

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：32621

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860025

研究課題名(和文)ナンセンス変異型遺伝性疾患への抗生物質の薬理メカニズムの解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pharmacological effects of antibiotics against genetic diseases caused by nonsense mutations and development of new therapeutic agents

研究代表者

近藤 次郎 (Kondo, Jiro)

上智大学・理工学部・准教授

研究者番号：10546576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝性疾患治療薬の開発を目指して、様々な生物/細胞がもつリボソームRNA分子スイッチのX線結晶解析による構造研究と、得られた構造情報を基にした新規薬剤の設計・合成に取り組んだ。その結果、高いリードスルー活性、抗原虫活性または抗菌活性をもち、人体に対する副作用が低い数種類の化合物の設計・合成に成功した。特に、今回設計・合成したフッ素化アミノグリコシドのうちの一つは、真核生物や薬剤耐性菌がもつRNA分子スイッチに特異的に結合することが明らかになった。この新規フッ素化アミノグリコシドは、ナンセンス変異型遺伝性疾患に対する治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to develop new therapeutic agents against genetic diseases, I have performed structural studies of the ribosomal RNA molecular switches of several different organisms/cells by X-ray analysis and have designed and synthesized new drug compounds based on the obtained structural data. We have succeeded to design and synthesize several compounds possessing high readthrough, antiprotozoal or antibacterial activity and less toxicity against human. Especially, one of the designed/synthesized fluorinated aminoglycosides specifically binds to the RNA molecular switches of eukaryote and antibiotic-resistant bacteria. This compound can be a potent therapeutic agent against genetic diseases caused by nonsense mutations.

研究分野：構造生命科学

キーワード：ナンセンス変異型遺伝性疾患 抗生物質 リボソーム X線結晶解析 ドラッグデザイン

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィー症など約 2,400 種類にも及ぶナンセンス変異型遺伝性疾患は、アミノ酸コドンが突然変異によって終止コドン(中途終止コドンと呼ぶ)に変化し、それによって完全長タンパク質が合成されなくなるために起こる。近年、細菌感染症に対して処方されるアミノグリコシド系抗生物質がヒト細胞質リボソームの活性部位に存在する RNA 分子スイッチに作用して中途終止コドンを読み飛ばすリードスルー活性を示すこと、その結果として遺伝性疾患に対する薬理活性をもつことが基礎・臨床研究で明らかになってきている (Bidou *et al.*, 2012 など)。

タンパク質合成の過程では、リボソームの RNA 分子スイッチがそのコンフォメーションを ON/OFF の間で切り替える事で正しくコドンを読み取り、正確なタンパク質合成を可能にしている。アミノグリコシド系抗生物質は、細菌がもつこの分子スイッチを ON 状態に固定して OFF への切り替えを妨げ、コドンの読み取りにエラーを生じさせることで殺菌効果を示す。一方、この薬剤がヒトの分子スイッチに間違っただけで作用してしまうと、当然ながら人体への副作用を引き起こす。しかし、この副作用を逆手にとって、意図的にコドンの読み取りにエラーを生じさせて中途終止コドンをリードスルーさせれば、完全長タンパク質の合成がある程度回復し、ナンセンス変異型遺伝性疾患の治療が可能になる。このアイデアに基づいて遺伝性疾患治療の臨床研究が行われているが、その詳しい分子メカニズムが明らかになっていないために、現在使用されている薬剤には薬理活性と副作用の両面で大きな課題が残っている。

### 2. 研究の目的

研究代表者は本研究で、アミノグリコシドがヒト細胞質リボソームの分子スイッチに作用する様子を X 線結晶解析で詳しく観察して、遺伝性疾患に対する薬理活性と人体への副作用のメカニズムを分子レベルで明らかにし、薬理活性が高く副作用の低い新規の遺伝性疾患治療薬を設計・開発することを目指した。

アミノグリコシドの作用点であるヒト細胞質 RNA 分子スイッチは、そのコンフォメーションを ON/OFF の間で切り替えることでコドンの読み取りを制御している (図 1)。そこでまず、この分子スイッチの ON と OFF の間のさまざまな状態の構造を解析して繋ぎ合わせ、正常な ON/OFF スwitching の動きを観察することを第一の目標とした。つぎに、分子スイッチと種々のアミノグリコシドの複合体構造を解析し、この薬剤が switching の動きに及ぼす影響を詳しく観察することで、アミノグリコシドがもつ遺伝性疾患に対する薬理活性と人体への副作用の両方のメカニズムを分子レベルで明らかにするこ

とを第二の目標とした。そして、本研究で得られた立体構造情報を利用して、より優れた薬理活性をもち、人体への副作用の低い新規薬剤を設計・開発することを最終目標とした。

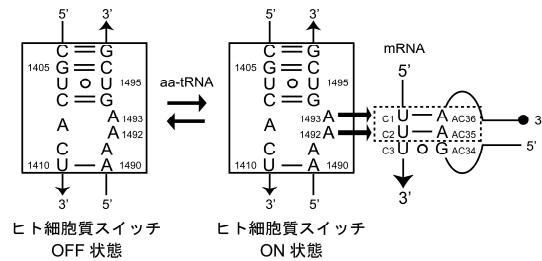


図 1. ヒト細胞質リボソームがもつ RNA 分子スイッチの働き方の概念図

### 3. 研究の方法

細菌(野生型 1 種類、薬剤耐性型 2 種類)、原虫、およびヒト(細胞質、ミトコンドリア)のリボソーム RNA 分子スイッチ (図 1) の配列を導入した比較的小さな RNA モデル分子を設計・合成して実験に用いた。化学合成した RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動と C18 逆相カラムクロマトグラフィーで精製した。RNA の結晶化は、研究代表者らが独自に開発した「塩溶効果を利用した核酸分子結晶化用スクリーニングキット」(近藤 & 竹中, 2005) を用いて行った。X 線回折実験は高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の構造生物学ビームラインで行った。構造決定は分子置換法および単波長/多波長異常分散法を用いて行った。

構造解析によって得られた結晶構造から RNA 分子スイッチ部分を抽出し、多様な安定・準安定状態の立体構造スナップショットを線形補間によって繋ぎ合わせてスムーズに動く動画を編集することで、細菌・原虫・ヒトの RNA 分子スイッチの動きを観察した。そして、さまざまなアミノグリコシドが各分子スイッチに対してどのように結合するのか、そしてスイッチの動きにどのような影響を及ぼすのかを詳しく観察した。

以上の実験で得られた各分子スイッチの立体構造および動的構造変化の情報を基に新規抗生物質の設計を行った。設計した薬剤の化学合成と薬理効果の検討は、研究協力者であるモントリオール大学(カナダ)の Stephen Hanessian 教授およびテクニオン工科大学(イスラエル)の Timor Baasov 教授の研究グループと共同で行った。薬剤の各分子スイッチへの結合定数の解析については、ストラスブール大学(フランス)の Eric Ennifar 研究部長のグループと共同で現在も進めている。さらに今回設計・合成した新規フッ素化アミノグリコシドについては、RNA に対する新しい結合様式を発見したため、この相互作用についての理論化学的な解析については、ストラスブール大学の Pascal Auffinger 研究部長と共同で現在も進めている。

#### 4. 研究成果

##### (1) 分子スイッチの動的構造変化の観察

ヒト細胞質リボソームがもつ RNA 分子スイッチに特異的に作用し、ヒトミトコンドリアリボソームがもつ分子スイッチには結合しない(副作用のない)アミノグリコシドを設計・合成するために、これら2種類の分子スイッチの立体構造とその動的変化を解析した。その結果、ヒト細胞質分子スイッチは ON 状態と OFF 状態の構造がともに安定で、ON/OFF の切り替わりもスムーズに起こることがわかった。一方、ヒトミトコンドリア分子スイッチは OFF 状態の構造が極めて安定で、OFF から ON への切り替わりが起りにくいことがわかった。以上のことから、ヒト細胞質分子スイッチに特異的に結合するアミノグリコシドを設計するための立体構造・動的構造変化の情報を得ることができた。

##### (2) パロモマイシン誘導体の合成と RNA 分子スイッチへの結合様式の解明

遺伝性疾患治療薬の設計・開発のためのリード化合物として、5種類のパロモマイシン誘導体を化学合成した(T. Baasov 教授との共同研究)。これらの薬理作用を調べたところ、すべての化合物が高いリードスルー活性を示すことが確認できた。さらにこれらの化合物は高い抗原虫活性を示すことも明らかになった。

そこで、パロモマイシンとその誘導体5種類について、ヒト細胞質および原虫の RNA 分子スイッチとの複合体の X 線結晶解析に取り組んだ。その結果、ヒト細胞質分子スイッチとの複合体については良質な結晶を得ることができず、構造解析には至らなかった。一方、原虫分子スイッチについてはパロモマイシンとの複合体の立体構造解析に成功し(図2)新規薬剤を設計するための立体構造情報を得ることができた。

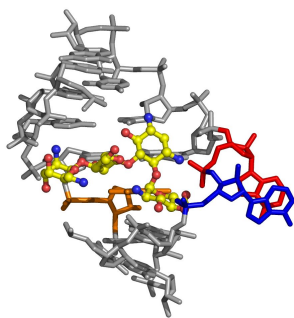


図2. 原虫分子スイッチとパロモマイシンの複合体の立体構造

##### (3) フッ素化アミノグリコシドの合成と細菌 RNA 分子スイッチへの結合様式の解明

遺伝性疾患治療薬の設計・開発の手段として、アミノグリコシドのフッ素化に着目した。フッ素は最も電気陰性度が高い原子であり、さらにサイズが水素原子と酸素原子の間ほどで立体障害がほとんど問題にならない。また正電荷をもつアミノ基の近傍にフッ素

を導入することでアミノ基の pKa を低下させることが報告されており、アミノグリコシドの正電荷に起因すると考えられている腎毒性のような副作用を低減させることが期待できる。

まず、7種類のフッ素化アミノグリコシドを化学合成した(S. Hanessian 教授との共同研究)。これらの薬理作用を調べたところ、フッ素化アミノグリコシドの多くは極めて高い殺菌作用を示しつつ人体への副作用が低いことが明らかになった。

そこで、7種類のフッ素化アミノグリコシドと細菌 RNA 分子スイッチの複合体の X 線結晶解析に取り組んだ。その結果、4種類の複合体の構造解析に成功し、フッ素原子と RNA との間に生じる新しい相互作用を発見した。

##### (4) 真核生物の RNA 分子スイッチを標的としたフッ素化アミノグリコシドの合成と各種分子スイッチへの結合様式の解明

上述の3つの研究によって得られた立体構造情報に基づいて、真核生物の RNA 分子スイッチに特異的に結合しうるフッ素化アミノグリコシド 6'-fluoro sisomicin を設計・合成した。そしてこの薬剤と細菌(野生型1種類・薬剤耐性型2種類)・原虫・ヒト細胞質の合計5種類の RNA 分子スイッチとの複合体の結晶化と構造解析に取り組んだ。その結果、ヒト以外の4種類の分子スイッチとの複合体の構造決定に成功した。得られた構造から、このフッ素化アミノグリコシドは細菌(野生型)の分子スイッチに対しては弱く結合する(図3左:水素結合の数が少ない)のに対して、薬剤耐性菌と原虫の分子スイッチに対しては強く結合する(図3右:水素結合の数が多)ことが明らかになった。このように本研究では、一般的な細菌には効かないが、重篤な感染症を引き起こす薬剤耐性菌や原虫に対して選択的に効果を発揮するアミノグリコシドのデザイン・合成に成功した。また、今回合成した 6'-fluoro sisomicin については、ヒトの分子スイッチとの複合体の構造解析には至らなかったものの、ヒトの分子スイッチに結合する可能性があるため、今後はこの薬剤についてリードスルー活性があるかどうかを確認し、ナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬の合成へと結び付けていきたい。

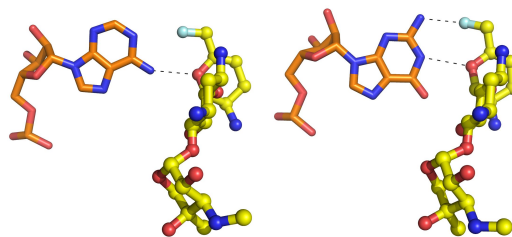


図3. 6'-fluoro sisomicin の糖環が細菌の分子スイッチのアデニン(左)と薬剤耐性菌および原虫の分子スイッチのグアニン(右)と水素結合をする様子

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. 近藤次郎. DNA ナノメディシンの Structure-Based Design. *月刊化学工業*, 27, 28-36. (2016). 【査読なし・執筆依頼あり】
2. 近藤次郎. 核酸構造生物学の最前線. *SOPHIA SCI-TECH 上智大学理工学振興会会報*, 27, 2-7 (2016). 【査読なし・執筆依頼あり】
3. Hiroki Kanazawa, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, Jiro Kondo. Crystal Structure of the Bacterial A Site in Complex with  $\beta$ -Fluoro Neomycin Analog. *Photon Factory Activity Report 2014*, 232 (2015) 【査読なし】
4. Hiroki Kanazawa, Stephen Hanessian, Jiro Kondo. Crystal structure of the bacterial A site in complex with axial 4'-fluoro neomycin analog. *Photon Factory Activity Report 2014*, 231 (2015). 【査読なし】
5. Jiro Kondo. Crystallographic studies of the ribosomal A-site molecular switches by using model RNA oligomers. *Nucleic Acid Crystallography: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 315-327 (2015). 【査読なし・執筆依頼あり】
6. 近藤次郎. ノンコーディング核酸の「動き」を見て「働き」を理解する. *日本RNA学会会報*, 36, 12-14 (2015). 【査読なし・執筆依頼あり】
7. 近藤次郎. 核酸構造生物学の創薬・ナノ材料科学への展開. *日本化学会・生体機能関連化学部会ニュースレター*, 29, 15-18. (2015). 【査読なし・執筆依頼あり】
8. Stephen Hanessian, Oscar M. Saavedra, Miguel A. Vilchis-Reyes, Juan P. Maianti, Hiroki Kanazawa, Paola Dozzo, Rowena D. Matias, Alisa Serio, Jiro Kondo. Synthesis, broad spectrum antibacterial activity, and X-ray co-crystal structure of the decoding bacterial ribosomal A-site with 4'-deoxy-4'-fluoro neomycin analogs. *Chemical Science*, 5, 4621-4632 (2014). 【査読付】 DOI: 10.1039/C4SC01626B
9. Juan Pablo Maianti, Hiroki Kanazawa, Paola Dozzo, Rowena D. Matias, Lee Ann Feeney, Eliana S. Armstrong, Darin J. Hildebrandt, Timothy R. Kane, Micah J. Gliedt, Adam A. Goldblum, Martin S. Linsell, James B. Aggen, Jiro Kondo, Stephen Hanessian. Toxicity modulation, resistance enzyme evasion, and A-site X-ray structure of broad-spectrum antibacterial neomycin analogs. *ACS Chemical Biology*, 9, 2067-2073 (2014). 【査読付】 DOI: 10.1021/cb5003416

〔学会発表〕(計14件)

1. Hiroki Kanazawa, Juan. P. Maianti, Stephen Hanessian, Jiro Kondo. Crystal structures of the bacterial ribosomal RNA in complex with fluorinated aminoglycosides. *ISNAC2016 (The 43th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2016年9月27日~2016年9月29日(熊本大学黒髪キャンパス, 熊本市)
2. 近藤次郎. DNA ナノマテリアル・ナノメディシンの Structure-Based Design. *JST 新技術説明会*, 2016年9月15日(JST 東京本部別館ホール, 東京都)
3. Hiroki Kanazawa, Juan. P. Maianti, Stephen Hanessian, Jiro Kondo. Interactions between the bacterial ribosomal RNA and fluorinated aminoglycosides. *RNA2016*, 2016年6月28日~2016年7月2日(京都国際会館, 京都市)
4. 金澤宏樹, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, 近藤次郎. フッ素化アミノグリコシドの細菌リボソーム RNA との相互作用. *日本核酸医薬学会 第1回年会*. 2015年11月30日~2015年12月2日(京都テルサ, 京都市)
5. 近藤次郎, Eric Westhof. 核酸塩基-アミノ酸相互作用の分類. *GE Life Sciences Day 2015*, 2015年7月24日(パシフィコ横浜, 横浜市)
6. 近藤次郎, Eric Westhof. RNA-リガンド相互作用の分類. *GE Life Sciences Day 2015*, 2015年7月24日(パシフィコ横浜, 横浜市)
7. 金澤宏樹, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, 近藤次郎. フッ素化アミノグリコシドとリボソーム RNA の複合体の X 線結晶解析. *GE Life Sciences Day 2015*, 2015年7月24日(パシフィコ横浜, 横浜市)
8. 金澤宏樹, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, 近藤次郎. フッ素を導入した新規アミノグリコシドと細菌リボソーム RNA の複合体の X 線結晶解析. *第3回物構研サイエンスフェスタ*, 2015年3月17日~2015年3月18日(エポカルつくば, つくば市)
9. Mai Miyazaki, Tamaki Tetsumoto, Yukiko Takahashi, Jiro Kondo. Structural and crystal polymorphisms of the mitochondrial ribosomal A-site RNA. *ISNAC2014 (The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2014年11月5日~2014年11月7日(北九州国際会議場, 北九州市)
10. Fumika Baba, Mai Koganei, Jiro Kondo. Crystal structures of the bacterial ribosomal A site containing an antibiotic-resistant mutation. *ISNAC2014 (The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2014年11月5日~2014年11

- 月 7 日 (北九州国際会議場, 北九州市)
11. Hiroki Kanazawa, Jiro Kondo. Crystal structure of RNA duplex containing strontium ion binding motif. *ISNAC2014 (The 41th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry)*, 2014 年 11 月 5 日 ~ 2014 年 11 月 7 日 (北九州国際会議場, 北九州市)
  12. 金澤宏樹, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, 近藤次郎. フッ素を導入した新規アミノグリコシドの細菌リボソーム RNA への結合様式の解明. 平成 26 年度 日本結晶学会年会, 2014 年 11 月 1 日 ~ 2014 年 11 月 3 日 (東京大学, 東京都)
  13. Hiroki Kanazawa, Jiro Kondo. Crystal structure of unusual RNA duplex containing strontium ion binding motif. *IUCr2014 (23rd Congress and General Assembly of International Union of Crystallography)*, 2014 年 8 月 5 日 ~ 2014 年 8 月 12 日 (モントリオール, カナダ)
  14. 金澤宏樹, Juan Pablo Maianti, Stephen Hanessian, 近藤次郎. フッ素を導入した新規アミノグリコシドとリボソーム RNA の複合体の X 線結晶解析. 第 16 回 日本 RNA 学会年会, 2014 年 7 月 23 日 ~ 2014 年 7 月 25 日 (ウインクあいち, 名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 次郎 (Jiro KONDO)  
上智大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 10546576

### (2) 研究協力者

Stephen Hanessian  
モントリオール大学・教授  
Timor Baasov  
テクニオン・イスラエル工科大学・教授  
Eric Ennifar  
フランス国立科学研究機構・研究部長  
Pascal Auffinger  
フランス国立科学研究機構・研究部長