

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
共同研究報告書

平成 25 年 9 月 30 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

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
(ふりがな) すぎやま ひろし

1. 事業名 国際共同研究事業国際化学研究協力事業
2. 研究課題名 (和文) 新規なテロメア構造の研究とヒトテロメラーゼへの影響
(英文) Investigation of Novel Telomeric Structures and Their Effects on Human
Telomerase

3. 共同研究実施期間 (全採用期間)

平成 22 年 9 月 1 日 ~ 平成 25 年 8 月 31 日 (3 年 0 ヶ月)

4. 研究経費総額

- (1) 本事業により交付された研究経費

総額 59,400 千円

初年度	(平成 22 年度) 経費	<u>15,400</u> 千円
第 2 年度	(平成 23 年度) 経費	<u>19,800</u> 千円
第 3 年度	(平成 24 年度) 経費	<u>19,800</u> 千円
第 4 年度	(平成 25 年度) 経費	<u>4,400</u> 千円

- (2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0 円

* 10 ページ<備考> 1. 参照

5. 研究組織

(1) 日本側参加者（代表者を除く）（共同研究実施期間中の日本側参加者を全員記入してください。）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	専門及び本研究における役割
ましも ともこ 真下 知子	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	コンピューターを用いた計算科学的アプローチ
さんのへ ゆうた 三戸 祐太	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	PAGE, CD・蛍光スペクトル SPR assay, テロメラーゼの活性評価, DNAの合成
かしわぎ げんご 柏崎 玄伍	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	コンピューターを用いた計算化学的アプローチ
かつだ ようすけ 勝田 陽介	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	高速原子力間顕微鏡による四重鎖構造の観測
たんがべる THANGAVEL	京都大学大学院理学研究科・特定研究員、H25.年3月より時間雇用研究員	様々なテロメア結合分子の合成 DNA結合性分子の合成と評価
はいじやいやんてい VAIJAYANTHI	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	テロメラーゼの活性評価
もりなが ひろのぶ 森永 浩伸	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	テロメア結合分子の合成
やん やん やん YANG YANGYANG	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	DNAの合成、高速原子力間顕微鏡による四重鎖構造の観測
えんどう まさゆき 遠藤 政幸	京都大学物質 - 細胞統合システム拠点・准教授	コンピューターを用いた計算化学的アプローチ
ばく そやん 朴 昭映	京都大学大学院理学研究科・助教	PAGE、テロメラーゼの活性評価
きざき せいいちろう 木崎 誠一朗	京都大学大学院理学研究科・修士課程学生	光ピンセットを用いたテロメア構造の研究
やまもと せいぎ 山本 清義	京都大学大学院理学研究科・博士課程学生	テロメア構造の研究
たけなか ともひろ 竹中 友洋	京都大学大学院理学研究科・修士課程学生	実験データの解析や資料整理
にいみ やすこ 新實 康子	技術補佐員	

(2) 米国側参加者（代表者を含む*）（共同研究実施期間中の米国側参加者を全員記入してください。）

氏名	所属・職名	研究協力テーマ
○Mao Hanbin	ケント大学化学科・助教 ケント大学化学科・准教授	光ピンセットを用いて中間鯛構造や高次構造についての研究
Deepak Koirala	ケント大学化学科・博士課程学生	光ピンセットによる構造の確認, PAGE, CD測定
Shuo Li	ケント大学化学科・博士課程学生	光ピンセットを用いたリガンドの四重鎖構造安定化能の評価, ゲルシフトアッセイ

* 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. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

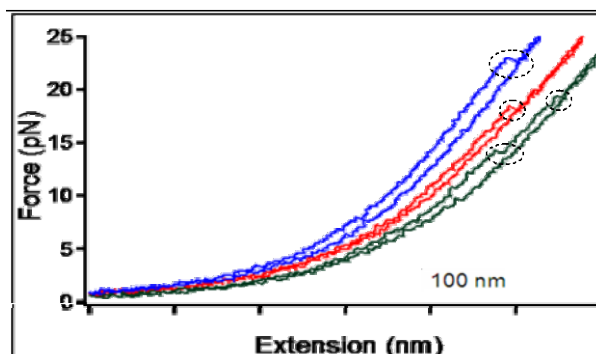
※ 申請書の内容を踏まえて、日本語にて記入してください。

※ 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。

細胞寿命を司るテロメアは染色体の末端に位置し、その長さによって細胞分裂の回数を制限している。また、多くのがん細胞ではテロメアを伸長する酵素の一種であるテロメラーゼが活性化されており、テロメアの短縮が起こらず、がん細胞の不死化の要因となっている。近年、テロメア配列を持つDNAは四重鎖構造という二次構造をとることが明らかになってきた。四重鎖構造はテロメラーゼの働きを阻害することができるため、四重鎖構造を安定化する小分子は抗がん剤としての期待が持たれる。また、DNA配列特異的に結合するポリアミドはがん腫特異的な抗がん性が期待できる。申請者の研究室では、これまでにヒト培養がん細胞に対する細胞毒性やヒトテロメア四重鎖構造に関する様々な研究を進めてきた。これらの研究の進展によって、DNAの配列や高次構造を標的とした抗がん剤の開発に新たな知見をもたらすと考えられる。

1. 光ピンセットを用いた高次四重鎖構造と中間体構造の観測

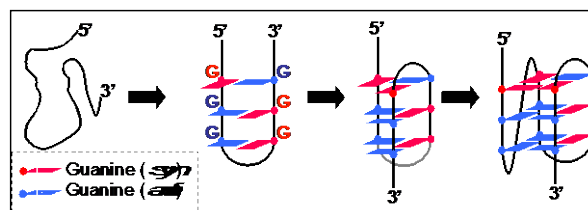
我々の研究室で所有するDNA合成機を用いて、ヒトテロメア配列を含む多種多様なDNA フラグメントを合成する必要がある。それらの合成には日本バイオサービス等からの多くの合成試薬・溶媒が必要であり、高速遠心機による分画と高速液体クロマトグラフィーによる精製を経て研究に使用する。光ピンセット手法によって、合成したDNAフラグメントの高次四重鎖構造や中間体構造について解析をすすめた（Mao研究室）。具体的には、DNA フラグメントをビーズに固定化し、レーザーでビーズを捕捉して動かすことで、DNA に力を加え、DNA の二次構造がほどける様子を、図に例示しているようなグラフによって観測した。再現性を得るために十分な回数の測定は実施され、構造の熱力学的安定性 ΔG について正確なデータが得られた。



博士課程の学生である三戸らはDNAフラグメントの合成と光ピンセットによる測定を実施しており、四重鎖構造を安定化する小分子の安定効果もまとめて論文として報告した。（*Nature Chemistry*, 2011, 3, 782-787）また、DNAフラグメントの有する四重鎖構造の強い安定性をカテナン構造の形成へ応用する研究も進め、その結果を報告した。（*Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20, 2030-2034）一方、Mao研究室でも光ピンセットを用いる単分子観測によって、四重鎖構造の熱力学的安定性に依存する崩壊過程を速度論的に評価した結果を論文としてまとめた。（*J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 2235-2241）

2. 計算科学的アプローチによる中間体構造の解明

我々の研究室では、何らかのフォールディング経路を辿ることで、ヒトテロメア配列を持つ一本鎖 DNA から準安定な四重鎖構造が形成されると、実験結果から考察していた。現在、我々が提唱している経路は、図に示すようなDNA の鎖が一本ずつ折りたたまれていくことで、安定な三重鎖構造を経由する経路である。



本事業に先立ち、博士課程の学生である眞下らは局所的な構造の安定性についてFM0計算などの量子化学計算および分子動力学計算を行い、フォールディング経路を報告した。(T. Mashimo et. al. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 14910-14918) この計算結果に基づき、重要中間体としての三重鎖構造の候補を絞り込むことができた。本事業の支援によって、候補となるDNAフラグメントを実際に数多く合成し、Mao研究室での光ピンセット法による解析データをまとめ、三重鎖構造がテロメア四重鎖構造の安定な重要中間体であることを論文として報告した。(Chem. Commun., 2011, 48, 2006-2008)

3. DNA配列特異的結合性ポリアミドを用いる機能性評価

我々の研究室では、DNA塩基配列特異的アルキル化能を有するポリアミドの抗がん性の評価を進めてきた。本事業期間中に新たに合成したポリアミドは、優れた配列特異性と効率的なアルキル化能を示した。ポリアミド合成には、FmocPyImCO₂H等の合成原料、合成試薬、溶媒と高速液体クロマトグラフィーによる精製が必要である。見出した4種のポリアミドにおいて、各々のヒト培養がん細胞に対する細胞毒性を評価した。二連の細胞毒性評価には、CO₂インキュベーターとクリーンベンチが必要であり、研究遂行に応じて増設した。とりわけ優れた抗がん性を示した2種のポリアミドにおいて、ヌードマウス実験系でのin vivoでの細胞増殖阻害能の評価とDU145、および、A549に対する網羅的なアジレントマイクロレイによる遺伝子発現解析を実施した。博士課程の学生である柏崎らはこれらの結果をまとめ、論文として報告した。(J. Med. Chem. Soc., 2012, 55, 2057-2066) 新實は、技術補佐員として各種実験データの解析や資料整理をサポートした。現時点で、特定配列を標的とする配列特異的アルキル化と特異的な遺伝子発現阻害の間で、相関・因果関係の立証は残念ながらできていない。

また、細胞内蛍光プローブとしての可能性を探索するために、DNA結合に連動する蛍光性ポリアミドの開発も進めた。実際に、ピレン蛍光基をつけたポリアミドを合成し、そのDNAに対する結合性と蛍光性の関連性を評価した。その結果、蛍光基の配置によって蛍光性に大きな変化があることを確認し、論文として報告した。(Bioorg. Med. Chem., 2013, 21, 852-855) また、蛍光プローブとして研究されているポリアミドについて総説をまとめた。(ChemBioChem., 2012, 13, 2170-2185) T. VAIJAYANTHI は特定研究員としてこれらの研究に従事した後、現在、時間雇用研究員としてDNA 結合性分子の合成と機能評価研究を進めている。

4. AFMを用いた四重鎖構造の直接観察

本事業に先立ち、我々の研究室では“DNA フレーム”と呼ばれるDNAナノ構造体を用いて、原子間力顕微鏡(AFM)による四重鎖構造の形成過程の直接観測に成功し、その結果を報告した。(Y. Sannohe et. al. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 16311-16313) このDNA フレームとAFMを組み合わせた直接観測手法は、様々な蛋白-DNA間の相互作用を解析する手法として、我々の研究室が有する画期的な手法である。DNA フレームには数多くの特定配列を有するDNAフラグメントの合成が必要である。また、AFMで使用するカンチレバーは測定時に徐々に摩耗していくため、消耗品として交換する必要がある。最近、6連続のグアニンに富むG₆配列が形成する四重鎖構造について共同研究をすすめ、AFMを中心に用いて詳細に解析した結果をまとめ、2報の論文として報告した。(ACS Nano. 2013, 7, 5701-5710. Nucleic Acids Research 2013, in press.) また、Albany 2013:The 18th Conversationやワシントン大学での招待講演においても本事業からの研究成果を発表した。現在も、DNA フレームを用いてテロメアDNA の四重鎖構造とテロメラーゼとの間の結合性について、単分子観測を継続して実施しているが、論文としてはまだ報告できていない。

7. 研究の成果（「6. 研究概要」の内容と対応させつつ、本研究によって得られた新たな知見、成果を平易な表現で記述してください。）

(1) 学術的価値（本研究により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果）

テロメアの四重鎖構造を形成するフォールディング経路の解明には学術的に重要な意義がある。本研究期間中に、我々はこれまでに考えられていなかった安定な新しい中間体構造を実験的に実証した。実際に、テロメア四重鎖のフォールディング経路内ではその安定な中間体構造を経由して、速やかに四重鎖構造の形成を促進していた。一般的に、四重鎖構造は細胞老化や癌の不死化において、生物学的に重要な役割を果たしていると考えられており、その新しい安定な中間体構造は新規薬剤の標的となりうる可能性を秘めている。しかしながら、その中間体の存在を直接的に観察した報告例はこれまでなかった。一般に生成する中間体は存在時間が非常に短いため、従来の巨視的な手法では中間体の存在を確認することは技術的に不可能であった。我々の研究室で行っているDNAフレーム内での高速AFM観察技術と、Mao研究室で行っている光ピンセット法は、単一分子のDNAを用いて観測を行う点が共通していた。本共同研究を進めていくことによって、鍵となる中間体構造と四重鎖構造の識別を可能にすることに世界に先駆けて成功した。具体的には、我々の [3+1] 型の四重鎖構造の安定性についての一連の研究報告によって、三重鎖構造がテロメア四重鎖構造の安定な重要中間体であることを実証することができた。この三重鎖構造中間体の存在を提唱できたことによって、テロメア配列以外に存在するグアニンを豊富に含む配列における四重鎖構造フォールディング経路の理解にも将来的には繋がり、四重鎖構造の研究において大きな学術的マイルストーンを構築できたと考える。

(2) 米国との交流実績（本研究による国際共同研究の活性化や、両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果）

本研究期間内に3名(Y.Sannohe, T.Mashimo, D.Koirala)の博士課程の学生をお互いの研究室に派遣した。このような外国への研究室間での学生派遣は、実際に研究をしている博士課程の学生にとって、非常に研究に対する意欲を向上させるものである。我々は、AFM技術やMOシミュレーションへの計算手法などを米国の学生に教授し、Mao博士の所属するケント州立大学では、光ピンセットを用いた単一分子観測手法が我々の学生に教授された。両研究室の学生にとっては、本国の研究室だけでは経験できない技術を学ぶことができだけでなく、異なる文化環境下における慣習や思考に適応して研究したことは若い学生にとって重要なことである。これから益々グローバル化していく社会環境の中で生きていく若い学生にとって貴重な時間となったことは間違いない。米国のMao研究室に派遣された三戸は、派遣された間で合成したテロメア配列を含むDNAフラグメントを用いて光ピンセット手法による観察実験を行い、重要な実験データを得ることに成功した。(Nature Chemistry, 2011)

(3) 社会的貢献（社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか）

従来のNMRやX線結晶構造解析といった巨視的な手法では観察できなかった三重鎖構造構造を提唱できたことは、いわば新しいコロンブスの卵、新しい創造的概念を社会へ示すことができたと考える。見出された三重鎖構造中間体の存在は、四重鎖構造と同様、細胞老化や癌の不死化において生物学的に重要な役割を果たしているだろう。特に、超高齢化社会を迎える日本において、社会的に関心の高い抗老化薬剤の標的として三重鎖構造中間体の存在は興味を集めるだろう。また、本研究における交流実績によって、若い研究者へ外国留学への関心を高めることができた。実際に、本研究室の学生への外国への挑戦心を高め、これからの若手研究者の育成に向けて重要な機会を与えることができたと考える。

(4) 若手研究者養成への貢献（若手研究者養成への取り組み、成果）

本研究事業に関わった6名の博士後期課程の学生(Y. Katsuda, Y. Sannohe, T. Mashimo, H. Morinaga, Y. Yangyang, S. Yamamoto)の内、2名の博士後期課程の学生(Y. Sannohe, T. Mashimo)をMao博士の所属するケンタッキー州立大学に派遣することができた。また、本研究室では積極的に多くの外国人の学生を博士課程の学生として受け入れており、国際交流を基盤とした研究環境を整えてきた。共同研究を続けた各自の学生の研究成果は、最終的に共著論文としてまとめることができている。現在、本研究事業によって培われた国際的な研究交流は本研究室で継続しており、学生育成のための国際交流の一環として、T. VAIJAYANTHIを平成25年3月より時間雇用研究員として雇用している。これまでに博士を取得した学生(Y. Katsuda, Y. Sannohe, T. Mashimo, H. Morinaga)は、ポスドクや大学・企業の研究者として本学を無事修了した後、活躍している。

(5) 将来発展可能性（本研究・交流事業を実施したことにより、当初見込んでいた将来的な発展は認められたか）

Mao研究室は、四重鎖構造の解析に光ピンセット手法をはじめて用いた生物物理学領域の先駆的な研究室である。光ピンセットは市販されておらず、装置を自らで組み立てる必要があり、専門的な知識と技術を必要としていた。そのため、本研究事業において日米間の研究協力は必須であった。光ピンセット手法によって非常に弱い数 pN の力を測定することが可能である。DNAの二次構造を崩す力は数 pN であり、光ピンセットは、これらの高次構造や中間体の解析に最適であった。我々の研究室では、コンピュータシミュレーション、表面プラズモン共鳴法、各種スペクトル測定、高速原子間力顕微鏡などの様々な解析手法を駆使し、DNAに関する生物有機化学領域の研究を行ってきた。しかしながら、本研究の目的である四重鎖の中間体構造を直接観測するには、原子間力顕微鏡による数百 pN~数 nN の力の測定では不可能であった。

本研究事業の実施により、二つの異なる専門分野（生物物理学と生物有機化学）から、お互いの最先端の技術を適用することで研究目的を達成することができ、異なる研究領域間での大きなシナジー効果が得られたと考える。将来的にも、このような異領域間の学問的なシナジー効果は期待できる。

(6) その他（上記(1)～(5)以外に得られた成果があれば記述してください）

本研究期間中に、我々の研究室として DNA 塩基配列や高次構造に対する特異性を特定の遺伝子群の発現制御に応用する分子生物学的技術の開発に向けても研究を進めてきた。これらの研究の進展によって、癌の要因となる DNA の塩基配列や高次構造を創薬標的とするコンセプトが確立すれば、抗がん剤への応用が期待される。また、現在治療不可能とされている様々な遺伝子性疾患に対する治療薬や、iPS 細胞への誘導・分化を促進する遺伝子発現制御剤への応用に繋がるものになると考える。

9. 研究発表（本共同研究の一環として発表したもの、又は、発表予定のものについて記入してください。なお、印刷物がある場合は1部添付してください。）

【雑誌論文】 計（ 9 ）件 うち査読付論文 計（9）件

共著の有無*	著者名	論文標題			
	○	Koirala, D.; Dhakal, S.; Ashbridge, B.; Sannohe, Y.; Rodriguez, R.; Sugiyama, H.; Balasubramanian, S.; Mao, H.	A Single-Molecule Platform for Investigation of Interaction Between G-Quadruplex and Small-Molecule Ligands.		
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Nature Chemistry	有	3	2011	782-787
○	著者名	論文標題			
	Koirala, D.; Mashimo, T.; Sannohe, Y.; Yu, Z.; Mao, H.; Sugiyama, H.	Intramolecular Folding in Three Tandem Guanine Repeats of Human Telomeric DNA			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Chem. Commun.	有	48	2012	2006-2008
	著者名	論文標題			
	Sannohe, Y.; Sugiyama, H.	Single Strand DNA Catenane Synthesis Using the Formation of G-Quadruplex Structure.			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Bioorg. Med. Chem.	有	20	2012	2030-2034
	著者名	論文標題			
	Vaijyanthi, T.; Bando, T.; Pandian, G. N.; Sugiyama, H.	Progress and Prospects of Pyrrole-Imidazole Polyamide-Fluorophore Conjugate as Sequence-Selective DNA Probes.			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	ChemBioChem.	有	13	2012	2170-2185
	著者名	論文標題			
	Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Yoshidome, T.; Masui, S.; Takagaki, T.; Hashiya, K.; Pandian, G.N.; Yasuoka, J.; Akiyoshi, K.; Sugiyama, H.	Synthesis and Biological Properties of Highly Sequence-Specific- Alkylating N-Methylpyrrole-N-Methylimidazole Polyamide Conjugates			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	J. Med. Chem.	有	55	2012	2057-2066
	著者名	論文標題			
	Vaijyanthi, T.; Bando, T.; Hashiya, K.; Pandian, G. N.; Sugiyama, H.	Design of a New Fluorescent Probe: Pyrrole/Imidazole Hairpin Polyamides with Pyrene Conjugation at Their γ-Turn			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Bioorg. Med. Chem.	有	21	2013	852-855
◎	著者名	論文標題			
	Koirala, D.; Ghimire, C.; Bohrer, C.; Sannohe, Y.; Sugiyama, H.; Mao, H. (2241, ACKNOWLEDGMENTS)	Long-Loop G-Quadruplexes are Misfolded Population Minorities with Fast Transition Kinetics in Human Telomeric Sequences			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	J. Am Chem. Soc.	有	135	2013	2235-2241
	著者名	論文標題			
	Yatsunyk, L.A.; Pietrement, O.; Albrecht, D.; Tran, P.L.T., Renciuik, D.; Sugiyama, H.; Arbona, J-M.; Aime, J-P.; Mergny, J-L.	Guided Assembly of Tetramolecular G-Quadruplexes			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	ACS Nano.	有	7	2013	5701-5710
	著者名	論文標題			
	Rajendran, A.; Endo, M.; Hidaka, K.; Phong L., Thao T.; Mergny, J-L.; Sugiyama, H.	Controlling the Stoichiometry and Strand Polarity of a Tetramolecular G-quadruplex Structure by Using a DNA Origami Frame			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	Nucleic Acids Research	有		2013	In Press

〔学会発表〕計(5)件 うち招待講演 計(3)件

①	発表者名	発表標 題		
	Hiroshi Sugiyama	Direct Observation of Single Molecular Event in DN A Origami Frame		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	
	7th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium	November 11, 2011	Osaka, Japan	
②	発表者名	発表標 題		
	杉山 弘	Direct Observation of Single Molecular Event in DN A Origami Frame		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	
	第50回日本生物物理学会年会	2012年9月23日	名古屋大学東山キャンパス	
③	発表者名	発表標 題		
	Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo	Single-molecule observation of enzymes and DNA structural changes in the DNA nanostructures		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	
	Albany 2013 : The 18th Conversation	June 14, 2013	Albany, USA	
④	発表者名	発表標 題		
	木崎 誠一郎	5-プロモウラシを含むDNAの光反応		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	
	第35回日本光医学・光生物学会	2013年7月12日	浜松、日本	
⑤	発表者名	発表標 題		
	竹中 友洋	ピロールイミダゾールポリアミドを用いた配列特異的なDNAへの電子導入		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	
	第35回日本光医学・光生物学会	2013年7月12日	浜松、日本	
⑥	発表者名	発表標 題		
	学会等名	発表年月日	発表場 所	

備考：必要に応じて、欄を追加してください。

〔図 書〕計(0)件

共著の有無*	著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数	
	著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数	
	著者名	出版社		
	書名	発行年	総ページ数	

10. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出 願〕 計（ 0 ）件

	産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別
①						
②						
③						
④						
⑤						
⑥						

備考：必要に応じて、欄を追加してください。

〔取 得〕 計（ 0 ）件

	産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
①						
②						
③						
④						
⑤						
⑥						

備考：必要に応じて、欄を追加してください。