

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19288

研究課題名（和文）人為的核酸修飾を介したナンセンス変異のリードスルー化による疾患治療法

研究課題名（英文）A disease therapy by read-through of nonsense mutations via artificial nucleobase modification

研究代表者

塚原 俊文（Tsukahara, Toshifumi）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60207339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ナンセンス変異を原因とする疾患治療法として翻訳リードスルー法が研究されているが、従来の方法では本来の終止コドンまでリードスルーしてタンパク質に余分なC末端を付加する結果となっていた。本研究では変異によって生じた未成熟終止コドンの塩基を化学修飾してリードスルーを誘発させることが可能かを検証し、またリードスルー効率の高い修飾塩基を検索した。修飾塩基を含んだmRNAを高効率で翻訳するため、合成RNAの上流にSD配列あるいはIRESを付加することで、修飾塩基による翻訳リードスルーの検証系を確立した。また新たに5-methyl Uや5-fluoro Uによってもリードスルーが発生することも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって修飾塩基を含んだ完全合成RNAから無細胞翻訳系で高効率にタンパク質を合成するシステムが構築され、翻訳リードスルーを誘発する修飾塩基の検索が容易となった。また、新たに5-methyl Uや5-fluoro Uによっても翻訳リードスルー誘発が可能であることが示された。この結果は他の修飾塩基によっても翻訳リードスルーが可能であることを示唆する。既に様々な核酸塩基修飾法が知られていることから、高い翻訳リードスルー効率の修飾塩基が検索出来れば、細胞内の変異したRNAを修飾することによる翻訳リードスルーの誘発が可能となり、多くのナンセンス変異を原因とする遺伝性疾患の治療が可能となる。

研究成果の概要（英文）： Translation read-through methods have been studied for the treatment of nonsense mutation-caused diseases, but the conventional methods read-through to the original termination codons and add extra C-terminus to the proteins. In this study, we examined whether it is possible to induce read-through by chemically modifying nucleobases of premature termination codons caused by point mutations, and searched for modified nucleobases which induce read-through with high efficiency. In order to efficiently translate mRNAs containing modified bases, we have established a system to verify the translation read-through by modified bases by adding SD sequence or IRES to the upstream of the synthetic RNA. We also found that readthroughs were also generated by 5-methyl U and 5-fluoro U.

研究分野：分子生物学

キーワード：修飾塩基 リードスルー 遺伝コード修復 終止コドン 無細胞翻訳系 合成RNA IRES

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

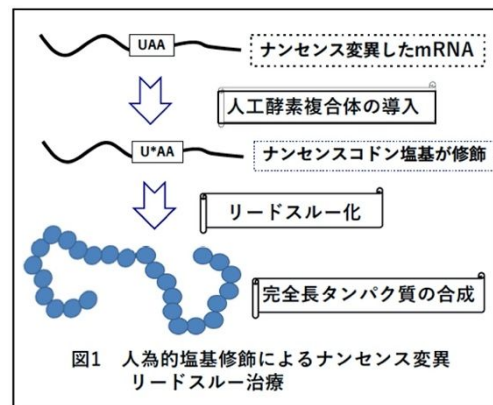
### 1. 研究開始当初の背景

全遺伝性疾患の11%、コーディング領域の点変異を原因とする疾患では20%がナンセンス変異を原因とする疾患である (Mort M, *et al. Human Mutation*, **29**, 1037-1047, 2008)。この様な疾患の治療法として薬物を用いて変異によって生じた未熟終止コドンをリードスルーさせ、完全長タンパク質を発現させる医薬が提案されている。アミノグリコシド系抗生物質にリードスルー作用が発見されるなど、研究が進展しているが、実用化には至っておらず、またリードスルー作用の分子機構も解明されていない。変異したサプレッサー-tRNA を利用してリードスルーさせる試みもあるが、いずれにせよ従来の方法では本来の終止コドンをも抑制し、目的以外の多くのタンパク質で終止すべきタンパク質合成が止まらず、余分な C 末端を付加してしまう結果にもつながることが懸念されてきた。一方、Karijolich と Yu は終止コドン中の U を (Pseudouridine) に変換すると、Watson-Crick 型塩基対の形成が阻害されて他のコドンとして認識され、結果としてリードスルーされることを示した (*Nature*, **474**, 395-398, 2011)。この結果は、終止コドンの塩基を化学修飾して本来のサプレッサー-tRNA ではなく、アミノアシル tRNA を結合させることができれば、リードスルー可能であることを示す。この結果は U から への置換 (修飾) によって、本来のサプレッサー-tRNA よりも Ser や Thr のアミノアシル tRNA とより強く結合したと考えられるが、Ser または Thr の tRNA には XAA や XAG のアンチコドンは存在せず、これらの塩基対形成は水素結合形成によって説明できる Watson-Crick 型塩基対形成とは異なる原理による現象と考えられた。

一方、我々は変異 RNA の遺伝コードを細胞内で修復する方法を研究し、RNA editing を触媒する酵素、Adenosine Deaminase Acting on RNA 1 (ADAR1) の活性ドメインと標的 RNA に相補的に結合する guide RNA が MS2 システムを介して細胞内で結合する人工酵素複合体の開発にも成功した。ナンセンス変異を導入した EGFP-mRNA の遺伝コードを当該酵素複合体遺伝子を細胞に導入することによって修復に成功した (Azad MdTA, *et al. Gene Therapy*, **24**, 779-786, 2017)。既に多くの塩基修飾酵素が同定され、構造や機能解析も進んでいることから、同様の方法で塩基配列特異的な塩基修飾の導入は可能である。即ち、リードスルー化に有効な塩基修飾が同定できれば、当該塩基修飾を触媒する人工酵素の開発を行うことが可能であり、ナンセンスを原因とする疾患の治療に資すると期待されていた。

### 2. 研究の目的

上述した様に、Karijolich と Yu の結果から我々は終止コドンの塩基を化学修飾することで本来のサプレッサー-tRNA ではなく、アミノ酸付加用のアミノアシル tRNA を結合させることが可能ではないかと考えた。図1に示した様に、本研究の目的は、修飾塩基という夾雑官能基の存在によって、Watson-Crick 型塩基対形成がどのように影響を受けるのかを解明し、さらに未成熟終止コドンをリードスルー化させる修飾塩基を明らかにすることである。遺伝性疾患の多くは治療法の確立していない難病であり、根本的治療法としては遺伝子治療しか無いのが実情である。しかし、従来の遺伝子治療は変異によって『壊れた』遺伝子の代わりに機能を代償する外来遺伝子を導入するというものであった。患者細胞内に発現している『壊れた』遺伝子を『修復する』という構想は我々が提唱しているもので、世界的にも類を見ないものである。

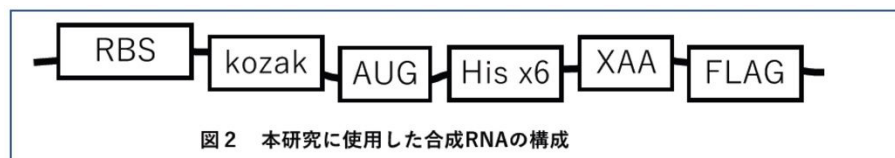


### 3. 研究の方法

周知の様に、U および A は全ての終止コドンに共通に存在する。これら塩基が化学修飾されると Watson-Crick 型塩基対形成が乱れることが予想される。まず、修飾塩基を終止コドンに含み、その上流に Hisx6 (His-tag) を、下流には FLAG 配列を有する RNA を化学合成し、無細胞翻訳系でタンパク質を *in vitro* 合成する。翻訳産物を抗 His-tag および抗 FLAG 抗体を用いて確認することでリードスルーの可否が判定できる。具体的には下記の様に行った。

#### (1) 修飾塩基含有 RNA の委託合成

図2に示した様に、Ribosome Binding Site (RBS) の下流に開始コドンと Hisx6、さらに下流に修飾塩基 X を含んだ終止コドン (XAA) と FLAG を配した RNA を委託合成した。修飾塩基には、N3-methyl-U、5-fluoro-U、5-methyl-U を用いた。ポジティブコントロールとしては X に A を用いた。なお、配列に対応する RNA 配列のコドンについてはヒトのコドン使用頻度に準じた。



## (2)合成 RNA への SD 配列、IRES 配列の付加

合成 RNA を効率よく翻訳する目的で、5' 端に SD 配列あるいは IRES (internal ribosome entry site) を付加するため、合成 RNA の 5' 端と付加する配列の 3' 端に相補的な splint-oligo DNA を加えて RNA ligase を用いて結合した。

## (3) *In vitro* 翻訳とリードスルーの確認

化学合成した RNA あるいは SD や IRES 配列を付加した RNA を無細胞翻訳系で *in vitro* 翻訳し、反応産物 2  $\mu$ l をメンブレンにスポットした。これを抗 Hisx6 あるいは抗 FLAG 抗体を用いてプロットした。無細胞翻訳系として、まず全合成翻訳系である PURE flex を用い、さらにウサギ網状赤血球由来無細胞翻訳系、HeLa 細胞由来無細胞翻訳系を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 翻訳効率の高い RNA 配列の検討

様々な修飾塩基を含んだ RNA を調製するためには化学合成が便利である。そのため、完全化学合成 RNA を用いて *in vitro* でタンパク質合成する実験系を確立した。図 1 に示したドメイン構成に対応する RNA 配列を決定し、委託合成した。5' 端に RBS と Kozak 配列を配置し、さらに開始コドン、Hisx6、終止コドンの UAA、さらに FLAG と続く全合成 RNA をネガティブコントロールとした。終止コドンの U に代えて様々な修飾塩基とした修飾塩基含有 RNA も合成した。修飾塩基としては、先行研究で成功している および 5-methyl U、5-fluoro U、N3-methyl U を選んで実験を行った。ポジティブコントロールには U を A に代え AAA (Lys) とした RNA と U に代えた RNA を用いた。これら RNA を委託合成したものを以下の実験に用いた。

### (2) 無細胞翻訳系を用いた *in vitro* 翻訳におけるリードスルー

上記の全合成 RNA を PURE flex あるいは HeLa 細胞由来無細胞翻訳系を用いてタンパク質合成を行い、反応試料 2  $\mu$ l をナイロンメンブレンに滴下し、抗 Hisx6 抗体あるいは抗 FLAG 抗体でドットプロットした。PURE flex の系では AAA で翻訳されたタンパク質が His tag、FLAG tag 共に確認されたが、5-methyl U あるいは 5-fluoro U ではシグナルが弱く、有意な結果は得られなかった。しかし再現性は低いが 5-methyl U あるいは 5-fluoro U において より強いシグナルが観察される傾向であった。一方、ウサギ網状赤血球あるいは HeLa 細胞由来の系では AAA も含めてシグナルが観察出来なかった。これはコピキチン系による分解のためと推察された。プラスミドから *in vitro* 転写した mRNA に比べると 1/10 以下ではあるが、幾つかの修飾 U を導入した終止コドンではリードスルー現象が発生することが示された。しかしながら再現性が低かったため、翻訳配列の検討を行った。

### (3) 完全合成 RNA を用いた無細胞翻訳実験系の確立

上記の結果における再現性の低さはタンパク質合成能が低いためと考えられた。そこで翻訳効率向上のため、合成 RNA の上流に SD (Shine-Dalgarno) 配列を付加することで翻訳効率を改善を試みた。また、翻訳開始直後の配列の検討も行った。

具体的には SDx 配列 RNA と合成 RNA を両者に相補的な splint oligo DNA と RNA リガーゼによって結合させることで、大腸菌由来の無細胞翻訳系での翻訳効率は従来の 10 倍以上に向上した。同様に、IRES (internal ribosome entry site) 配列を合成 RNA の上流に結合させることで、哺乳動物由来の無細胞翻訳系でも同様に、再現性良くタンパク質への翻訳確認ができることを確認し、検証可能な実験系を確立することが出来た。

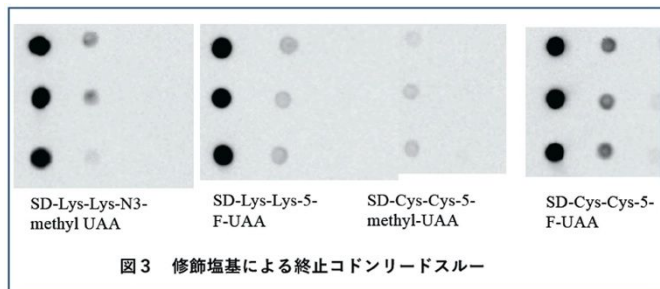


図3 修飾塩基による終止コドンリードスルー

### (4) リードスルーに有効な修飾塩基の検討

修飾塩基としてはこれまでに、N3-methyl U および 5-fluoro U に *in vitro* 翻訳系での終止コドンではリードスルー現象が発生することを確認した他、新たに A の誘導体である Clitocine に翻訳リードスルー効果を認めた。これらの結果は、終止コドンの A または U を部位特異的に修飾することによって、ナンセンス変異を有する mRNA だけを特異的にリードスルーできることを示した。即ち、細胞内で塩基配列特異的に A または U を修飾することができればナンセンス変異はリードスルーされ、完全長タンパク質の翻訳が実現できることが示唆され、翻訳リードスルー療法に新しい可能性が拓かれた。

メチル化やハロゲン化については化学的、あるいは酵素化学的な修飾法が存在しており、また我々は酵素活性部位を標的 RNA に特異的な guide RNA でリクルートし、標的塩基の脱アミノ化修飾に成功している。従って、この方法を利用して標的 RNA の終止コドンの特異的に修飾することでナンセンス変異をリードスルーする疾患治療が可能であると考えた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saifullah, Satoshi Fuke, Hiroshi Nagasawa and Toshifumi Tsukahara	4. 巻 66
2. 論文標題 Single nucleotide recognition using a probes-on-carrier DNA chip.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 73 - 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/btn-2018-0088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Md. Thoufic Anam Azad, Umme Qulsum, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 19
2. 論文標題 Comparative Activity of Adenosine Deaminase Acting on RNA (ADARs) Isoforms for Correction of Genetic Code in Gene Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 31 - 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1566523218666181114122116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sonali Bhakta, Md Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic code restoration by artificial RNA editing of Ochre stop codon with ADAR1 deaminase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Engineering , Design and Selection	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/protein/gzz005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Umme Qulsum, Md. Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 62
2. 論文標題 Analysis of tissue-specific RNA editing events of genes involved in RNA editing in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Biology	6. 最初と最後の頁 351 - 358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12374-018-0452-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasithorn Wanna-Udom, Minoru Terashima, Hanbing Lyu, Akihiko Ishimura, Takahisa Takino, Matomo Sakari, Toshifumi Tsukahara, Takeshi Suzuki	4. 巻 524
2. 論文標題 The m6A methyltransferase METTL3 contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 150 - 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonali Bhakta, Toshifumi Tsukahara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Artificial RNA editing with ADAR for gene therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Md Thoufic Anam Azad, Sonalo Bhakta, Matomo Sakari
2. 発表標題 Artificial RNA editing enzymes for RNA restoration in vivo
3. 学会等名 Malaysia-Japan Joint International Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Md Thoufic Anam Azad, Sonalo Bhakta, Matomo Sakari
2. 発表標題 Site-Directed RNA Editing of Mutated RNAs by Artificial Enzymes
3. 学会等名 BIT's 9th World Gene Convention-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sonali Bhakta, Md. Thoufic Anam Azad, Toshifumi Tsukahara
2. 発表標題 Artificial RNA Editing in (BFP) Blue Fluorescence Protein (Derivative of GFP) by Using APOBEC1 Deaminase for Restoration of Genetic Code
3. 学会等名 World Congress of Molecular & Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifumi Tsukahara, Sonali Bhakta, Md. Thoufic Anam Azad
2. 発表標題 Genetic Code Restoration by Using Artificial RNA Editing for G to A mutated mRNAs
3. 学会等名 World Congress of Molecular & Cell Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タンパク質を生合成させる方法および未成熟終止コドンの修飾方法	発明者 塚原 俊文、盛 真友、田中 龍太	権利者 北陸先端科学技術大学院大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-018379	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	盛 真友  (Sakari Matomo)  (90466772)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・研究員    (13302)	