

「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創出」
平成 20 年度採択研究代表者

杉山 弘

京都大学大学院理学研究科・教授

生体分子情報－構造－機能統合ナノシステムの構築

1. 研究実施の概要

本研究では、DNAの持つ塩基配列による分子集合と形成される構造を活用し、プログラム可能で多次元に拡張可能なDNAナノ組織体の構築方法の開発とそれを基にした高密度に集積した生体分子ナノアレイの構築方法の検討、生体分子複合体形成の制御と相互作用の操作、さらに超高密度・高感度センサーデバイスの開発を行う。

これら目的に対して本年度は、以下の5項目の研究を実施し成果を得た。①DNAタイル上での分子の配置のため、結合サイトと相補鎖DNAとの2本鎖形成と最適な配列を検討し、原子間力顕微鏡(AFM)によってDNAタイル上での選択的な2本鎖形成を解析できた。②新規な2次元DNAナノ構造の配列設計と実際の自己集合体の形成を行い、構造の安定性と最適な配列を検討し、設計通りの2次元構造が得られた。③ポリアミドの分子設計と新規ユニットの開発を行い、特定塩基配列を認識するポリアミドについてその配列特異性とDNAアルキル化能を評価した。④リン酸化チロシン部位を特異的に検出する蛍光性リボヌクレオペプチド(RNP)センサーの開発を行った。⑤イオン電流として観測することが困難であるGタンパク質共役型受容体の応答を電気応答として検出するシステムの構築に成功した。

今年度の結果から、DNA タイルの自由な構造設計が可能となったため、新規な DNA タイルを足場とした精密な分子配列の検討と機能が可能となった。新規な RNP はペプチドの残基特異的なセンシングを可能とし、より多様なペプチドのセンシングに拡張できることがわかった。また、非常に高感度なリガンドを検出できる受容体－イオンチャネル複合体システムの構築が可能となり、創薬におけるスクリーニングシステムへの応用も見込める。今後も、生体分子のプログラム性・高次構造とそこから生み出される高い機能性を探索する研究を進める。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

A. 生体分子ナノ組織体の構築と機能発現

DNA タイルの形成するナノスケール空間である 10–30 nm 程度の空間にターゲット分子を自己集合によって精密に配置し機能させる方法を開発する。

1. 分子の任意の位置へ配置するため、DNA の配列設計によって、それぞれ異なる配列の 1 本鎖 DNA を配置した DNA タイルの作成を行った。アドレスの間隔をさまざまに変化させ、DNA タイル上へ 9 箇所の結合部位を導入した。この結果、すべて異なる DNA 配列にそれに対応した相補鎖 DNA が結合することが明らかとなった。
2. 新規な DNA ナノ構造の配列設計を行い、構造の安定性と最適な配列を検討した。DNA の自己集合体の形成を AFM によって解析した結果、配列設計の通り、テープ状構造、Y 字構造、十字構造、6 方向分岐構造が得られ、自由な 2 次元構造の設計が可能であることが明らかとなった。相補鎖の導入により 3 次元構造への拡張も可能であった。また、3+1 の G- 四重鎖が DNA の投げ縄構造を安定化する足場を形成できることを発見し、ナノ構造への応用が可能となった(A-4)。
3. DNA 認識技術の精密化に向けた新規ポリアミドを開発するため、分岐型 (H-pin) の Py-Im ポリアミドの分子設計と合成を行った。また、より長鎖の配列を認識可能とするため、タンデム型のポリアミドの分子設計と合成を行った。これらの新規ポリアミドにアルキル化剤を結合し、認識の配列特異性を DNA シークエンサーによって解析した。この結果、通常のヘアピン型に対する結合能の向上と配列の拡張が可能となった (A-1)。

B. 高機能 RNP ナノデバイスの開発

細胞内のシグナル伝達過程を解明するために、タンパク表面上の特定のリン酸化チロシン部位を特異的に検出する方法が必要とされている。そこで、これまでに確立した蛍光性リボヌクレオペプチド (RNP) センサーの作製法に従い、リン酸化チロシンを含む特定のペプチド配列に対して選択的に応答する蛍光性 RNP センサーを開発した。

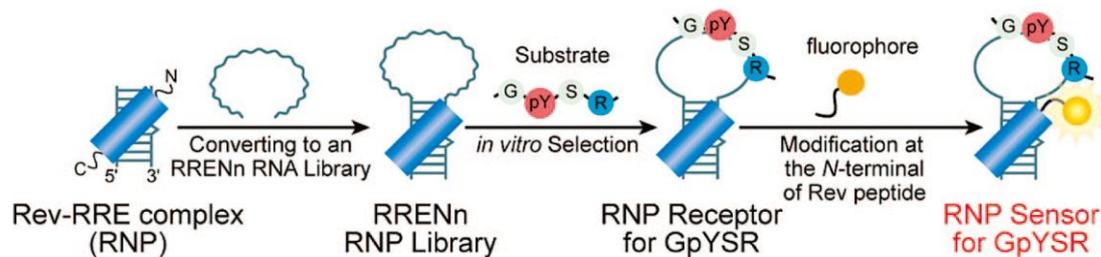


図 1 リン酸化チロシンを含む特定のペプチド配列を検出する蛍光性 RNP センサーの作製法

これらのセンサーが、チロシン部位のリン酸化だけではなく、周辺のアミノ酸配列も識別可能であることを実証した。

タウタンパクのアミロイド繊維形成過程において、特定アミノ酸のリン酸化が凝集に及ぼす影響を検討するために、凝集コア配列 (PHF6) 中のチロシン部位にリン酸基を導入した短鎖ペプチドの凝集特性を評価した (B-6)。

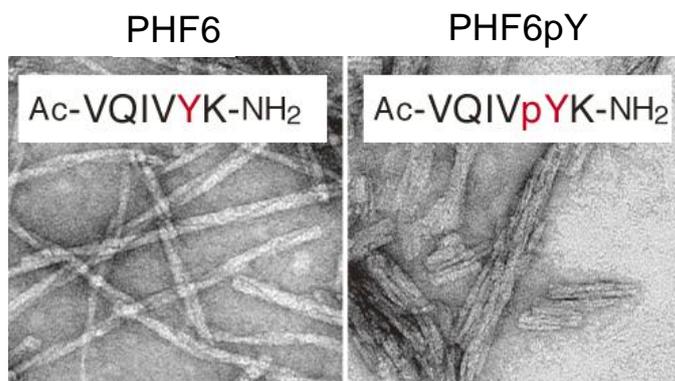


図 2 凝集コア配列の短鎖ペプチド (PHF6)、及びチロシン部位リン酸化体 (PHF6pY) の繊維状凝集物の TEM 画像

チロシンのリン酸化により、コア配列中の隣接リシンのアミノ基の電荷が中和され、アミロイド凝集体の形成が促進されることを実証した (B-7)。

C. 受容体・イオンチャネル複合体の高機能化

受容体とイオンチャネルの複合体形成を人工的に制御して、高い感受性を有しながら高感度な検出を可能とする生体物質応答細胞システムの構築を研究目的とする。本年度は、イオン電流として観測することが困難である G タンパク質共役型受容体の応答を電気応答として検出するシステムの構築に成功した。具体的には、改変 G タンパク質と改変イオンチャネルを分子設計し、細胞内に強制発現させることで、リガンドの応答を電気応答として読み出すシステムが構築できた。この方法論は、創薬におけるスクリーニングシステムへの応用が期待される。

細胞膜においてタンパク質複合体を形成するジストログリカンや TRPM2 イオンチャネルのタンパク質機能を明らかにした (C-9, C-11)。また、TRPA1 イオンチャネルの活性化分子、TRPC3 イオンチャネルの制御分子を同定した (C-10, C-12)。これらの知見は、イオンチャネルセンサー構築の基盤技術になると期待される。

3. 研究実施体制

(1)「杉山」グループ

①研究分担グループ長: 杉山 弘 (京都大学、教授)

②研究項目

新規 DNA ナノ構造の設計と構築、DNA タイル上への選択的な機能性分子の配置、DNA 認識技術の精密化に向けたポリアミドの開発

(2)「森井」グループ

①研究分担グループ長: 森井 孝 (京都大学、教授)

②研究項目: 機能性RNPの構築、人工光合成デバイスの構築と機能評価、機能性タンパク質の構築、タンパク質センサーの構築、機能性ペプチド組織体の構築

(2)「森」グループ

③研究分担グループ長:(京都大学、教授)

④研究項目

レセプター・イオンチャネル複合体の高機能化、イオンチャネルの高度集積化の解析、高度集積化ナノデバイスの構築

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

A. 杉山グループ

1. A-1. Sequence-Specific Alkylation by Y-shaped and Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides. Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* 2008, *14*, 864-870.
2. A-2. Detection of Triplet Repeat Sequences in the Double-Stranded DNA using Pyrene-Functionalized Pyrrole-Imidazole Polyamides with Rigid Linkers. Fujimoto, J.; Bando, T.; Uchida, S.; Iwasaki, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16*, 5899-5907.
3. A-3. Perylene-Conjugated Pyrrole Polyamide as a Sequence-Specific Fluorescent Probe. Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Nishijima, S.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, *16*, 9741-9744.
4. A-4. Stable Lariat Formation Based on a G-quadruplex Scaffold. Xu, Y.; Sato, H.; Sannohe, Y.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, *130*, 16470-16471.
5. A-5. Cooperative Alkylation of Double-strand Human Telomere Repeat Sequences by PI Polyamides with 11-Base-pair Recognition Based on a Heterotrimeric Design. Kashiwazaki, G. Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, *17*, 1393-1397.

B. 森井グループ

6. B-6. Hasegawa, T., Hagihara, M., Fukuda, M., Nakano, S., Fujieda, N., Morii, T. Context-dependent fluorescence detection of a phosphorylated tyrosine residue by a ribonucleopeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 8804-8812, (2008).
7. B-7. Inoue, M., Hirata, A., Tainaka, K., Morii, T., Konno, T. A charge-pairing mechanism of phosphorylation effect upon amyloid fibrillation of human tau core peptide. *Biochemistry*, 47, 11847-11857, (2008).
8. B-8. Anraku, K., Inoue, T., Sugimoto, K., Morii, T., Mori, Y., Okamoto, Y., Otsuka, M. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates relevant to the biotin-avidin techniques. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 1822-1830, (2008).

C. 森グループ

9. C-9. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H & Mori Y. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med.* 14, 738-747 (2008)
10. C-10. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K, Mori Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels* 2, 287-298 (2008)
11. C-11. Takeuchi K, Nakano Y, Kato U, Kaneda M, Aizu M, Awano W, Yonemura S, Kiyonaka S, Mori Y, Yamamoto D, Umeda M. Changes in temperature preferences and energy homeostasis in dystroglycan mutants. *Science* 323, 1740-1743 (2009).
12. C-12. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I, Mori Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5740-5745 (2009).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)