

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32713  
研究種目：挑戦的研究（萌芽）  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K22581  
研究課題名（和文）中枢型トリプトファン水酸化酵素のエクソン・スキップによる翻訳抑制解除と創薬

研究課題名（英文）Removal of translation repression of tryptophan hydroxylase 2 and drug discovery by exon skipping strategy

研究代表者  
廣井 朋子（Hiroi, Tomoko）  
聖マリアンナ医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：20238398  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳におけるセロトニン合成量を増加させることを目的として、合成の律速酵素であるTPH2の産生量を増加させるため、当初はTPH2のエクソン2をスキップさせることで自己翻訳抑制ドメインの一部を欠失させ、抑制作用を解除しようと試みた。ところが、エクソン2をスキップさせても発現抑制は全く解除されず、その原因として、エクソン3にこれまで発見されていなかった強力な自己翻訳抑制作用があることを見出した。その抑制作用は塩基配列依存性であり、転写には影響せず翻訳を抑制すること、アンチセンス側の配列でも効果があり、遺伝子翻訳領域に存在することが必要であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
セロトニン作動性神経系の機能障害は、不安障害、気分障害など様々な疾患の原因となる。中枢型トリプトファン水酸化酵素（TPH2）は重要な創薬標的であるが、その転写制御機構は極めて複雑であり、未だTPH2発現量を増加させるための画期的な方法は見出されていない。今回見出された[翻訳領域に存在する翻訳抑制塩基配列]は、これまでの転写制御解明のための研究において、発現量が増加する結果を鮮明に得られなかった原因のひとつであると考えられる。これは今後の研究を進める上で重要な発見であり、転写制御機構の解明と並行して、この翻訳抑制機構を解明することが、TPH2発現量を増加させるために必須となる。

研究成果の概要（英文）：Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) is the rate-limiting enzyme in serotonin (5-HT) synthesis in the brain. Previous studies have shown that the human TPH2 (hTPH2) exon 2 contains a translational auto-repression domain. During this project, we initially attempted to increase the hTPH2 protein levels by skipping of the hTPH2 exon 2. Contrary to our expectation, skipping of the hTPH2 exon 2 did not increase the hTPH2 levels. Instead, in-depth analysis of regulatory effects of the hTPH2 exon 3 on the hTPH2 translation revealed that the hTPH2 exon 3 contains a previously unappreciated potent translational auto-repression element (TRE). The hTPH2 exon 3 TRE inhibited the hTPH2 translation in a nucleotide sequence-dependent, but an encoded amino acid sequence-independent manner. The hTPH2 exon 3 TRE did not affect the hTPH2 transcription levels, and only repressed the hTPH2 translation when localized within the hTPH2 protein-coding region.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソン・スキップ 翻訳抑制

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セロトニン(5-HT)作動性神経系の機能障害に起因する様々な疾患に対する薬を開発する上で、5-HT 生合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素(TPH)は重要な創薬標的である。TPH の 2 つのアイソフォームのうち、縫線核など中枢神経系に特異的に発現する中枢型 TPH (TPH2)<sup>1)</sup> については、脳内セロトニン合成量を増加させることを目指して多くの研究がなされているが、未だその発現量を増加させる画期的な方法は見出されていない。研究代表者らはこれまでに、TPH2 遺伝子の発現制御機構を解明する研究を進めてきた<sup>2)</sup> が、複雑な転写制御機構であるため、生合成活性を増加させるために転写制御機構そのものを創薬標的とすることは、かなり困難であると予想される。

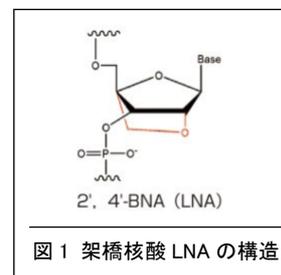
### 2. 研究の目的

TPH2 には、N 末端に自己翻訳抑制活性をもつドメインが存在し、それを欠失させるとタンパク発現量が増加するという報告があった<sup>3)</sup>。それによると翻訳抑制ドメインはエクソン 1 と 2 にまたがっているため、150 塩基のエクソン 2 をスキップさせることで翻訳抑制ドメインの一部でも欠失させれば、高次構造が変化して抑制活性が解除される可能性があると考えた。特定のエクソンを破断させる機能をもつアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Duchenne 型筋ジストロフィーの治療において核酸医薬品として実用化されている。本研究における当初の目的は、脳内セロトニン合成量を増加させることができる核酸医薬品の候補として、エクソン 2 をスキップさせる効果のあるオリゴヌクレオチドを策定し、その効果を検証することであった。

### 3. 研究の方法

(1) エクソン 2 破断活性を検出するため、エクソン 1,2,3 およびイントロン 1,2 の一部を含むミニジーンであるプラスミド「pCMV-Ex123-Luc」を構築した。まず発現ベクター pCMV-Script のクローニング部位に、レポーターとして市販のルシフェラーゼアッセイベクターよりルシフェラーゼ遺伝子部分を増幅したものを挿入し(pCMV- Luc)、翻訳開始点 ATG の直下に、[ATG より下流の TPH2 エクソン 1 (以下、これを「E1」とする)]、[イントロン 1 の下流約 300 塩基]、[エクソン 2 (以下、「E2」)]、[イントロン 2 の上流約 300 塩基]、[エクソン 3 の最後の 1 塩基を除いたもの(アミノ酸読み取り枠がずれないように 3 の倍数とするため) (以下、これを「E3」とする)]を順次挿入した。

(2) E2 におけるエクソン内スプライシング促進配列(exonic splicing enhancer; ESE)<sup>4)</sup> を探索するため、オンラインツール ESE Finder 3.0 ([http://kramer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese\\_finder.cgi?process=home](http://kramer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home)) により、候補配列の結合可能性スコアを得た。スコアの高い 8 か所を E2 の ESE 候補配列として選択 (ESE1~ESE8 と命名) し、その機能を阻害するためのアンチセンスオリゴを合成した。Duchenne 型筋ジストロフィーのエクソン・スキップに関する論文<sup>5)</sup> にならって、アンチセンスオリゴは架橋核酸および RNA より成る 18 塩基のキメラオリゴとし、両端の 5 塩基を架橋核酸とすることとした。架橋核酸としては 2,4-BNA(LNA) (図 1) を選択した。



(3) ラット褐色細胞腫由来 PC-12 細胞 (ATCC, CRL-1721) (神経細胞のモデル細胞であるが TPH2 を発現しない) へ、pCMV-Ex123-Luc とアンチセンス LNA-RNA キメラオリゴを共にトランスフェクションし、一定時間後に全 RNA を調整した。E1 および E3 内にあるプライマーを用いて RT-PCR を行い、その産物について断片長を確認し、E2 破断活性の有無を検証した。

(4) E2 破断活性が高かった ESE4 の LNA-RNA キメラオリゴを選択して、ヒト肺小細胞癌由来 SHP-77 細胞 (ATCC, CRL-2195) (肺癌細胞であるが TPH2 を発現している) にトランスフェクションし、(3) と同様に RT-PCR によって内在性の TPH2 についても E2 破断活性があることを確認した。内在性の TPH2 mRNA は発現量が少ないため、RT-PCR 後 nested-PCR をすることによって、増幅産物の泳動像を得た。

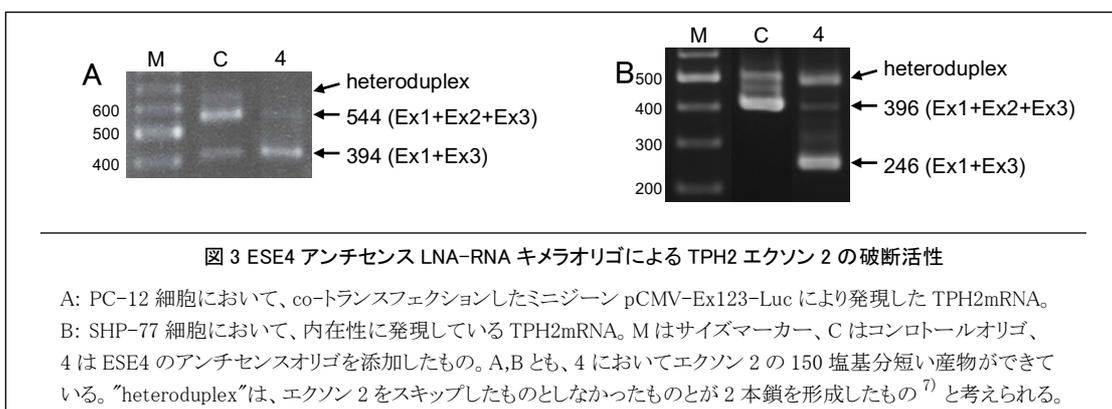
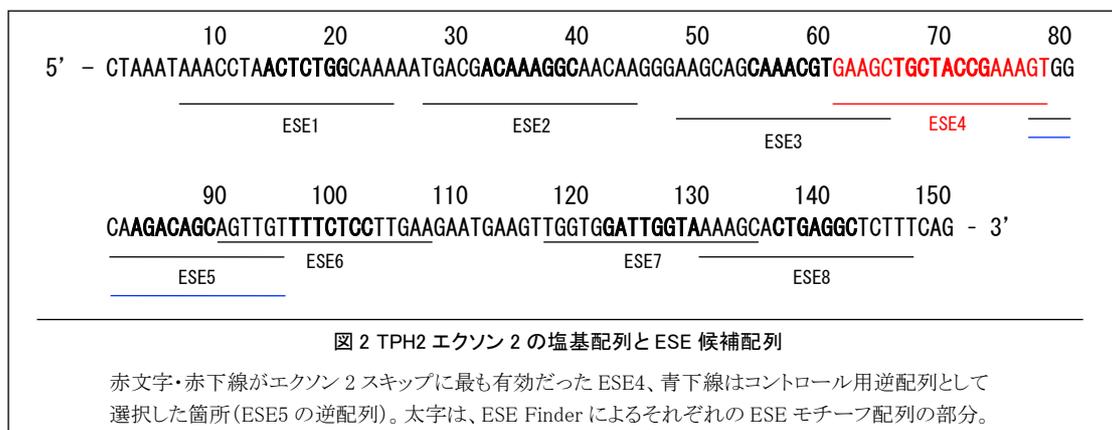
(5) E2 破断活性のあるアンチセンス配列は見出せたが、ミニジーン pCMV-Ex123-Luc では、コントロール用のセンスオリゴでも少量ではあるが非定型的スプライシングを受けた mRNA ができてしまい、ルシフェラーゼアッセイによっては発現量の増減は観察できなかった。そのため、ミニジーン pCMV-Ex123-Luc からイントロン部分を除き、発現ベクター pCMV-Luc の翻訳開始点 ATG の直下に E1, E2, E3 を様々な組み合わせで挿入したプラスミドを作成した。これを PC-12 細胞にトランスフェクションして、TPH2 エクソン由来のアミノ酸とルシフェラーゼとの融合タンパク質を発現させ、ルシフェラーゼアッセイにより発現量を測定した。

(6) ルシフェラーゼの N 末端に TPH2 の E3 由来のアミノ酸が融合したタンパク質の立体構造を、PDB のデータ 1BA3 (firefly luciferase)<sup>6)</sup> を用いて、分子動力学シミュレーションソフト Amber16 によって予測し、融合ペプチド部分がルシフェラーゼの活性に深刻な影響は及ぼさないであろうことを確認した。

(7) (5)のプラスミドをPC-12 細胞にトランスフェクション後、一定時間後に全 RNA を調整した。ルシフェラーゼの一部を増幅するプライマーを作成し、One Step TB Green Prime Script PLUS RT-PCR Kit (TAKARA) および Thermal Cycler Dice Real Time System III (TAKARA)を用いてリアルタイム RT-PCR を行い、ルシフェラーゼ mRNA 発現量を定量した。

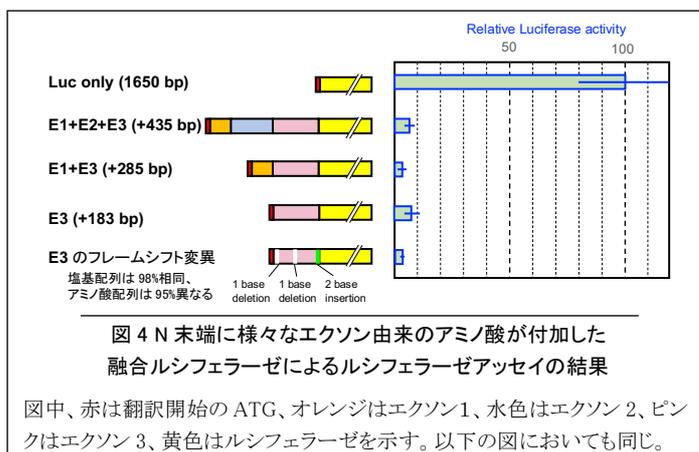
#### 4. 研究成果

(1) TPH2 のエクソン 2 を効率良く破断するエクソン内スプライシング促進配列(ESE)を発見した。8 箇所 ESE 候補配列のうち、最も E2 の破断活性が高かったものは、E2 中央付近の「ESE4」であった(図 2)。このアンチセンス LNA-RNA キメラオリゴは、SHP-77 細胞においても、内在性 TPH2 の E2 を効率良く破断した(図 3)。

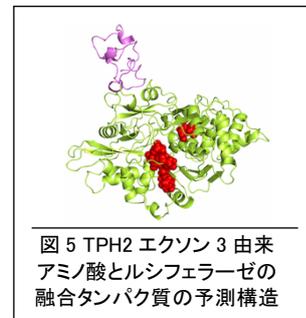


(2) E2 を破断したことによる発現量の変化を確認するため、発現ベクター pCMV-Luc の翻訳開始点 ATG の直下に E1+E2+E3 および E1+E2 を挿入したものを PC-12 細胞にトランスフェクションして、ルシフェラーゼアッセイにより発現量を測定した。その結果、E2 を破断しても、ルシフェラーゼ発現量は増加しないことが判明した(図 4)。

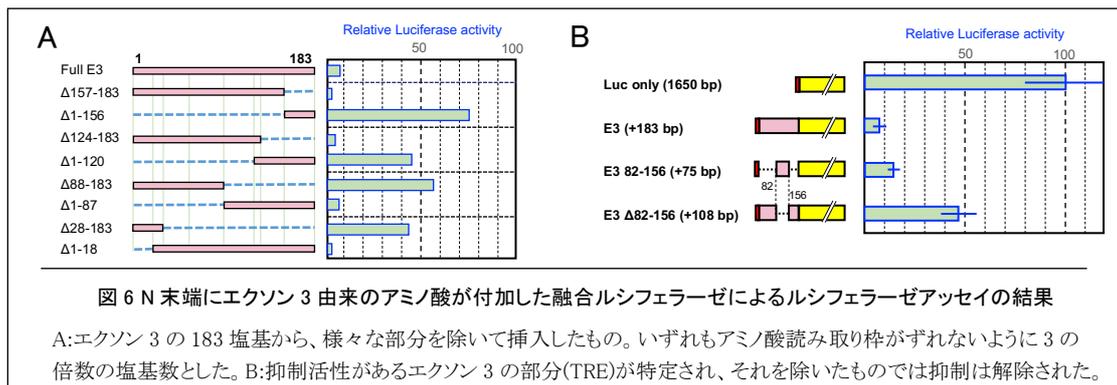
(3) E3 だけを挿入したのもも作成したところ、E3 だけでも強い発現抑制がみられた。また、2 箇所の 1 塩基欠失と 2 塩基追加によってフレームシフト変異を起こさせ、塩基配列が 98%相同で、翻訳されるアミノ酸配列は 95%異なるようにした E3 も試みたところ、それでも同様に抑制された(図 4)ことから、この抑制作用はアミノ酸配列依存性ではなく、塩基配列依存性であることが示唆された。



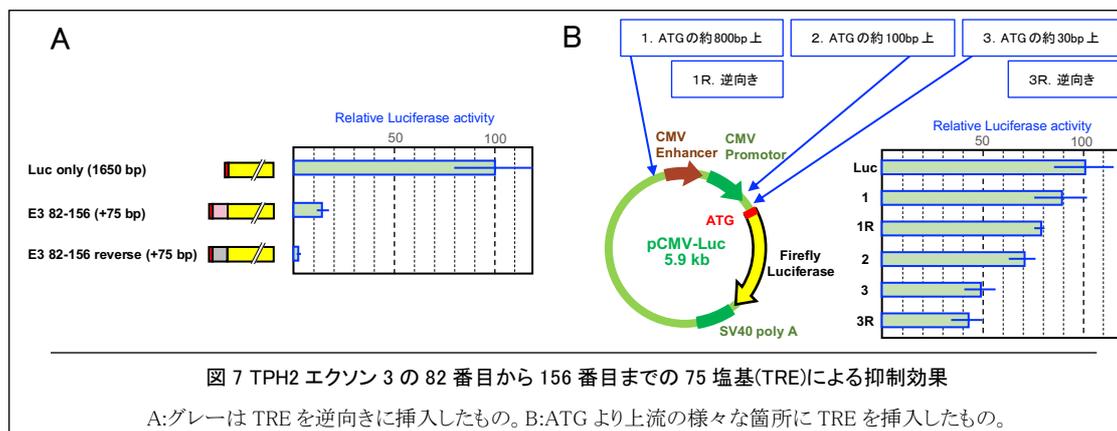
(4) E3 の 183 塩基由来のアミノ酸 61 残基をルシフェラーゼの N 末端に融合させたタンパク質の構造について、分子動力学シミュレーションソフト Amber16 によって予測した(図 5)。ルシフェラーゼの構造および活性に重要な 9 アミノ酸の部位(図 5 中、緑および赤で描画)は、PDB 1BA3<sup>6)</sup> による。E3 由来のアミノ酸部分(図 5 中、ピンクで描画)は、ルシフェラーゼの酵素活性に対して重大な影響は及ぼさないであろうと考えられ、ルシフェラーゼアッセイの結果は、ルシフェラーゼ発現量を反映していると考えられた。



(5) E3 の塩基配列を、結合配列検索ソフト JASPAR 2020 を用いて探索し、様々な候補因子およびその結合モチーフを含む塩基配列の候補を得た。結合モチーフの区切りが良い箇所を考慮して、E3 の塩基配列のうち、抑制作用がある領域は 82 番目から 156 番目の 75 塩基であることを特定した(図 6)。この 75 塩基を「translational auto-repression element (TRE)」と命名した。



(6) TRE は、アンチセンス側が翻訳されたとしてもストップコドンは現れず、無関係なアミノ酸配列となつて翻訳は止まらない。そのため、そのまま逆向きに挿入して抑制作用を確認した。結果は、逆向きに挿入しても抑制した(図 7A)。また、ATG より下流に挿入して融合タンパク質として翻訳させるのではなく、1. 発現ベクターのプロモーターやエンハンサーよりもさらに上流、2. プロモーターの直後、3. 転写されるが翻訳はされない ATG の直前、の 3 箇所に TRE を挿入して、それぞれの抑制作用を確認した。結果は、翻訳領域よりも上流に挿入した場合は、抑制作用はみられなかった(図 7B)。



(7) トランスフェクションした PC12 細胞より RNA を抽出し、ルシフェラーゼの一部を増幅するプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行って、ルシフェラーゼ mRNA 発現量を定量したところ、いずれのクローンにも大きな差はなく、ルシフェラーゼアッセイの値と mRNA 量に関連性はみられなかった。すなわち、TRE による抑制作用は、転写レベルではなく翻訳レベルで起きていると考えられた(図 8)。

(8) TPH2 は、E1 によってコードされる 11 番目から 20 番目のアミノ酸配列によって翻訳が抑制されている(未発表)。本研究では、その他に、翻訳開始点より下流にある E3 の塩基配列(TRE)が、そのコードするアミノ酸とは無関係に翻訳を抑制していることを発見した。E3 だけの場合は TRE を除くと翻訳抑制が解除されるが、E1, E2 が存在する場合はこれを除いても翻訳抑制が解除されない(図 9)ことから、E3 の翻訳抑制活性は、E1 に存在する翻訳抑制活性とは独立した作用であると考えられる。また、E2 と E3 だけを挿入したのものにも翻訳抑制活性がみられ、TRE を除去しても翻訳抑制が解除されないことから、E2 にもさらに別の抑制機構が存在していることが示唆された。

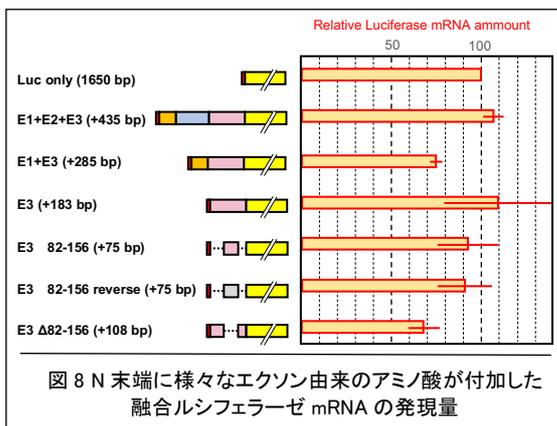


図 8 N 末端に様々なエクソン由来のアミノ酸が付加した融合ルシフェラーゼ mRNA の発現量

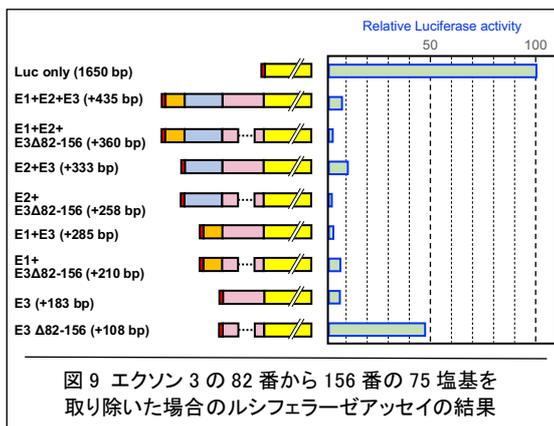


図 9 エクソン 3 の 82 番から 156 番の 75 塩基を取り除いた場合のルシフェラーゼアッセイの結果

### (9) まとめ

本研究は、当初は TPH2 のエクソン 2 をスキップさせる効果をもつアンチセンスオリゴを投与することで、エクソン 1 とエクソン 2 によってコードされる自己翻訳抑制ドメインの一部を欠失させ、抑制作用を解除しようと試みるものであった。ところが、エクソン 2 をスキップさせても発現抑制は全く解除されず、その原因として、エクソン 3 にこれまで発見されていなかった強力な抑制作用があることを見出した。その抑制作用は塩基配列依存性であり、転写には影響せず翻訳を抑制すること、アンチセンス側の配列でも効果があるが、遺伝子翻訳領域に存在することが必要であることを見出した。この翻訳抑制塩基配列を「translational auto-repression element (TRE)」と命名した。

何らかの RNA 結合性の因子が mRNA に結合して翻訳を阻害している可能性と、mRNA 自身が高次構造をとることによって物理的に翻訳が阻害されている可能性の双方が考えられる。翻訳領域であるため、必ずこの 75 塩基の領域は TPH2 mRNA に含まれているにも関わらず、細胞によっては定常的に TPH2 を産生していることを考えれば、TPH2 産生細胞では、阻害因子が他の因子との相互作用を介して TPH2 mRNA から取り除かれ、その結果、TPH2 翻訳抑制が解除され、TPH2 産生が起こるといった機構である可能性がある。または、TPH2 産生細胞であっても、その産生量が少なく検出や精製が困難であることの原因が、mRNA が転写された後も mRNA 自身の高次構造によって常に翻訳が阻害されているため、という可能性もある。今後は、ここに結合する因子の探索をはじめとして、mRNA の塩基配列による翻訳抑制機構の解明を進め、この翻訳抑制を解除する方法を探索していく。

### <引用文献>

- 1) Walther DJ et al., Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform, *Science*, 299, 2003, 76
- 2) Nawa Y et al., Functional characterization of the neuron-restrictive silencer element in the human tryptophan hydroxylase 2 gene expression, *J of Neurochemistry* 2017, 1-14
- 3) Carkaci-Salli N et al., Functional Domains of Human Tryptophan Hydroxylase 2 (hTPH2), *J. Biol. Chem.*, 281, 2006, 28105-28112
- 4) Wang J et al., Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes, *Nucleic Acids Res.*, 33, 2005, 5053-5062
- 5) Surono A et al. Chimeric RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acids Promote Dystrophin Expression in Myocytes of Duchenne Muscular Dystrophy by Inducing Skipping of the Nonsense Mutation-encoding Exon, *HUMAN GENE THERAPY* 15, 2004, 749-757
- 6) N.P.Franks et al. Structural Basis for the Inhibition of Firefly Luciferase by a General Anesthetic. *Biophysical Journal* 75, 1998, 2205-2211
- 7) Eckhart L et al., Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction Products of Alternatively Spliced mRNAs Form DNA Heteroduplexes and Heteroduplex Complexes. *J. Biol. Chem.*, 274, 1999, 2613-2615

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 廣井 朋子
2. 発表標題 ヒト中枢型トリプトファン水酸化酵素 (TPH2) のexon3には75塩基対の翻訳抑制配列が存在する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大滝正訓
2. 発表標題 トリチウム水を用いた蒸気拡散法による水分子の定量的評価
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会第20回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大滝 正訓
2. 発表標題 Structure prediction of the N-terminal regulatory domain of the human tryptophan hydroxylase 2
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那和 雪乃
2. 発表標題 Activation transcription factor 4(ATF4)-dependent activation of the human tryptophan hydroxylase 2 gene is mediated through th a CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP)-ATF composite site in its promoter
3. 学会等名 Society for Neuroscience (SFN) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	那和 雪乃  (Nawa Yukino)  (10549786)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・助教   (32713)	
研究 分担者	大滝 正訓  (Ootaki Masanori)  (20612683)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教   (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------