HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリア遺伝子発現を目指した遺伝子設計および in vivo 遺伝子導入による機能検証［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	安﨑, 友香理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11422号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55793
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yukari_Yasuzaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　氏 名　安崎 友香理

学 位 論 文 題 名

ミトコンドリア遺伝子発現を目指した遺伝子設計および *in vivo* 遺伝子導入による機能検証

ミトコンドリアは、エネルギー産生、アポトーシスの誘導制御をはじめとする多彩な機能を有した細胞内小器官であり、その機能異常によって、癌、糖尿病、パーキンソン病、自己免疫性疾患など、様々な疾患を誘発することが知られている。更に、近年、これらの疾患において、核の遺伝子とは異なるミトコンドリア独自の DNA (mtDNA)の変異により引き起こされる例が相次いで報告されている。従って、正常なミトコンドリア遺伝子をコードする遺伝子の導入及び発現により、ミトコンドリア病の根本治療や解析に繋がると考えられる。

これまで、外来遺伝子の導入検証に関する報告はごくわずかであり、また、ミトコンドリアにおける転写・翻訳の過程を詳細に検証している報告は皆無であった。ミトコンドリアにおける外来遺伝子の発現を達成するためには、第一に、ミトコンドリアで発現するような適切な遺伝子を設計すること、第二に、ミトコンドリアにおいて発現するために十分な量の遺伝子を送達する技術を確立することが必要であると考えられる。

本研究では、ミトコンドリアの転写・翻訳システムに重要と思われる配列を有する遺伝子を設計し、外部からミトコンドリアへと導入することで、その機能がミトコンドリアにおいて発現可能か否かを検証することを目的とした。ミトコンドリアへの遺伝子導入には、ハイドロダイナミクス法の適用を考えた。本法は、大容量の遺伝子溶液を、圧力をかけて投与することで、一過的な膜透過性の亢進を引き起こし、特定の臓器 (肝臓・筋肉など)において高い遺伝子発現を得ることのできる投与方法である。本投与法による核あるいは細胞質への遺伝子送達が可能なのであれば、ミトコンドリアにも送達され得ると考えられる。

【ミトコンドリア発現型遺伝子の設計と遺伝子発現検証】

mtDNA は、H 鎖・L 鎖からなる環状二本鎖 DNA であり、多くのタンパク質サブユニットは H 鎖にコードされ、エキソン領域が密に配置されるという特殊な構造を持つ。例外的に、タンパク質等をコードしない 1kbp 程度の領域があり、その中には、ミトコンドリア特異的プロモーターである HSP (H strand promoter) が存在する。本研究では、HSP を mtDNA コード内因性タンパク質サブユニット ND4 配列の上流に付加し、下流には外来遺伝子のタグとして FLAG を付加することで、pHSP-ND4FLAG を新たに設計した。

まず、肝臓へのハイドロダイナミクス法である HTV (Hydrodynamic tail vein injection)法により pDNA を投与し、ミトコンドリアに遺伝子を送達可能であるか否かを、定量的 PCR 法によって検証した。その結果、非特異的にではあるが、ミトコンドリアへと遺伝子が導入されていることが示唆された。

次に、pHSP-ND4FLAG をマウス肝臓に HTV 法で導入し、RT-PCR にて外来導入遺伝子の転写を評価したところ、pHSP-ND4FLAG の転写と思われるバンドが検出された。更に、核転写用プロモーターを有する pCMV-ND4FLAG、及びプロモーターを削除した pND4FLAG を比較対象のコントロール遺伝子として設計し、核抽出液中に各遺伝子を添加して、核における *in vitro* 転写量を定量的 RT-PCR にて定量した。その結果、pHSP-ND4FALG の転写量は、pCMV-ND4FLAG に比較して有意に低く、核ではほぼ転写されていないことが示唆された。

続いて、外来遺伝子発現を簡便に検証するため、NanoLuc レポーター遺伝子を組み込んだ遺伝子の設計、及び発光の検出を試みた。設計には、次の二点に配慮した。第一に、ミトコンドリア特有のコドン対応が挙げられる。ミトコンドリアコドンのいくつかは、核由来の遺伝子のコドンとは異なる対応をしている。従来の NanoLuc 配列では、一部のコドンに対応するアミノ酸がないためにミトコンドリア翻訳停止がかかっており、このままの配列では発現しないことになる。第二に、RNA processing 過程が挙げられる。mtDNA からポ

リシストロニックに転写された RNA は、mttRNA の構造を認識した RNase P (5’側)及び RNase Z (3’側)によるスプライシングを経て、機能単位へと分解されることで翻訳過程へと進むことが報告されている。

そこで本実験では、ミトコンドリアコドン対応及び RNA processing 過程を考慮した遺伝子 pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133}-tRNA (以下[TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133})を設計し、NanoLuc の発光活性を測定することにより、遺伝子発現の可否を検証した。なお、発現検証の比較対象として、核・ミトコンドリアの両方で翻訳停止するコドンバリアント pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TG*A**]^{34}[*T*A**G]^{133}-tRNA (以下[TG*A**]^{34}[*T*A**G]^{133}) を併せて設計した。検証の結果、[TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133} 投与群の発光活性は、[TG*A**]^{34}[*T*A**G]^{133} 投与群よりも有意に高いことが明らかとなった。このことから、[TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133} 遺伝子は、ミトコンドリアにおいて機能し、タンパク質を発現することが示唆された。

以上のことから、本研究で設計した遺伝子はミトコンドリアにおいて機能し、転写・翻訳可能であることが示唆された。

【骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達および機能検証】

ミトコンドリアの病態を呈する主な組織は骨格筋であるが、ミトコンドリアへの外来遺伝子導入に成功した報告はほぼ皆無である。本章では、骨格筋を標的としたハイドロダイナミクス法である HLV (Hydrodynamic limb vein injection)法を用いて、ミトコンドリアへの外来遺伝子導入を検証した。

HLV 投与後の骨格筋ミトコンドリア中に pDNA が送達され得るか否かを、PCR で増幅することで検出を試みた。その結果、ミトコンドリア画分において pDNA のバンドが検出され、また、局所投与サンプルに比較してより強いバンド強度が認められた。次に、投与量と投与容積の最適化により、約 200 μg、3 mL で効率的にミトコンドリアへ遺伝子を送達可能であることが明らかとなった。加えて、ミトコンドリア膜電位、及び COX 活性について評価したところ、顕著な低下は認められなかった。

以上の結果から、HLV 法により導入された遺伝子は、非特異的ではあるが、ミトコンドリアに傷害を与えることなく送達されることが示唆された。しかしながら、定量的なデータを得ることで、1 細胞あたりの mtDNA が 1000 コピーとすると、10~100 細胞に 1 コピーの割合で pDNA が送達されたことが明らかとなった。ミトコンドリアにおけるより効率的な遺伝子発現を達成するためには、送達量の向上が重要であると考えられる。

pDNA のミセル化ナノ粒子を HLV 投与した場合、naked pDNA 投与群と比較して、骨格筋内に 200 倍程度の pDNA を送達可能であり、核においては持続的かつ高い遺伝子発現が得られたことが報告されている。そこで、ミトコンドリアにおける遺伝子送達においても、投与遺伝子の形態を変化させることで送達量の上昇が期待できると考えた。本研究では、ポリカチオンとしてプロタミンを用いて遺伝子を凝縮化し、調製したナノ粒子を HLV 投与して、ミトコンドリアへの遺伝子送達量の向上を目指した。その結果、凝縮化ナノ粒子を投与した際には、naked pDNA 投与群と比較して、約 100~1000 倍の送達量を示すことが明らかとなった。

続いて、先に設計した[TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133} をラット骨格筋に投与し、ミトコンドリア機能解析に意義のある骨格筋におけるタンパク質発現が可能か否かを検証した。NanoLuc の発光活性を評価した結果、ミトコンドリアストップコドンを含む[TG*A**]^{34}[*T*A**G]^{133} を投与した場合と比較して、有意に高い値を示すことが明らかとなった。以上のことから、ミトコンドリアにおいて発現するようにデザインした新規設計遺伝子は、骨格筋においても発現することが示唆された。

本研究の遂行により、ミトコンドリアへの外来遺伝子送達を評価する実験系を構築し、pDNA を肝臓及び骨格筋のミトコンドリアへ送達することに成功した。また、ミトコンドリアにおいて発現可能な遺伝子を設計し、転写と翻訳を検証することに成功した。本研究の成果により、 *in vivo* 肝臓及び骨格筋ミトコンドリアにおいて、レポーター遺伝子の発現を得ることに初めて成功した。