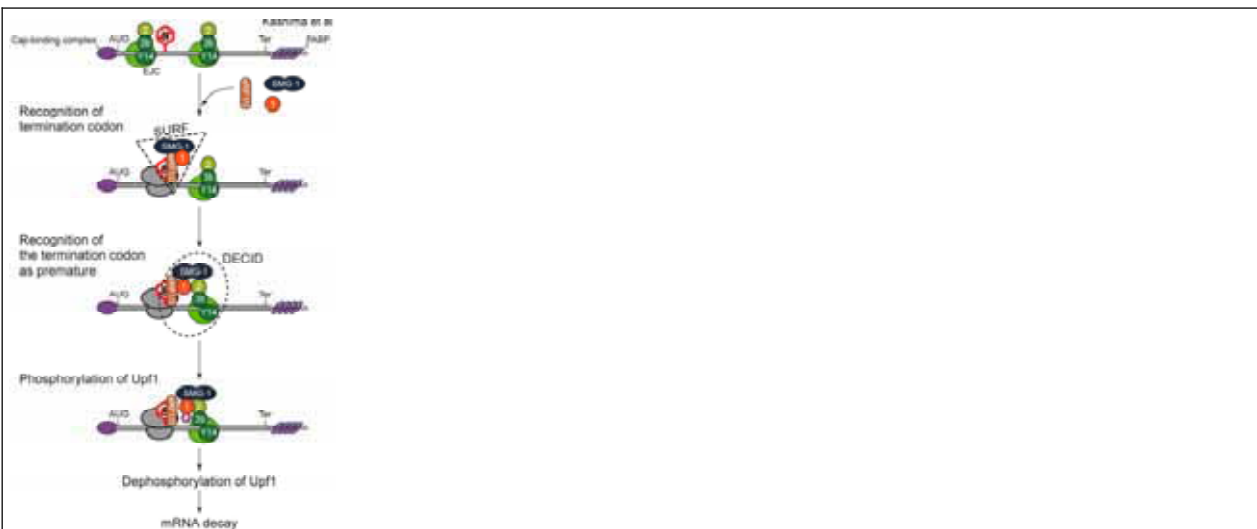


2-2-1 研究成果

中テーマ名：シグナル伝達モニタリング技術の開発	
サブテーマ名：mRNAサーベイランス系の操作技術の展開応用	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院医学研究科 教授	大野茂男
研究従事者（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院医学研究科 準教授	平井秀一
	助手
麒麟ビール（株） フロンティア技術研究所 主幹研究員	水野恵子
大鵬薬品工業（株） 飯能研究センター 創薬企画部	水谷 悟
	江村智博
	がん研究所
	松尾憲一
	三好和久
	宮寺和孝
	藤岡弥生
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要	
<p>遺伝子の変異の1/3は、結果的にタンパク質のC末端を欠損した異常タンパク質をコードした異常mRNAを生じる。異常mRNAはまた転写後過程でも生じる。細胞内では、このようなナンセンスmRNAを識別して排除する機構（mRNAサーベイランス、nonsense-mediated mRNA decay, NMD）が存在する。mRNAサーベイランスは癌や遺伝性疾患などの症状に直結し、将来のテーラーメイド医療における重要な検査項目となるだけでなく、異常遺伝子の発見などの新技術を提供する。</p>	
②研究の独自性・新規性	
<p>SMG-1というプロテインキナーゼによるUPF1のリン酸化に着目し、これがmRNAサーベイランスにおける異常mRNA認識のまさに根幹で起きている現象であることを見出すと同時に、詳細な分子機構を世界に先駆けて解明した。さらに、その阻害技術とモニター技術を踏まえて、筋ジストロフィー症の培養細胞レベルで症状の緩和に世界に先駆けて成功した。</p>	
③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）	
<p>本研究においては、異常mRNA認識の分子機構の解明を進めると同時に、mRNAサーベイランス系の操作技術、モニター技術を開発する。同時に、その展開応用の可能性を試験し、遺伝性疾患の克服の可能性を開くと同時に、がん分子標的など、新規な薬剤開発につながる可能性を検討する。</p>	
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して）	
<p>異常mRNA認識の分子機構を世界に先駆けて解明し、SMG-1のリン酸化の位置付けを明確とした。これを利用して、mRNAサーベイランス系の操作技術、モニター技術を開発した。さらに、その展開応用の可能性を試験し、遺伝性疾患の克服の可能性を開くと同時に、癌分子標的など新規な薬剤開発につながる薬剤のスクリーニング系をほぼ確立することに成功した。主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <p>(1) 異常mRNA認識の分子機構の解明：</p> <p>SMG-1キナーゼがUPF1の特異的な部位をリン酸化することを見出した。SMG-1はスプライシングを受けたmRNA上で、パイオニアラウンドのリボソームが終止コドンを見つけたときに翻訳終結因子、UPF1と複合体（SURF）を形成する。終止コドンがナンセンスコドンの場合には、SURFがEJCと結合しDECID複合体を作る。DECID複合体でUPF1のリン酸化が起きる。UPF1のリン酸化は、仮想的なサーベイランス複合体のリモデリングを引き起こし、脱リン酸化酵素PP2Aをリクルートし、UPF1を脱リン酸化する。これらの過程すべてが、mRNAサーベイランスに必須であることを明らかとした。新規タンパク質（SMG-8）はリン酸化をサポートする。</p>	



(2) mRNA サーベイランスの特異的阻害技術の開発

SMG-1の阻害剤としてWortmannin、caffeineを見いだした。SMG-1やUPF1の変異体の高発現、SMG-1のRNAiによる発現抑制法を開発した。これらの方法を用いてmRNAサーベイランスを抑制することにより、本来合成されないナンセンス変異を有する遺伝子産物を合成させることに成功した。これまではタンパク質合成阻害剤のみがmRNAの品質監視機構の阻害法として知られていたが、その利用範囲は大きく限られていた。我々が開発したいくつかの手法を用いることにより、様々な疾患におけるmRNAの品質監視機構の役割を初めて明確に評価することが可能となった。

(3) mRNA サーベイランスの特異的阻害技術を用いた、疾患との具体的な関わりへの解明

遺伝性疾患の1/4から1/3は、mRNA上の異常な位置に終止コドンナンセンスコドンが生じるタイプの変異であると言われている。この中には、ナンセンスコドンによりトランケートされたタンパク質分子が残存活性を有する場合もあるが、多くの場合mRNAサーベイランス系によりmRNAレベルで分解排除されてしまい、タンパク質は合成されない。このような場合には、mRNAサーベイランス系は生体に害を及ぼしている事となる。このような状況が期待されるケースとして、私たちは重篤な筋ジストロフィー症の一種であるUllrich病の患者さんに着目した。この患者さんでは、3本鎖構造を有するコラーゲン鎖の1本が上記の理由で合成されないためにある種のコラーゲン繊維が合成されず、結合組織の異常が起きている。これを反映して、この患者さんの線維芽細胞は基質への接着能が低下している。私たちは、この患者さんの線維芽細胞を用いて、mRNAサーベイランス系の阻害により本来合成されないコラーゲン分子が合成できること、細胞の接着能が一部回復することを示した。

この種のケースは、様々な遺伝子について少数ながらあることが容易に想像される。つまり、mRNAサーベイランスの阻害が、時として創薬の標的となる可能性を実際に検証することに成功した事となる。

(4) mRNAの品質監視機構の特異的なモニター法の開発

mRNAサーベイランスの生理的、病理的な役割の解析には、その作動状況を的確に把握する方法論の開発も必要である。これまでは、mRNAの分解速度を直接測定する方法しかなかったが、これは煩雑な操作を必要とする。我々は既に、hSMG-1によるhUPF1のリン酸化がその有用な指標となることを見出すと同時に、リン酸化部位特異的なモノクローナル抗体を作成して来た。そして、これを用いることにより、極めて簡便にmRNAの品質監視機構の作動状況をモニターすることが可能となった。これらに加え、mRNA品質監視機構の阻害剤の大規模スクリーニングなどに利用できる簡便な検定システムを開発した。

特許件数：7

論文数：36

口頭発表件数：66

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

mRNAサーベイランスにおけるナンセンスコドンの認識機構は最大の謎であったが、我々が世界に先駆けて解明することに成功した。その成果に基づく抑制技術は、国内外において独走している。SMG-1関係の一連の特許を申請中である。

2 実用化に向けた波及効果

SMG-1の低分子阻害剤のスクリーニング系をほぼ構築し終わったので、近い将来低分子阻害剤を利用可能となる。それを利用することにより、これまで不可能であった以下の事が可能となる。

- (1) 本来分解されていた異常タンパク質や異常mRNAを発現させる事により、疾患細胞における責任遺伝子を簡便に同定したり、変異点を推定する新たな手法を提供できる可能性がある。将来のテーラーメイド医療において、大きな力を発揮する可能性がある。
- (2) 遺伝性疾患の中で、ナンセンスコドンを生じるタイプの変異であり、かつ変異タンパク質が活性を保持している場合には、SMG-1阻害剤によりサーベイランス系を抑制し疾患症状を一部回復できる可能性がある。
- (3) 癌細胞では、サーベイランス系が生存に大きな寄与を果たしており、その抑制は癌細胞の増殖を抑制するので、全く新たな原理に基づく抗癌剤の標的となる可能性がある。

残された課題と対応方針について

低分子阻害剤のハイスループットスクリーニング系を確立する。

	JST負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	H12	H13	H14	H15	H16	H17	小計	
人件費	0	0	0	0	0	0	0	1,350	10,000	6,800	8,329	8,857	6,100	41,436	41,436
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	0	0	0	0	0	0	0	3,500	2,136	2,731	3,668	3,766	15,801	15,801
旅費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計	0	0	0	0	0	0	0	1,350	13,500	8,936	11,060	12,525	9,866	57,237	57,237

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

- JST負担による設備：
- 地域負担による設備：

※ 複数の研究課題に共通した経費については按分する