

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Restoration of the nonsense mutation by antibiotic treatment**  
(抗生物質を用いたナンセンス突然変異の正常化)

氏名 荒川 正行

### 緒言

抗生物質はバクテリアに対する抗菌作用があり、その作用機序の一つはタンパク質合成の阻害であるといわれている。アミノグリコシド系抗生物質は、原核生物のタンパク質合成の過程において、rRNA に作用し、その構造を変化させることが知られている。その結果、同抗生物質はタンパク質合成の阻害や翻訳忠実度の低下、または、終止コドンの読み越えを起こすことが知られている。アミノグリコシド系抗生物質には、ストレプトマイシンをはじめ、カナマイシン、ゲンタマイシン、パロモマイシン、G418 などがある。

真核生物を対象とした研究は、1978年に Wilhelm らが行い、ヒト KB 培養細胞に、パロモマイシンを投与すると翻訳忠実度が低下することを報告した。Burke ら(1985)は、COS7 細胞に coding 領域内に終止コドンを有する遺伝子を導入し、その細胞に G418 またはパロモマイシンを投与すると、終止コドンの読み越えが起きることを報告した。これらの研究報告から、真核細胞においても、アミノグリコシド系抗生物質は終止コドンの読み越え活性を有することが証明された。一方、Howard ら(1996)は、嚢胞性線維症(CF)の原因である Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) 遺伝子内にナンセンス突然変異を有する患者由来の細胞を用いた研究で、ゲンタマイシンが終止コドンの読み越えを引き起こし、CFTR タンパク質の全長が発現されたことを報告している。これらの研究は、培養細胞系での研究であるが、アミノグリコシド系抗生物質がナンセンス突然変異を有する遺伝子病に治療効果を有することを示唆している。

疾患動物モデルを用いた研究では、Barton-Davis ら(1999)が、X 連鎖型遺伝子病で

あるデュシャンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy: DMD)のモデルでジストロフィン遺伝子のナンセンス突然変異体である mdx マウスに、ゲンタマイシンを投与し、ジストロフィンを発現させることに成功したことを報告した。Howardら(2002)は、ナンセンス突然変異を導入したヒト線維芽細胞に、各種アミノグリコシド系抗生物質を投与し、その作用がナンセンス突然変異の種類、そして終止コドンとその周辺配列が読み越え活性に影響を及ぼすことを報告した。また、Duら(2002)は、CFTR protein をコードする遺伝子に終止コドンを組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、ゲンタマイシンあるいはトブラマイシンを投与したところ、CFTR タンパク質が合成され、その症状も改善したことを報告している。最近では、ナンセンス突然変異を有する CF や DMD 患者に対してアミノグリコシド系抗生物質を用いた臨床研究も始まりつつある。

しかし、アミノグリコシド系抗生物質は大量・長期間投与すると耐性菌の出現や、聴力・腎障害等の強い副作用が問題となる。また、アミノグリコシド系抗生物質は生体内における吸収効率が悪いことも知られている。

本研究では、アミノグリコシド系抗生物質以外の既知抗生物質の中に、終止コドンの読み越え作用をもち、副作用が少ない物質を探索し、その作用機序を検討することを目的とした。文献調査の結果、私は、(財)微生物化学研究会微生物化学研究所の浜田ら(1970)により、放線菌から発見され、グラム陰性菌に有効なジペプチド系抗生物質ネガマイシン(Negamycin)が大腸菌由来無細胞翻訳系において、アミノグリコシド系抗生物質と類似した終止コドンの読み越え作用があると報告している論文を見出した(1)。しかし、これまで真核生物に対してネガマイシンによる終止コドンの読み越え活性を示す報告はない。私は、このネガマイシンが分子量248で、アミノグリコシド系抗生物質と比較しても低分子であり、分子構造も異なるために、生体内における吸収効率の良さが予想される点に着目した。

そこで mdx マウス、そのマウス由来培養骨格筋細胞、さらに、筋ジストロフィー患者由来骨格筋細胞を用いて、ネガマイシンによるナンセンス突然変異の読み越え作用を細胞生物学的、免疫組織化学的手法によって検討した。また、マウスにおける毒性、ネガマイシンと rRNA の A-site に対する分子間相互作用についても検討した。

## 材料と方法

mdx マウス(4~8 週齢♂)に 2 または 4 週間、NM( $1.2 \times 10^{-5}$  mol/kg)を連日皮下投与を行い、抗ジストロフィン抗体による骨格筋、心筋(心室)組織の蛍光抗体染色、投与終了後にエバンスブルー生体染色色素(EB)による変性筋線維の定量、イムノプロットによるジストロフィンの検出と分子量の測定を試みた。副作用の検討のために、ネガマイシンやゲンタマイシン投与における体重変化と聴力障害の有無を調べた(2)。

次に、温度感受性 SV40-T 遺伝子を導入した mdx マウス由来骨格筋由来準株化細胞を作成し、その細胞にネガマイシンを 7 日間投与して、ジストロフィンの検出を試みた。また、ジストロフィンを最適条件下で検出できる培養条件の検討を行った(2)。

次に、終止コドンの読み越えの作用機序を解明するために、飛行時間型質量分析計(Time-of-Flight Mass Spectrometer :TOF-MS)を用いて、rRNA(A-site:27mer)との

分子間結合を調べた。

#### 結果と考察

ネガマイシンを mdx マウスに皮下投与すると骨格筋において正常レベルの最大 10% のジストロフィンの蓄積を認めた。従って、ネガマイシンは哺乳類においても大腸菌に対する場合と同様に、ナンセンス突然変異における終止コドンの読み越え活性が有ることが明らかとなった。また、筋細胞膜の透過性の指標である EB 色素を用いて、変性筋線維数を調べた所、変性筋線維数が未投与群に比べ減少し、ジストロフィンが機能していることが明らかとなった。マウスにおけるネガマイシンの副作用を検討するため、効果があった濃度の 50 倍以上を投与したところ、体重の減少が見られたが聴力障害は起こさなかった。同時にネガマイシンを 100 倍量 ( $1.2 \times 10^{-3} \text{mol/kg}$ ) 投与すると、体重の減少は認められるものの死亡するマウスはいなかった。それに対し、ゲンタマイシンを同分子数投与すると、4 時間以内に投与された全てのマウスが死亡した(2)。

筋細胞におけるネガマイシンの効果を検討するために、mdx マウス由来骨格筋標準株化細胞を作成した。その細胞にネガマイシンを投与した結果、ジストロフィンの発現が認められた (2)。筋管形成におけるジストロフィンの発現効率を上げるために、培養の最適条件の検討を行った。まず、細胞外基質とビタミン C 添加による影響を調べた。その結果、100  $\mu\text{M}$  ビタミン C 存在下でネガマイシン投与によってジストロフィンの発現が上がる傾向が示された。

さらに、レポーター遺伝子の途中で終止コドン挿入した遺伝子を導入した NIH3T3 細胞にネガマイシンまたはゲンタマイシンを投与したところ、ネガマイシン投与の方がゲンタマイシン投与に比べて、高い読み越え活性を有することが明らかとなった。

ネガマイシンの作用機序を解明するために、TOF-MS を用いた分析を行い、ネガマイシン分子が rRNA(A-site) に結合することが明らかになった。このことは、ネガマイシンが rRNA(A-site) の構造変化を起こし、終止コドンの読み越えを生じる可能性を示唆している。

これらの結果からネガマイシンは真核細胞において終止コドンの読み越え作用を有することが初めて示された。ネガマイシンはゲンタマイシンよりも毒性が低く、ナンセンス突然変異型の遺伝子病の治療薬として有効であると考えられる。

#### 参考文献

1. Hamada, M., Takeuchi, T., Kondo, S., Ikeda, Y., Naganawa, H., Maeda, K., Okami, Y., and Umezawa, H. (1970) A new antibiotic, negamycin. *J. Antibiot.* (Tokyo) **23**:170-171.
2. Arakawa, M., Nakayama, Y., Hara, T., Shiozuka, M., Takeda, S., Kaga, K., Kondo, S., Morita, S., Kitamura, T., and Matsuda, R. (2001) Negamycin can restore dystrophin in mdx skeletal muscle. *Acta Myologica* **20**:154-158