

リードスルー化合物の作用機構解析

内藤 あかり (筑波大学 生物学類) 指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ナンセンス変異はタンパク質コード領域中に未熟終止コドン (Premature termination codon: PTC) を生じる変異で、活性を全く、もしくはわずかしかもたない短いタンパク質が産生されるため、遺伝性疾患の一因となっている。ナンセンス変異型遺伝性疾患の治療法の1つに、PTCを読み飛ばす「リードスルー化合物」を用いることで、完全長で活性のあるタンパク質産生を誘導する治療法がある (図1) ¹⁾。

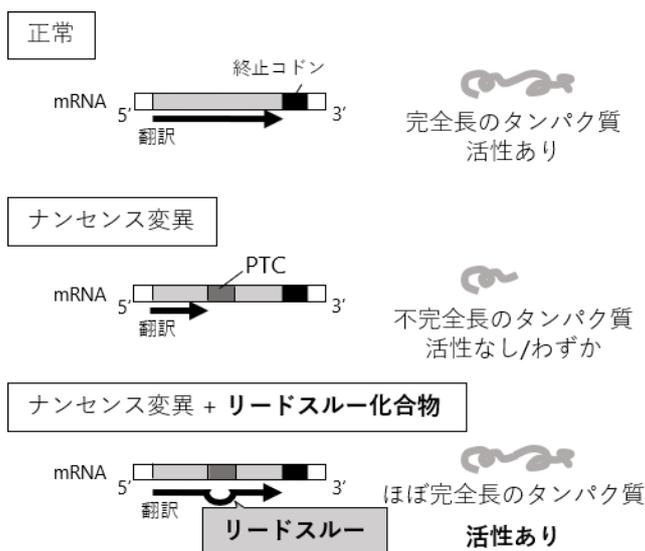


図1 リードスルー治療の概略

Negamycin (図2) は、リードスルー活性を有するジペプチド抗生物質であり²⁾、種々の高活性類縁体が創出されてきた^{3,4)}。しかしながら、negamycin、及びその類縁体がリードスルーを引き起こす機構は不明のままである。そこで本研究室では、出芽酵母を用いて negamycin によるリードスルー誘導機構解析を進めている。これまで薬剤排出ポンプ、及びその転写因子をコードする12遺伝子を破壊することで多剤超感受性を示す12gene Δ 0HSR株に *ade2-E64X* (PTC変異) を導入し、リードスルー活性を定性的に評価可能な出芽酵母株「YKH002」が構築された。この株は *ade2*変異のため、アデニン制限培地では赤色コロニーを形成するが、リードスルーが起きてアデニン合成活性が回復すると、白色コロニーを形成する (図3)。このYKH002を用いて negamycin 高活性類縁体に耐性を示す変異酵母株の単離、及び変異遺伝子の同定が行われた。

本研究では、耐性を付与すると考えられる複数の候補遺伝子のうち、ユビキチン・プロテアソーム系に関わる遺伝子に着目し、negamycin 耐性機構の解明を行った。

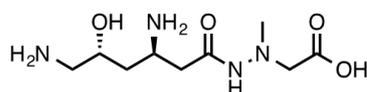


図2 negamycin

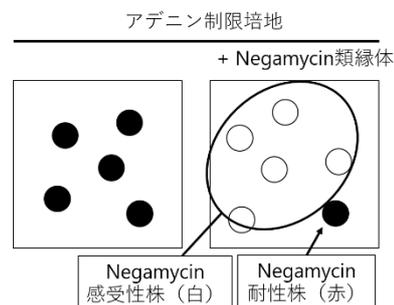


図3 YKH002を用いたアデニン制限アッセイの概略

材料

YKH002: *MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0 pdr3 Δ 0 pdr8 Δ 0 pdr1 Δ 0 yrr1 Δ 0 snq2 Δ 0 pdr5 Δ 0 pdr10 Δ 0 yor1 Δ 0 pdr15 Δ 0 pdr11 Δ 0 pdr12 Δ 0 aus1 Δ 0 RME1(*ins308A*) ade2-E64X* (ochre mutation)

方法

1. 遺伝子破壊、及びタンパク質へのタグ付け
二回相同組み換えを用いたCassette PCR法により、目的遺伝子の破壊、及びタンパク質へのタグ付けを行った⁵⁾。
2. アデニン制限アッセイ
Negamycin類縁体を含むアデニン制限培地にYKH002株をスポットして、30°Cで数日間培養した後、コロニーの色を観察した。コロニーが赤色の場合はリードスルーが起きていない (リードスルー耐性)、白色の場合はリードスルーが起きている (リードスルー感受性) と判断した (図3)。
3. ウェスタンブロット
タグ付けしたタンパク質を発現する酵母からタンパク質をガラスビーズ破砕により抽出後、SDS-PAGEにて分離し、それぞれのタグに対する抗体を用いて検出した。

結果と考察

詳細は研究発表会にて紹介する。

参考文献

- 1) Welch, *et al.*, *Nature*, 2007, 447, 87-91.
- 2) Uehara, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 374, 82-95.
- 3) Hamada, *et al.*, *ACS Med Chem. Lett.*, 2015, 6, 689-694.
- 4) Taguchi, *et al.*, *ChemMedChem*, 2014, 9, 2233-2237.
- 5) Janke, *et al.*, *Yeast*, 2004, 21, 947-962.