

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06889

研究課題名(和文) 高等動物神経系における翻訳リードスルー機構とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism and physiological significance of translational readthrough in higher animals nervous system

研究代表者

山口 宜秀 (Yamaguchi, Yoshihide)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50311832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳リードスルーは、mRNAにコードされた正統な分子と共にC末部に付加ドメインを持つ分子を産生する翻訳制御システムである。本研究では、高等動物神経系の生理的翻訳リードスルー機構の存在意義を解明するために、末梢神経髄鞘に存在する翻訳リードスルー分子L-MPZの遺伝子改変マウスや培養細胞強制発現系を用いた解析を行った。その結果、髄鞘機能には適正量のリードスルー産物が必要であり、またその特異的付加ドメインのリン酸化が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳リードスルーはヒトを含めた哺乳類にも存在するシステムとして注目されている。また特に近年、様々な生理的機能に関わるタンパク質の機能調節メカニズムとして翻訳時の制御機構が新たに見出されている。本研究では、適正量のリードスルー産物が正常な神経機能に必要であり、これらの破綻が病気を引き起こす可能性を示した。高等動物神経系における遺伝子機能調節としての生理的な翻訳リードスルー機構の研究は、将来的に基礎研究だけでなく神経系疾患の研究にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Translational readthrough is a regulation system to produce an isoform with an extended extra-functional domain at the C-terminus from the same mRNA coding a canonical molecule. In this study, to clarify the meaning of the existence of physiological translational readthrough in the higher animal nervous system, we performed the analyses of a translational readthrough isoform L-MPZ in peripheral nerve myelin using genetically modified mice and forced expression cell culture system. The results indicate the necessity of appropriate ratio of readthrough isoform and the significance of the phosphorylation in the additional domain for the proper myelin function.

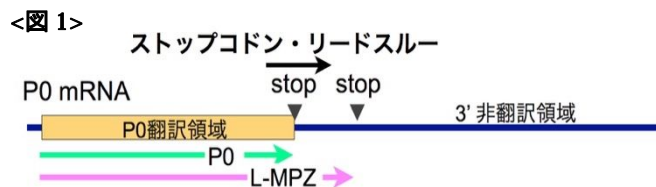
研究分野：分子神経生物学

キーワード：翻訳リードスルー 髄鞘 リン酸化 タンパク質キナーゼC シャルコー・マリー・トゥース病 脳・神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

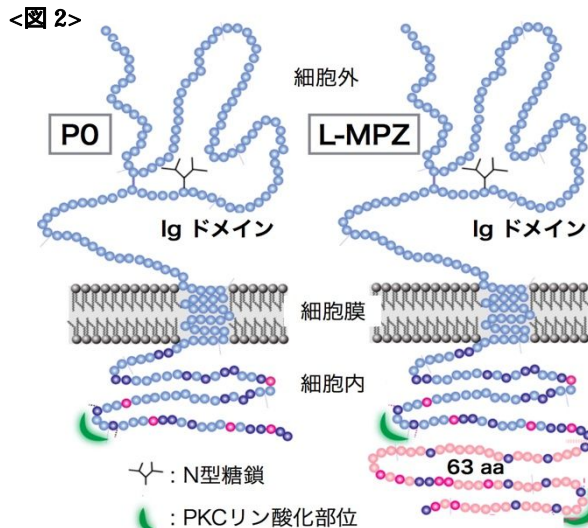
1. 研究開始当初の背景

翻訳リードスルー (翻訳時のストップコドン・リードスルー) は、ウイルスからショウジョウバエに至るまで普遍的に行われており、少ない遺伝子数においてもタンパク質の多様性を生み出す重要なシステムである。高等動物でも同様のシステムが存在すると予想されていたが、近年まではウサギのグロビンのみの報告であり、普遍的な存在は確認されていなかった。申請者が見出した L-MPZ は、ヒトを含む哺乳類において普遍的に存在するタンパク質では初めての例である。L-MPZ (約 36 kDa) は末梢ミエリン主要構成タンパク質である P0 (約 30 kDa) の mRNA 本来のストップコドン (UAG) のリードスルーにより、読み枠を維持したまま次のストップコドン (UGA) まで合成が進み産生される新しいタイプのアイソフォームである (図 1, Yamaguchi et al., 2012)



末梢神経系において、髄鞘 (ミエリン) は神経系の発達過程や様々な神経活動に関与する。P0 は末梢ミエリンの形成や維持に非常に重要な主要タンパク質であり、細胞外に Ig ドメインを持つ 1 回膜貫通型の細胞接着タンパク質として働いている。また細胞内には接着性の調節に関わる PKC リン酸化サイトを持っている。さらに P0 は重篤な遺伝性脱髄性疾患の原因分子であり、様々な末梢神経障害との関連も報告されている。L-MPZ は、この P0 の細胞内ドメインの C 末

に 63 アミノ酸が付加した構造をしている (図 2)。L-MPZ は主にミエリンに存在し、その構造の大部分は P0 と同一であるため、機能的にも P0 と共通する点が多いと考えられた。しかし強制発現細胞を用いた実験では、L-MPZ も細胞接着性を示すがその活性が弱いことが示唆された。また L-MPZ には新たな PKC リン酸化サイトが存在し、この部分のアミノ酸配列はカエルからヒトまで相同性が高く系統発生的に非常によく保存されているため L-MPZ 特異的な機能部位として非常に重要であると考えている。L-MPZ は P0 と共に P0 mRNA から産生されるため、異なる機能を持つ L-MPZ の産生量や局在などが制御されていると予想される。しかしながら、生体内における L-MPZ の機能的な重要性や P0 との違いなどは不明であり、産生



制御メカニズムも未だ明らかではない。一方、遺伝子翻訳領域内に生じたナンセンス変異により機能タンパク質が産生されず発症する数多くの重篤な疾患を治療するために、現在、ナンセンス変異を翻訳時にリードスルーさせ機能性タンパク質を産生させる薬 (リードスルー薬) が国内外で開発されている。米国では既に臨床試験が行われたものも存在するが、リードスルー薬の生理的な翻訳リードスルーへの影響が副作用に繋がる可能性も考えられる。そこで安全な開発には、L-MPZ に代表される生理的な翻訳リードスルーメカニズムを解明することが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、L-MPZ を中心にその生理機能や産生メカニズムを明らかにし、高等動物神経系における生理的な翻訳リードスルー機構の存在意義を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) L-MPZ と P0 の比率を変化させたマウスの解析

L-MPZ は P0 と同一の mRNA より産生されるため、P0 と異なる機能を持つ場合には厳密に産生が制御され、比率を保つことが重要である。そこで P0 と L-MPZ の量比率を変化させた場合の生体の特に末梢神経系への影響を調べることにより、P0 と異なる L-MPZ の機能の予測が可能となる。解析には CRISPR-Cas9 系のゲノム編集により作製した L-MPZ のみ (L-MPZ マウス) あるいは P0 のみを発現するマウス (L-MPZ 欠損マウス、P0 マウス) を使用した。タンパク質発現量はウエスタンブロット法により解析した。末梢神経機能を解析するに、運動機能や神経伝導速度

を調べた。さらに組織学的な変化を調べるために坐骨神経の免疫組織染色並びに電子顕微鏡解析を行った。

(2) L-MPZ 特異的な PKC リン酸化サイトの機能解析

L-MPZ 特異ドメインの後半部には P0 本来の PKC リン酸化サイトよりも PKC への親和性が高い PKC リン酸化サイトが存在する。L-MPZ 特異的 PKC リン酸化サイトの働きを明らかにするためには、この部分を変異させた分子の細胞接着性を調べる必要がある。そこで L-MPZ 特異的 PKC リン酸化サイトあるいは P0 特異的リン酸化サイトに変異をもつ発現ベクターを作製し、HeLa 細胞強制発現細胞接着系を用いて細胞接着性と L-MPZ 特異的ドメインの相関を調べた。さらに生体内での影響を調べるために、その部位を変異させたマウスを外部委託でのゲノム編集により作製し、系統化に着手した。

(3) 新規リードスルー薬の L-MPZ 産生への影響解析

学内共同研究により合成された新規リードスルー薬候補である 6 種のネガマイシン誘導体に関して、L-MPZ 産生への影響をヒト P0 cDNA を用いた無細胞系、HeLa 細胞を用いた強制発現系により調べた。さらに 6 種のうち L-MPZ 産生効率の高かった分子 (TCP-1109) に関して、マウス坐骨神経への直接注入により生体内における産生率の変化や運動機能への影響を調べた。

電子顕微鏡解析には、自然科学研究機構が行っている先端バイオイメージング支援プラットフォーム (Advanced Bioimaging Support: ABiS) の支援 (21D-20C-031-E07) を受けて実施した。動物実験および遺伝子組換え実験に関しては、東京薬科大学の各関連委員会に申請し、学長の承認を受けた上で関連規程を遵守し実施した。

4. 研究成果

(1) 作製し系統化したゲノム編集マウス (L-MPZ のみを産生する L-MPZ マウス、P0 のみを発現する P0 マウス) における L-MPZ の産生量は、L-MPZ マウスホモ接合体、L-MPZ マウスヘテロ接合体、野生型マウス、P0 マウスヘテロ接合体、P0 マウスホモ接合体の順で減少することが確かめられた。先行して系統化した L-MPZ マウス成体を解析した結果、ホモ接合体とヘテロ接合体ともに末梢有髄神経に異常を引き起こし、運動機能障害を示した。特に L-MPZ 産生量のより過剰なホモ接合体の症状が重く、その症状からこのマウスが遺伝性神経難病であるシャルコー・マリー・トゥース病の新たなモデル動物となることが明らかとなった。またこのマウスでは重層したミエリン膜の細胞内側のみの開大がみられ、ミエリン維持に必要な細胞質ゾルを残す部分において L-MPZ 特異的な部位が細胞内領域のスペース確保に関わる可能性が示唆された (Otani et al., 2020)。ミエリンの形成・維持過程における解析ではミエリンやランビエ絞輪周辺部の異常はミエリン形成期から認められ、6 ヶ月あるいは 12 ヶ月齢まで維持され加齢により増悪することが示唆された。またホモ接合体よりもヘテロ接合体で病態が軽いことから、これらの異常の度合は L-MPZ の異常な増加の度合に依存することが明らかとなった (国内外の学会で発表、投稿準備中)。L-MPZ を産生できず P0 のみを産生する P0 マウスでは、見かけ上の運動機能障害は認められなかったが、神経刺激による複合筋活動電位の振幅の高さが減少し、それと関連して免疫蛍光染色法によりランビエ絞輪周辺部の異常などが認められた (国内外の学会で発表、投稿準備中)。

(2) L-MPZ 特異的 PKC リン酸化サイトあるいは P0 特異的リン酸化サイトに変異を加えた発現ベクターを用い、培養細胞強制発現系による細胞接着実験を行った結果、どちらのサイトのリン酸化も接着活性の増加を引き起こし、リン酸化の抑制により接着活性が減少することを明らかにした (国内学会で発表、投稿準備中)。またゲノム編集により委託作製した PKC リン酸化部位変異マウスのヘテロ接合体の系統化に成功し、LMPZ 特異的ドメインの PKC リン酸化を検出するために作製したペプチド抗体の有用性についても確認できた。

(3) 新たなリードスルー薬により生体内の生理的なリードスルーアイソフォームである L-MPZ 産生が無細胞系や培養細胞強制発現系で増加することが明らかとなった。また坐骨神経への直接注入では L-MPZ の産生は増加するが重篤な副作用は生じないことを明らかにした (Otani et al., 2022)。

以上の結果より、高等動物の神経機能において適正量の翻訳リードスルー産物が産生されることが必要であり、またその特異的付加ドメインのリン酸化がその機能の調節において重要であることを示した。

<引用文献>

Yamaguchi, Y., Hayashi, A., Campagnoni, C.W., Akio Kimura, A., Inuzuka, T., Baba, H. L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. J Biol

Chem. 287(21):17765-76. doi: 10.1038/s42003-020-0854-z (2012)

Otani Y., Ohno N., Cui J., Yamaguchi Y., Baba H. Upregulation of large myelin protein zero leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy in mice. *Commun Biol*, doi: 10.1038/s42003-020-0854-z (2020)

Otani Y, Taguchi A, Hamada K, Hayashi Y, Yamaguchi Y, Baba H. Influence of novel readthrough agents on myelin protein zero translation in the peripheral nervous system. *Neuropharmacology*. 15(211)109059. doi: 10.1016/j.neuropharm.2022.109059. (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshinori Otani, Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Yoshio Hayashi, Yoshihide Yamaguchi, Hiroko Baba	4. 巻 211
2. 論文標題 Influence of novel readthrough agents on myelin protein zero translation in the peripheral nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 109059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2022.109059	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 Otani Yoshinori, Ohno Nobuhiko, Cui Jingjing, Yamaguchi Yoshihide, Baba Hiroko	4. 巻 3
2. 論文標題 Upregulation of large myelin protein zero leads to Charcot-Marie-Tooth disease-like neuropathy in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-020-0854-z	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 瀬戸口 潔、大谷 嘉典、林 明子、崔 晶晶、平井 大之、雨宮 千紗、山口 宜秀、澤井 撰、馬場 広子
2. 発表標題 ミエリンタンパク質L-MPZは末梢神経系の構造維持と機能に必要である
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 雅裕、渡邊 佑奈、中島 鉄博、大谷 嘉典、馬場 広子、山口 宜秀
2. 発表標題 末梢ミエリンタンパク質L-MPZのPKCリン酸化による細胞接着活性の解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 宜秀
2. 発表標題 P0タンパク質翻訳リードスルーの異常増加で誘導されるCMT病態の解析
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬戸口 潔、林 明子、崔 晶晶、林 萌々花、平井 大之、雨宮 千紗、大谷 嘉典、馬場 広子、山口 宜秀
2. 発表標題 末梢神経ミエリンタンパク質L-MPZを欠損したマウスの解析
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 雅裕、渡邊 佑奈、中島 鉄博、大谷 嘉典、馬場 広子、山口 宜秀
2. 発表標題 L-MPZの機能とリン酸化による制御機構の解明
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉 新、後藤 雅裕、山口 宜秀
2. 発表標題 L-MPZ PKCリン酸化サイト変異マウスの作製
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 雅裕, 崔 晶晶, 瀬戸口 潔, 林 萌々花, 平井 大之, 大谷 嘉典, 山口 宜秀, 馬場 広子
2. 発表標題 翻訳リードスルー産物である L-MPZは末梢神経系 におけるミエリン形成・維持に重要である
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 嘉典, 崔 晶晶, 山口 宜秀, 藍郷 加奈子, 原 綾香, 坂 剛太, 藤谷 昌司, 馬場 広子
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病モデルマウス:L-MPZマウスの病態進行の解析
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Yamaguchi, Y. Otani, M. Takehara, T. Nakajima, T. Narazaki, J. Cui, H. Baba
2. 発表標題 Excessive Production of L-MPZ, a Translational Readthrough Isoform of Myelin Protein Zero (PO, MPZ), Causes Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT)-like Phenotype.
3. 学会等名 The 14th Biennial ISN Satellite Meeting on Myelin Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yamaguchi, Y. Otani, M. Takehara, T. Nakajima, T. Narazaki, J. Cui, H. Baba
2. 発表標題 Abnormalities of Peripheral Mmyelin Development in Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease model, L-MPZ mouse.
3. 学会等名 2019 ISN-ASN Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 宜秀、大谷 嘉典、竹原 雅之、中島 鉄博、榑崎 琢朗、崔 晶晶、馬場 広子
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病モデル L-MPZ マウスにおけるミエリン形成過程の解析
3. 学会等名 NEURO 2019 第42回日本神経科学大会 第62回日本神経化学会大会 合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Yamaguchi, Y. Otani, N. Ohno, J. Cui, H. Baba
2. 発表標題 Translational Readthrough Regulates Physiological Function in the Nervous System
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース 薬学部 馬場広子教授、山口宜秀准教授 https://www.toyaku.ac.jp/pharmacy/newsttopics/2019/0314_3606.html</p>
--

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
研究協力者	馬場 広子 (Baba Hiroko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	大谷 嘉典 (Otani Yoshinori)		
研究協力者	崔 晶晶 (Cui Jingjing)		
研究協力者	大野 伸彦 (Ohno Nobuhiko)		(ABIS支援者)

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