二本鎖構造に対する結合性リガンドのヒテロメア DNA 配列に対する結合性や、配列特異性を、SPR や蛍光顕微鏡等の解析技術を駆使することによって、河本が合成を、THANGAVEL が観測、評価を進める。これらの解析評価を実施するために、化学修飾された様々な塩基配列の「核酸オリゴマー」、化学合成試薬類、生物試薬類、センサーチップなどが必要である。合成したリガンドはHPLCカラムによる精製後、機能評価を実施する。

四重鎖結合性リガンドの開発と特異的結合機能評価

DNA遺伝子配列内で形成する四重鎖構造(もしくは、三重鎖構造)は、転写因子などのDNA結合性タンパク質の特異的な認識に関連していることが示唆されている。従って、四重鎖構造に特異的に結合するリガンドには、特定遺伝子発現の制御、並びに、生体内での四重鎖構造の解析プローブなどの様々な研究応用が期待される。

申請者らの研究室では、結合性リガンドのDNA四重鎖構造に対する結合性や、配列特異性を、SPRやAFM等の解析技術を駆使することによって、朝光が合成を、SAHAが観測、機能評価を進める。加えて、次世代シーケンサーによって特異的な結合配列を解することにより、四重鎖結合性リガンドの結合性を網羅的に評価していく。これらの解析評価を実施するために、化学修飾された様々な塩基配列の「核酸オリゴマー」、化学合成試薬類、生物試薬類、センサーチップなどが必要である。朝光はこれらの研究成果をまとめて、学会発表、論文発表する予定である。

7. 本年度経費総額 16,500 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	7,580	20	1,000	5,760	100	540	1,500

- * 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	左の欄は該当する場合のみ記入してください。 (単位：千円)
13,200	6,600		

- * 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	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)
49,500	

- * 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
	化学合成試薬類	3,580	センサーチップ解析用品 1,580(千円) 有機系薬品類 1,000(千円) DNA 合成用原料 1,000(千円)
	核酸オリゴマー	1,600	DNA フレーム、プライマーとして使用
	生物試薬類	1,000	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	7,580		
人 件 費 ・ 謝 金 等	時間雇用研究員	3,000	250,000 円×12 ヶ月 (THANGAVEL, Vaijayanthi)
	時間雇用研究員	2,760	230,000 円×12 ヶ月 (SAHA, Abhijit)
	計	5,760	
そ の 他 経 費	学会参加登録費、 運搬費等	100	学会参加登録費 環太平洋国際化学会議 PACIFICHEM 2015 朝光 世煌 30,000 円 (250USD×120 円) 第 42 回国際核酸化学シンポジウム Li Yue 5,000 円 運搬費 サンプル送付 65,000 円
	計	100	

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**
Li Yue	京都	姫路市	11 月頃、4 日間	第 42 回国際核酸化学シン ポジウムに参加し発表を 行う	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

(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**
河本 佑介	京都	ケント州立 大学(ケン ト市)	8 月・9 月 頃、3 週間	ヒトテロメア配列標的型リ ガンドの合成及び打合せ	有
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
朝光 世煌	京都	米国ハワイ 州ホノルル	12 月 14 日 ～12 月 20 日 6 泊 7 日	環太平洋国際化学会議 PACIFICHEM 2015 に参加 し、発表を行う	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」