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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主　査	教　授	原　島　秀　吉
	副　査	教　授	前　仲　勝　実
	副　査	准教授	秋　田　英　万
	副　査	准教授	尾　瀬　農　之

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

博士学位論文審査等の結果について（報告）

ミトコンドリアは、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様々な疾患を誘発することが知られている。近年、これらの疾患において、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。本論文では、ミトコンドリア遺伝子発現を目指した遺伝子を設計および *in vivo* 遺伝子導入による機能検証を目的としている。

第一章では、『ミトコンドリア発現型遺伝子の設計と遺伝子発現検証』について論じられている。本章では、ミトコンドリア特異的プロモーターである H strand promoter (HSP)を mtDNA コード内因性タンパク質 ND4 配列の上流に付加した pHSP-ND4FLAG を設計し、マウス肝臓における遺伝子送達および転写・翻訳を検証している。ミトコンドリアへの遺伝子導入には、大容量の遺伝子溶液を、圧力をかけて投与するハイドロダイナミクス法を適用した。肝臓へのハイドロダイナミクス法である HTV 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。続いて、外来遺伝子発現を検証するため、ミトコンドリアコドンに対応した NanoLuc レポーター遺伝子を組み込んだ遺伝子（pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133}-tRNA (以下[TG*A**]^{34}[*C**GG]^{133})）の設計および発光の検出を試みた。また、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。

第二章では、『骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達および機能検証』について述べられている。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 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ている。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 法を用いて検出し、ミトコンドリア画分において pDNA のバンドが検出された。さらに、pDNA の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 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。

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。一連の結果は，ミトコンドリアを標的とした遺伝子送達、遺伝子発現の基盤技術に関する新たな知見を得たものであり，本オルガネラに対する遺伝子治療の発展に貢献する事が期待される。また、著者は本学位論文の副審査担当者のコメントに対しても丁寧に対応し、これらのコメントに基づいた論文修正を施している。よって、筆者・安崎友香理は北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。