

also possessed myogenic properties (data not shown), although their growth rates were very low compared to the mouse cell line. By designing specific sets of primers for human orthologs to the *mdx*-up and -down genes, we examined the mRNA expression of these genes in the nine human muscle cell lines by RT-PCR. We found that relative to the unaffected donor-derived cell line, mRNAs for Arg/Gly amidinotransferase and EST-MNCb4008 were always increased in the BMD/DMD patient-derived cell lines (data not shown, Table 1). In contrast, all of the BMD/DMD patient-derived cell lines showed lower RAMP mRNA expression levels relative to the control line (Figure 5B). That both the *mdx*-sm- and the BMD/DMD-derived cell lines show an attenuation of RAMP expression suggests that RAMP could be involved in the pathogenesis of DMD.

Discussion

In this study, we identified 19 genes that are differentially expressed by newly established skeletal muscle cell lines from *mdx* and control B10 mice. We also showed that the expression of the novel gene RAMP, which is down-regulated in the *mdx* line, was frequently impaired in the muscle cell lines derived from six DMD and two BMD patients.

Gene expression studies using *mdx* mice or DMD biopsies have been published before^{10-13,16,17} but unlike these studies, we used immortalized skeletal muscle cell lines as the initial materials for the cDNA microarray and Northern blot analyses. The immortalization was achieved by conditional transformation of the primary cells by infecting them with the SV40 tsT-bearing retrovirus vector. This method has been used successfully to expand target cell types before.¹⁹ It has been reported that myogenic cell lines established by the SV40 large T antigen retain their differentiation capacity *in vitro*.^{37,38} Supporting this is that the myoblastic cell lines established in this study possess myogenic differentiation activity. It is also known that rodent cells can be fully immortalized by the SV40 T antigen.³⁹ However, as the life span of human primary cells *in vitro* is dependent on their telomerase activity, human cells carrying the SV40 large T antigen will eventually undergo senescence and crisis because of telomere shortening. Nevertheless, our approach yielded sufficient numbers of progeny human myoblastic cells from single biopsies from DMD or BMD patients.

The skeletal muscle cell line that was established from *mdx* mice (*mdx*-sm) differentiated more frequently into a myotube-like structure *in vitro* than the line derived from the control C57BL/10 mice (B10-sm) (Figure 1A). That MEF2C expression in *mdx*-sm cells is enhanced (Table 1, data not shown) confirms that the myogenic differentiation program in these cells is engaged. This property could reflect the status of the myoblastic precursor cells in the *mdx* mouse muscle at the time of virus infection. In adult mice, skeletal muscle stem cells (satellite cells) that reside beneath the basal lamina of muscle fibers are mitotically quiescent and are only activated in response to mechanical stimuli such as exercise and injury.⁴⁰ In the process of muscle regeneration, satellite cells are believed to generate myoblasts that proliferate and differ-

entiate to make myotubes before fusing with existing myofibers. In *mdx* mice, the destruction of muscle fibers caused by the lack of dystrophin and compensatory muscle regeneration are thought to occur continuously.⁹ As is consistent with a previous report, the injury-response signaling pathway mediated by JNK1 MAP kinase may thus be activated in the majority of myoblasts in *mdx* mice.⁴⁰ All of the subclonal cell lines from the original bulk culture of *mdx*-sm produced desmin⁺ myotube-like structures at a higher rate (data not shown). Because retrovirus infection occurs only in dividing cells in culture, the *mdx*-sm line may represent a proliferating subpopulation of myogenic precursor cells in *mdx* skeletal muscle. This may also be true for the human patient-derived muscle cell lines. Thus, the genetic programs in these cell lines are likely to represent those that are present in most, if not all, myoblasts in intact skeletal muscle.

The comparison of the *mdx*-sm and B10-sm cell lines revealed that 12 genes are up-regulated and 7 genes are down-regulated in the *mdx*-sm line (Figure 1B, Table 1). Dystrophin is expressed in muscle fibers and mature myotubes but not in proliferating myoblasts. To verify that the differential gene expression in *mdx*-sm cells is not because of the absence of dystrophin, we introduced a microdystrophin gene lacking the 4th to 23rd rod domains into *mdx*-sm cells and induced these cells to express the truncated dystrophin protein. Microdystrophin has been proven to be fully functional in restoring myopathy in *mdx* mice.^{23,41} However, the presence of this protein in *mdx*-sm cells did not affect the expression of the 19 genes whose expression patterns are altered in *mdx*-sm cells (Figure 2B, data not shown). Thus, the altered gene expression pattern in *mdx*-sm cells is the result of a dystrophin-independent event in the myoblasts of *mdx* mice.

Among the 12 up-regulated genes in the *mdx*-sm cell line, Arg/Gly amidinotransferase is of particular interest because it is a first and rate-limiting enzyme for the creatine biosynthesis that is a major energy source in skeletal muscle.⁴² A previous study has shown that Arg/Gly amidinotransferase mRNA is rapidly induced in kidney *in vivo* by adding creatine and growth hormone.²⁹ It is reasonable to suppose that skeletal muscle cells of *mdx* mice also produce this enzyme more abundantly in response to the creatine and creatine kinase that is released by disrupted muscle fibers. We found that all DMD- and BMD-derived muscle cell lines also produce a higher level of Arg/Gly amidinotransferase (Table 1, data not shown). This suggests that the measurement of mRNA for this enzyme in muscle cells as well as detection of higher creatine kinase levels in serum may be useful in the diagnosis of DMD and other myopathies.

Increased expression of thymosin β 4 in the *mdx* mouse muscle has been reported in previous studies.¹² We found that its expression was up-regulated in *mdx*-sm cells and *mdx* muscle tissue, but not in the DMD patient-derived cell lines. Thymosin β 4 is a bifunctional protein that sequesters G-actin in the cytoplasm and stimulates the migration of endothelial cells and monocytes once secreted outside of cells.^{43,44} The acetylated tetrapeptide acSDKP that is proteolytically released from the N-

terminus of thymosin β 4 inhibits proliferation of hematopoietic progenitor cells and enhances angiogenesis.⁴⁵ Presumably, thymosin β 4 may play some roles in the regenerating muscle area by acting on inflammation-associated cells. A study is underway to determine whether higher amounts of thymosin β 4 could ameliorate DMD pathogenesis.

The gene products of SCHIP-1 and mc7 are structural proteins in the muscle and brain. It has been suggested that SCHIP-1 links membrane proteins to the cytoskeleton²⁶ and that mc7 directly binds to the C-terminal region of dystrophin (GenBank data base), although clear evidence for these functions is not yet available. The relevance of the up-regulation of these two genes in the mdx-sm cell line remains uncertain. However, it is tempting to speculate that the expression of sarcolemmal membrane-associated proteins is induced in the absence of dystrophin by a compensatory mechanism. The expression of utrophin in mdx mice is the most famous example of this. Recent gene profiling studies of mdx mice and DMD biopsies also revealed such tendencies.^{10,17}

The selenoprotein P gene is also down-regulated in the mdx-sm cell line. This down-regulation could affect the anti-oxidant defense of cells. Selenoproteins possess thioredoxin reductase activity that neutralizes the cytotoxic response of cells to the oxidant stress mediated by thioredoxin.⁴⁶ Recently, 10 families with congenital muscular dystrophy were shown to carry mutations in the selenoprotein N gene.⁴⁶ Moreover, there are reports showing that selenium deficiency is associated with muscular dystrophy in animals and cardiomyopathy in humans.^{47,48} However, we found that the overall mRNA level of selenoprotein P in mdx mice was higher than that in control mice, as has also been shown in a previous report.¹⁰ The presence of increased amounts of selenoprotein P as well as RAMP in adult mdx mice may be related to the milder skeletal myopathic phenotype observed in this model.

Of the seven down-regulated genes in mdx-sm cells, RAMP was the only one whose expression was always lower in muscle cell lines from six DMD and two BMD patients compared to the expression in a line from an unaffected control. Although the normal human myoblastic cell line used in this study was derived from a relatively aged donor, this difference appears to be significant because most of the other genes that showed differential expression in the mdx-sm line had a similar pattern of expression between the BMD/DMD patient-derived cell lines and the unaffected control cell line (Table 1). RAMP is a novel secreted protease that carries three major molecular signatures (Figure 3B). One of these is the CUB domain, which is often found in the extracellular domain of developmentally regulated proteins. Examples of these are bone morphogenetic protein 1 (a metalloendopeptidase that induces cartilage and bone formation) and neuropilin (a calcium-independent cell adhesion molecule that functions during the formation of neuronal and vascular circuits). Another molecular signature is the CCP modules/Sushi domain. These exist in a wide variety of complement and adhesion proteins. The third significant molecular motif of RAMP is its serine protease do-

main belonging to the trypsin family at its C-terminus. In normal unchallenged mice, RAMP mRNA is only detectable in the skeletal muscle and brain. Previous studies showed that genes encoding cathepsin S and cathepsin H proteases are up-regulated in mdx muscle,^{11,12} but RAMP-related proteases have not been described previously. The reason why the RAMP gene has not been identified in the microarray studies in the past by using mdx mice is probably because its expression level is low and the amount of mRNA in the intact skeletal muscle of mdx and normal mice do not differ significantly. A unique finding of this study is that RAMP mRNA is specifically induced in regenerating muscle fibers found after skeletal muscle injury. As described above, during muscle regeneration, myoblasts differentiate into myotubes and the cells then fuse with existing muscle fiber. Accumulating evidence from previous publications suggests that an elevated calcium concentration in regenerating muscle activates calcineurin, which dephosphorylates nuclear factors of activated T cells (NF-ATs).^{49,50} Specific NF-AT isoforms in skeletal muscle play crucial roles in the myogenic differentiation and myoblast fusion events. As with the interleukin-4 induction that triggers myotube fusion in regenerating muscle areas,⁵¹ RAMP mRNA is induced in small centrally nucleated myofibers (Figure 4B). Thus, RAMP could be an important regulator of the muscle regeneration process. Further analysis of its enzymatic targets and biological activities in skeletal muscle would shed light on this novel protease and enhance our understanding of the processes involved in muscle regeneration and the malignant progression of DMD.

Acknowledgments

We thank Drs. Yuko Miyagoe-Suzuki and Shin-ichi Takeda (National Institute of Neuroscience) for valuable advice; and Drs. Norman Drinkwater (University of Wisconsin Medical School) and Masatoshi Hagiwara (Tokyo Medical and Dental University) for providing us with the pMESVts and pLRT-X retrovirus vectors, respectively.

References

1. Hoffman EP, Brown Jr RH, Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987, 51:919-928
2. Ervasti JM, Campbell KP: Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1993, 5:82-87
3. Ervasti JM, Campbell KP: Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991, 66:1121-1131
4. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS: Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995, 82:743-752
5. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL: Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:3710-3714
6. Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Steinhardt RA: Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 1990, 250:673-676
7. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81:1189-1192
8. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Bar-

- nard PJ: The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989, 244:1578-1580
9. Dangain J, Vrbova G: Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* 1984, 7:700-704
 10. Tkatchenko AV, Le Cam G, Leger JJ, Dechesne CA: Large-scale analysis of differential gene expression in the hindlimb muscles and diaphragm of mdx mouse. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1500:17-30
 11. Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, Leahy P, Li J, Guo W, Andrade FH: A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet* 2002, 11:263-272
 12. Tseng BS, Zhao P, Pattison JS, Gordon SE, Granchelli JA, Madsen RW, Folk LC, Hoffman EP, Booth FW: Regenerated mdx mouse skeletal muscle shows differential mRNA expression. *J Appl Physiol* 2002, 93:537-545
 13. Rouger K, Le Cunff M, Steenman M, Potier MC, Gibelin N, Dechesne CA, Leger JJ: Global/temporal gene expression in diaphragm and hindlimb muscles of dystrophin-deficient (mdx) mice. *Am J Physiol* 2002, 283:C773-C784
 14. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL: Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002, 157:137-148
 15. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS: Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002, 420:418-421
 16. Chen YW, Zhao P, Borup R, Hoffman EP: Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* 2000, 151:1321-1336
 17. Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, Bennett RR, Greenberg SA, Kohane IS, Beggs AH, Kunkel LM: Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:15000-15005
 18. Pinsat C, Montarras D: Cell Systems for ex Vivo Studies of Myogenesis: A Protocol for the Isolation of Stable Muscle Cell Populations from Newborn to Adult Mice. San Diego, Academic Press, Inc., 1994
 19. Lee GH, Ogawa K, Drinkwater NR: Conditional transformation of mouse liver epithelial cells. An in vitro model for analysis of genetic events in hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol* 1995, 147:1811-1822
 20. Morita S, Kojima T, Kitamura T: Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000, 7:1063-1066
 21. Yoshikawa T, Nagasugi Y, Azuma T, Kato M, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Seki N: Isolation of novel mouse genes differentially expressed in brain using cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275:532-537
 22. Maeda S, Otsuka M, Hirata Y, Mitsuno Y, Yoshida H, Shiratori Y, Masuho Y, Muramatsu M, Seki N, Omata M: cDNA microarray analysis of Helicobacter pylori-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 284:443-449
 23. Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M, Yokota T, Ikemoto T, Suzuki M, Dickson G, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 293:1265-1272
 24. Watsuji T, Okamoto Y, Emi N, Katsuoka Y, Hagiwara M: Controlled gene expression with a reverse tetracycline-regulated retroviral vector (RTRV) system. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 234:769-773
 25. Hara T, Tamura K, de Miguel MP, Mukoyama Y, Kim H, Kogo H, Donovan PJ, Miyajima A: Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and Sertoli cells in mice. *Dev Biol* 1998, 201:144-153
 26. Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G: Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* 2000, 20:1699-1712
 27. Boutou E, Matsas R, Mamalaki A: Isolation of a mouse brain cDNA expressed in developing neuroblasts and mature neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 2001, 86:153-167
 28. Huff T, Muller CS, Otto AM, Netzer R, Hannappel E: Beta-thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:205-220
 29. Guthmiller P, Van Pilsunm JF, Boen JR, McGuire DM: Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J Biol Chem* 1994, 269:17556-17560
 30. Smith JB, Herschman HR: The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, and GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains. *Arch Biochem Biophys* 1996, 330:290-300
 31. Mostert V: Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch Biochem Biophys* 2000, 376:433-438
 32. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN: Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997, 276:1404-1407
 33. von Heijne G: Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 1985, 184:99-105
 34. Bork P, Beckmann G: The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 1993, 231:539-545
 35. Norman DG, Barlow PN, Baron M, Day AJ, Sim RB, Campbell ID: Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol* 1991, 219:717-725
 36. Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993, 290:205-218
 37. Mouly V, Edom F, Decary S, Vicart P, Barbert JP, Butler-Browne GS: SV40 large T antigen interferes with adult myosin heavy chain expression, but not with differentiation of human satellite cells. *Exp Cell Res* 1996, 225:268-276
 38. Berghella L, De Angelis L, Coletta M, Berarducci B, Sonnino C, Salvatori G, Anthonissen C, Cooper R, Butler-Browne GS, Mouly V, Ferrari G, Mavilio F, Cossu G: Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther* 1999, 10:1607-1617
 39. Manfredi JJ, Prives C: The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1198:65-83
 40. Kolodziejczyk SM, Walsh GS, Balazsi K, Seale P, Sandoz J, Hierlihy AM, Rudnicki MA, Chamberlain JS, Miller FD, Megeney LA: Activation of JNK1 contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Curr Biol* 2001, 11:1278-1282
 41. Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, Harper HA, Robinson AS, Engelhardt JF, Brooks SV, Chamberlain JS: Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2002, 8:253-261
 42. Carlson M, Van Pilsunm JF: S-adenosylmethionine:guanidinoacetate N-methyltransferase activities in livers from rats with hormonal deficiencies or excesses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973, 143:1256-1259
 43. Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK: Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *EMBO J* 1997, 11:474-481
 44. Young JD, Lawrence AJ, MacLean AG, Leung BP, McInnes IB, Canas B, Pappin DJ, Stevenson RD: Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med* 1999, 5:1424-1427
 45. Liu JM, Lawrence F, Kovacevic M, Bignon J, Papadimitriou E, Lallemand JY, Katsoris P, Potier P, Fromes Y, Wdziecck-Bakala J: The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Blood* 2003, 101:3014-3020
 46. Moghadaszadeh B, Petit N, Jaillard C, Brockington M, Roy SQ, Merlini L, Romero N, Estournet B, Desguerre I, Chaigne D, Muntoni F, Topaloglu H, Guicheney P: Mutations in SEPN1 cause congenital muscular dystrophy with spinal rigidity and restrictive respiratory syndrome. *Nat Genet* 2001, 29:17-18
 47. Oldfield JE: Selenium in animal nutrition: the Oregon and San Joaquin Valley (California) experiences—examples of correctable deficiencies in livestock. *Biol Trace Elem Res* 1989, 20:23-29
 48. Ge K, Xue A, Bai J, Wang S: Keshan disease—an endemic cardiomyopathy in China. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983, 401:1-15
 49. Abbott KL, Friday BB, Thaloer D, Murphy TJ, Pavlath GK: Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 1998, 9:2905-2916
 50. Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P, Molkenkin JD: A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol* 2000, 20:6600-6611
 51. Horsley V, Jansen KM, Mills ST, Pavlath GK: IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 2003, 113:483-494



ナンセンス変異型の遺伝性疾患は抗生物質で治療できるか?

Is it possible to treat genetic diseases caused by nonsense mutations with antibiotics?

Key Words: ナンセンス変異

- ⇒ナンセンス変異(nonsense mutation)
- ⇒maxマウス(max mouse)
- ⇒ネガマイシン(Negamycin)
- ⇒ハイスルースクリーニングスクリーニング(high-throughput screening)
- ⇒オーファシトドラッグ(orphan drug)

塩塚政孝^{1,2)}, 荒川正行³⁾, 松岡良一⁴⁾

- 1) 東京大学大学院総合文化研究科 生命理工学系
- 2) 長崎大学大学院 厚生労働科学研究推進課 分子薬理学室
- 3) 財団法人 日本医療科学 老人病研究所 生化学部門
- 4) 慶応大学大学院 総合文化研究科 生命理工学系 薬理学

「ゴマコ・ニベトアホホ」のトキロイスと置

抗生物質の“read-through”活性～終止コドンの読み越し～

蛋白質の生合成過程では、リボソーム上で mRNA 上の塩基配列を読みとり、その情報に対応するアミノ酸を選び出しペプチド鎖を形成する。終止コドン(塩基配列)(UAG, UAA, UGA)がリボソーム(tRNA と蛋白質の複合体)の A(アミノアシル)部位にくると、遊離因子がリボソームの A 部位に結合する。さらに、遊離因子によりペプチジル基転移酵素が活性化され、tRNA に結合したポリペプチドを切り離すことにより、蛋白質合成は終結する。アミノグリコシド系抗生物質は、細菌の蛋白質翻訳系を標的として抗菌作用を示す。特にゲンタマイシンやトブラマイシン、G418 は、リボソームに結合し、mRNA 上の終止コドンとリボソームの A 部位との結合を阻害するため、終止コドンを飛び越えて翻訳が誤読のまま進行し、本来より長い蛋白質分子を作らせる作用(read-through)を有する

「read-through」は normal (正常) の場合でもごく稀に起こる現象であるが、抗生物質による read-through の促進作用が知られている¹⁾。アミノグリコシド系抗生物質による蛋白質合成の阻害は、もともと抗生物質に感受性のある原核細胞から調製した無細胞系翻訳系において発見されたが、その後 90 年代になって真核細胞においても起きることが知られ、ナンセンス変異型遺伝性疾患の薬物による治療の可能性が開けてきた。

アミノグリコシド系抗生物質によるナンセンス変異の誤読

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy ; DMD) は、ジストロフィン遺伝子に欠失、切断、あるいは遺伝子の途中に点突然変異(塩基置換により premature stop codon を生じるナンセンス変異(nonsense mutation)や、塩基の欠失や追加により生じるフレームシフト変異など)が起きた結果、筋細胞膜裏打ち蛋白質ジストロフィンを合成できず、筋細胞膜が破壊され発生する進行性の筋萎縮症

である。ジストロフィン遺伝子がX染色体上にあるため、新生男児3,500人に1人の割合で発症し、30歳までに呼吸不全か心不全で死亡するケースが多い。この重篤な遺伝性筋疾患であるDMDの有効な治療方法はいまだ確立されていない。DMD患者集団のなかでナンセンス変異によるケースはそのおよそ15%を占めるといわれている。

90年代後半、嚢胞性線維症の原因遺伝子cystic fibrosis transmembrane regulatorのナンセンス変異で生じた異常終止コドンが、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンやG418でread-throughされ、欠失していた蛋白質が作られると報告された²⁾。特に、ジストロフィン遺伝子のエクソン23にナンセンス変異をもつ、DMDのモデル動物であるmdxマウス(mdx mouse)にゲンタマイシンを投与することで、筋組織内でのジストロフィンの蓄積と筋力の上昇がみられたという1999年のBartonらの報告³⁾は、効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移植以外に方法はないと考えられていた筋ジストロフィーに対する新しい治療手段として注目を集めた。

一方、点突然変異によって遺伝子の途中に生じた終止コドンのread-throughを起こさせる活性のある薬剤を投与すると、本来の翻訳終止点までもread-throughしてしまう可能性がある。さらに、翻訳の誤読が頻繁に起こった場合も、細胞へ悪影響が及ぼされることが危惧される。しかし、実際にはmRNAは本来の翻訳終止点のあとにも終止コドンが並んでいる場合が多く、2002年にDuらにより報告されたゲンタマイシンやトブラマイシンによるread-through効率は15%以下であり⁴⁾、read-throughによる副作用は少ないと思われる。Premature stop codonは通常終止コドンよりも周囲の配列の特徴によって決まる終止効率が低く、選択的にread-throughされやすい。また、read-through自体の効率は低くとも、終止コドンを乗り越えるリボソームがあればnonsense-mediated mRNA decayが抑制されるため、より多くの全長翻訳産物が得られる。したがって、アミノグリコシド系抗生物質は、ナンセンス変異を原因とする

遺伝性疾患では、遺伝子治療よりも現実的な治療として期待を高めている。

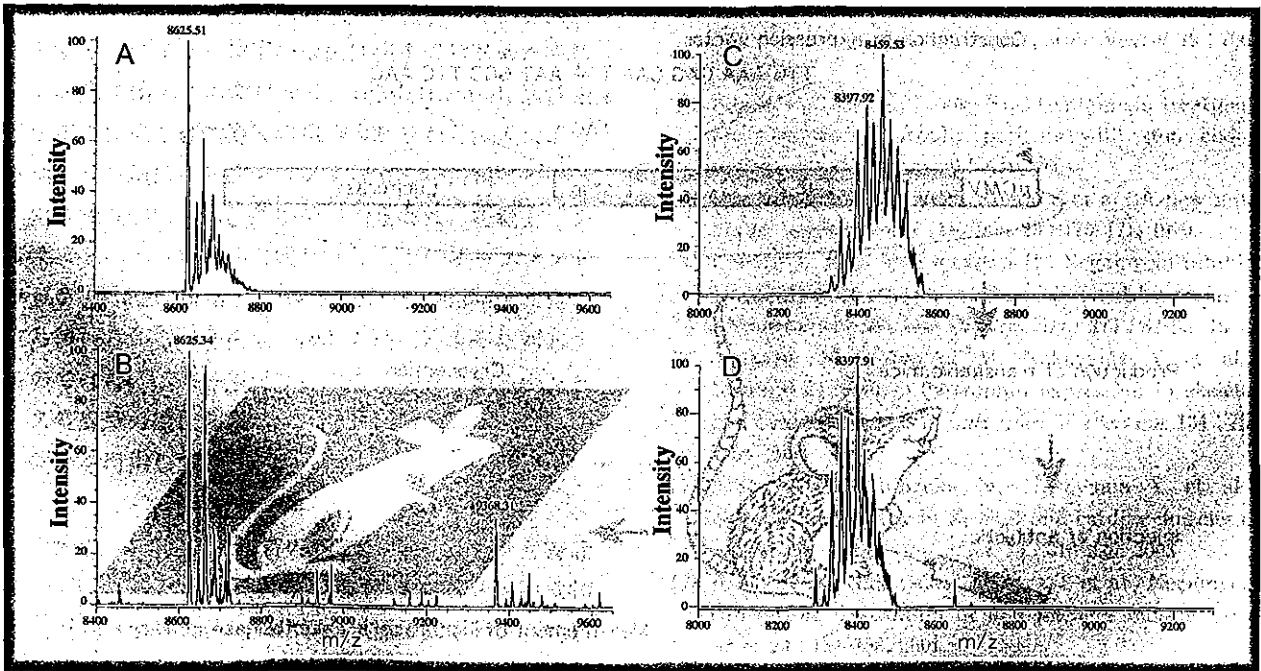
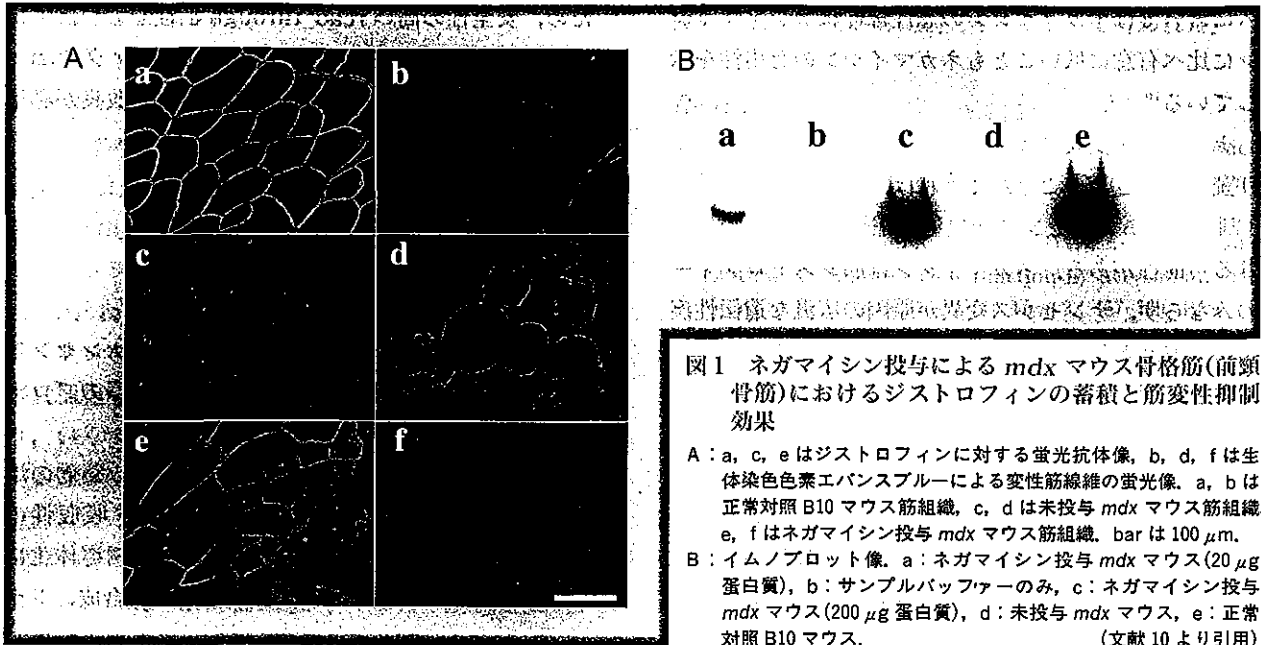
Politanoら(2003年)は、ヒトDMDの4患者中1例ではあるが、ゲンタマイシン投与によりジストロフィン蛋白質の蓄積を免疫組織化学的・生化学的に確認した⁵⁾。免疫染色の結果だけであればさらに2つの陽性例が確認されているが、反対にWagnerら⁶⁾とSeranoら⁷⁾は陰性例を報告している。この相違に関しては、ゲンタマイシンの3つの異性体の存在とその精製度の違いによって説明ができるかもしれない。一方、遺伝性疾患の治療には患者への長期間投与が必要である。しかし、アミノグリコシドは血中濃度の安全域が狭く、それを上回ると直ちに腎毒性や聴覚毒性、筋弛緩作用などの強力な副作用が現れ、患者への長期間投与には少なからぬ危険性がともなうと予想される。

筋ジストロフィーのネガマイシン・セラピー

われわれは、70年代に微生物化学研究所で見えられたジペプチド系の未承認抗生物質ネガマイシン(Negamycin)⁸⁾に着目し、研究を行ってきた。この抗生物質は大腸菌由来の無細胞翻訳系でread-through活性を示すこと⁹⁾が報告されているからである。このネガマイシンを微生物化学研究所から入手し、2~4週間にわたり、ネガマイシンをmdxマウスに連日投与したところ、骨格筋および心筋組織内に筋ジストロフィー症の原因遺伝子産物ジストロフィンの蓄積が正常筋組織の10%程度認められた。骨格筋でのジストロフィンの免疫染色像とイムノプロット像を図1に示す。同様にmdxマウス由来の培養筋細胞でもジストロフィンの蓄積がみられた。さらに、ネガマイシンとrRNAとの構造活性相関について、エレクトロスプレーイオン化法による質量分析法を用いて分析したところ、ネガマイシンはrRNAのA部位に結合することが明らかとなった(図2)。細胞を用いたダブルレポーターアッセイによりネガマイシンはゲンタマイシンよりread-through活性が高く(未発表データ)、マウ

ナンセンス変異型の遺伝性疾患は抗生物質で治療できるか?

SHIOZUKA Masataka, ARAKAWA Masayuki, MATSUDA Ryoichi



スにおいてはネガマイシンの急性毒性はゲンタマイシンに比べ有意に低いこともネガマイシンの有用性を示している¹⁰⁻¹²⁾。

ナンセンス変異により生じた終止コドンを薬物により読み越えさせることができれば、単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異型の遺伝性疾患を治療できる可能性がある。ネガマイシンは筋ジストロフィーのみならず、ナンセンス変異が原因の広汎な遺伝性疾患の治療薬として有望である。しかし、ネガマイシンはすでに発見されている抗生物質のひとつにすぎず、これまでに見つかっている抗生物質のなかにはさらに高いread-through活性と安全性をもつ物質が存在している可能性がある。今後、read-through活性を有する抗生物質ごとに終止コドンの種類や周辺の塩基配列に対する特異性、副作用が異なることが考えられる。

ため、安全性の高いread-through活性をもつ抗生物質のハイスループット・スクリーニング(high-throughput screening)と候補物質の分子改良が必須となるだろう。

ネガマイシンから創薬へ

われわれは、read-through活性によるナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬を開発すべく、2つのプロジェクトを進めている。

- ① ネガマイシンをリード化合物として、薬効の増強、副作用の軽減、溶解性・安定性・吸収性の改善を目的とした化学修飾もしくは誘導体化による構造の改変、最適化(修飾および合成、ドラ

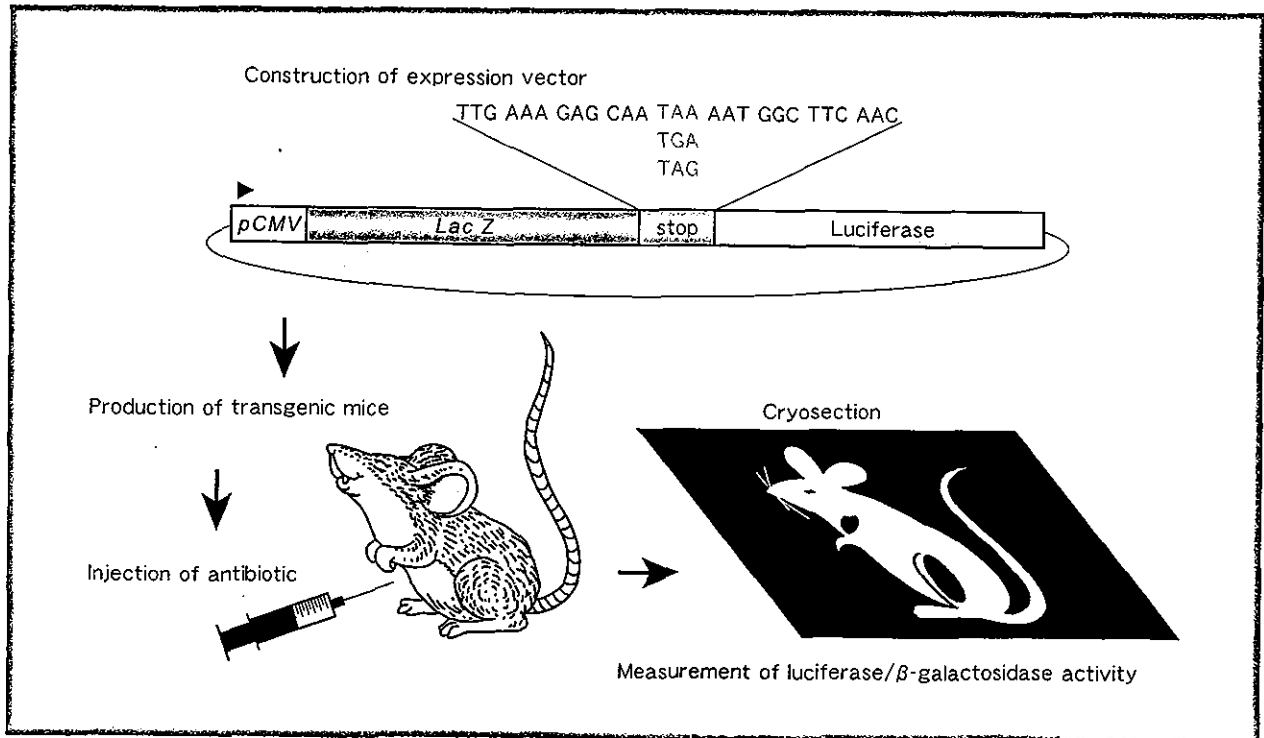


図3 read-through活性を調査するためのダブルレポーターアッセイ

サイトメガロウイルスのプロモーター以降に β -ガラクトシダーゼ(Lac Z)とルシフェラーゼ遺伝子を縦列につなぎ、そのつなぎ目に3種類の終止コドンを挿入したコンストラクト(周辺配列はmdxマウスのエクソン23部位)を含む発現ベクターを構築し、これを生殖細胞系列に組み込んだトランスジェニックマウスを作成する。候補抗生物質を一定期間投与したあとの組織/臓器からルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼの活性を測定し、比を求めることで、そのread-through活性を定量化する。

ナンセンス変異型の遺伝性疾患は抗生物質で治療できるか?

SHIOZUKA Masataka, ARAKAWA Masayuki, MATSUDA Ryoichi

ックデザイン)を行うこと

- ② さらに入手可能なあらゆる抗生物質を用い、それらの臓器別 read-through 活性を網羅的に検討すること

である。目下、その第一段階として、read-through 活性の検出系となる、ダブルレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの作出を試みている(図3)。read-through 活性をもつ物質の検索は、終止コドンを含むダブルレポーター遺伝子を組み込んだ培養細胞を用いてほかのグループによって行われており、いくつかの候補新規物質が見出されているが、動物個体を用いて解析しなかったため、それらはすべて毒性が強く、かつ標的組織/臓器も不明であり、結局、実用に耐える物質は見出されていない。われわれの方法では、read-through 活性をマウスの全組織について測定することにより、抗生物質の臓器/組織特異性、毒性などの把握が明確となり、逆にその標的組織を原因組織とするナンセンス変異型遺伝性疾患の治療薬候補とする。つまり、特定の遺伝性疾患にはじめから絞って研究を始めるのではなく、read-through 活性を示す抗生物質と標的組織の組み合わせから、逆に治療候補となる遺伝性疾患を特定することを目指している。

出現頻度が低い遺伝性疾患の治療薬は、医療上の必要性は高いが、商業的に成り立ちにくいオーファンドラッグ(orphan drug)であるため、その開発は非常に立ち後れている。今後は、個々の遺伝性疾患に対処するのではなく、単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異型の遺伝性疾患に対し、汎用性の高い治療薬の開発を目指していきたい。

*

本研究は、厚生労働省の精神・神経疾患研究委託費/厚生科学研究費、科学研究費、公益信託医用薬物研究奨励富岳基金(以上 RM)、早稲田大学特定課題研究助成、笹川科学研究助成、長寿科学振興財団厚生労

働科学研究推進事業(以上 MS)によって行われた。

References

- 1) Singh A, Ursic D, Davies J : Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 277 : 146-148, 1979
- 2) Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM : Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 2 : 467-469, 1996
- 3) Barton-Davis ER, Cordiner L, Shotoruma DI et al : Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J Clin Invest* 104 : 375-381, 1999
- 4) Du M, Jones JR, Lanier J et al : Aminoglycoside suppression of premature stop mutation in a *Cftr*^{-/-} mouse carrying a human *CFTR-G542X* transgene. *J Mol Med* 80 : 595-604, 2002
- 5) Politano L, Nigro G, Nigro V et al : Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 22 : 15-21, 2003
- 6) Wagner KR, Hamed S, Hadley DW et al : Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 49 : 706-711, 2001
- 7) Serrano C, Wall C, Moore SA : Gentamicin treatment for muscular dystrophy patients with stop codon mutations. *Neurology* 56 : A79, 2001
- 8) Hamada M, Takeuchi T, Kondo S et al : A new antibiotic, negamycin. *J Antibiot* 23 : 170-171, 1970
- 9) Uehara Y, Hori M, Umezawa H : Negamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phage f2 RNA *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 374 : 82-95, 1974
- 10) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J Biochem* 134 : 751-758, 2003
- 11) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y et al : Negamycin-therapy in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *Basic Appl Myol* 13 : 313-320, 2003
- 12) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T et al : Negamycin can restore dystrophin in *mdx* skeletal muscle. *Acta Myol* 20 : 154-158, 2001

ナンセンス変異型遺伝性疾患のリードスルー療法

塩塚政孝¹⁾, 荒川正行^{1,2)}, 松田良一¹⁾

1) 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系 2) 日本医科大学老人病研究所生化学部門

抗生物質には細菌のタンパク質翻訳系を標的にして抗菌活性を示すものがあり、アミノグリコシド系抗生物質は、濃度によっては翻訳忠実度の低下（コドンの誤読）を起こさせたり、終止コドンを読み越え（リードスルー）させる活性をもつことが報告されている。そのなかでもリードスルー活性が高いゲンタマイシンはナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬の有力な候補とされており、2003年に初めてリードスルー療法（抗生物質のリードスルー活性を利用した遺伝子治療法）によるDuchenne型筋ジストロフィー患者のゲンタマイシンによる治療例がイタリアから報告された。本稿では、ナンセンス変異型遺伝性疾患のリードスルー療法の理論とその可能性、現在行われているアミノグリコシド系抗生物質による治療例、そして現在筆者らが取り組んでいるネガマイシンセラピーについて紹介する。

Key words negamycin, nonsense mutation, read-through

●抗生物質がもつリードスルー活性

タンパク質の生合成過程では、リボソーム上でmRNA上の塩基配列をtRNAが読み取り、その情報に対応するアミノ酸を選び出してペプチド鎖を形成する。終止コドン(UAG, UAA, UGA)が、rRNAとタンパク質の複合体であるリボソームのアミノアシル(A)部位にくると、遊離因子がA部位に結合する。さらに、遊離因子によりペプチジル基転移酵素が活性化され、tRNAに結合したポリペプチドを切り離すことにより、タンパク質合成は終結する。

一方、アミノグリコシド系抗生物質は、細菌のタンパク質翻訳系を標的として抗菌作用を示す。特にゲンタマイシンやトブラマイシン、G418などは、

リボソームに結合し、mRNA上の終止コドンとリボソームのA部位との結合を阻害するため、終止コドンを読み越えて翻訳が進行し、本来より長いタンパク質分子を作らせる作用（リードスルー）を有することが知られている¹⁾。アミノグリコシド系抗生物質によるタンパク質合成の阻害は、もともと抗生物質に感受性のある原核細胞から調製した無細胞系翻訳系において発見されたが、その後90年代になって真核細胞においても起きることが知られ、ナンセンス変異^{*1}型遺伝性疾患の薬物による治療の可能性が開けてきた。

Read-through therapy for genetic disease caused by nonsense mutation

Masataka Shiozuka Masayuki Arakawa Ryoichi Matsuda

しおづか・まさたか 1999年早稲田大学大学院満期退学、2000年博士号（人間科学）取得。早稲田大学人間科学部助手を経て、02年より厚生労働科学研究リサーチレジデント（長寿科学振興財団）として東京大学大学院総合文化研究科松田研究室に所属。現在の研究テーマは骨格筋の再生機構。

●アミノグリコシド系抗生物質のリードスルー活性を用いたナンセンス突然変異の正常化

90年代後半、嚢胞性線維症の原因遺伝子CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) のナンセンス突然変異で生じた終止コドンが、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンやG418でリードスルーされ、欠失していたタンパク質が作られると報告された²⁾。特に、ジストロフィン遺伝子のエクソン23にナンセンス変異をもつDuchenne型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD)^{*2}のモデル動物であるmdxマウス³⁾、*3にゲンタマイシンを投与することで、筋組織内でのジストロフィンの蓄積と筋力の上昇がみられたという1999年のBartonらの報告⁴⁾は、効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移植以外に方法はないと考えられていたDMDに対する新しい治療手段として注目を集めた。

●リードスルー療法の可能性

一方、点突然変異によって遺伝子の途中で生じた終止コドンのリードスルーを起こさせる活性のある薬剤を投与すると、本来の翻訳終止点までもリードスルーしてしまう可能性がある。さらに、翻訳の誤読が頻繁に起こった場合も、生体へ悪影響が及ぼされることが危惧される。しかし、2002年にDuらに

より報告されたゲンタマイシンやトブラマイシンによるリードスルー効率は15%以下であり⁵⁾、実際にはmRNAは本来の翻訳終止点の後にも終止コドンが複数個存在している場合が多く、そのいずれかの終止コドンで翻訳が終結するため、リードスルーによる副作用は少ないと思われる。本来の翻訳終止コドンより5'上流側に点突然変異で生じた終止コドンは、本来の終止コドンよりも周囲の配列に支配されている翻訳終止効率が低く、選択的にリードスルーされやすい⁶⁾。また、リードスルー自体の効率は低くとも、終止コドンを乗り越えるリボソームがあればnonsense-mediated mRNA decay (NMD)^{*4}が抑制されるため、より多くの全長翻訳産物が得られる。これは、セレノシステインに読み替えられた終止コドン(UGA)のリードスルーが、セレンに依存するグルタチオンペルオキシダーゼI遺伝子のNMDを減少させたこと⁷⁾からも示唆される。したがって、アミノグリコシド系抗生物質の投与は、ナンセンス突然変異を原因とする遺伝性疾患では遺伝子治療よりも現実的な治療として期待を高めている。

●ゲンタマイシンでヒトDMDは治せるか

Politanoらは2003年に、DMDの4患者中1例ではあるが、ゲンタマイシン投与によるジストロフィンタンパク質の蓄積を免疫組織化学的・生化学的に確認した⁸⁾。ジストロフィンのロッドドメインの免疫染色の結果だけであれば、さらに2つの陽性例が

*1 ナンセンス変異 一塩基置換による点突然変異の一つ。一つのコドンを構成する3塩基のうち、1つの塩基が置き換わって本来の翻訳終止部位より5'側に終止コドン (premature stop codon) が生じることにより、リボソーム上でmRNAの翻訳を終止させる。その結果、完全長の機能をもったタンパク質が作られず、致死や遺伝子病を生じる (例: CAAはグルタミン、TAAは終止コドン)。

*2 Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) ジストロフィン遺伝子に欠失、切断、あるいは遺伝子の途中で点突然変異 (塩基置換により premature stop codon を生じるナンセンス変異や、塩基の欠失や追加により生じるフレームシフト変異など) が起きた結果、筋細胞膜裏打ちタンパク質ジストロフィンを合成できず、筋細胞膜が破壊されて発生する進行性の苛酷な筋萎縮症である。ジストロフィン遺伝子がX染色体上にあるため、新生男児3,500人に1人の割合で発症し、30歳頃までに呼吸不全か心不全で死亡する場合が多い。DMD患者集団のなかでナンセンス変異によるケースはそのおよそ15%を占めるといわれている。

*3 mdxマウス 1984年に報告された、X染色体に連鎖した遺伝形式をもつ筋力低下を伴う突然変異系統のマウス。ジストロフィン遺伝子上のエクソン23にナンセンス突然変異を有し、機能的なジストロフィンを合成できない。そのため筋変性を呈するが、ヒトの場合と異なり、明確な臨床症状がなく、発症して死に至ることはない。

*4 nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mRNAサーベイランスとも呼ばれる。ナンセンス変異が引き起こす転写産物を選択的に分解すること。ナンセンス変異が存在するmRNAにコードされたトランケート型の (C末端の欠けた) 異常なタンパク質は、毒性を発揮することが容易に予測できるため、潜在的に危険なタンパク質の合成をmRNAレベルで排除する細胞の基本的な防御機能。

確認されている。これらの陽性例はすべてTGAの終止コドンをもち、3'側の塩基が共通してCであった。これはゲンタマイシンによるリードスルー効率が最も高いとされている塩基配列である⁹⁾。TAAの終止コドンをもつ残り1例ではジストロフィンの発現はみられなかった。ゲンタマイシンによるDMDの治療効果はみられたとするPolitanoらとは対照的に、Wagnerら¹⁰⁾とSerranoら¹¹⁾は陰性例を報告している。加えて、2002年4月よりオハイオ州立大学のMendellらは、ゲンタマイシンを用いた3度目の臨床試験を36患者に対して長期間行っているが、現在のところ陽性例は報告されていない。これらの相違に関しては、ゲンタマイシンの3つの異性体(C1, C1a, C2)の存在比とその精製度の違いもあり、説明は難しい。

また、2003年にWilschanskiらは、ナンセンス変異によって生じた終止コドンをもつ嚢胞性線維症患者の気道上皮にゲンタマイシンを局所投与することで、上皮細胞の周辺と表面のCFTR染色に有意な増加を認め、CFTRの機能不全によって引き起こされる典型的な電気生理学的異常を修正することができることを報告した¹²⁾。

一方、遺伝性疾患の治療には患者への長期間投与が必要である。しかし、アミノグリコシドは血中濃度の安全域が狭く、それを上回るとただちに腎毒性や聴覚毒性、筋弛緩作用(神経筋接合部の障害)などの強力な副作用が現れる。現在では、ゲンタマイシンの聴覚毒性を減少させるものとして鉄キレート剤であるdihydroxybenzoateや、活性酸素、カルバイン阻害薬であるロイペプチンなどがあげられているが、患者への長期間投与には少なからぬ危険性が伴うと予想される。

●ネガマイシンセラピー

筆者らは、1970年代に微生物化学研究所で発見され、大腸菌由来の無細胞翻訳系でリードスルー活性を示すことが報告されているジペプチド系の未承認抗生物質ネガマイシン¹³⁾に着目し、研究を行ってきた。このネガマイシンを*mdx*マウスに2~4週間

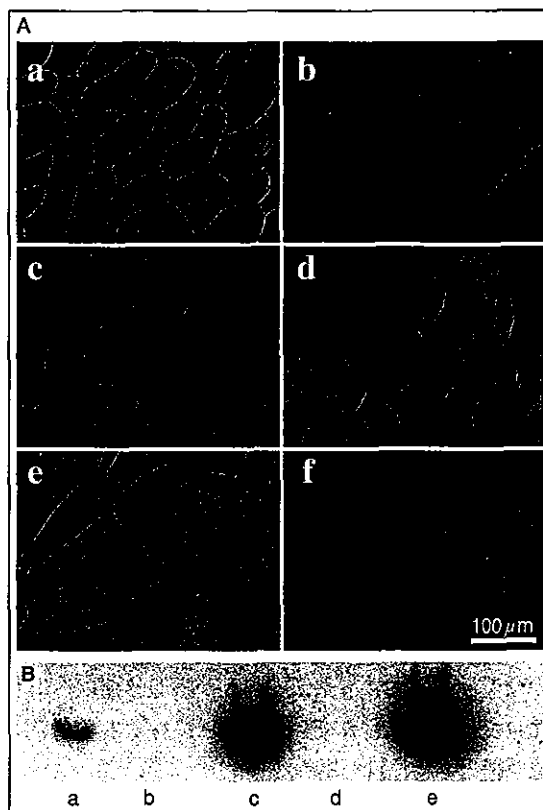


図1 ネガマイシン投与による*mdx*マウス骨格筋(前頸骨筋)におけるジストロフィンの蓄積と筋変性抑制効果

A: a・c・eはジストロフィンに対する蛍光抗体像, b・d・fは生体染色色素エバンスブルーによる変性筋線維の蛍光像。a・bは正常対照B10マウス筋組織, c・dは未投与*mdx*マウス筋組織, e・fはネガマイシン投与*mdx*マウス筋組織。

B: イムノブロット像 (a: ネガマイシン投与*mdx*マウス(20 μ gタンパク質), b: サンプルバッファーのみ, c: ネガマイシン投与*mdx*マウス(200 μ gタンパク質), d: 未投与*mdx*マウス, e: 正常対照B10マウス)

(Arakawa M, et al: *J Biochem(Tokyo)* 134, 751-8, 2003¹⁴⁾より)

にわたり連日投与したところ骨格筋および心筋組織内に、その欠損が筋ジストロフィー症の原因となる遺伝子産物ジストロフィンの蓄積が正常筋組織の10%程度認められ、同様に*mdx*マウス由来の培養筋細胞でもジストロフィンの蓄積がみられた¹⁴⁾。骨格筋でのジストロフィンの免疫染色像とイムノブロット像を図1に示す。さらに、ネガマイシンとrRNAとの構造活性相関について、エレクトロスプレーイ

オン化法による質量解析法を用いて分析したところ、ネガマイシンはrRNAのAサイトに結合することが明らかとなった。また、培養細胞を用いたダブルレポーターアッセイにより、ネガマイシンはゲンタマイシンよりリードスルー効率が大きく（未発表データ）、マウスにおいてはネガマイシンの急性毒性はゲンタマイシンに比べ有意に低いこともネガマイシンの有用性を示唆している¹⁴⁻¹⁶⁾。

ナンセンス変異により生じた終止コドンを薬物により読み越えさせることができれば、遺伝性疾患の5~15%を占めているナンセンス変異型の遺伝性疾患を治療できるかも知れない。ネガマイシンは筋ジストロフィーのみならず、ナンセンス変異が原因の広汎な遺伝性疾患の治療薬として有望である。しかし、ネガマイシン以外にも、これまでに見つかっている抗生物質のなかにさらに高いリードスルー活性と安全性をもつ物質が存在している可能性がある。今後、リードスルー活性を有する抗生物質ごとに終止コドンの種類や周辺の塩基配列に対する特異性、副作用が異なることが考えられるため、安全性の高いリードスルー活性をもつ抗生物質のハイスルーブット・スクリーニング^{*5}と候補物質の分子改良が必須となる。

●リードスルー活性検出系の必要性

大規模スクリーニングの際に必須となるのが、優れた検出系の確立である。筆者らは、リードスルー活性によるナンセンス変異型遺伝性疾患治療薬を開発すべく、現在次の2つのプロジェクトを進めている。すなわち、①ネガマイシンをリード化合物として、薬効の増強、副作用の軽減、溶解性・安定性・吸収性の改善を目的とした化学修飾もしくは誘導体化による構造の改変、最適化（修飾および合成、ドラッグデザイン）を行うこと、②さらに入手可能なあらゆる抗生物質を用い、それらのリードスルー活性を網羅的に検討すること、である。目下、その第一段階として、リードスルー活性の検出系となる、ダブルレポーター遺伝子を組み込んだ細胞株とトランスジェニックマウスの作出を試みている。その模

式図を図2に示す。リードスルー活性をもつ物質の検索は、終止コドンを含むダブルレポーター遺伝子を組み込んだ培養細胞を用いて他のグループによって行われており、いくつかの候補新規物質が見出されているが、動物個体を用いて解析しなかったため、それらはすべて生体に対する毒性が強く、かつ標的組織・臓器も不明であり、結局、実用に耐える物質は見出されていない。筆者らの方法では、リードスルー活性をマウスの全組織について測定することにより抗生物質の臓器・組織特異性、毒性等の把握が明確となり、逆にその標的組織を原因組織とするナンセンス変異型遺伝性疾患の治療薬候補とする。つまり、特定の遺伝性疾患に初めから絞って研究を始めるのではなく、“リードスルー活性”という薬効を示す抗生物質と標的組織の組み合わせから、逆に治療候補となる遺伝性疾患を探索・特定することを目指している。

また、パリ南大学のRousset教授らとの共同研究により、リードスルー効率を視覚化（色変換）した手法も用いることを計画している。図3は、異なる終止コドンの周辺配列を挿入したURA3 (pFL38) ベクターにADE2 遺伝子をレポーターとした酵母 (FS1) 生体内で、終止コドン周辺配列の違いによるリードスルー効率を調査したものである¹⁷⁾。リードスルー効率が2%未満なら赤色、2~10%なら淡紅色、15%以上なら白色のコロニーとして現れる。なお、彼らはこのSELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法に類似した、酵母ADE2 遺伝子を用いた系で、リードスルーやフレームシフトによる“recoding”のメカニズムを研究し、哺乳類細胞でゲンタマイシンに対する終止コドンの周辺配列の効果を分析している。

さらに筆者らは、カラーインクジェットプリンタ

*5 ハイスルーブット・スクリーニング 膨大な医薬品候補の化合物群から、薬として最適なリード化合物（新薬候補化合物：薬理活性のプロファイルが明らかであり、これを化学的に修飾することで活性の向上、毒性の減弱が期待できる新規化合物）を探索・抽出する際、薬効が高く、低毒性の有益なものを迅速に選択するための技術。創薬の初期段階のスクリーニングを効率化するうえで重要な役割を担うアプローチである。

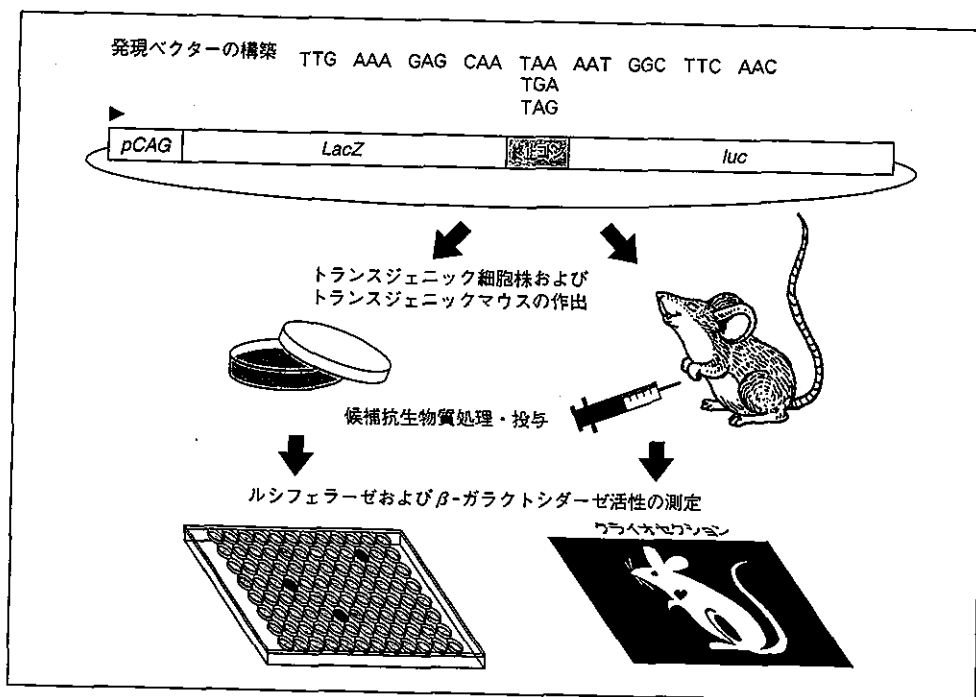


図2 リードスルー活性を調査するためのダブルレポーターアッセイの模式図
β-ガラクトシダーゼ (LacZ) とルシフェラーゼ遺伝子 (luc) を縦列につなぎ、そのつなぎ目に3種類の終止コドン挿入したコンストラクト (周辺配列は *mdx* マウスのエクソン23 部位) を含む CAG (サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリβ-アクチンハイブリッド) プロモーターを有する発見ベクター (pCAGGS) を構築し、これを生殖細胞系列に組み込んだトランスジェニックマウスとトランスジェニック細胞株を作出する。候補抗生物質を一定期間投与・処理した後、全身凍結切片の組織/臓器や細胞抽出液からルシフェラーゼとβ-ガラクトシダーゼの活性を測定し、比を求めることで、そのリードスルー活性を定量化する。

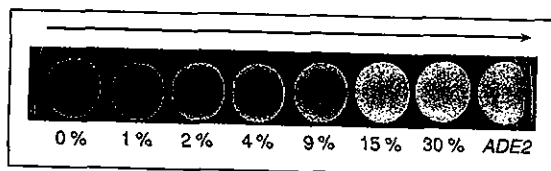


図3 ADE2 遺伝子のリードスルー効率
リードスルー効率の視覚化。異なるリードスルーモチーフを挿入した pFL38 プラスミドに ADE2 遺伝子を組み込み、FS1 酵母に形質転換したものを、1% のリードスルー効率から 30% まで並べたものである。指数関数的に増殖する細胞をプレート上にスポットし (1×10^6 / ml)、30℃ で3日間培養した後、色を観察した。
(Namy O, et al: *EMBO Rep* 2, 787-93, 2001¹⁷⁾ より)

を利用し、成長因子アレイを作製して解析する系をすでに確立している¹⁸⁾。多因子を正確かつ簡便に組み合わせる技術を応用することで、インクの代わりに複数の薬剤を培養液・培養基質に吐出させ、細胞培養系で多様な組み合わせの複合作用を同時に解析

できる。この系を用いるとタンパク質合成系に干渉する抗生物質や、リードスルー効率を相乗的に高める薬剤、副作用を抑制する薬剤、タンパク質・核酸合成阻害薬などの複数の薬剤の相互・複合作用を検討することが可能となる。

おわりに

出現頻度が低い遺伝性疾患の治療薬はオーファンドラッグ (国内の対象患者が5万人以下の希少疾病用医薬品) であり、製薬企業にとっては研究開発リスクが高く敬遠されがちである。そのため、医療上の必要性が高いにもかかわらず、開発は非常に立ち遅れているのが現状である。今後は、個々の遺伝性疾患に対処するのではなく、単一遺伝性疾患の3割を占めるナンセンス変異型の遺伝性疾患に対し、汎用性の高い治療薬の開発を目指していきたい。

本研究は、厚生労働省の精神・神経疾患研究委託費/
厚生科学研究費、科学研究費、公益信託医用薬物研究奨
励富岳基金（以上RM）、早稲田大学特定課題研究助成、

笹川科学研究助成、長寿科学振興財団厚生労働科学研究
推進事業（以上MS）によって行われた。

文献

- 1) Singh A, Ursic D & Davies J. Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **277**, 146-8 (1979)
- 2) Howard MT, Frizzell RA & Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* **2**, 467-9 (1996)
- 3) Allamand V & Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy : Valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet* **9**, 2459-67 (2000)
- 4) Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE & Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J Clin Invest* **104**, 375-81 (1999)
- 5) Du M, Jones JR, Lanier J, et al. Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a *Cftr*^{-/-} mouse carrying a human *CFTR*-G542X transgene. *J Mol Med* **80**, 595-604 (2002)
- 6) Namy O, Duchateau-Nguyen G, Hatin I, et al. Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **31**, 2289-96 (2003)
- 7) Moriaty PM, Reddy CC & Maquat LE. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* **18**, 2932-9 (1998)
- 8) Politano L, Nigro G, Nigro V, et al. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon : Preliminary results. *Acta Myol* **22**, 15-21 (2003)
- 9) Howard MT, Shirts BH, Petros LM, et al. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough : Potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* **48**, 164-9 (2000)
- 10) Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* **49**, 706-11 (2001)
- 11) Serrano C, Wall C & Moore SA. Gentamicin treatment for muscular dystrophy patients with stop codon mutations. *Neurology* **56**, A79 (2001)
- 12) Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* **349**, 1433-41 (2003)
- 13) Hamada M, Takeuchi T, Kondo S, Ikeda Y & Naganawa H. A new antibiotic, negamycin. *J Antibiot (Tokyo)* **23**, 170-1 (1970)
- 14) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, et al. Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 751-8 (2003)
- 15) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, et al. Negamycin-therapy in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *Basic Appl Myol* **13**, 313-20 (2003)
- 16) Arakawa M, Nakayama Y, Hara T, et al. Negamycin can restore dystrophin in *mdx* skeletal muscle. *Acta Myol* **20**, 154-8 (2001)
- 17) Namy O, Hatin I & Rousset JP. Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* **2**, 787-93 (2001)
- 18) Watanabe K, Miyazaki T & Matsuda R. Growth factor array fabrication using a color ink jet printer. *Zool Sci* **20**, 429-34 (2003)

＜シンポジウム 12-3＞遺伝性筋ジストロフィーの根本治療をめざして

筋ジストロフィーの病態に応じた薬物治療の可能性

塩塚 政孝 荒川 正行 松田 良一

(臨床神経, 44: 908-910, 2004)

Key words: リードスルー療法, ゲンタマイシン, ネガマイシン, ナンセンス突然変異

はじめに

アミノグリコシド系抗生物質は細菌のタンパク質翻訳系を標的として抗菌作用を示す。とくにゲンタマイシンは、リボソームのA部位に結合し、mRNA上のコドンとリボソームのA部位との結合を干渉する。そのため、本来とはことなるtRNAの結合による過ったアミノ酸配列の形成 (miscoding) や終止コドンを飛び越えて翻訳が進行し、本来より長いタンパク質分子を作らせる作用 (read-through) を有することが知られている¹⁾。このread-through作用は、もともとアミノグリコシド系抗生物質に感受性のある原核細胞から調製した無細胞系翻訳系において発見されたが、その後、90年代になって真核細胞においてもおきることが知られ、ナンセンス突然変異型遺伝子病の薬物治療の可能性が拓けてきた²⁾。本稿ではゲンタマイシンとネガマイシンによる最近のread-through薬に関する研究成果について述べる。

筋ジストロフィーのゲンタマイシン療法

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy: DMD) は、ジストロフィン遺伝子に欠失、切断、あるいは遺伝子の途中で点突然変異 (塩基置換により Premature Termination Codon: PTC を生じるナンセンス突然変異や、塩基の欠失や追加により生じるフレームシフト変異など) がおきた結果、筋細胞膜裏打ちタンパク質ジストロフィンを合成できず、筋細胞膜が破壊され発生する進行性の筋萎縮症である。ジストロフィン遺伝子がX染色体上にあるため、新生男児3,500人に1人の割合で発症し、30歳までに呼吸不全か心不全で死亡する。この重篤な遺伝性筋疾患であるDMDの有効な治療方法はまだ確立されていない。DMD患者集団の中でナンセンス突然変異によるケースはそのおよそ15%を占めるといわれている。

1999年、Bartonら³⁾はジストロフィン遺伝子のエクソン23にナンセンス突然変異をもつ、DMDのモデル動物であるmdxマウスにゲンタマイシンを投与することで、筋組織内でのジストロフィンの蓄積と筋力の上昇をみとめた。この報告は効果的な治療手段がなく、将来的にも遺伝子導入か細胞移

植以外に方法はないと考えられていた筋ジストロフィーに対する新しい治療手段を提供するものとして注目を集めた。2003年、Politanoらは、ヒトDMDの4患者中1例ではあるが、ゲンタマイシン投与によりジストロフィンタンパク質の蓄積を免疫組織化学的・生化学的に確認した⁴⁾。免疫染色の結果だけであればさらに2つの陽性例が確認されているが、反対にWagnerら⁵⁾とSerranoら⁶⁾は陰性例を報告している。この相違に関しては、ゲンタマイシンの3つの異性体含有比率と精製度の違いによって説明ができるかもしれない。一方、遺伝子病の治療には患者への生涯にわたる長期間投与が不可欠である。しかし、アミノグリコシド系抗生物質は血中濃度の安全域が狭く、それを上回ると直ちに腎毒性や聴覚毒性、筋弛緩作用などの強力な副作用が現れ、さらに耐性菌出現の可能性があり、遺伝子病患者への長期間投与には少なからぬ危険性がともなうと予想される。したがって、アミノグリコシド系抗生物質とは構造がことなる別分子種のread-through薬の出現が待たれる。

筋ジストロフィーのネガマイシン療法

われわれは70年代に微生物化学研究所で発見されたジベプチド系の未承認抗生物質ネガマイシン⁷⁾に着目し、研究をおこなってきた。なぜなら、この抗生物質は大腸菌由来の無細胞翻訳系でread-through活性を示すことが報告されていたからである⁸⁾。このネガマイシンを2-4週間にわたりmdxマウスに連日皮下投与したところ、骨格筋および心筋組織内にジストロフィンタンパク質の蓄積が正常筋組織の10%まで回復することを免疫染色とイムノプロット法によりみとめた。同様にmdxマウス由来の培養筋細胞でもジストロフィンの蓄積がみられた。さらに、ネガマイシンとrRNAとの構造活性相関について、エレクトロスプレーイオン化法による質量解析法をもちいて分析したところ、ネガマイシンはrRNAのA部位に結合することが明らかとなった⁹⁾。細胞をもちいたダブルレポーターアッセイによりネガマイシンはゲンタマイシンよりread-through活性が高く (未発表データ)、マウスにおいてはネガマイシンの急性毒性はゲンタマイシンにくらべ有意に低い¹⁰⁾。ナンセンス突然変異により生じたPTCを薬物により読み越えさせることができれば、遺伝子疾患の

5~15%を占めているナンセンス突然変異型の遺伝子病を治療できる可能性がある。したがって、ネガマイシンはゲンタマイシンとともに、筋ジストロフィーのみならずナンセンス突然変異が原因の広汎な遺伝子疾患の治療薬として注目される。

ネガマイシンから創薬へ

われわれは、read-through 活性によるナンセンス突然変異型遺伝子病治療薬を開発すべく、2つのプロジェクトを進めている。すなわち、(1) ネガマイシンをリード化合物として、薬効の増強、副作用の軽減、溶解性・安定性・吸収性の改善を目的に、化学修飾もしくは誘導体化による構造の改変、最適化(修飾および合成、ドラッグデザイン)をおこなうこと。(2) コンピュータ上でネガマイシンと構造的類似性が高い化学物質を検索し、それらのread-through 活性を網羅的に検討することである。問題は検出系である。これまでread-through 活性をもつ物質の検索は、PTCを組み込んだデュアルレポーター遺伝子を導入した培養細胞をもちいて他のグループによっておこなわれており、いくつかの候補新規物質がみいだされている。しかし、それらは培養細胞をもちいているため、毒性や標的組織/臓器は不明である。そこでわれわれは目下、read-through 活性の検出系としてデュアルレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの作出を試みている。このトランスジェニックマウスをもちいれば、read-through 活性をマウスの全組織について測定することにより、薬物の臓器/組織特異性、毒性などが明確となる。逆にその標的臓器を原因臓器とするナンセンス突然変異型遺伝子病の治療薬候補とできる。

read-through 薬のもつ副作用

PTCをread-through する能力は翻訳系の忠実度を下げることによって生じる。そのためにおきるmis-codingの問題、本来の翻訳終結コドンのread-throughがこのread-through 薬の欠点といえる。長期間投与による腎毒性、肝毒性、さらに耐性菌の出現も考慮しなければならない。適応症例を酵素欠損疾患のような最少レベルのread-throughによっても治療効果が期待できるナンセンス突然変異疾患に限定する必要性も考えられる。さらに、mis-coding 効率よりread-through 効率が高い薬物の開発が待たれる。

まとめ

翻訳過程でPTCをread-through させる薬物は、ナンセン

ス突然変異による遺伝子病の化学療法を可能にするものである。そのような作用をもつゲンタマイシンとネガマイシンが現在、注目されている。これらの抗生物質の長期間投与によるmiscoding や耐性菌の出現などの問題をいかに少なくするかは実用化の鍵になる。われわれは、ネガマイシンの構造類縁体をオンチップ検索するとともに、read-through の検出用トランスジェニックマウスとそれをもちいたread-through 物質の大規模スクリーニング計画を進めている。

謝辞：本研究は、厚生労働省の精神・神経疾患研究委託費/厚生科学研究費、公益信託医用薬物研究奨励富岳基金などによっておこなわれた。

文 献

- 1) Singh A, Ursic D, Davies J: Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 1979; 277: 146-148
- 2) Howard MT, Frizzell RA, Bedwell DM: Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996; 2: 467-469
- 3) Du M, Jones JR, Lanier J, et al: Aminoglycoside suppression of premature stop mutation in a *Cftr*^{-/-} mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J Mol Med* 2002; 80: 595-604
- 4) Barton-Davis ER, Cordiner L, Shoturma DI, et al: Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 375-381
- 5) Politano L, Nigro G, Nigro V, et al: Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 2003; 22: 15-21
- 6) Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al: Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001; 49: 706-711
- 7) Serrano C, Wall C, Moore SA: Gentamicin treatment for muscular dystrophy patients with stop codon mutations. *Neurology* 2001; 56: A79
- 8) Hamada M, Takeuchi T, Kondo S, et al: A new antibiotic, negamycin. *J Antibiot* 1970; 23: 170-171
- 9) Uehara Y, Hori M, Umezawa H: Negamycin inhibits termination of protein synthesis directed by phage f2 RNA in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1974; 374: 82-95
- 10) Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, et al: Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice. *J Biochem* 2003; 134: 751-758

Abstract**Possible chemotherapy of muscular dystrophy caused by nonsense mutation**

Masataka Shiozuka, Ph.D., Masayuki Arakawa, Ph.D. and Ryoichi Matsuda, Ph.D.

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, the University of Tokyo at Komaba

Gentamicin, an aminoglycoside antibiotics which causes read-through of premature termination codon during translation, has been used to rescue genetic diseases caused by nonsense mutation. Its strong side effects, however, has always threaten patients. In order to utilize other antibiotics with less side effects than gentamicin, we have shown that negamycin, a dipeptide antibiotics with read-through activity in prokaryotes, restored dystrophin in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mouse, an animal model for Duchenne type muscular dystrophy caused by nonsense mutation. To avoid miscoding and emerging resistant bacteria for these read-through antibiotics, further drug design and high throughput screening of gentamicin- or negamycin-related molecules will be needed.

(Clin Neurol, 44 : 908—910, 2004)

Key words : chemotherapy, muscular dystrophy, gentamicin, negamycin, nonsense mutation

成長因子アレイを カラーインクジェット プリンタで

イモリ心筋再生の秘密はどこにあるのか？
この謎を調べるには、様々な成長因子の組み合わせと濃度を検討する必要があり、実験量が膨大になる。この問題を解決する鍵は身近なところにあった。

松田良一

(まつだ・りょういち)

東京大学大学院
総合文化研究科
広域科学専攻

イモリに心臓疾患はあるか？

現代人の死因のうち、がんに次いで多いのが心臓疾患である。その根本的原因は、成人の心筋細胞には分裂能力がなく心筋は再生できないためだ。いったん心筋細胞が死ぬと、代償的に非心筋細胞が増殖し、心筋の一部が結合組織化してしまい、それが心筋梗塞の原因になる。同じ横紋筋である骨格筋はほとんどの場合、寿命に影響する程の疾患にはならない。骨格筋には衛星細胞という未分化な筋細胞が多数存在し、それらが筋の変性にとまない増殖し筋組織を再生させるからだ。も

し、成人の心筋細胞を増殖させることができれば、寿命の延長につながる朗報になるだろう。

一方、ヒトの場合とは異なり、再生に長けた両生類イモリでは心筋の再生が起きるらしい。イモリの心臓に凍傷を負わせ、DNA合成を調べると、確かに分化した心筋細胞が増殖に向けてDNA合成を開始する(図1)。

イモリの心筋細胞の増殖に必要な成長因子は何か？イモリの心筋細胞を培養してみたが、なかなか増殖しない。生体内では多数の成長因子などが複合的に関与しているであろうことは想像にかたくない。きっと、私たちが実験に用いている培養液に何種類かの成長因子が足りないのだろう。

カラーインクジェットプリンタの登場

もし、心筋細胞の増殖に複数の成長因子が必要ならばそれを証明するための実験は複雑になる。例えば、成長因子の濃度を10段階設定し、成長因子を n 種類用いると「10の n 乗通り」の実験が必要になる。2種類程度なら実験できるだろうが、3種類、4種類と増えてくると実験がきわめて困難になる。こんなテーマを大学院生に与えたら、院生は不登校になるか研究室の所属を変更してしまうだろう。大学院生たちと研究室で雑談しながら、今後、実験をどのように進めたらよいかを考えていたのが4年前の夏。その時、思いついたのが市販のカラーインクジェットプリンタだった。インクの代わりに複数種類の成長因子を培養基質上にアレイ状にプリントし、その上で細胞を培養すれば、複数種類の細胞への複合作用を研究することができるはずだ。

インクジェットプリンタをかき集める

早速、大学院生の渡辺耕平は研究室にあったプリンタのインクタンクやヘッドの洗浄と改造に取り組んだ。使いやすいプリンタを求めて彼は大学の廃棄物集積所に足を運び、彼の実験台と研究室前の廊下には中古のプリンタが山積みとなった。インクジェットプリンタのインク吐出方式には主にピエゾ方式とサーマルジェット方式がある。ヘッド構造の単純さと洗浄や改造の容易さ、そして値段の安さからわれわれは後者のプリンタにねらいを定めた。

この方式はキヤノンが開発し、同社製プリンタに採用されている。ヒーターボードと呼ばれる微小加熱部でインクの一部が発泡し、そこで急激に

図1

イモリの心筋細胞はDNA合成する

イモリを麻酔し、心臓に凍傷を負わせ、その数日後にプロモデオキシウリジン(BrdU)を投与し、1日後に心筋を採取。その凍結切片を抗心筋ミオシン抗体(緑)と抗BrdU抗体(赤)で免疫染色した蛍光抗体写真。核DNAはヘキスト33258で青く染色されている(近藤公彦、松田未発表)。

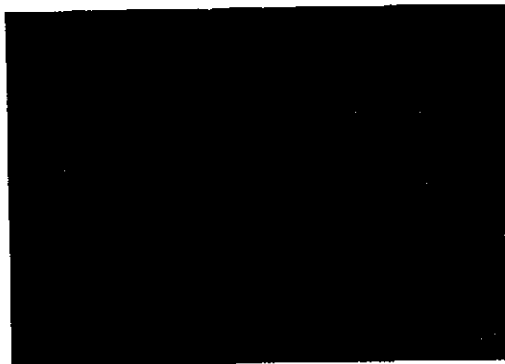
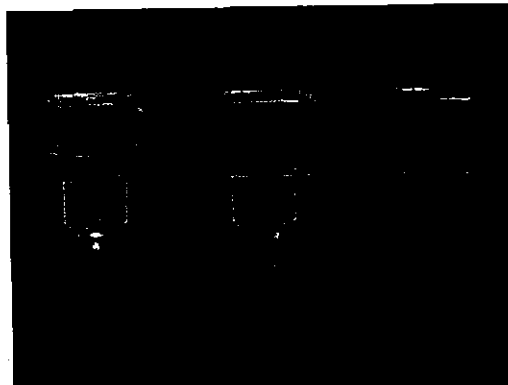


図2

サーマルジェット方式のプリンタとインク吐出のしくみ

ヒーターボード上の極微量のインクが発泡すると、生じた泡がインクを押し出す。



膨張した水蒸気がインクを押し出すしくみだ(図2)。われわれはキヤノンの技術協力のもと、研究を進めることになった。

成長因子の固定化

ポリスチレン培養基質にプリントされた成長因子が培養液に流れ出ないように、ポリスチレンと化学架橋を作る必要がある。そこで、渡辺は4-azidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide を用いて光化学架橋アームをペプチド性成長因子に付加し、水銀ランプからの光を照射することでポリスチレンと架橋することに成功した。さらに大学院生の藤山朋代は活性化デキストランを用いてポリスチレンに成長因子を架橋させた。

このように固定化したインスリン、インスリン様成長因子-1(IGF-1)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)は溶解状態の場合と同様、筋芽細胞株C2C12に対して活性を示した。藤山と渡辺はIGF-1、bFGFと骨形成因子(BMP-2)による成長因子アレイの作製に成功し、C2C12細胞の筋分化と骨分化におけるこれら3種類の成長因子の複合作用について調べた(図3、投稿中)。胚性幹細胞についても検討中だ。

再生医療にも使える

最近、注目されているのが分化多能性をもつ幹細胞の再生医療への応用である。成体の骨髄などに含まれる幹細胞を必要な細胞タイプに分化させ、それを本人の必要な標的臓器に移植してやれば、免疫学的さらには倫理的問題をクリアして臓器の再生を促すことができるだろう。いかにして幹細胞を必要な特定の分化運命をもった細胞に特化させるかが問題だ。ここにも複数種類の成長因子による複合作用が効いているのではないか?これも、先に述べたカラーインクジェットプリンタによる成長因子アレイが大きな働きをする分野と考えられる。

細胞の配列パターンを制御する

多細胞生物の体内では細胞の配列が制御され、機能細胞は特定パターンに配列して組織を構築し

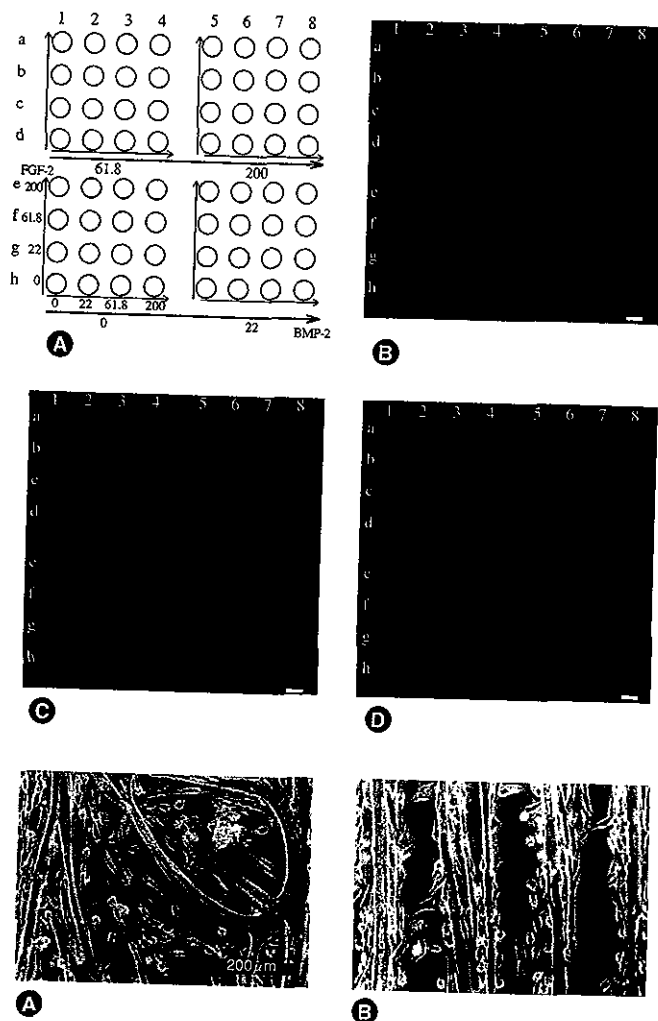


図3 成長因子アレイ上におけるマウス骨格筋細胞C2C12の分化

(A) のようにbFGF、IGF-1、BMP-2を異なった量でプリントし、固定化させてかC2C12細胞を培養した。培養4日後に固定、(B) DNA結合色素TOTO-3、(C) 抗ミオシン重鎖抗体MF20、(D) 抗アルカリファスファターゼ抗体と反応させ、IRDye800結合抗マウスIgG抗体にて染色後、近赤外線画像解析装置オデッセイ(アロカ)にて画像化した。

図4 ゼラチン帯上に分化したニワトリ骨格筋細胞

ポリスチレン膜にインクジェットプリンタを用いてゼラチンを平行、帯状にプリント後、その上でニワトリ胚由来骨格筋細胞の初代培養を行った。形成された筋ファイバーは平行にパターンニングされた(満武未発表)。(A) ゼラチンを全面塗布した培養基質上でランダム方向に分化した筋細胞。(B) ゼラチンを直線帯状にプリントした培養基質上で帯方向に形成された筋細胞。

ている。細胞の配列には、コンタクトガイダンスと呼ばれる細胞外基質に沿った細胞の接着と移動が働いている。ところが、培養条件下で細胞の配列を制御することはむずかしい。筋組織内では張力方向にきれいに配列する骨格筋細胞も培養皿内で分化させると、形成した筋ファイバーの方向性はランダムになってしまう。血管内皮細胞による血管形成も神経細胞から延びる神経突起の成長も同様だ。配向を制御した培養シートを作製できれば、再生医療の新しいツールができるかもしれない。

そこで大学院生の満武里奈は、細胞外基質成分であるコラーゲンの加水分解物ゼラチンを、インクジェットプリンタを用いて種々の帯幅と間隔で平行にプリントし、その上で骨格筋細胞を培養した。生じた筋ファイバーはゼラチン帯の上にきれいに並び、生体筋組織内における場合と同じく平行に配向させることに成功した(図4)。このカラーインクジェットプリンタの優秀な機能を活かして、細胞生物学の新たな展開をめざしたい。

参考文献

- (1) K. Watanabe, T. Miyazaki & R. Matsuda: "Fabrication of growth factor array by using a color ink jet printer" *Zool Sci* 20 (2003) 429-434
- (2) T. Fujiyama, K. Watanabe, T. Miyazaki, M. Shiozuka & R. Matsuda: "Growth factor array fabrication using an ink jet printer" *Mol Biol Cell* 14 (2003) 427a

特集



幼稚な教科書がハカをつくる

②東大でも高校の補習が必要な理由

松田良一

(東京大学助教授)



質・量とも最低の生物教科書で科学立国、遠い夢



私

は東大教養学部で理科Ⅱ・Ⅲ類の学生を中心に生物学を講義しています。98年度から正規の授業のほかに、高校生物の「補習」を行っています。理科Ⅲ類は医学部進学コースで、理科Ⅱ類も生物に関連のある専門課程に進学する学生が多いコースです。ところが、教育制度の改定により、97年度の入学生から、理系であるのに高校で生物をまったく学んでいない学生が一定の割合を占めるという事態になりました。

97年に行った調査では、理科Ⅲ類進学者の約4割が高校生物の未修者で、その状態は現在も続いています。将

来、医者を目指す学生たちが高校時代に生物の基礎をきちんと学んでいないというのは、非常に由々しき事態だと思います。高校で学んだ者と中学校までしか学んでいない者とは、大学の授業の理解力には大きな差があり、放っておくわけにはいきません。そのような事情で、高校レベルの補習を行わざるをえなくなったというわけです。

さすがに優秀な学生が多いので、一般教養課程を終える2年後までに彼らが大学レベルへ到達することはそれほど難しいことではありません。しかし、来年度には、新たな心配事が加わります。今年度の入学生までは、生物の進

化やイオンのほたらきなどについては、たとえ高校時代に教わらなくても中学

の理科で最低限の基礎だけは学んでいました。しかし、来年度の入学生からは、それさえも学んでいない学生が入ってくる可能性があるからです。

じつは、高校の理科の授業課程は、ここ半世紀あまりの間に大きな変貌を遂げています。

1963年度施行の学習指導要領では「物理」「化学」「生物」「地学」の4科目が「必修」でした。ちょうど団塊の世代以後、10歳ぐらいたままでの方——私もそうですが——は、理科の4領域を個別にきちんと学んだ世代で