

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620122

研究課題名(和文) 終止コドンの配列選択的リードスルー法

研究課題名(英文) Sequence-specific read through of premature termination codon

研究代表者

萩原 伸也 (Hagihara, Shinya)

名古屋大学・理学研究科(WPI)・准教授

研究者番号：80373348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸に対応したコドンが終止コドンに置き換わるナンセンス変異は、疾患に関連した遺伝子変異の約1/3を占める。このような疾患に対する治療法の一つとして、終止コドンを翻訳時に読み飛ばすリードスルー誘導法が注目されており、その候補化合物にはアミノグリコシド系抗生物質(AG)が検討されている。しかし、既存のAGは、遺伝子選択性・コドン選択性がなく、副作用などの問題から実用化には至っていない。本研究では、標的のコドンに対して特異的にAGを作用させる新規手法の開発を行った。これにより、リードスルー効率の向上と副作用の軽減が同時に期待される。

研究成果の概要(英文)：A nonsense mutation is a genetic mutation, which replaces codon encoding an amino acid into premature termination codon (PTC). The presence of PTC results in the expression of truncated proteins and hence causes a variety of diseases such as Duchenne muscular dystrophy. Aminoglycoside-induced readthrough of PTC has potential for the treatment of these diseases. Aminoglycosides induce PTC readthrough by decreasing the accuracy of translation by binding to the decoding center of ribosome. A limitation of aminoglycoside as pharmacogenetic agents is risk of significant toxicity. The effect of aminoglycoside is not specific to PTC, causing incorporation of an incorrect amino acid at a sense codon. We examined to design a new molecule that induces gene- and sequence-specific readthrough of PTC by conjugating aminoglycoside with oligonucleotide.

研究分野：生物有機化学

キーワード：アミノグリコシド PTCリードスルー

## 1. 研究開始当初の背景

DNA の配列情報は mRNA へと転写され、これを鋳型としてタンパク質がリボソームにより合成される。従って、DNA への変異の挿入は、構造的・機能的に異常なタンパク質を発現させ、様々な疾患を引き起こす。特に、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、タンパク質の合成が途中で停止するため影響が大きく、重篤な症状となる。このようなナンセンス変異を起因とする疾患の治療法の一つとして、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、アミノグリコシド系抗生物質 (AG) が主に検討されてきた。[参考文献: Trends in Genetics, 24, 552-563]

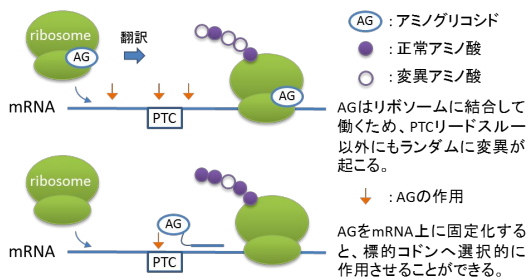


図1. AGの局在化によるPTC選択的リードスルー

アミノグリコシドは、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菌作用を示す。この仕組みが PTC に対して働くと、終止コドンに対しても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 (図 1 上段)。すなわち、アミノグリコシドの作用は PTC に対して特異的に起こるのではなく、同時にランダムなタンパク質の変異を誘発する。このため、リードスルー誘導効果の強いアミノグリコシド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) の原因となる。このような背景から、低分子化合物による PTC のリードスルー誘導治療は実現していなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、標的 PTC の近傍にアミノグリコシドを局在させることで、上記リードスルー誘導法の課題解決をめざした。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アミノグリコシドに連結することで、アミノグリコシドを 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アミノグリコシドが作用し、PTC 選択的リードスルーが誘起される (図 1 下段)。本手法は、リードスルー効果の向上と副作用の抑制を同時に達成でき、ナンセンス変異を起因とする遺伝子疾患に対する革新的治療法への発展が期待される。

### 【分子設計】

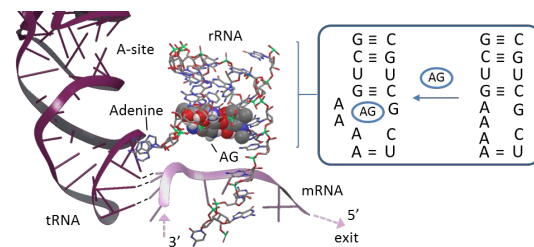


図2. AGのAサイトへの結合による翻訳正確性の低下

本研究の目標達成にむけて最も重要となるのは、「アミノグリコシド オリゴ核酸連結分子」の精密な分子設計である。近年提唱されたアミノグリコシドによる PTC 読み飛ばし機構を図 2 に示す。アミノグリコシドは、リボソームの A サイトを構成する rRNA に結合し、二本鎖内に収まっていたアデニン塩基を外側へフリップアウトさせる。追い出されたアデニンは、tRNA を押さえつけるように働くため、コドンとアンチコドンとの間にミスマッチが存在しても、tRNA が A サイトに取り込まれた状態を安定化する。この間にタンパク質合成が進むことで、コドン情報とは異なるアミノ酸が取り込まれる。同様の仕組みで終止コドンに対して何らかの tRNA が取り込まれると、その後も継続して翻訳が進み、終止コドンが読み飛ばされる。

この仕組みを標的コドンに対して特異的に

働かせるため、本研究ではアミノグリコシドをオリゴ核酸と連結し、mRNA 上の狙った位置にアミノグリコシドを局在させた。図 2 において、tRNA と塩基対を組んでいる 3 塩基が読み飛ばしの標的コドン(PTC)であり、この状態でオリゴ核酸が mRNA と二本鎖を形成し、同時にアミノグリコシドが rRNA と効果的に結合することが必要となる。これらの情報をもとに、基本となる分子として、G418 (真核生物のリボソームに強く作用するアミノグリコシド)のリボソーム親和性に関与しない水酸基と、オリゴ核酸の 3' 末端とを 20Å のスペーサーで連結した分子を設計した。本研究期間内は、この分子の精密設計、効率的合成法の開発、培養細胞レベルでの評価までを実施し、終止コドンの配列選択的リードスルーの実証をめざした。

### 3 . 研究の方法

本研究を効率よく推進するため、「アミノグリコシド オリゴ核酸連結分子」の合成、非細胞系・細胞系でのリードスルー評価、その結果に基づいた分子の再設計、の 3 項目に分けて実施した。この中で、連結分子の合成が最も時間を要する。このため、アミノグリコシドの誘導体化を研究協力者 1 名 (博士課程学生) が実施、これと並行して核酸部分の合成を申請者が担当し、連携のもと合成を進めた。評価には、申請者の構築した PTC 導入ルシフェラーゼ mRNA および DNA を用いた。非細胞系または細胞系の翻訳における PTC リードスルーによる全長ルシフェラーゼの発現を、ルシフェラーゼ活性を指標として定量した。ここで得られた結果をもとに、「アミノグリコシド オリゴ核酸連結分子」の再設計を行った。以上、～ の過程を繰り返すことで、分子構造の最適化を行った。

#### 【リードスルー評価】

本研究の評価系として、PTC を導入したホタルルシフェラーゼ DNA・mRNA をすでに構築

済みである。この mRNA (50 nM) を用いて G418 の細胞外翻訳系におけるリードスルー活性を評価したところ、1  $\mu$ M 程度の G418 の添加によりルシフェラーゼ活性の回復が見られた。しかし、これ以上 G418 の濃度を上げるとルシフェラーゼ活性の低下が起こり、10  $\mu$ M では完全に活性が消失した。これは、天然型 mRNA でも見られるように、ランダムな変異の挿入により活性が低下したものと考えられる。これらのことから、 $\mu$ M 以下の濃度、理想的には mRNA と等量程度のアミノグリコシド オリゴ核酸連結分子によってリードスルー活性を得ることを、本研究の達成目標とした。

### 4 . 研究成果

#### ・アミノグリコシド部の最適化

G418 は、細胞外翻訳系において最も高いリードスルー活性を示すが、ヒト細胞に対する高い毒性 (LD50 = 0.04 mg/ml) を有する。しかし、糖部への化学修飾により毒性の低下が見込まれ、また、オリゴ核酸との連結で得られるリードスルー活性の向上により、投与量を劇的に低減できる。これらのことを総合的に考慮し、アミノグリコシド部の第一候補として G418 を採用した。初期段階ではこれを用いて細胞外翻訳系における活性評価からスペーサー等の最適化を行った。これに加え、アミノグリコシド部をより毒性の低いゲンタマイシン、パロモマイシン (LD50 2.5 mg/ml) などに変更した分子の合成も行った。また、天然型だけでなく、化学修飾を加えて rRNA への結合性を調節したアミノグリコシドを用いることで、より最適なアミノグリコシド構造の探索を行った。合成法を検討した結果、パロモマイシンを導入したオリゴ合成に成功し、これを用いて次項目の最適化を行った。

#### ・オリゴ核酸部およびスペーサーの最適化

mRNA の塩基配列を認識するオリゴ核酸部の最初の選択肢として、RNA に対する高い親和性を有し、RNase H を介した mRNA 切断活性を持たない 2' -OMe RNA を採用した。これを用いて、mRNA に対するオリゴ核酸の結合位置（標的コドンからの距離）・スペーサーの長さ・種類を系統的に検討したところ、最適な組み合わせを選抜することができた。

#### 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)

Development of the crosslinking reactions to RNA triggered by oxidation.

Shuhei Kusano, Takuya Haruyama, Shogo Ishiyama, Shinya Hagihara, Fumi Nagatsugi  
*Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3951-3954

DOI: 10.1039/C3CC49463B

[学会発表](計 1 件)

Development of the Oxidation Induced Cross-link reaction

Shuhei Kusano, Takuya Haruyama, Nao Iwamoto, Shinya Hagihara, Fumi Nagatsugi,  
The 40th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, (2013)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://synth.chem.nagoya-u.ac.jp/wordpress/?p=9690>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

萩原 伸也 (HAGIHARA, Shinya)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・准教授

研究者番号: 80373348

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: