

別紙 4

報告番 -	※ 甲 第 号
----------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 Regulation of translation by synthetic molecules
(合成分子を用いた翻訳の制御)

氏 名 山下 隼

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内では、DNAに記録された遺伝情報がmRNAに転写され、mRNAの配列情報をもとにリボソームがタンパク質を合成（翻訳）している。タンパク質は全ての生命現象の中心的役割を担うため、正確な構造のタンパク質を合成することは生命活動の根幹に関わる。すなわち、あらゆる生命活動は翻訳の正確性に立脚していると言える。翻訳の正確性はmRNAのコドンと対をなすtRNAを取り込む段階で主に決まり、この認識はリボソームのAサイトで行われる。

Aサイト周辺に結合する抗生物質は、翻訳の正確性を低下させることが知られている。例えば、アミノグリコシド（AG）は、Aサイトを構成するリボソームRNA（rRNA）に結合することでtRNA認識の正確性を低下させる。これにより、遺伝情報と異なるアミノ酸が取り込まれて（誤翻訳）、正常な機能をもたないタンパク質が合成される。私は、誤翻訳の現象に着目し、人工分子を用いて翻訳の正確性をあえて低下させる新規生体機能制御法の確立を目指した。本論文は、以下の三章で構成される。

第一章では、新規リボソーム結合性分子の迅速スクリーニングについて論じている。真核生物と原核生物ではAサイトの構造が異なることから、原核生物のAサイトに対して選択的に結合するAGは抗生物質として用いられる。しかし、腎毒性や耳毒性など重篤な副作用のため、AGの医薬品としての適用は限定的である。この要因の一つは、AGの非特異結合性である。AGは、名の通りアミンを多くもつ化合物であるため、様々なRNAやタンパク質と非特異的に結合し、これが副作用を引き起こす。また近年では、AGの耐性菌の出現も問題となっている。本研究では、こうした問題を解決するため、AGの代替となる化合物の開発を目指し、Aサイト結合性の新規骨格分子を探索した。

リボソームAサイト結合性分子の迅速評価系として、SPRセンサーおよび蛍光偏光法を用いたスクリーニング系を構築した。ITbM化合物ライブラリーの3600化合物を用いてスクリ

ーニングを実施し、得られたヒット化合物の翻訳阻害活性を評価したところ、バクテリアリボソーム選択的な翻訳阻害剤が見つかった。この化合物は AG より活性が低いものの、バクテリアと真核生物で明確な選択性をもつため、新たな抗生物質のリード化合物の候補として期待される。

第二章では、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を用いた配列選択的リードスルーについて論じている。ナンセンス変異は、アミノ酸に対応するコドンが終止コドン (PTC) に置きかわる変異で、タンパク質合成が途中で終了し機能不全のタンパク質が合成されるため、重篤な疾患につながる。そのような疾患を治療する手法としてリードスルー療法が知られている。この手法では、リボソームが PTC を翻訳する際に終結因子の代わりにアミノアシル tRNA を取り込ませることで、全長タンパク質を産生させる。これまで AG のような翻訳の正確性を低下させる化合物がリードスルー治療に利用されてきた。しかし、誤翻訳を非特異的に誘導することによる毒性が臨床応用を制限している。本研究では、標的の終止コドン特異的なリードスルーを可能にする新規リードスルー戦略の開発を行った。

申請者は、真核生物の翻訳終結機構に着目した。近年、リボソームの構造解析と翻訳位置の解析によって、真核生物終結因子は終止コドンに結合すると、mRNA を U 字型コンフォメーションに変形させリボソーム内のトンネルに引き込むことが示された。この知見をもとに申請者は、PTC 下流に結合する ASO が、mRNA の引き込み、すなわち翻訳終結を阻害し、アミノアシル tRNA の取り込みを誘導すると仮定した。PTC を導入した変異ルシフェラーゼをレポーターとして、ASO の結合部位や長さを最適化したところ、配列特異的なリードスルーを誘導することに成功した。また、翻訳産物をゲル電気泳動で解析したところ、実際に全長タンパク質が合成されることが確認された。

第三章では、AG と ASO を連結した分子 AG-ASO による配列選択的な遺伝情報変換について論じている。ヒトリボソームに結合する AG は、ランダムにアミノ酸配列が置換されたタンパク質の合成を誘導するため、「毒」である。しかし、AG の作用を標的 mRNA の狙ったコドンに対して特異的に起こすことができれば、翻訳段階でアミノ酸配列を変える方法になる。こうした発想の転換にもとづき、申請者は標的コドンの近傍に AG を局在化させることを考えた。具体的には、AG と ASO を連結した分子 AG-ASO によって、AG を mRNA 上の狙った位置に提示する。これにより、リボソームが標的コドンを読み取るときにだけ AG が作用し、標的コドン選択的なアミノ酸置換が誘起される。本章では、まず終止コドンの変換、すなわちリードスルーの効率を指標に本手法のコンセプトを評価した。AG-ASO を種々合成し、リードスルー活性評価を行ったところ、AG および ASO の単独または併用投与と比較して、AG-ASO でリードスルー活性の向上が見られた。この結果は、本手法の妥当性を示している。

以上、申請者はリボソームの翻訳を制御する分子の開発を合成化学、生化学の両面から行い、新規リボソーム結合性分子、リードスルーの新手法、配列選択的な遺伝子変換手法を開発した、これらの成果は、生命科学や医療技術の発展に寄与することが期待される。