

論文審査の結果の要旨

氏名 荒川 正行

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)

本論文は3章からなり、第1章は、翻訳過程を干渉する抗生物質が Duchenne 型筋ジストロフィーのモデル動物である mdx マウスに及ぼす影響、第2章は抗生物質が及ぼす培養 mdx 骨格筋細胞に対する影響、第3章はネガマイシンとリボソーム RNA との結合について述べられている。

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終了過程において、rRNA と結合し、その構造を変化させる。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。培養細胞系を用いた先行研究において、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への治療の可能性を示唆されている。

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ている。申請者は、(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が大腸菌由来無細胞翻訳系において、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。

そこで Duchenne 型筋ジストロフィーの原因遺伝子ジストロフィンのナンセンス突然変異体である mdx マウス、そのマウス由来培養骨格筋細胞を用いて、ネガマイシン投与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、飛行時間型質量分析計 (Time-of-Flight Mass Spectrometer :TOF-MS) を用いてネガマイシンと rRNA(A-site) の分子間相互作用についても検討した。

その結果、第1章において、ネガマイシンを mdx マウスに皮下投与する

と骨格筋や心筋において全長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、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、EBに染まる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したところ、亜急性毒性、聴覚毒性ともにネガマイシンはゲンタマイシンよりはるかに低いことが判明した。

第2章では、筋細胞におけるネガマイシンの効果を直接検討するために、mdxマウス由来骨格筋単株化細胞を作成し、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。さらに、レポーター遺伝子の途中に終止コドンを挿入した遺伝子をマウス NIH3T3 細胞に導入した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高い読み越え活性を有することが明らかとなった。

第3章では、終止コドン読み越えの作用機序を解明するために、TOF-MSを用いて、分子間相互作用を調べた結果、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と推定される。

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。申請者は、ネガマイシンは、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結論した。

なお、本論文の第1章は、原孝彦、中山由紀、森田純代、武田伸一、北村俊雄、塩塚政孝、加我君孝、近藤信一、松田良一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与出来ると認める。