

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

**平成23年度～平成27年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」  
研究成果報告書概要**

1 学校法人名 千葉工業大学                      2 大学名 千葉工業大学

3 研究組織名 千葉工業大学ハイテク・リサーチ・センター

4 プロジェクト所在地 千葉県習志野市津田沼2-17-1

5 研究プロジェクト名 長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用

6 研究観点 研究拠点を形成する研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
河合剛太	工学部	教授

8 プロジェクト参加研究者数 9 名

9 該当審査区分 理工・情報      生物・医歯      人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
河合剛太	工学部・教授	長鎖 RNA の構造解析手法の開発, および研究代表者	長鎖 RNA の解析手法を開発するとともに, プロジェクトを推進する.
高久洋	工学部・教授	HIV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定	プロジェクトにおいて開発する手法を用いて HIV ゲノム RNA を解析する.
黒崎直子	工学部・教授	HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用	HIV ゲノム RNA に見出される局所的構造領域について, その機能および応用可能性について検討する.
橋本香保子	工学部・准教授	免疫系における mRNA の構造と機能の解析	プロジェクトにおいて開発する手法を用いて, 免疫系で特異的に発現している mRNA の解析を行う.
坂本泰一	工学部・准教授	ウイルスゲノム RNA の構造領域の解析およびアプタマーの取得	プロジェクトにおいて開発する手法を用いて, ウイルスゲノム RNA の解析を行う. さらに, 機能構造ドメインに対するアプタマーの取得を試みる.

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

柴田裕史	工学部・准教授	長鎖 RNA の相互作用の解析および応用可能性の検討	長鎖 RNA とタンパク質あるいは分子内の相互作用解析を行うとともに、見出された機能構造ドメインの応用可能性を検討する。
根本 直樹	工学部・准教授	長鎖 RNA の X 線結晶構造解析	HIV ゲノム RNA の構造解析
竹中 章郎	附属研究所・客員研究員	長鎖 RNA の X 線結晶構造解析の助言	RNA の構造解析あるいは構造と機能の関係について助言する。
中村 慎吾	附属研究所・共同研究員	長鎖 RNA の二次構造解析の助言	長鎖 RNA の二次構造解析について助言する。
(共同研究機関等)			

## &lt;研究者の変更状況(研究代表者を含む)&gt;

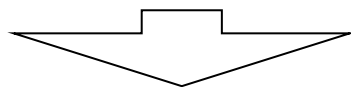
旧

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定	附属総合研究所・教授	下遠野 邦忠	HCV ゲノム RNA についての解析を行う。

(変更の時期:平成24年9月30日)

プロジェクト外での研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発	博士研究員	大山 貴子	長鎖 RNA の構造領域解析の手法を開発する。

(変更の時期:平成25年3月31日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
いわき明星大学・教授	附属総合研究所・客員研究員(平成25年4月1日より)	竹中 章郎	RNA の構造解析あるいは構造と機能の関係について助言する。
Catalent Pharma Solutions・Account director	附属総合研究所・共同研究員(平成25年7月12日より)	中村 慎吾	長鎖 RNA の二次構造解析について助言する。
工学部・准教授	工学部・准教授(平成26年4月1日より)	根本 直樹	HIV ゲノム RNA の構造解析

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## 11 研究の概要(※ 項目全体を10枚以内で作成)

### (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

本研究プロジェクトは、近年重要性がさらに増している RNA 研究の分野において、いまだほとんど手つかずとなっている長鎖 RNA の構造解析手法の開発をめざすものであり、RNA 研究のみならず、生命科学や医学・薬学の分野に大きな波及効果を持つことが期待できる。同時に、本学において10年以上にわたり推進してきた RNA についての研究基盤をさらに確固たるものにすることができると考えている。また、近年注目されている長鎖 non-coding RNA (lncRNA) の機能を推定する手法としても応用可能な本プロジェクトは、学術的に極めて重要である。

mRNA を含め、数百残基を超える長い RNA の二次構造を解析する現実的な方法としては、現時点で2つしか存在しない。プロジェクトのメンバーである中村慎吾が開発したプログラム GenoPoemics による方法(*J. Biochem.*, **146**, 251-261, 2009)と、University of North Carolina の Kevin M. Weeks 博士が開発した SHAPE 法(*PLoS Biology* **6**, e96, 2008)である。GenoPoemics による方法は、従来法の二次構造予測プログラムを利用しつつ、長鎖 RNA 全体の二次構造をあたかもスペクトルのように俯瞰することができ、局所的な構造形成領域を容易に抽出することが可能である。一方、SHAPE 法では従来法の二次構造予測と RNA 分子全体にわたる化学反応性を比較することにより局所的な構造形成領域を解析することができるが、得られる構造が二次構造(ステムとループ)に限定される短所がある。研究代表者の河合は、安定同位体標識を駆使した NMR 法によって 100 残基を超える RNA の構造を解析する手法の開発を太陽日酸株式会社と進めており(JST シーズイノベーション顕在化ステージ「機能性長鎖 ncRNA の NMR 構造解析技術の顕在化」など)、GenoPoemics とこの NMR 手法を組み合わせることによって、これまでにない迅速で高精度の解析が可能になると考え、本プロジェクトを計画した。

本研究計画では、主として方法論の開発を行うチーム I と、ウイルスのゲノム RNA の解析などを進めるチーム II の大きく 2 つのチームが互いに連携して研究を推進することとした。以下に各年次で特に集中して行う内容を示すが、これらについてもいずれも並行して推進した。

平成23年度:長鎖 RNA から構造形成領域を推定し、その領域に相当する RNA の構造を NMR 法によって解析する。また、構造領域間の相互作用の解析や NMR の RDC 法による構造解析などを行い、構造形成を検証する。

平成24年度:開発した手法を lncRNA, mRNA あるいはウイルス RNA に適用し、構造形成領域を推定する。

平成25年度:推定した構造形成領域とタンパク質性調節因子との相互作用を解析し、その領域の機能を推定する。

平成26年度:推定した機能構造領域に対する RNA アプタマーやアンチセンス RNA を開発し、機能の検証を試みる。

平成27年度:lncRNA と mRNA の構造をそれぞれ解析し、これらの間に構造的な差異があるのかを明らかにする。

本学では従来より RNA 研究が盛んであり、比較的小さな RNA 分子の構造・機能解析あるいは創薬応用などについて多くの成果を上げており、世界的に見ても RNA 研究の一つの拠点を形成しているといえる。本研究によって長鎖 RNA の解析法を開発することにより、世界に類を見ないハイレベルな研究拠点としてさらに発展でき、本学のみならず、日本の生命科学の発展に寄与できると確信し、研究を推進した。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## (2) 研究組織

本研究計画は、主として方法論の開発を行うチーム I と、ウイルス RNA への応用を行うチーム II から構成される。

## [チーム I]

河合、橋本、柴田および博士研究員の大山でスタートした。本研究では、河合の研究室で開発された RNA の二次構造解析プログラムである vsfold を利用し、これと武田薬品工業株式会社が在籍時に中村慎吾が開発したプログラム GenoPoemics を融合させ (vsfold/GP)、利用することを計画した。中村は、プロジェクト発足時には、外部から助言する立場であったが、プロジェクトの 3 年目にあたる平成 25 年 7 月には共同研究員としてプロジェクトに加わった。橋本および柴田は、mRNA の解析技術の検証および応用可能性の検討を担当した。博士研究員の大山は、長鎖 RNA の NMR 法による解析を担当し、プロジェクトの方向付けを行った後、平成 25 年 3 月に理化学研究所に異動となった。プロジェクト終了時の研究者数は中村を含めて 4 名である。河合、橋本、柴田の研究室で毎年度 10 名程度の学生が本プロジェクトにかかわる研究を実施した。なお、最終年度では、半年間にわたり技術員を雇用して RNA 試料の調製を行った。河合は、中村、橋本および柴田のそれぞれの緊密に連絡をとり、協力してチーム I の研究を推進し、また、大山の研究もサポートした。

## [チーム II]

坂本、高久、黒崎、および下遠野で構成される。坂本をチームリーダーとし、チーム I によって開発される手法をウイルスのゲノム RNA に適用することを試みた。坂本は、HIV や HCV のゲノム RNA の解析を行うとともに、推定した構造領域に対するアプタマーの創成を担当した。高久、黒崎は HIV について、下遠野は HCV について担当し研究をスタートさせた。なお、下遠野は、平成 24 年 9 月に学外に異動となり、HCV ゲノム RNA の機能構造の解析については、河合および高久が引き続き進めた。平成 25 年 4 月より竹中が客員研究員として加わり、RNA の X 線結晶構造解析について検討を開始し、平成 26 年 4 月から根本が加わって、RNA の結晶化を担当した。プロジェクト終了時のメンバーは竹中を含めて 5 名である。坂本、黒崎、根本の研究室では、毎年度 5 名程度の学生が本プロジェクトにかかわる研究を実施した。

## (3) 研究施設・設備等

津田沼キャンパス 8 号館 4 階に約 150 m<sup>2</sup> の RNA 専用実験室を用意して、RNA 試料の調製等を行っている。この実験室には、RNA の調製および解析に必要な装置・器具がほぼ整備されている。また、本プロジェクトで購入した超遠心機もこの実験室に設置してある。プロジェクトの前半では、本学茜浜キャンパスの分子構造測定室に設置されていた 600 MHz および 500 MHz の 2 台の高分解能 NMR 分光計を、河合および坂本のグループが独占的に利用した。また、平成 25 年 10 月に理化学研究所より 600 MHz の分光計を無償貸与され、津田沼キャンパス 8 号館 1 階に設置した。分光計の数は 1 台となったが、感度が向上したことから、得られるデータ量も増大した。

平成 26 年 8 月には、客員研究員の竹中先生がいわき明星大学で利用していた X 線回折系を津田沼キャンパス 8 号館 4 階に移設し、河合および根本のグループで運用を開始した。

RNA の二次構造の解析については、通常のパソコンでの利用が可能であるが、河合の研究室(津田沼キャンパス 1 号館 5 階)では、大規模計算のための専用の計算サーバー数台を設置している。

これらに加え、河合、高久、黒崎、橋本、坂本、柴田の 6 名の教員は、それぞれ 135 m<sup>2</sup> を単位とする実験室(津田沼キャンパス 1 号館)を 1~2 単位利用しており、それぞれプロジェクトの研究の推進に活用している。なお、高久は平成 25 年度で退職したが、その後も附属研究所専任研究員として 8 号館の実験室等を利用して研究を推進した。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

(4) 研究成果の概要 ※下記、13及び14に対応する成果には下線及び\*を付すこと。

チーム I では、長鎖 RNA について二次構造解析を行い、二次構造を形成する可能性の高い領域を検出する方法の開発、および検出した領域に対応する RNA 断片の二次構造あるいは立体構造を NMR 法によって解析する手法の開発を行った。また、RNA 断片と他の分子との相互作用を迅速に解析するための手法の開発を進めた。以下にチーム I の成果の概要を示す。

#### I-1. 神経特異的 mRNA である HAR1F RNA の二次構造解析

ほ乳類での保存性が高く、同時に、ヒトにおいて変異が認められる領域のひとつである HAR1 から発現している non-coding RNA の HAR1F RNA について、特定の領域の二次構造がヒトとチンパンジーで異なっていることが報告されている。そこで、この RNA について、vsfold/GenoPoemics (vsfold/GP) を用いて二次構造解析を行った。その結果、特定の領域に二次構造形成が示された。特に、ヒトとチンパンジーで二次構造が異なることが指摘されている領域で比較的安定な二次構造が形成されることが示された。このように、vsfold/GP を用いることによって、長鎖 RNA の二次構造の特徴を効果的に描き出すことができることが示された。ヒトとチンパンジーで異なる二次構造が予測された3つの領域のうち、脊椎動物で保存されているのは、2番目の領域のみであり、生物学的な重要性は、おそらく2番目の領域にあると判断できた。

このように、\*vsfold/GP によって二次構造の比較が効果的に行えることが示された。今後は、二次構造の差が見られた領域について、実際に NMR 法による構造解析を行い、その立体構造の違いについて明らかにしていきたい。

#### I-2 HCV ゲノム RNA における構造領域の機能の推定

HCV ゲノムが自立的に複製する細胞を用いて複製を抑制する宿主要因を単離するために、HSV チミジンキナーゼ (TK) を利用したスクリーニングの系を作成した際に、TK 遺伝子が入っていないレプリコンを持つ細胞では、レプリコンが自立的に複製したのに対して、TK-neo を持つレプリコンは自立複製しなかった。この HCV レプリコンにおける HCV RNA の自己複製が阻害される現象について、本プロジェクトで開発を進めている手法を適用し、その二次構造を解析した。vsfold/GP によって人為的改変 HCV RNA の 5' 領域の二次構造を解析した結果、いくつかの二次構造が予測された。今後、これらの構造と自己複製阻害との関連について解析する必要がある。なお、\*HCV RNA の IRES 領域にいくつかの二次構造が推定されており、これらはすでに解析されている IRES の二次構造とよく一致していた。このことは本手法の有効性を示すものである。

#### I-3 免疫機能に関与する長鎖 non coding RNA の新規機能の検索

免疫機能に関与する分子の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に着目し、vsfold/GP によって特徴的な構造を見出せるか、検討を行った。

TNF など炎症に関わる分子の mRNA の 3'-UTR には、AUUUA 配列を特徴とする AU rich element (ARE) と呼ばれる領域がある。そこで、これらの mRNA について vsfold/GP で解析したところ、ARE 領域の 3' 側に二次構造形成が予測された。また、サイトカインのような分泌タンパク質や toll-like receptor (TLR) などの mRNA についても、ARE に近接してループ構造の形成が予測された。これらの予測された二次構造について、比較検討を行っている。また、mRNA 編集酵素である APOBEC1 が、IL8 の mRNA の 3'-UTR の ARE と相

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

相互作用することが最近見出された。そこで、APOBEC1 の認識に必要な構造要素の解明をめざし、vsfold/GP によって IL8 mRNA の二次構造の解析を行った。その結果、ARE が集中している領域において、安定ではないが二次構造の形成が予測された。これらの結果は、vsfold/GP が様々な mRNA の構造領域を抽出できることを示している。

#### I-4. 翻訳エンハンサー活性を有する OsMac 遺伝子群 5'-UTR の構造解析

東京理科大学の島田浩章博士との共同研究として、植物由来 mRNA を対象とした構造解析を進めた。イネの OsMac 遺伝子群の mRNA は長い 5'-UTR をもち、これが下流の open reading frame (ORF) の翻訳量を 10~20 倍に促進することが発見されている。そこで、vsfold/GP によって OsMac1 および OsMac3 の 5'-UTR の二次構造解析を行った。

OsMac1 遺伝子からは、選択的スプライシングによって3種類の mRNA が合成されるが、このうち 5'UTR がもっとも長い mRNA が効率良く翻訳されることが知られており、この配列について二次構造予測を行った。その結果、いくつかの安定なヘアピンが予測されたが、機能部位には安定なステムループは予測されなかった。一方、OsMac3 の 5'-UTR についても vsfold/GP による解析を行った結果、2つの比較的安定な二次構造が予測された。すでに OsMac3 の 5'UTR に由来する RNA 断片についての NMR 解析をスタートさせており、今後、これらの二次構造あるいは立体構造を比較することによって、翻訳促進に関与する機能構造を明らかにしたいと考えている。

#### I-5 LINE RNA と逆転写酵素の認識特異性の決定要因

散在性核内反復配列 (LINE) の逆転写酵素認識部位と考えられている RNA 領域について、逆転写酵素認識メカニズムを明らかにすることを目的とし、東京工業大学の梶川正樹博士らとの共同研究として立体構造解析を進めた。

既にウナギの LINE RNA (UnaL2, 17 残基) の逆転写酵素結合部位のステムループの立体構造を決定しており、逆転写酵素の認識において G8 が重要であり、U10 がその構造を支えていることを示した。一方、ゼブラフィッシュには UnaL2 と極めて類似した ZfL2-2 と、少し差異のある ZfL2-1 がある。塩基配列の比較から、ZfL2-1 では、UnaL2/ZfL2-2 における U10 の位置にステムループが挿入されており、G8 に対応する位置は A10 となっている。

\*<sub>2</sub>ZfL2-1 のステムループの立体構造を決定したところ、A10 は、UnaL2/ZfL2-2 の場合と同様に 5'側とスタッキングしており、ループの内側を向いていた (PDB ID: 2RVO, BMRB ID: 11607)。ZfL2-1 においても A10 が逆転写酵素による認識特異性に関与しているかどうかを調べるため、この残基を G 残基に変えた RNA (ZfL2-1-G10) を調製し、NMR スペクトルの解析を行った。その結果、基本的な構造は ZfL2-1 と同じであることが分かった。

共同研究者の梶川博士らによって、ゼブラフィッシュ LINE の逆転写酵素において RNA の特異的な認識に関与している領域が明らかにされた。そこで、その領域に対応するペプチドと UnaL2/ZfL2-2 および ZfL2-1 との相互作用解析を行った。ペプチドについては、NMR 解析用の安定同位体標識された試料を調製することが必要なため、無細胞タンパク質合成系を利用した新しい方法を開発した。これは、安定同位体標識化合物のメーカーである大陽日酸株式会社と共同で、理化学研究所 NMR 施設の産学連携無償利用課題として実施した (外部利用課題 13-700-007, 14-700-012)。このペプチドを用いて、RNA との相互作用をゲルシフト法および NMR 法において解析したところ、\*<sub>3</sub>逆転写酵素による ZfL2-1 および ZfL2-2 の識別に G8 および A10 が重要であることが明らかとなった。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

### I-6 HCV ゲノム RNA における構造領域の立体構造解析

C 型肝炎ウイルス(HCV)のゲノム RNA において、いくつかの分子内相互作用が、その複製や翻訳に重要であることが示されている。本プロジェクトでは、NS5B タンパク質の遺伝子領域に存在するステムループである 5B SL3.2 と 3'-UTR の X region に存在する X-tail SL2 との相互作用(相互作用 A)、および、5B のステムループとその上流との相互作用(相互作用 B)に着目し、NMR 法による解析を進めた

(相互作用 A)5B SL3.2 と X-tail SL2 に由来する RNA についての NMR スペクトルの解析から、複合体形成によってそれぞれのステムループの構造は大きくは変化しないことが分かった。つぎに複合体について立体構造解析を進めが、キッキンググループ周辺の拘束条件が少ないこともあり、ステムループ間の位置関係は決定できなかった。そこで、\*<sub>4</sub>RDC に由来する大局的な構造情報(各塩基の向きの情報)を導入して構造計算を行ったところ、ステムループ間の位置関係が限定された。このように、RDC 情報が RNA の立体構造解析において重要であることが示された。(相互作用 B)5B のステムループとその上流に由来する 2 つの RNA について、それぞれ単体の NMR スペクトルと複合体の NMR スペクトルを比較したところ、イミノプロトンシグナルに変化が観測された。これらは、複合体形成による構造変化および分子間塩基対の形成を反映していると考えている。5B のステムループのシグナルについては変化していないものもあることから、\*<sub>5</sub> 推定どおり、バルジループで相互作用していると考えられる。現在、複合体の立体構造の決定をめざし、NMR シグナルの解析を進めている。

### I-7. NMR 法による長鎖 RNA の構造解析手法の開発

これまでの RNA の立体構造解析の多くは、機能性 RNA の一部のヘアピンを切り出して行われており、実際に機能を果たす RNA の部分構造であることが多い。このため、これまでには、部分構造を組み合わせることで全体の機能を類推する研究が多数であった。そこで、特定の立体構造を形成する 100nt から 300nt 程度の長さの機能性 RNA の立体構造を NMR 法によって解析し、機能と構造の相関を解明する手法を開発することを目的とした。

(1)HCV IRES の解析: 100 塩基程度の機能性 RNA のモデルとして、まず HCV 由来の IRES を選んだ。IRES のコア領域に相当する 91 塩基の RNA について、全長と 2 種の断片を調製し、その NMR スペクトルを測定した。その結果、全長のスペクトルは、各断片のイミノプロトンシグナルの重ね合わせとほぼ一致した。このことから、\*<sub>6</sub>IRES のコア領域は推定した二次構造を形成していることが示唆された。また、コア領域はその活性に Mg<sup>2+</sup> が必須である。NMR 法による Mg<sup>2+</sup> の添加実験を行った結果、\*<sub>6</sub> コア領域は活性型(Mg<sup>2+</sup>結合型)と不活性型で立体構造が異なることが示唆された。

(2) 高度好熱菌由来リボスイッチの解析: 次に当研究室で発見した *Thermus thermophilus* の TPP リボスイッチを解析対象とした。vsfold5 で予測された二次構造に基づき、91 残基の RNA (*Tt*TPP91) をデザインし、NMR 法によって TPP による滴定実験を行った結果、\*<sub>7</sub>*Tt*TPP91 と TPP は 1 対 1 で複合体を形成していることが示唆された。また、TPP 非存在下と結合時の NMR スペクトルを比較しすることによって、\*<sub>7</sub>TPP の結合によって、複数の新たな水素結合が形成されることが示唆された。一方、*Tt*TPP91 の立体構造および相互作用の解析を効率よく行うために、理化学研究所の平尾一郎博士と共同研究で、人工塩基対を利用した転写反応を行い、常磁性タグを特定の残基に導入した。この方法は、これまでに例のない画期的なものである。\*<sub>8</sub> 常磁性タグの存在によっていくつかのシグナルの強度が減少しており、常磁性タグの近くに位置していることがわかった。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

### I-8 J-motif RNA

J-motif RNA は、中村によって、神経系の分化に関連した遺伝子の mRNA に見出された RNA の配列である。この配列は、vsfold/GP においては二次構造が予測されないが、実は構造を形成するという例であり、実際に特定の立体構造を形成しているかを NMR 法によって解析することとした。塩基対に由来するシグナルが観測される領域において、J-motif RNA ではシグナルが全く観測されなかった。しかしながら、重水中の NOESY スペクトルでは、3つの A 残基の H2 から非常に強い NOE が観測され、\*<sub>9</sub> 特徴的な構造の形成が示唆された。

### I-9. 長鎖 RNA の相互作用の解明を行うための QCM を用いた解析方法の開発

RNA-RNA, タンパク質相互作用を解析する新規な手法として、金センサー上に RNA を固定化することが可能な自己組織化膜を形成することで、ビオチン化などの煩雑な過程を必要としない QCM 測定を実現するための基盤技術を開発することとした。本プロジェクトにおいて、\*<sub>10</sub> 種々の官能基を有するチオール誘導体を用いた、金基板上における自己組織化膜が形成された QCM センサーの調製に成功し、サケ白子由来の DNA を用いた固定化技術を開発するに至った。特に、\*<sub>11</sub> 末端にアミノ基およびカルボキシル基を有するチオール誘導体により修飾された QCM センサーを用いることで、効率的に DNA が固定化されることを見出した。 さらに、坂本によって構造および相互作用が明らかとされているアプタマーである Apt1-S を用いた実験の結果、\*<sub>11</sub> アミノ基を末端に有するチオール誘導体により修飾された QCM センサーを用いることで、RNA が固定化されることを見出した。 一方、酸化チタンを用いた光照射による生体分子の吸脱着制御についても開発を進めた。表面修飾を行った酸化チタンを用いることで、\*<sub>12</sub> 酸化チタンの光誘起超親水化現象に基づいた、光による BSA の吸脱着制御に成功した。 また、光照射による表面の濡れ性の制御が可能な薄膜の調製を行い、\*<sub>13</sub> 光照射により回収することが可能な繊維芽細胞のシートを調製するに至った。

チーム II では、HIV-1 および HCV を対象として、その機能構造領域を見出すこと、および機能構造領域に対するアプタマーを取得し、それを機能制御に応用することをめざした。

### II-1. HIVゲノムRNAにおける構造領域の機能の推定

#### (1) T細胞内miRNAによるHiv-1の複製制御

データベースに登録されている miRNA と相補性を示す HIV-1 の部分配列を含むベクターを、T 細胞由来で HIV-1 感染性の M4C8 細胞と Jurkat E6 cells に形質導入し、抑制的な影響を持つ配列を多数同定した。その結果、*pol* 領域、*env-nef* 領域において新たな機能領域が示唆された。また、抑制効果を解除するように変異を導入したウイルスでは、ウイルスの産生量が減少する結果が得られた。これらの結果から、miRNA の抑制配列がウイルスゲノムのパッケージングとウイルスタンパク質の発現効率のバランスを担っている可能性が示唆され、HIV-1 ウイルスが RNA 干渉に適応し、これを利用している可能性が示唆された。miRNA による抑制効果を解除するように *pol* 領域および *env-nef* 領域に部位特異的変異を導入したウイルスによる抑制の解除の確認、および Drosha の knock-down および RNA-IP による Ago2 と標的 mRNA との相互作用の確認からも、\*<sub>14</sub> 本研究で見出された miRNA は HIV-1 を標的とした宿主内 miRNA である事が確認された。



法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## (2)HEXM1-7SK snRNA-P-TEFb複合体は HIV-1 Tatの活性を制御する

HEXIM1は最近転写伸長反応の阻害装置として注目されている。本研究ではTat, HEXIM1とHIV-1 TARおよび7SK snRNAとの相互作用を検討することで、新たなLTR転写活性制御機構の解明を目的とした。TatおよびHEXIM1とHIV-1 TARおよび7SK snRNAとの相互作用をin vitroの系で解析したところ、HEXIM1と7SK snRNAの間には相互作用が無く、7SK snRNAはHIV-LTR転写活性には直接影響しないことが明らかになった。さらに、7SK snRNPがHIVの遺伝子転写の抑制には関わっていないことも示唆された。したがって、HEXIM1が過剰発現することでTARに直接結合してTatの機能を阻害したと考えられる。

## II-2 宿主内因子, Prostaglandin A<sub>1</sub>(PGA<sub>1</sub>)によるHCV-IRES依存的翻訳阻害

Prostaglandin A<sub>1</sub>(PGA<sub>1</sub>)は、生体内のいたるところに存在して生理活性を有する物質であり、HIV-1などのウイルス感染時には宿主防御因子APOBEC3Gの発現を高めHCVの増殖・複製を制御することを高久のグループが報告している。そこで、C型肝炎ウイルス複製制御に係わるPGA<sub>1</sub>の機能解析を行った。PGA<sub>1</sub>は、濃度依存的にHCVの複製を制御し、細胞毒性も伴うことなく高い抗HCV活性を長期間示すことが確認された。また、PGA<sub>1</sub>はCap依存的翻訳阻害を伴うことなくHCV-IRES依存的翻訳阻害を誘導していることが分かった。さらに、\*<sub>15</sub>PGA<sub>1</sub>は、PGA<sub>1</sub>/eIF3/40Ssubunit/IRES複合体を形成することでHCV-IRES依存的翻訳を阻害することが示唆された。

## II-3 HIV ゲノム RNA における機能構造領域の応用

ウイルス遺伝子の発現を制御する際に最も有効な標的部位を探索することを目的として、DIS 領域に加え、ウイルス遺伝子のスプライシングに関与する 4 つの部位(D1, D4, A3, A7)を標的とした核酸分子によるウイルス遺伝子の発現抑制効果を検討した。各部位を標的とした siRNA を用いてレポーター遺伝子の発現抑制効果を比較した結果、\*<sub>16</sub>DIS または D1 を標的とした siRNA は、いずれも gag 遺伝子を含む mRNA の発現量を減少させた。またスプライシングによって生じる tat 遺伝子の発現解析から、DIS または D1 を標的とした siRNA がスプライシングを阻害している可能性が示唆された。つぎに、強い抗ウイルス活性が確認された DIS を標的とした shRNA について発現ベクターを構築し、抗ウイルス活性を検討した。その結果、\*<sub>17</sub>このベクターは HIV-1 の遺伝子発現を抑制した。そこで、坂本が作製した TAR 領域に対するアプタマーの抗ウイルス活性を同様な方法で検討したが、抗ウイルス活性は認められなかった。HIV-1 遺伝子発現を制御する領域については絞り込みが出来たので、アプタマー不活性の原因を解明し、抗ウイルス活性を最大限に増強させることができれば、HIV-1 治療戦略の選択肢を拡張するツールとして期待できると考える。

## II-4 HCV ゲノムの解析およびアプタマーの取得

HCV のタンパク質の一つである NS5A を用いて SELEX を行ったが、アプタマーを得ることはできなかった。一方、NS5A が HCV ゲノムの 3'-UTR に結合することを確認した。さらに、3'-UTR の欠損変異体を用いて相互作用解析を行ったところ、\*<sub>18</sub>3' X region の SL I および SL II を削った変異体および 3' X region のみの変異体でも NS5A と結合するが、3' X region の SLI を削った変異体では、NS5A との親和性が低くなることが示唆された。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## II-5 HIV ゲノムの解析およびアプタマーの取得

SELEX 法と NMR 法を用いて, HIV ゲノムの 5'-UTR の立体構造情報を得ることを試みた. アプタマーは標的分子の立体構造を認識して結合するので, 得られるアプタマーの構造を解析することにより, 標的分子の構造情報が得られると考えた. アプタマーは, 5'-UTR の分子表面と塩基対形成によって相互作用すると考えられ, 塩基対を形成した領域のトポロジーから 5'-UTR の全体構造をモデリングできる可能性がある. これまで SELEX 法を立体構造解析に利用した報告はなく, 新しい試みであると考えている.

TAR を標的として SELEX を行なった. 得られたアプタマー候補の配列を解析したところ, 既に報告されているアプタマー配列を含む RNA の他に, それとは異なる配列も見つかった. 新しいアプタマー候補のうち2つは, TARと相補的な配列を2箇所含んでいた. DISを標的とした SELEX では, DIS のループ部分に相補的な配列を含むライブラリと含まないライブラリを用いて選別を行なった. その結果, 相補配列を含まないライブラリからも DIS のループ部分に相補的な配列が濃縮された. 一方, 相補配列を含むライブラリからも同様な配列が濃縮されたことから, <sup>\*19</sup> アプタマー配列の濃縮に成功していると判断した. 開始コドン AUG を含むヘアピン部分を標的とした SELEX では, 標的 RNA と結合する RNA プールが得られたが, 配列の収束度が高くなかった. 以上のように, 5'-UTR に対するアプタマーが取得可能であることが示された. そこで, 357 残基の 5'-UTR (Summers らのグループが NMR 解析した配列) を調製し, 樹脂に固定化して, SELEX 実験を進めている.

5'-UTR の NMR 解析も行っている. 5'-UTR は, 低イオン濃度 (LI Buffer) ではモノマーとなるが, 生理的条件 (PI Buffer) ではダイマーになることが知られているが, NMR 法によって, LI Buffer と PI Buffer では構造変化が起きていることを確認した.

## II-6. 長鎖 RNA の X 線結晶構造解析

HIV-1 のゲノム RNA の 5'-UTR は, 立体構造が変化することによって, その下流にある遺伝子の翻訳を促す状態と, ウイルスゲノムがパッケージングされる状態とが制御されると報告されている. パッケージングの状態では, 5'-UTR の Dimerization Initiation site (DIS) を介して二量体化するとされており, この状態の立体構造を明らかにできれば, HIV-1 粒子形成阻害剤の開発につながると期待される. そこで, HIV-1 の 5'-UTR の立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすることを目的とした.

HIV-1 の 5'-UTR の 357mer を T7 RNA ポリメラーゼを用いた in vitro 転写法によって調製し, 600 種類以上の条件で結晶化を開始した. 目的とする RNA 結晶は得られていないが, Mg<sup>2+</sup> 存在下, あるいは Tat タンパク質やヌクレオキャプシドタンパク質存在下において結晶化を試みる予定である.

以上のように, 2 つのチームのそれぞれにおいて成果が得られている. 本プロジェクトにおいて, vsfold/GP による長鎖 RNA の二次構造の予測手法が開発でき, 広く Web で利用可能となっている. また, RNA についての NMR 解析および X 線結晶構造解析の設備が整えられた. さらに, 相互作用解析のための新しい手法も開発され, また, 遺伝子発現制御の解析やアプタマーの取得などの研究もそれぞれ大きく進展した. これらの研究を推進するための装置・設備は本学津田沼キャンパスに集約されており, まさに研究拠点が形成されたと考えている. 以上のことから, 本プロジェクトは当初の目標を超える成果を上げたと考えている.

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

#### <優れた成果が上がった点>

本プロジェクトにおいて vsfold/GP システムが整備され、長鎖 RNA の二次構造解析が Web サイトからも行えるようになったことが重要な成果の一つであると考えている。本システムについては、その有用性を日本 RNA 学会年会(2013 年 7 月)において口頭発表として紹介したところ、多くの研究者が利用を希望した。しかしながら、その時点では Web サービスが存在しておらず、実際の利用は限定的であった。プロジェクトの最終年度で Web サイトが開設されたことによって、今後、国内外からの利用からの利用が期待される。

LINE RNA の構造と機能の研究において、逆転写酵素による認識部位に相当する RNA の立体構造を決定し、さらに、逆転写酵素の RNA 認識部位に相当するタンパク質との相互作用解析を行うことによって、逆転写酵素が RNA の特定の 1 残基の違いを識別できることを明らかにした。この研究成果は、RNA とタンパク質の相互作用に関して新しい知見を与えるだけでなく、LINE の増幅機構の解明につながる成果であると考えている。

さらに、本プロジェクトにおいて、T 細胞が HIV-1 を標的とした miRNA を持ち、一方、その miRNA がウイルスゲノムのパッケージングとウイルスタンパク質の発現効率のバランスを担っている可能性が示唆されたことも特筆すべき成果である。

また、QCM 解析のために開発された金表面の自己組織化膜による修飾による RNA 吸着の手法は、今後の大きな展開が期待できる。

#### <課題となった点>

当初計画の一つとして、lncRNA の二次構造解析と mRNA との比較を予定していたが、これについては有意な結果が得られていない。今後も引き続き解析を進め、結果を蓄積することによって、mRNA と lncRNA を特徴づけるものが見出せると期待している。

#### <自己評価の実施結果と対応状況>

本プロジェクトでは、期間中に 6 回のミーティングを行い、自己評価を行った。

第 1 回 平成23年6月20日(公開): プロジェクトの開始にあたり、河合および坂本がそれぞれのチームの研究計画について説明し、メンバー間の意思統一を行った。

第 2 回 平成 23 年 12 月 19 日(非公開) 各メンバーがそれまでの進捗状況を報告した。メンバー間の相互作用を高める必要があることが指摘され、河合と橋本の共同研究、および坂本と黒崎の共同研究を推進することが提案された。また、河合と下遠野の共同研究を深化させることも提案された。

第 3 回 平成24年5月10日(公開): プロジェクト 1 年目の研究成果および 2 年目の研究計画を、各メンバーが報告した。おおむね順調に進んでいるが、中間評価に向けてさらに研究を加速させることとした。

第 4 回 平成25年3月7日(非公開): プロジェクト 2 年目の研究成果および 3 年目の研究計画を、各メンバーが報告した。下遠野が平成 24 年 9 月に移動したことに伴い、HCV についての解析を高久、坂本および河合で分担し、引き続き推進することとした。また、大山が平成 25 年 3 月に移動することに伴い、大山が担当していた研究課題を河合が引き続き推進することとした。

(平成 25 年 6 月に公開シンポジウムを行い、それまでの成果をまとめて中間報告書とした。)

第 5 回 平成 26 年 9 月 13 日(非公開): 中間評価の結果を踏まえ、プロジェクトの残りの期間の研究方針について議論した。免疫系の mRNA の解析が NMR 解析の段階に進んでいないことから、この試料調製に充当する予定であった予算を、新しく開始した X 線結晶構造解析を推進するため、根本に配分することとした。また、坂本と根本が協力して、HIV-1 の 5'-UTR の結晶化を行うことが提案され、それを実施することとした。

第 6 回 平成 27 年 12 月 12 日(公開): プロジェクトの終了にあたり、これまでの研究成果

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

を報告するとともに、研究成果報告書の作成に向けた取り組みについて検討した。また、プロジェクト終了後に開催を予定している公開シンポジウムについても議論した。  
以上の各ミーティングにおいて率直な意見交換を行うことによって、研究の方向性について十分な検討を行い、プロジェクトを推進した。

#### <外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

2名の外部評価委員から3回の評価を受け、プロジェクトの推進に役立てた。  
廣瀬哲郎 博士(2013年8月まで:産総研 BIRC 機能性 RNA 工学チーム研究チーム長, 2013年9月より:北海道大学遺伝子病制御研究 RNA 生体機能分野 教授)  
内藤 晶 博士(横浜国立大学大学院工学研究院機能発現工学専攻 教授, 平成26~27年度 日本核磁気共鳴学会会長)  
第1回外部評価(平成24年8月): プロジェクト初年度の研究成果をまとめた報告書を作成し、内藤博士には、平成24年5月に開催したミーティングにも出席していただいた上で、評価を実施した。プロジェクトの方向性に関する重要な指摘を多数いただき、各メンバーにおいてそれぞれ対応した。  
第2回外部評価(平成25年9月): プロジェクト2年目の研究成果をまとめた平成24年度報告書を作成し、内藤博士には、平成25年6月に開催した公開シンポジウムにも出席していただいた上で、評価を実施した。各研究課題に対して詳細なコメントをいただき、その後の研究の推進に役立てた。  
第3回外部評価(平成27年2月): プロジェクトの3~4年目の研究成果をまとめた平成25・26年度報告書を作成し、評価を実施した。プロジェクトの最終年度に向けた貴重なコメントをいただき、これに対して各メンバーが対応した。  
2名の外部評価委員からは、それぞれ研究内容についてきわめて率直かつ適切なコメントをいただくことができ、プロジェクトの推進に大きく役立った。なお、外部評価委員かからのコメントおよびそれに対する対応については、それぞれ翌年度の報告書に記載した。

#### <研究期間終了後の展望>

研究期間は終了したが、プロジェクトにおいて整備した装置あるいは技術を活用し、今後も長鎖 RNA の構造機能解析を積極的に推進する予定である。特に、HIV-1 あるいは HCV のゲノム RNA の研究については、X 線結晶構造解析も含めて積極的に推進する予定である。また、植物ウイルスの RNA あるいは lncRNA の研究にも取り組む予定である。  
これらの研究を通して、千葉工業大学の RNA 研究をさらに発展させ、国内外の RNA 研究の進展に貢献したい。

#### <研究成果の副次的効果>

本プロジェクトにおいて形成された長鎖 RNA の機能構造解析の基盤のさらなる向上とその活用のため、mRNA をターゲットとした創薬の基盤研究を推進する特定非営利活動法人(NPO)の設立を計画している。複数の大学および製薬企業が参加し、今年度中に活動を開始する予定である。この活動で、これまでの研究成果を社会に還元できると期待している。

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- |                           |                  |                    |
|---------------------------|------------------|--------------------|
| (1) <u>non-coding RNA</u> | (2) <u>mRNA</u>  | (3) <u>RNAウイルス</u> |
| (4) <u>二次構造予測</u>         | (5) <u>NMR</u>   | (6) <u>立体構造</u>    |
| (7) <u>相互作用</u>           | (8) <u>アプタマー</u> |                    |

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## 13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

## &lt;雑誌論文&gt;

(河合剛太)

1. Okui, S., Ushida, C., Kiyosawa, H., and Kawai, G., Sequence and structure analysis of a mirror tRNA located upstream of the cytochrome oxidase I mRNA in mouse mitochondria, *J. Biochem.* **159**, 341-350 (2016).
2. Kanagawa, M., Baba, S., Watanabe, Y., Nakagawa, N., Ebihara, A., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Sampei, G., and Kawai, G., Crystal structures and ligand binding of PurM proteins from *Thermus thermophilus* and *Geobacillus kaustophilus*, *J. Biochem.* **159**, 313-321 (2016).
3. Dawson, W. and Kawai, G., A new entropy model for RNA: part V, Incorporating the Flory-Huggins model in structure prediction and folding, *Journal of Nucleic Acids Investigation*, in press.
4. Dawson, W. and Kawai, G., A new entropy model for RNA: part IV, The minimum free energy and the thermodynamically most-probable folding pathway, *Journal of Nucleic Acids Investigation*, in press.
5. Masuda, T., Sato, Y., Huang, Y.-L., Koi, S., Takahata, T., Hasegawa, A., Kawai, G., and Kannagi, M., Fate of HIV-1 cDNA intermediates during reverse transcription is dictated by transcription initiation site of virus genomic RNA, *Scientific Reports* **5**, 17680, (2015)
6. Kiyosawa, H., Okumura, A., Okui, S., Ushida, C., and Kawai, G., Secondary structure-based analysis of mouse brain small RNA sequences obtained by using next-generation sequencing, *Genomics* **106**, 122-128 (2015).
7. Okui, S. and Kawai, G., In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **34**, 103-113 (2015).
8. Zhang, F., Hoque, M. M., Jiang, J., Suzuki, K., Tsunoda, M., Takeda, Y., Ito, Y., Kawai, G., Tanaka, H., Takénaka, A., The Characteristic Structure of Anti-HIV Actinohivin in Complex with Three HMTG D1 Chains of HIV-gp120, *Chembiochem* **15**, 2766-2773 (2014).
9. Hashi, Y., Kawai, G. and Kotani, S., Microtubule-associated protein (MAP) 4 interacts with microtubules in an intrinsically disordered manner, *Biosci Biotechnol Biochem.* **78**, 1864-1870, (2014).
10. Dawson, W., Takai, T., Ito, I., Shimizu, K. and Kawai, G., A new entropy model for RNA: part III, Is the folding free energy landscape of RNA funnel shaped?, *Journal of Nucleic Acids Investigation* **5**, 2652 (2014).
11. Sampei, G., Kanagawa, M., Baba, S., Shimasaki, T., Taka, H., Mitsui, S., Fujiwara, S., Yanagida, Y., Kusano, M., Suzuki, S., Terao, K., Kawai, H., Fukai, Y., Nakagawa, N., Ebihara, A., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. and Kawai, G., Structures and reaction mechanisms of the two related

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

- enzymes, PurN and PurU, *J. Biochem.* **154**, 569–579 (2013).
12. Dawson, W., Yamamoto, K., Shimizu, K. and Kawai, G., A new entropy model for RNA: part II, persistence-related entropic contributions to RNA secondary structure free energy calculation, *Journal of Nucleic Acids Investigation* **4**, e2 (2013).
  13. Hatano, A., Okada, M. and Kawai, G., Solution structure of S-DNA formed by covalent base pairing involving a disulfide bond, *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 7327-7333 (2012).
  14. Dawson, W., Yamamoto, K. and Kawai, G., A new entropy model for RNA: part I, a critique of the standard Jacobson-Stockmayer model applied to multiple cross links, *Journal of Nucleic Acids Investigation* **3**, e3 (2012).
  15. Suzuki, S., Yanai, H., Kanagawa, M., Tamura, S., Watanabe, Y., Fuse, K., Baba, S., Sampei, G. and Kawai, G., Crystal Structure of *N*-formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase II (PurL) from *Thermus thermophilus* HB8, *Acta Cryst.* **F 68**, 14-19 (2012).
  16. Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., Kumasaka, T. and Nakamura, K., Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq, *Nucl. Acids Res.* **40**, 1856-1867 (2012).

(高久洋)

1. Nishitsuji, H., Sawada, L., Sugiyama, R., Takaku, H., ZNF10 inhibits HIV-1 LTR activity through interaction with NF- $\kappa$ B and Sp1 binding motifs, *FEBS Lett.* **589**, 2019-2025 (2015).
2. \*15 Tsukimoto, A., Sugiyama, R., Abe, M., Nishitsuji, H., Shimizu, Y., Shimotohno, K., Kawai, G., Takaku, H., A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors, *Antiviral Res.* **117**, 1-9 (2015).
3. Sugiyama, K., Ebinuma, H., Nakamoto, N., Sakasegawa, N., Murakami, Y., Chu, P. S., Usui, S., Ishibashi, Y., Wakayama, Y., Taniki, N., Murata, H., Saito, Y., Fukasawa, M., Saito, K., Yamagishi, Y., Wakita, T., Takaku, H., Hibi, T., Saito, H., Kanai, T., Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One* **9**, e94460 (2014).
4. Shimizu, Y., Nishitsuji, H., Marusawa, H., Ujino, S., Takaku, H., Shimotohno, K., The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA, *J Biol. Chem.* **289**, 26226-26238 (2014).
5. \*14 Kato, K., Senoki, T., Takaku, H., Inhibition of HIV-1 replication by RNA with a microRNA-like Function, *Int. J. Mol. Med.* **31**, 252-258 (2013).
6. Sugiyama, R., Abe, M., Nishitsuji, H., Murakami, Y., Takeuchi, H., Takaku, H., Induction of heat-shock protein70 by prostaglandin A1 inhibits HIV-1

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

Vif-mediated degradation of APOBEC3G, *Antiviral Res.* **99**, 307-311 (2013).

7. Nishitsuji, H., Funami, K., Shimizu, Y., Ujino, S., Sugiyama, K., Seya, T., Takaku, H., Shimotohno, K., Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokine mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. *J. Virol.* **87**, 8169-8178 (2013).
8. Noguchi, K., Ishibashi, K., Miyokawa, K., Hokari, M., Kanno, T., Hirano, T., Yamamoto, N., Takaku, H., HIV-1 suppressive sequences are modulated by Rev transport of unspliced RNA and are required for efficient HIV-1 production, *PLoS One* **7**, e51393 (2012).
9. Nishitsuji, H., Abe, M., Sawada, R., Takaku, H., ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription, *FEBS Lett.* **586**, 3562-3568 (2012).
10. Ujino, S., Nishitsuji, H., Sugiyama, R., Suzuki, H., Hishiki, T., Sugiyama, K., Shimotohno, K., Takaku, H., The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site, *Virus Res.* **163**, 390-395 (2012).
11. Nishitsuji, H., Yokoyama, M., Sato, H., Yamauchi, S., Takaku, H., Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors, *FEBS Lett.* **585**, 3372-3377 (2011).
12. Sugiyama, R., Naganuma, H., Nishitsuji, H., Takaku, H., Human immunodeficiency virus-1 Nef suppresses Hsp70-mediated Tat activation, *FEBS Lett.* **585**, 3367-3371 (2011).
13. Noguchi, K., Ishitu, Y., Takaku, H., Evaluating target silencing by short hairpin RNA mediated by the group I intron in cultured mammalian cells, *BMC Biotechnol.* **11**, 79 (2011).
14. Sugiyama, R., Nishitsuji, H., Furukawa, A., Katahira, M., Habu, Y., Takeuchi, H., Ryo, A., Takaku, H., Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G, *J. Biol. Chem.* **286**, 10051-10057 (2011).

(坂本泰一)

1. Ohuchi, S. J., Sagawa, F., Sakamoto, T., Inoue, T., Altering the orientation of a fused protein to the RNA-binding ribosomal protein L7Ae and its derivatives through circular permutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 388-392 (2015).
2. Ohuchi, S. J., Sagawa, F., Sakamoto, T., Inoue, T., A trifunctional, triangular RNA-protein complex, *FEBS Lett.* **589**, 2424-2428 (2015).
3. Iwashita, S., Suzuki, T., Yasuda, T., Nakashima, K., Sakamoto, T., Kohno, T., Takahashi, I., Kobayashi, T., Ohono-Iwashita, Y., Imajoh-Oomi, S., Song, Si-Y., Dohmae, N., Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

S250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions, *Biosci. Rep.* **35**, e00228 (2015).

4. Kakimoto, Y., Fujinuma, A., Sakamoto, T., Kikuchi, Y., Umekage S., Evidence for RNA template-directed elongation induced by binding T7 RNA polymerase, *AIP Conf. Proc.*, **1649**, 116 (2015).
5. 坂本泰一, 河合剛太, 自然界の翻訳制御リボスイッチ, *細胞工学*, **34**, 778-782 (2015).
6. 天野亮, 高田健多, 坂本泰一, NMR による RNA の構造変化の解析, *分光研究*, **64**, 411-412 (2015).
7. Nomura, Y., Tanaka, Y., Fukunaga, J., Fujiwara, K., Chiba, M., Iibuchi, I., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Kozu, T., and Sakamoto, T., Solution structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against transcription factor AML1 Runt domain. *J. Biochem.* 154, 513-519, 2013.
8. Fukunaga J., Nomura Y., Tanaka Y., Amano R., Tanaka T., Nakamura Y., Kawai G., Sakamoto T., Kozu T., The Runt domain of AML1 (RUNX1) binds a sequence-conserved RNA motif that mimics a DNA element, *RNA*, **19**, 927-936 (2013).

(柴田裕史)

1. \*12 Shibata, H., Shinozaki, R., Ogura, T., Sakai, H., Abe, M., Kawai, G., Hashimoto, H., Fabrication and BSA Adsorption/Desorption Properties of Titania/Silica Composite Films Modified with Silane Coupling Agents, *J. Oleo Sci.* **63**, 1077-1083 (2014).
2. Kawasaki, H., Tozawa, S., Matani, T., Hayashi, T., Watanabe, S., Shibata, H., Matsumoto, M., Triggered J-aggregation in Mixed Langmuir-Blodgett Films of Amphiphilic Spiropyran Having a Methoxy Group at 5' Position and an Azobenzene Derivative, *J. Oleo Sci.* **63**, 691-700 (2014).
3. Shibata, H., Ogura, T., Nishio, K., Sakai, H., Abe, M., Hashimoto, K., Matsumoto, M., Facile Synthesis of Mesoporous Gold Particles Using Silica as a Binder Through a Solvent Evaporation Process, *Transactions of Materials Research Society of Japan* **38**, 221-223 (2013).
4. Oka, K., Shibata, H., Watanabe, S., Sakai, K., Abe, M., Matsumoto, M., Structures of Langmuir-Gibbs Films Consisting of Long-Chain Fatty Acid and Water-Soluble Surfactants, *J. Oleo Sci.* **62**, 681-693 (2013).

<図書>

1. 河合剛太, NMR 測定のためのハードとソフト, 「NMR 分光法」(阿久津秀雄, 嶋田一夫, 鈴木榮一郎, 西村善文編)89-108, 講談社サイエンティフィク(2016)
2. 野村祐介, 坂本泰一, RNA アプタマーの立体構造と創薬, 「タンパク質結晶の最前線」(杉山成 監修)230-237, シーエムシー出版 (2013).
3. Kawai, G., Translational Control by Antisense RNA, *Bacteria, Encyclopedia of Systems Biology*, Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H., eds, 2282-2285, Springer (2013)



法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

4. Sakamoto, T., Translational Control by cis RNA Elements, *Bacteria, Encyclopedia of Systems Biology*, Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H., eds, 2285-2288, Springer (2013)
5. Nameki, N., Someya, T., Kawai, G., Translational Control by Small RNAs, *Bacteria, Encyclopedia of Systems Biology*, Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H., eds, 2289-2292, Springer (2013)

<学会発表>

(河合剛太)

1. \*3 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA の特異性を決定するステムループとペプチドとの相互作用解析, 第 54 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2015 年 11 月, 千葉
2. \*8 藤田舜介, 大山貴子, 染谷龍彦, 木本路子, 平尾一郎, 河合剛太, 人工塩基対を利用した RNA へのスピラベルの導入と NMR 法による相互作用解析への応用, 第 54 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2015 年 11 月, 千葉
3. \*3 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA を特異的に認識するペプチドの構造解析, BMB2015, 2015 年, 神戸
4. \*5 片平智子, 松永美穂, 大友裕貴, Pratima Chaudhuri, 河合剛太, HCV ゲノム RNA の NS5B タンパク質コード領域における RNA-RNA 相互作用の解析, BMB2015, 2015 年, 神戸
5. \*3 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA と逆転写酵素の特異的な相互作用の解析, 第 17 回 RNA ミーティング, 2015 年, 札幌
6. \*3 大津舞菜, 梶川正樹, 河合剛太, LINE RNA と逆転写酵素の認識特異性の決定要因, 第 53 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2014 年 11 月, 大阪
7. \*5 大友裕貴, Pratima Chaudhuri, 河合剛太, HCV ゲノム RNA における NS5B タンパク質コード領域の SL3.2 とその 200 残基上流の一本鎖領域との相互作用の解析, 第 53 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2014 年 11 月, 大阪
8. \*2 Maina Otsu, Nao Norose, Nao Arai, Ryou Terao, Masaki Kajikawa, Norihiro Okada, and Gota Kawai, Structures of reverse transcriptase recognition sites of LINE RNA, 26th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2014 年 8 月, ダラス, 米国
9. \*1 中村慎吾, 宇遠道尊, 河合剛太, 二次構造予測に基づく長鎖 RNA の立体構造形成領域の推定, 第15回 RNA ミーティング, 2013 年 7 月, 松山
10. \*4 大友裕貴, 下地真理子, 齊藤裕之, 千勝大輔, 河合剛太, HCVゲノムRNAにおける分子内RNA-RNA相互作用の解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月, 神戸
11. \*9 片平智子, 奥村健介, 中村慎吾, 河合剛太, 神経特異的 mRNA における構造形成領域の立体構造解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月, 神戸
12. \*2 大津舞菜, 野呂瀬直, 新井直, 寺尾亮, 梶川正樹, 岡田典弘, 河合剛太, LINE RNA 逆転写酵素認識部位の立体構造と機能, 第 52 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2013 年 11 月, 金沢
13. \*2 大津舞菜, 野呂瀬直, 新井直, 寺尾亮, 梶川正樹, 岡田典弘, 河合剛太, LINE RNA 逆転写酵素認識部位の立体構造解析, 第15回 RNA ミーティング, 2013 年 7 月,

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## 松山

14. \*4 Yuki Otomo, Mariko Shimoji, Hiroyuki Saito, Daisuke Chikatsu, Gota Kawai, NMR analysis of RNA-RNA interactions necessary for RNA replication of HCV genome, 第39回国際核酸化学シンポジウム, 2012年11月, 名古屋.
15. \*7 大山貴子, 河合剛太, 100 残基を超える機能性 RNA の NMR 法による立体構造解析, 第 51 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2012年11月, 名古屋
16. \*7 大山貴子, 河合剛太, NMR による鎖長 100 残基を超える機能性 RNA の立体構造解析手法の開発, 第 14 回 RNA ミーティング, 2012年7月, 仙台
17. \*6 大山貴子, 河合剛太, Structural analysis of functional RNA longer than 100 nt by using NMR, 第回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2011年11月, 横浜

## (黒崎直子)

1. \*17 黒田彬仁, 黒崎直子, HIV-1 DIS を標的とした抗 HIV-1 遺伝子発現ベクターによる HIV-1 の転写抑制効果, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014年11月, 横浜
2. \*16 石井暢, 黒崎直子, 高久洋, HIV-1 非翻訳領域に対する核酸分子はウイルス遺伝子の発現を抑制する, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012年12月, 福岡

## (坂本泰一)

1. \*19 幸田美彩子, 天野亮, 平井翔, 坂本泰一, HIV-1 ゲノムの 5'-UTR を標的とした RNA aptamer, BMB2015, 2015年12月, 神戸
2. 武田有未, 天野亮, 高田健多, Colin A. Smith, 坂本泰一, HIV-1 ゲノムの RRE と Rev 変異体の相互作用の解析, 第 54 回 NMR 討論会(日本核磁気共鳴学会年会), 2015年11月, 千葉
3. 天野亮, 高田健多, 武田有未, Colin A. Smith, 坂本泰一, HIV-1 RRE RNA と Rev 変異体の相互作用の解析, 第 17 回 RNA ミーティング, 2015年7月, 札幌
4. \*18 Yuya Ishii, Hiroshi Takaku, Masami Kusunoki, Taiichi Sakamoto, Analysis of RNA Recognition by HCV NS5A protein, The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014年11月, 北九州
5. \*18 石井裕也, 高久洋, 楠木正巳, 坂本泰一, HCV の NS5A タンパク質に結合するアプタマーの取得と解析, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ, 2014年10月, 船堀
6. \*19 幸田美彩子, 天野亮, 星野啓治, 坂本泰一, HIV-1 の DIS に結合する RNA アプタマーの取得, 平成26年度日本生化学会関東支部例会, 2014年6月, 茨城
7. \*18 石井裕也, 楠木正巳, 坂本泰一, HCV の NS5A タンパク質に結合する RNA 配列 の探索, 平成 25 年度日本生化学会関東支部例会, 2013年6月, 山梨

## (柴田裕史)

1. 柴田裕史, 両親媒性分子を用いた無機材料の機能化, 第 33 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 2016年3月, 千葉 (依頼講演)
2. 柴田裕史, 両親媒性分子が創造する新たな光触媒の世界」信州コロイド&界面科学研究会 2015年(第1回)研究討論会, 2015年10月, 長野 (特別講演)
3. \*11 柴昇汰, 根本惇平, 山根悠佑, 天野亮, 坂本泰一, 橋本和明, 柴田裕史, 自己組

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

- 織化膜を用いた生体分子の固定化, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月, 京都
4. \*13 Hirobumi Shibata, Fabrication of Cell Sheets Using Titania / Silica Composite Films, Energy Materials Nanotechnology Meeting on Photocatalysis, 2015 年 11 月, ラスベガス, 米国 (招待講演)
  5. \*11 Shota Shiba, Ryo Amano, Taiichi Sakamoto, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, Hirobumi Shibata, Immobilization of DNA and RNA on QCM sensors modified with self-assembled monolayer of thiol derivatives, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015 年 12 月, ハワイ, 米国
  6. \*13 篠崎亮太, 柴田裕史, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明, チタニア/シリカ複合薄膜を用いた細胞シートの調製, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, 2013 年 9 月, 長野
  7. \*13 Ryota Shinozaki, Hirobumi Shibata, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, Preparation of cell sheets using titania / silica composite films as a scaffold material, 85<sup>th</sup> JSCM Anniversary Conference, 2013 年 10 月, 船堀
  8. \*12 Ryota Shinozaki, Hirobumi Shibata, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, Adsorption / Desorption Behavior of BSA on TiO<sub>2</sub> / SiO<sub>2</sub> composite films under UV light irradiation, International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2013 (ISIEM 2013), 2013 年 10 月, レンヌ, フランス
  9. \*10 山根悠佑, 柴田裕史, 河合剛太, 橋本和明, 自己組織化膜による生体分子の固定化技術の開発, 2013 年度材料技術研究協会討論会, 2013 年 12 月, 野田
  10. \*10 Hirobumi Shibata, Yusuke Yamane, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, Immobilization of Biomolecules on Quartz Crystal Microbalance Sensor Modified with Self-Assembled Monolayer, The 15<sup>th</sup> IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), 2014 年 8 月, 福岡
  11. \*13 柴田裕史, 篠崎亮太, 小倉卓, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明, シランカップリング剤で修飾されたチタニア/シリカ複合薄膜を用いた細胞シートの調製, 日本油化学会第 53 回年会, 2014 年 9 月, 札幌
  12. \*12 Hirobumi Shibata, Ryota Shinozaki, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Gota Kawai, Kazuaki Hashimoto, BSA adsorption/desorption property of TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> composite films modified with silane coupling agents having amino group, World Congress on Oleo Science (WCOS 2012), 2012 年 10 月, 長崎
  13. \*13 篠崎亮太, 柴田裕史, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明, チタニア/シリカ複合薄膜の調製および細胞シート調製への応用, 2012 年度材料技術研究協会討論会, 2012 年 12 月, 野田
  14. \*10 山根悠佑, 柴田裕史, 河合剛太, 橋本和明, QCM による SAM-生体分子間の相互作用測定, 2012 年度材料技術研究協会討論会, 2012 年 12 月, 野田

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

<研究成果の公開状況>(上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等  
<既に実施しているもの>

公開シンポジウム「長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用」  
平成 25 年 6 月 17 日(月) 14:00~17:00 千葉工業大学 津田沼キャンパス  
講演者 河合剛太, 梶川正樹(東京工業大学), 島田浩章(東京理科大学), 柴田裕史,  
坂本泰一, 高久 洋  
※プロジェクト前半の成果を公表するとともに, 後半の方針について議論した.

日本核磁気共鳴学会年会(第 54 回 NMR 討論会)  
平成 27 年 11 月 6 日(金)~8 日(日) 千葉工業大学 津田沼キャンパス  
世話人 河合剛太  
※千葉工大における RNA の NMR 研究について国内外にアピールした.

プロジェクトの Web ページ(平成 23 年 7 月公開)  
<http://www.le.it-chiba.ac.jp/kawai/longrna/index.html>  
長鎖 RNA の二次構造解析の Web ページ(平成 27 年 7 月公開)  
<http://www.rna.it-chiba.ac.jp/~vswindow/>

<これから実施する予定のもの>

公開シンポジウム「長鎖 RNA の機能構造を発見するための技術基盤の開発とその応用」  
平成 27 年 7 月(予定) 千葉工業大学 津田沼キャンパス  
※プロジェクトの研究成果を公表する予定である.

14 その他の研究成果等

受賞

- 第 22 回 JB 論文賞  
Nomura, Y., Tanaka, Y., Fukunaga, J., Fujiwara, K., Chiba, M., Iibuchi, I.,  
Tanaka, T., Nakamura, Y., Kawai, G., Koza, T., and Sakamoto, T., Solution  
structure of a DNA mimicking motif of an RNA aptamer against  
transcription factor AML1 Runt domain. *J. Biochem.* 154, 513-519, 2013.
- 2012 年度材料技術研究協会討論会 口頭講演賞  
篠崎亮太, 柴田裕史, 酒井秀樹, 阿部正彦, 河合剛太, 橋本和明 「チタニア/シリカ複  
合薄膜の調製および細胞シート調製への応用」
- 2012 年度材料技術研究協会討論会 ゴールドポスター賞  
山根悠佑, 柴田裕史, 河合剛太, 橋本和明「QCM による SAM-生体分子間の相互作用  
測定」

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

## 15 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項及び対応

## &lt;「選定時」に付された留意事項&gt;

技術開発について外部評価を取り入れる工夫をされたい。

## &lt;「選定時」に付された留意事項への対応&gt;

外部評価委員として、RNA の機能研究の第一人者の一人である産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・機能性 RNA 工学チーム・研究チーム長の廣瀬 哲郎博士(現:北海道大学・遺伝子病制御研究所・RNA 生体機能分野・教授), および NMR 研究の第一人者の一人である横浜国立大学大学院・工学研究院・機能発現工学専攻・教授・内藤晶博士に評価を依頼している。これまでに、平成23年度および平成24年度の研究成果についての評価コメントを頂いた。平成23年度報告書に対する評価コメントについては、平成24年度の研究推進のために役立てた。具体的な例としては、

「現在 NMR によって構造解析されている RNA 構造が、どのような生体制御機能を司っているのかについて検証する研究計画が明確でない。機能性 RNA 配列の構造決定を共同研究によって積極的に推進すべきではないでしょうか？」

というコメントに対応して、新たに2つの共同研究をスタートさせ、これによって構造と機能の関係に迫りたいと考えた。一つは、レトロトランスポゾンである LINE に関する共同研究で、逆転写酵素が自身の mRNA をどのように認識して逆転写反応を開始するかという問題である。もう一つは、イネの mRNA の 5'-UTR に存在する翻訳調節領域の構造解析で、そのメカニズムの解明を目標としている。これらの共同研究は、プロジェクトにおいてより重要な成果を上げること役立つと考えている。

平成24年度報告書に対する評価コメントについては、本年度以降の研究推進に役立てたい。また、今後も外部評価を継続する予定である。

## &lt;「中間評価時」に付された留意事項&gt;

中間評価時において、「立体構造情報が得られるかどうか研究加速の鍵となると思われます。NMR 機器があるので NMR 専従人員の穴埋めをするか、核酸の X 線解析がご専門の先生(竹中章郎先生)を客員に迎えられたので、結晶化実験専従人員を拡充し、かつ X 線解析専門の研究室との共同研究体制を構築する等の手当てをしたほうが良いかと思えます。」との所見をいただいた。

## &lt;「中間評価時」に付された留意事項への対応&gt;

RNA 研究の拠点を整備するという点からも、RNA について X 線結晶構造解析の体制を整備することが重要と考え、平成26年度より本学の根本直樹をメンバーに迎えた。根本は、タンパク質の X 線結晶構造解析が専門で、平成24年度に千葉工業大学に助教として着任した若い研究者である(平成27年度より准教授)。平成26年度には竹中先生の協力を得て学内に X 線回折系を設置した。竹中先生のアドバイスを受けつつ、根本と河合で RNA の X 線結晶構造解析の実験設備を整え、実際に坂本と根本が HIV-1 ゲノム RNA の 3'-UTR に由来する RNA の結晶化を進めている。

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

16

(千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備考
		法人負担	私学助成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他( )	
平成23年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	11,126	3,709	7,417	0	0	0	
	研究費	17,873	10,146	7,727	0	0	0	
平成24年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	
	研究費	19,000	11,309	7,691	0	0	0	
平成25年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	
	研究費	19,000	10,741	8,259	0	0	0	
平成26年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	
	研究費	13,911	8,083	5,828	0	0	0	
平成27年度	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	0	0	0	0	0	0	
	研究費	15,000	8,126	6,874	0	0	0	
総額	施設	0	0	0	0	0	0	
	装置	0	0	0	0	0	0	
	設備	11,126	3,709	7,417	0	0	0	
	研究費	84,784	48,405	36,379	0	0	0	
総計	95,910	52,114	43,796	0	0	0		

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

17

《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。)(千円)

施設の名目	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
津田沼校舎8号館4階	11	137 m <sup>2</sup>	1	9	0	0	
茜浜校舎分子構造測定室 (平成25年11月まで)	9	100 m <sup>2</sup>	2	10	0	0	
津田沼校舎8号館1階	25	59 m <sup>2</sup>	1	10	0	0	
津田沼校舎8号館4階	26	23 m <sup>2</sup>	1	10	0	0	

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

0 m<sup>2</sup>

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型番	台数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
<b>(研究装置)</b>							
高分解能NMR分光計	9	AVANCE600	1	23000 h			日本学術振興会
高分解能NMR分光計	25	AVANCE600	1	22000 h			無償譲渡
X線回折系	26	FR-E	1	150 h			無償譲渡
<b>(研究設備)</b>							
小型超望心機	23	小型望心機CS150GX II アングル型ロータS140AT S58A	1	18 h	5,995	3,997	文部科学省
分子間相互作用解析装置(QCM法)	23	NAPICOSシステムCPSA10A	1	200 h	5,131	3,420	文部科学省
RNA合成装置	9	Expedite8909	1	500 h			日本学術振興会
RNA精製装置	10	BioCAD700E	1	400 h			日本学術振興会
(情報処理関係設備) PCサーバーシステム	14	特注品	1	100 h	10,500	5,250	文部科学省

18 研究費の支出状況

(千円)

年度	平成 23 年度		積算内訳	
小科目	支出額	主な用途	金額	主な内容
<b>教育研究経費支出</b>				
消耗品費	12,443	試薬、冷媒	12,443	液体ヘリウム、液体窒素等
光熱水費				
通信運搬費				
印刷製本費				
旅費交通費	218	国内旅費	218	シンポジウム参加(北海道大学)等
報酬・委託料				
修繕費	851	装置修繕	851	核磁気共鳴装置修理
計	13,512		13,512	
<b>アルバイト関係支出</b>				
人件費支出 (兼務職員)				
教育研究経費支出 計				
<b>設備関係支出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)</b>				
教育研究用機器備品	751	製氷機、サーマルサイクラ	751	
図書				
計	751		751	
<b>研究スタッフ関係支出</b>				
リサーチ・アシスタント				
ポスト・ドクター	3,610		3,610	学内1人 月給(9ヶ月)+保険
研究支援推進経費				
計	3,610		3,610	学内1人

法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

年 度	平成 24 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	12,373	試薬、冷媒	12,373
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費	74	運搬費	74
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費	83	国内旅費	83
報 酬 ・ 委 託 料			
そ の 他	399	賃借料、奨学厚生費等	399
計	12,929		12,929
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 (兼務職員)	262		262
教育研究経費支出			
計	262		262
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	992	ヌクレオフェクター	992
図 書			
計	992		992
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント			
ポスト・ドクター	4,817		4,817
研究支援推進経費			
計	4,817		4,817

年 度	平成 25 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	9,628	試薬、冷媒	9,628
光 熱 水 費			
通 信 運 搬 費	7,950	運搬費	7,950
印 刷 製 本 費			
旅 費 交 通 費	542	国内旅費	542
報 酬 ・ 委 託 料			
そ の 他	600	修繕費等	600
計	18,720		18,720
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人 件 費 支 出 (兼務職員)	280		280
教育研究経費支出	0		
計	280		280
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	0		
図 書	0		
計	0		
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		
ポスト・ドクター	0		
研究支援推進経費	0		
計	0		



法人番号	121003
プロジェクト番号	S1101001

年 度	平成 26 年度			
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	8,406	試薬, 冷媒	8,406	液体ヘリウム、液体窒素等
光 熱 水 費				
通 信 運 搬 費	3,315	運搬費	3,315	X線回折系移設作業
印 刷 製 本 費				
旅 費 交 通 費	996	国外旅費, 国内旅費	996	学会参加(ダラス, 大阪大学, パシフィコ横浜)
報 酬・委 託 料				
そ の 他	522	修繕費 等	522	
計	13,239		13,239	
ア ル バ イ ト 関 係 支 出				
人 件 費 支 出 (兼務職員)	185 0		185	時給 1,000円, 年間時間数 185時間 実人数 3人
教 育 研 究 経 費 支 出	0			
計	185		185	
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教 育 研 究 用 機 器 備 品	216	バイオフィリーザー	216	
教 育 研 究 用 機 器 備 品	271	FASプリンター	271	
図 書	0			
計	487		487	
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	0			
ポスト・ドクター	0			
研究支援推進経費	0			
計	0			

年 度	平成 27 年度			
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳		
		主 な 使 途	金 額	主 な 内 容
教 育 研 究 経 費 支 出				
消 耗 品 費	7,191	試薬, 冷媒	7,191	液体ヘリウム等
光 熱 水 費				
通 信 運 搬 費				
印 刷 製 本 費				
旅 費 交 通 費	1,586	国外旅費, 国内旅費	1,586	学会参加(米国, 神戸国際会議場, 福岡国際会議場)
報 酬・委 託 料	63	委託料	63	英文校閲
そ の 他	316	修繕費 等	316	
計	9,156		9,156	
ア ル バ イ ト 関 係 支 出				
人 件 費 支 出 (兼務職員)	171		171	時給 1,000円, 年間時間数 171時間 実人数 1人
教 育 研 究 経 費 支 出				
計	171		171	
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)				
教 育 研 究 用 機 器 備 品	3,693	液体窒素再凝縮装置	3,693	
教 育 研 究 用 機 器 備 品	375	顕微鏡用CCDカメラ	375	
教 育 研 究 用 機 器 備 品	405	低温恒温器	405	
図 書				
計	4,473		4,473	
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出				
リサーチ・アシスタント	1,200	専門研究員	1,200	学内1人
ポスト・ドクター				
研究支援推進経費				
計	1,200		1,200	学内1人