

国際共同研究事業  
国際化学研究協力事業  
平成 28 年度実施計画書

平成 28 年 3 月 7 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<sup>すぎやま</sup> 弘<sup>ひろし</sup>

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, Vaijyanthi	時間雇用研究員	生物有機化学、CD、FACS、蛍光測定
Li Yue ( 李 岳 )	時間雇用研究員	生物有機化学、DNA 合成、CD 蛍光、UV 測定、解析評価
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
朝光 世煌	京都大学・大学院理学研究科 博士課程学生	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
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、継続してDNA遺伝子配列内に存在する様々な四重鎖構造を“DNAフレーム”により直接観測可能にする技術の開発研究を遂行する。研究開始3年目に向けて、“DNA フレーム”技術をヒテロメア配列から主として遺伝子プロモーター内に存在するG-rich配列が形成する様々な配列をもったG-四重鎖構造へと適用を進めていくことで、四重鎖構造の構造と機能の解析を進めていく。研究成果は、遠藤らが中心となって、発表、論文投稿する。

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、受託合成企業への発注、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、劣化摩耗していくため、消耗品として計上している。

### 長鎖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を目的に、申請者の研究室の“DNA フレーム”による1分子解析技術を活用して G-四重鎖の高次構造と機能の解析を Li が継続して進める。河本は共同研究の遂行に必要なビオチン標識化した PDC 類縁体の合成を Mao 研究室と共同して担当する。日本側では Li が中心となって研究を遂行する。

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としての PDC の存在分布が 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、この申請者らの 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。

### 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特異的な結合性リガンドの開発は、生細胞内でのヒテロメアの高次構造、機能解析において重要な役割を果たすと期待する。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、河本が中心となって合成、機能解析を進める。THANGAVEL は生細胞内での観測、評価を行なう。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、蛍光試薬、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フラッシュカラムや HPLC カラムによって精製された後、機能評価に使用する。得られた研究成果は、河本らが中心となって学会発表、論文投稿を進めていく予定である。

### 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朝光が中心となって新規四重鎖結合性リガンドの開発研究を進める。合成したリガンドの DNA 四重鎖構造と配列に対する特異的結合性を、SPR や AFM 等の解析技術を駆使して評価する。本年度は、四重鎖結合性リガンドの特異性を次世代シークエンサーによって網羅的に評価する。これらの解析研究を遂行するために、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、蛍光試薬、生物試薬類、センサーチップなどが必要である。朝光が中心となって研究成果をまとめて、速やかに学会発表、論文投稿を進める。

7. 本年度経費総額\* 13,200 千円\* 研究経費と業務委託手数料の合計を記入して下さい。

(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	4,600	200	800	5,760	116	524	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	左の欄は該当する場合のみ記入してください。 (単位：千円)
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	450	45,000円×10本
	化学合成試薬類	2,050	センサーチップ解析用品 850(千円) 有機系薬品類 600(千円) DNA合成用原料 600(千円)
	核酸オリゴマー	800	DNA フレーム、プライマーとして使用
	生物試薬類	800	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	4,600		
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 (Li Yue (李岳))
	計	5,760	
そ の 他 経 費	学会参加登録費、 通信、運搬費等	116	学会参加登録費 第43回国際核酸化学シンポジウム 杉山 弘 30,000円 日本化学会 第97春季年会 杉山 弘 12,000円 運搬費 サンプル送付 74,000円
	計	116	

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**
杉山 弘	京都	熊本	平成 28 年 9 月 27-29 日、3 日間	第 43 回国際核酸化学シン ポジウムに参加、研究発表 を行なう。	有
杉山 弘	京都	東京	平成 29 年 3 月 16-19 日、4 日間	日本化学会 第 97 春季年会 (2017)に参加、研究発表を 行なう。	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**
杉山 弘	京都	ケン ト 州 立大学	10-11 月頃 1 週間	共同研究打ち合わせ	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」