

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05491

研究課題名(和文) 翻訳段階における遺伝情報変換

研究課題名(英文) Amino acid substitution without genetic modification

研究代表者

萩原 伸也 (Hagihara, Shinya)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80373348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的タンパク質の狙った位置のアミノ酸をDNAの塩基配列を変えることなく置換する革新的手法の開発を目指した。この方法は、細胞外からの遺伝子導入を必要とせず、発生後の個体においてもタンパク質の構造・機能を改変することができる。このため、倫理的に遺伝子組換えが制限される“ヒト”を標的としたアミノ酸置換が可能で、疾患リスク・薬剤感受性の制御や難治性遺伝子疾患の治療など、幅広い医療分野での技術革新が期待される。

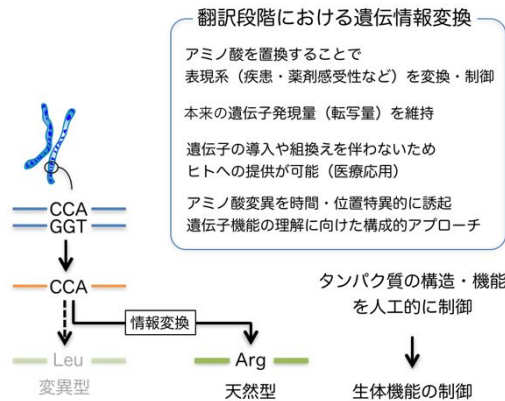
研究成果の概要(英文)：A nonsense mutation is a genetic mutation that converts a codon coding an amino acid to the stop codon called premature termination codon (PTC). This mutation causes a variety of diseases including Duchenne muscular dystrophy and cystic fibrosis. One of the potential methods for treating such diseases is readthrough therapy that is accomplished by the incorporation of an amino acid to PTC during translation and hence produces the full-length proteins. So far, aminoglycosides and other synthetic compounds that reduce the translation fidelity have been utilized to readthrough therapy. However, their toxicity due to the non-specific induction of inaccurate translation hampered their clinical use. In this study, we have developed a novel readthrough strategy that enables the target PTC-specific readthrough.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：革新的遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列の1塩基レベルの違い(1塩基多型)は、発現するタンパク質のアミノ酸配列の差(=機能の差)となり、様々な個体差(顔・形・疾患のかかりやすさ・薬剤感受性などの違い)や遺伝性疾患を引き起こす。このような1塩基多型と生体機能との相関は、続々と明らかにされており、高度にデータベース化されてきている。これらの情報を基に、タンパク質のアミノ酸配列を自在に変更できれば、タンパク質が担う様々な生体機能を制御することが可能である。これは、現時点で考えうる究極の生体機能制御法の一つである。



特に、遺伝子変異の中でもアミノ酸に対応したコドンが中途終止コドン (premature termination codon, PTC) に置き換わるナンセンス変異は、タンパク質合成が途中で停止するため生体機能への影響が大きく、多くの疾患の要因となっている。このようなナンセンス変異に由来する疾患の治療法として、翻訳時に PTC を読み飛ばして全長タンパク質を産生させる『リードスルー誘導法』が挙げられる。その候補化合物には、主にアミノグリコシド系抗生物質 (AG) が検討されてきた。AG は、リボソームに結合して翻訳の正確性を低下させ、mRNA のコドン情報と異なるアミノ酸を取り込ませることで抗生作用を示す。この仕組みが PTC に対して働くと、PTC に何らかのアミノ酸が取り込まれ、PTC の読み飛ばしが起こる。ただし、AG の作用は PTC に対して特異的に起こるのではないため、ランダムに変異の入ったタンパク質が合成される。従って、リードスルー効果の強い AG ほど細胞毒性も強い。また、十分なリードスルー効果を得るためには高い投与量が必要で、これが副作用 (腎毒性、耳毒性) の原因となっている。このような背景から、AG による PTC リードスルー治療は実現していない。

2. 研究の目的

申請者は、リードスルー誘導の上記課題に対し、標的 PTC の近傍に AG を局在させることで解決を図った。具体的には、mRNA に対して配列選択的に結合するオリゴ核酸を AG と連結することで、AG を mRNA 上の狙った

位置に提示する。これにより、リボソームが PTC を通過するときだけ AG が作用し、PTC 選択的なリードスルーが誘起される。本課題では、『塩基配列選択的な終止コドンのリードスルー法』の効率を向上させるとともに、標的を PTC だけでなく全コドンへ拡張を目指した。これにより、アミノ酸をコードしたコドンに対して本来の遺伝コードとは異なるアミノ酸を導入する『翻訳段階における遺伝情報変換』を実現する。

3. 研究の方法

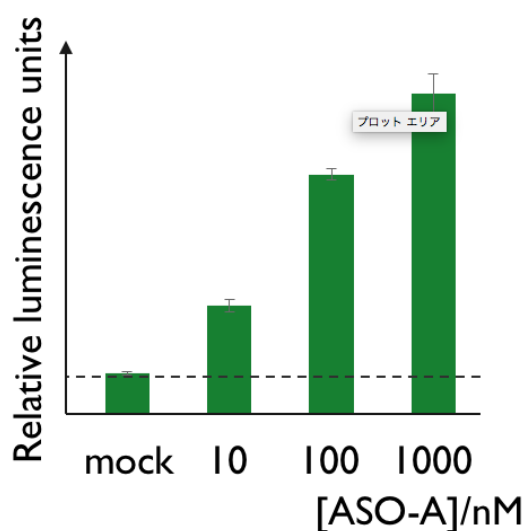
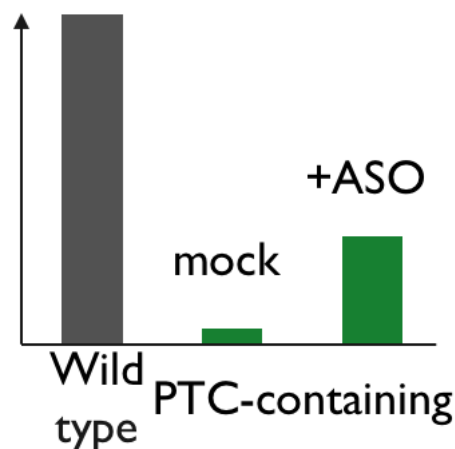
本研究の目的を達成するうえで鍵となるのは、標的コドンに対していかに効率よく、何のアミノ酸を導入できるか、である。初年度は、これらの2つの項目について、研究代表者と研究協力者 (大学院生) 1 名が集中的に検討した。初めに、ここで必要なリードスルー効果およびアミノ酸置換を評価する遺伝子発現系の構築を行なった。この発現系を用いて、無細胞翻訳系 (研究協力者: 多田安臣教授/名古屋大学より大量供給) で遺伝情報変換を定量的に解析・検証した。

4. 研究成果

当初は、「新規リボソーム結合性分子の迅速スクリーニング」を基盤としたリードスルー効率の向上をめざしていたが、後述の「アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた配列選択的終止コドンリードスルー誘導法」に関する研究において大きな進展があったため、注力して研究を行った。

ナンセンス変異は、アミノ酸に対応するコドンが終止コドン (PTC) に置きかわる変異で、タンパク質合成が途中で終了し機能不全のタンパク質が合成されるため、重篤な疾患につながる。そのような疾患を治療するための方法としてリードスルー療法が知られている。この手法では、リボソームが PTC を翻訳する際にアミノアシル tRNA を取り込ませることで、全長タンパク質を産生させる。翻訳の正確性を低下させるアミノグリコシドなどの化合物は、リードスルー治療に利用されてきた。しかし、不正確な翻訳を非特異的に誘導することによる毒性が臨床応用を制限している。本研究では、標的の終止コドン特異的なリードスルーを可能にする新規リードスルー戦略の開発を行った。

我々は、真核生物の翻訳終結機構に着目した。近年報告された cryo-EM 分析によって、真核生物終結因子 (eRF1) は終止コドンに結合すると、mRNA を U 字型コンフォメーションに変形させることが示された。U-turn の形成は mRNA をリボソーム進入トンネルに引き込む。したがって、PTC の下流に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) が、mRNA の引き込み、すなわち翻訳終結を妨害し、アミノアシル tRNA の取り込みを誘導すると仮定した。実際に、適切な配列の ASO がリードスルーを誘起することが示された。



本研究の比較対象となるのは、遺伝子組換えや遺伝子導入である。モデル生物や培養細胞レベルでは、遺伝子組換えにより標的アミノ酸の置換されたタンパク質を発現できる。しかし、胎生致死の変異を導入できないなど、遺伝子組換えには技術的な限界が存在する。さらに、倫理的な観点からヒトの個体を対象にできないため、医療への直接応用は不可能である。遺伝子導入は、目的のタンパク質をコードした遺伝子を細胞へ導入して発現させる手法で、医療応用を目指し様々な方法が試されている。しかし、最初の臨床研究が実施されてから 20 年以上経過した現在でも、安全で効率的な遺伝子治療の実用化には至っておらず、その将来性を疑問視する声も出ている。遺伝子導入の問題点の一つは、導入した外来遺伝子がゲノムに取り込まれて起こる副作用（癌化など）である。また、生体内の遺伝子発現量は厳密に制御されているのに対し、導入遺伝子からの発現量をコントロールするのが困難という課題も存在する。

以上の様な従来法の問題点を、一挙に解決するのが「翻訳段階における遺伝情報変換」である。本手法は、遺伝子としての性質を持たない機能性分子を細胞内へ導入することにより、タンパク質合成の段階でアミノ酸置

換を誘起する。このため、遺伝子組換えや遺伝子導入に見られる“倫理的問題”を回避できる。また、翻訳段階で作用するため、転写因子などによって厳密に制御されている細胞本来の遺伝子発現量に影響を与えない。簡便かつ安全にアミノ酸を置換できる本手法は、真の意味での遺伝子治療を実現する革新的な生体機能制御法であり、その波及効果は計り知れない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shun Yamashita, Dominik Bergmann, Ayato Sato, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Hans-Ulrich Humpf, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara

“High-throughput Assay for Quantification of Aminoglycoside-Ribosome Interaction”
Chem. Lett., **2016**, 45, 1048-1050. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

山下隼・伊丹健一郎・萩原伸也

「アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた配列選択的終止コドンリードスルー誘導法」

日本化学会 第 98 春季年会 4D7-17 日本大学理工学部 船橋キャンパス 千葉 2018 年 3 月 23 日 (口頭, B 講演) 山下隼, 佐藤綾人, 野元美佳, 多田安臣, 伊丹健一郎, 萩原伸也

Shun Yamashita, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara

「Antisense Oligonucleotides that Induces Sequence-specific Readthrough of Termination Codon」
グリーン自然科学国際教育研究プログラム IGER 2017 年度年次報告会 G-31 名古屋大学 愛知 2018 年 1 月 10 日 (ポスター)

Shun Yamashita, Ayato Sato, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara

“High throughput screening for the molecules that bind to ribosome”,
International ERATO Itami Molecular Nanocarbon Symposium 2017, P-29, Japan, 3rd Aug. 2017 (Poster)

山下隼・佐藤綾人・伊丹健一郎・萩原伸也

「新規リボソーム結合性分子の迅速スクリーニング」

日本化学会 第 97 春季年会 4D4-11 慶應義塾大学 日吉キャンパス 神奈川県 2017 年 3 月 19 日 (口頭, A 講演)

Shun Yamashita, Ayato Sato, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara
「High throughput screening for the novel translation regulator」
グリーン自然科学国際教育研究プログラム IGER 2016 年度年次報告会 G-37
名古屋大学 愛知 2017 年 1 月 13 日 (ポスター)

山下隼, 佐藤綾人, 伊丹健一郎, 萩原伸也
「リボソーム結合分子の開発と応用」
第 10 回バイオ関連化学シンポジウム
1P-064 もてなしドーム地下イベント広場 金沢 2016 年 9 月 7 日 (ポスター)

山下隼, 野元美佳, 佐藤綾人, 伊丹健一郎, 萩原伸也
「リボソーム結合分子の新規スクリーニング法の開発」
生体機能関連化学部会若手の会 第 28 回サマースクール P-35 西浦温泉旅館ホテルたつき 蒲郡 2016 年 7 月 15 日 (ポスター)

Shun Yamashita, Mika Nomoto, Yasuomi Tada, Ayato Sato, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara
「High throughput screening of novel translation inhibitors」
統合物質創製化学研究推進機構 キックオフシンポジウム P-42 名古屋大学 名古屋 2016 年 6 月 23 日 (ポスター)

Shun Yamashita, Ayato Sato, Kenichiro Itami, Shinya Hagihara
“Screening of small molecules that bind to ribosome”
The 5th International Conference on MEXT project of Integrated Research on Chemical Synthesis, P-05, Nagoya University, Japan, 29th Jan. 2016. (Poster)

山下隼, 萩原伸也, 佐藤綾人, 野元美佳, 多田安臣, 伊丹健一郎
「新規リボソーム結合性分子の探索」
第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2P-061, 熊本大学黒髪南キャンパス, 熊本, 2015 年 9 月 11 日 (ポスター)

「新規翻訳制御分子の探索に向けたスクリーニング法の開発」
第 3 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, P-57, 熊本大学黒髪南キャンパス, 熊本, 2015 年 9 月 9 日 (ポスター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 伸也 (HAGIHARA, Shinya)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 80373348

(2) 研究協力者

山下 隼 (YAMASHITA, Shun)