



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
Author(s)	安崎, 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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11422
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55794
Type	doctoral thesis
File Information	Yukari_Yasuzaki.pdf



博士学位論文

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

北海道大学大学院 生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
薬剤分子設計学研究室
安崎 友香理

-目次-

略語表	2
序論	4
本論	
第一章　ミトコンドリア発現型遺伝子の設計と遺伝子発現検証	10
1-1 結果	13
1-1-1. ミトコンドリア遺伝子発現を可能とする遺伝子の設計	13
1-1-2. 送達検証	14
1-1-3. 転写検証	15
1-1-4. タンパク質発現検証	18
1-2 考察	23
 第二章　骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達	29
2-1 結果	30
2-1-1. pDNA の骨格筋ミトコンドリア送達評価	30
2-1-2. pDNA の最適な投与容量・投与量の検討	33
2-1-3. ミトコンドリア内への pDNA 送達検証	33
2-1-4. pDNA 動態の組織学的評価	35
2-1-5. ミトコンドリアへの pDNA 送達量上昇の試み	36
2-1-6. ミトコンドリア毒性の評価	38
2-2 考察	41
 総括	46
 実験試薬・材料	48
 一般試薬調製	52
 実験機器	57
 実験操作・方法	59
 参考文献	72
 謝辞	84

略語表

本論文では以下の略語を用いた。

A.C.	autoclaving
AGE	agarose gel electrophoresis
Amp	ampicilin
APS	ammonium peroxodisulfate
ATP	adenosine triphosphate
BCA	bicinchoninic acid
bp	base pair (s)
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CMV	cytomegalovirus
COX	cyclooxygenase
DDW	deionized distilled water
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxylibonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide 5'-triphosphate
DQA	deqalinium chloride
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine N',N',N',N'-tetraacetic acid
EF-1 α	elongation factor-1 alpha
Em	emission
EtBr	ethidium bromide
EtOH	ethanol
Ex	excitation
FCCP	carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
<i>g</i>	gravity
GFP	green fluorescent protein
HEPES	N-2-hydroxyethylpyperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
hr	hour
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heavy strand promoter

hTERT	human telomerase reverse transcriptase
LB	Luria-Bertani's broth
Luc	luciferase
MCS	multi cloning site
min	minute
MIB	mitochondria isolation buffer
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
mt-mTNA	mitochondrial messenger RNA
mt-tRNA	mitochondrial transfer RNA
mt-rRNA	mitochondrial ribosomal RNA
MTS	mitochondrial targeting signal
MW	molecular weight
nDNA	nuclear deoxyribonucleic acid
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDNA	plasmid deoxyribonucleic acid
PFA	paraformaldehyde
PVDF	polyvinylidene fluoride
RFP	red fluorescent protein
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-PCR
R8	octaarginine
rpm	rotations per minute
r.t.	room temperature
sec	second
SDS	sodium dodecyl sulfate
STR-R8	stearylated octaarginine
SUV	small unilamellar vesicle
SV40	simian virus 40
TMRM	tetramethyl rhodamine methyl ester
TPP	triphenylphosphonium cation
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	ultraviolet

序論

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始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 (Schapira AH, 2006; Taylor RW *et al.*, 2005) (図 0-1)。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に繋がると考えられる。また、ミトコンドリアにおける外来遺伝子発現の達成は、ミトコンドリア病治療のみならず、逆遺伝学的解析を可能にすることによるミトコンドリア分子生物学の発展にも寄与するものである。

日本においては、ミトコンドリア病が 2008 年に厚生労働省が定める特定疾患に認定されたことを受け (ref.1)、ミトコンドリア病の治療方法の探索や治験が注目されている。MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like

mtDNA変異関連疾患	臨床病態・表現型	mtDNA遺伝子型	変異遺伝子	ヘテロ/ホモプラスミー
Kearns-Sayre syndrome	進行性ミオパチー、 眼筋麻痺、心筋症	単一大欠損	複数遺伝子の欠失	ヘテロプラスミー
CPEO	眼筋麻痺	単一大欠損	複数遺伝子の欠失	ヘテロプラスミー
Pearson syndrome	汎血球減少、 乳酸アシドーシス	単一大欠損	複数遺伝子の欠失	ヘテロプラスミー
MELAS	ミオパチー、変性脳疾患、 乳酸アシドーシス、 卒中様症状	A3243G T3271C 他	mt-tRNA ^{Leu} 、 ND1またはND5	ヘテロプラスミー
MERRF	ミオクローヌス痙攣、 ミオパチー	A8344G T8356C	mt-tRNA ^{Lys}	ヘテロプラスミー
NARP	ニューロパチー、運動失調、 網膜色素変性症	T8993G	ATP6	ヘテロプラスミー
MILS	進行性脳幹障害	T8993C	ATP6	ヘテロプラスミー
MIDD	糖尿、難聴	A3243G	mt-tRNA ^{Leu}	ヘテロプラスミー
LHON	視神経症	C3460A G11778A T14484C	ND1 ND4 ND6	ヘテロ/ホモプラスミー

図 0-1. mtDNA 疾患と変異

主に研究されている mtDNA 変異と疾患についてまとめた。ミトコンドリアがほぼすべての細胞に存在するため、その病態は全身に起き得る。しかしながら、実際には、特にエネルギー消費量の多い脳や骨格筋に限局して顕著な症状を呈する場合がほとんどである。(Taylor RW *et al.*, 2004 を参考に作製)

episodes, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) や MERRF (myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers)をはじめとするミトコンドリア病は、全身の様々な臓器において病態を示し得る多臓器疾患ではあるが (Bates MG *et al.*, 2012)、特にエネルギー需要の高い脳や骨格筋において症状を呈しやすいことが知られている (Wallace DC, 1999; Goto Y *et al.*, 1990; Shanske S *et al.*, 1990; Shoffner JM *et al.*, 1990)。現在、ミトコンドリア病の治療に関しては、低分子治療薬による対症療法が一般的である。具体的には、ジクロロ酢酸などの抗アシドーシス剤、エネルギー代謝基質であるコハク酸、電子伝達供与剤及びビタミン類のコエンザイム Q10・エルカルチン、ROS スカベンジャーのラジカット、などが挙げられる (Stacpoole PW *et al.*, 2003; Kaufmann P *et al.*, 2006; Curto N *et al.*, 2006; Bosemani T *et al.*, 2013)。低分子治療の中でも、特に L-アルギニン療法は、Koga らの医師主導治験などの実施により特に注目を集めているが (Koga Y *et al.*, 2005; Koga Y *et al.*, 2006; Koga Y *et al.*, 2007)、進捗は芳しくないようである。そのような中で、ごく最近、米国エジソン社が、MELAS の癲癇発作を抑制可能な新薬の開発を進めている (Sadun AA *et al.*, 2012)。日本においても、2013 年 3 月には EPI-589 について大日本住友製薬が日本における研究・開発・販売権を獲得し (ref.2)、2013 年 8 月からは EPI-743 について国立精神神経センターの Goto らが臨床研究を開始している (ref.3)。更に、2013 年 10 月にはアステラス製薬が米国マイトカイン社とミトコンドリア関連疾患領域における共同研究・開発に関する独占的な提携契約を締結しており (ref.4)、ミトコンドリア関連疾患に対する認知度の広範化とともに、国内製薬企業からのミトコンドリア病治療新薬の開発に大きな期待が寄せられている。

しかしながら、先述の通り、低分子医薬ではミトコンドリア病を根本から治療することは困難である。そのため、ミトコンドリアの遺伝子治療に関する研究も盛んに行われている。まず、mtDNA の変異が病態に至るまでの現在の理解について、以下に簡単に述べる。

ミトコンドリア病は変異型 mtDNA の蓄積により病態を呈すると考えられている。mtDNA は、環状二本鎖の DNA であり、哺乳動物細胞の一つのミトコンドリア内には 2~10 コピーの mtDNA が存在することが報告されている (Bogenhagen D *et al.*, 1974)。また、細胞の種類により差はあるが、体細胞 1 細胞内には約 200~2000 コピー程度 (Robin ED *et al.*, 1988)、成熟卵細胞内には約 100,000 コピーもの mtDNA が存在することが知られている (Pikó L *et al.*, 1987)。mtDNA に変異を有する細胞は、多くの場合、正常型 mtDNA と変異型 mtDNA が混在するヘテロプラスミーという状態をとる (Holt IJ *et al.*, 1988; Holt

IJ *et al.*, 1990)。ミトコンドリア病の場合、個体内ばかりか、臓器内、組織内、一細胞内においてもヘテロプラスミーの割合は異なり、非常に複雑な臨床的多様性を有する。その複雑さは何に起因することなのかについては未だ明らかにはなっていない。しかしながら、細胞レベルについて考えた場合、ミトコンドリアの COX 活性と mtDNA の変異の割合の間には、ある閾値が存在することが明らかとなっている (Nakada K *et al.*, 2009)。すなわち、正常 mtDNA と変異 mtDNA をヘテロに有する細胞で、80%変異レベルが COX 活性喪失の閾値である場合、80%や 90%の変異を有する細胞では COX 活性は全くない状態であるが、他の細胞で変異 mtDNA を 70%有していても、COX 活性は変異のない細胞と同等に維持されている。

以上の背景から、遺伝子レベルでの治療戦略としては、変異 mtDNA/mtRNA/タンパク質を減らす戦略と、正常 mtDNA/mtRNA/タンパク質を増やす戦略の 2 つが考えられる。

なお、現在検討されている方法の多くは、核への分子送達を介したミトコンドリア遺伝子治療である。すなわち、ミトコンドリアではなく、核に遺伝子を導入し、治療用の遺伝子やタンパク質を発現させ、ミトコンドリアに送達する方法である。変異型ミトコンドリア遺伝子を減らす戦略に関しては、変異 mtDNA の修復 (Kren BT *et al.*, 2003)、変異型 mtDNA 及び mt-mRNA の分解 (Minczuk M *et al.*, 2008; Bacman SR *et al.*, 2013)などが報告されている。一方、正常型ミトコンドリア遺伝子を増やす戦略に関しては、正常型 mttRNA 及びタンパク質の導入 (Karicheva OZ *et al.*, 2011; Perales-Clemente E *et al.*, 2011; Wang G *et al.*, 2012)が報告されている。しかし、これらの方法で発現させた治療用の遺伝子やタンパク質は、ミトコンドリアマトリクスに送達されなければならないが、この点についてはどの報告においても詳細に検証されていない。なお、これらの方法による臨床研究報告は皆無である。ミトコンドリアに治療用分子を送達し、かつ検証することは、遺伝子治療の実現に向けて考慮すべき重要な点であると考えられる。

一方、核ではなくミトコンドリアに直接治療用分子や遺伝子を送達し、発現させることで、ミトコンドリアの遺伝子治療も可能になると考えられる。しかしながら、外来の遺伝子を本オルガネラに導入し、発現させたことを報告する例はほとんど存在しない。その理由として、ミトコンドリアへ遺伝子を送達する簡便な方法が存在しないこと、ミトコンドリアの *in vitro* 転写・翻訳の再現は非常に困難であること、などが考えられる。すなわち、ミトコンドリアで発現させるべき遺伝子の質を確かめる方法がほとんどないということに換言できる。送達方法・送達量の問題と、送達遺伝子の質の問題は、ミトコンドリアの遺伝子発現の達成を目指す上で、不可分な課題である。現時点で考え得る解決策は、可能な

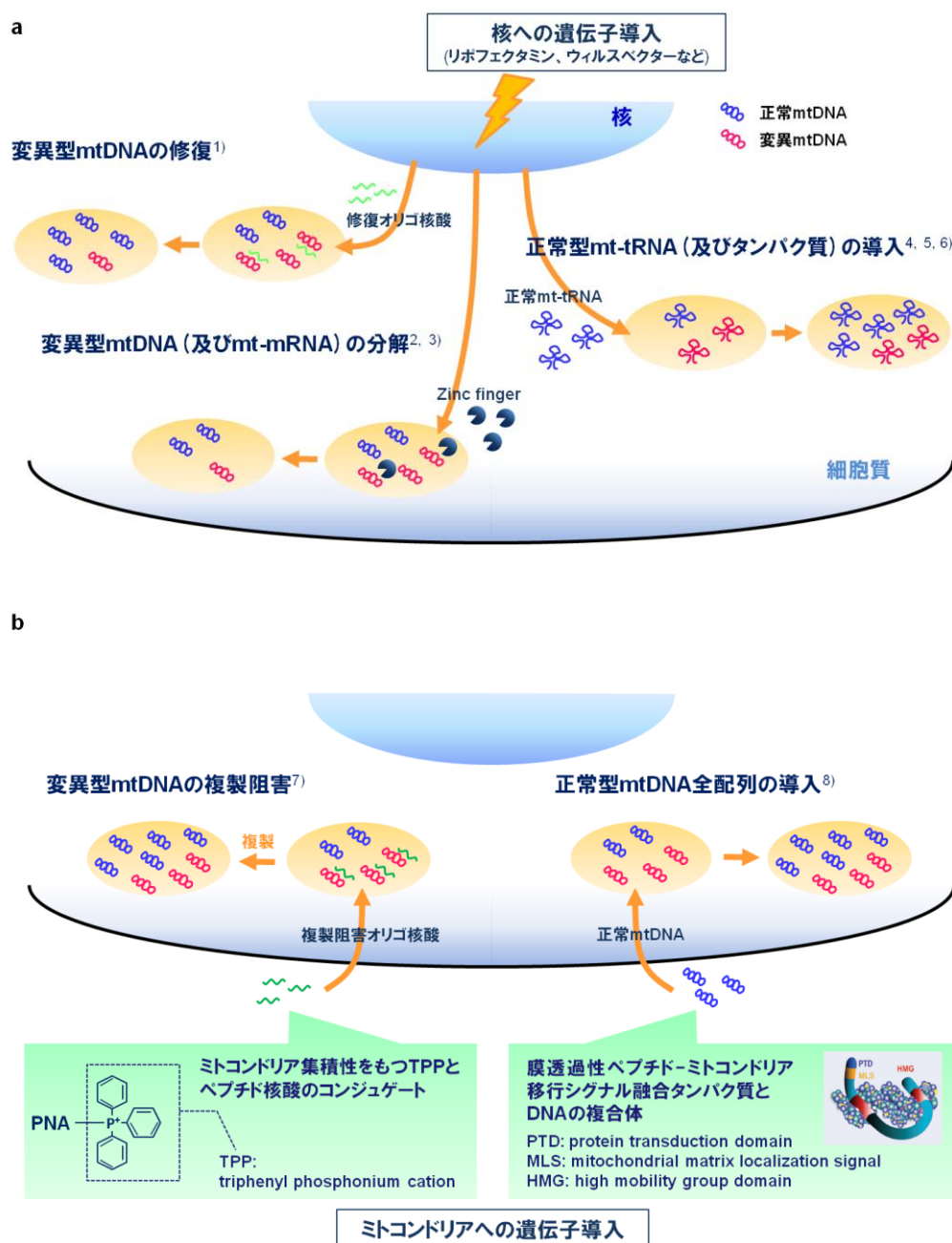


図 0-2. ミトコンドリア遺伝子治療戦略

(a)核への分子送達を介したミトコンドリア遺伝子治療。ミトコンドリアを直接標的化するよりも多くの報告が存在しているが、ミトコンドリアマトリクスへの治療用分子送達が検証されていないなど、更なる検証が必要な点がある。(b)ミトコンドリアを直接標的化したミトコンドリア遺伝子治療。限られたグループからの報告である。複製阻害の場合、全てが変異mtDNA (ホモプラスミー変異) の場合は、本戦略は適用できない。また、細胞系では機能が認められなかったため、引き続き報告が待たれている。正常配列の導入については、導入したmtDNAが発現・機能しているのかどうかは不明であるため、更なる検討が待たれる。以上の研究背景を考慮すると、ミトコンドリアに外来遺伝子を導入し、タンパク質を発現させたことを示した報告はほぼ存在しないと思われる。 1) Kren BT *et al.*, 2003. 2) Minczuk M *et al.*, 2008. 3) Bacman SR *et al.*, 2013. 4) Karicheva OZ *et al.*, 2011. 5) Wang G *et al.*, 2012. 6) Perales-Clemente E *et al.*, 2011. 7) Muratovska A *et al.*, 2001, 8) Iyer S *et al.*, 2012.

限りミトコンドリアに分子を送達可能であると思われる方法で遺伝子を送達し、ミトコンドリアで発現し得る遺伝子を構築し、遺伝子発現を得ることである。

ミトコンドリアは、細胞内で絶えず融合分裂を繰り返し、その内容物を相互に交換可能なオルガネラである (van der Bliek AM, 2013)。このことは、実験的に確かめられている。GFP または RFP 融合ミトコンドリアマトリクスタンパク質を安定発現させた HeLa 細胞を同時に播種し、2 種の細胞をセンダイウィルスにより細胞融合させた際、約 2 時間後以降には各々のタンパク質を相互に交換している様子が観察されたという報告が、理解しやすい例であろう (Ishihara N *et al.*, 2003)。

当研究室では、膜融合を介してミトコンドリアへの薬物送達を可能とするリポソーム型ナノキャリア “MITO-Porter” の研究・開発を行ってきた (Yamada Y *et al.*, 2008; Yamada Y *et al.*, 2010)。ミトコンドリアの性質に即した膜融合戦略は合理的であり、様々な論文にも紹介されている (Kyriakouli DS *et al.*, 2008; Fulda S *et al.*, 2010; Zhang E *et al.*, 2011)。なお、本キャリアの水相部にはタンパク質や核酸等の水溶性高分子を、脂質膜には脂溶性分子を封入することができ、薬物の種類に依存しない送達を可能とすることをコンセプトとしている。

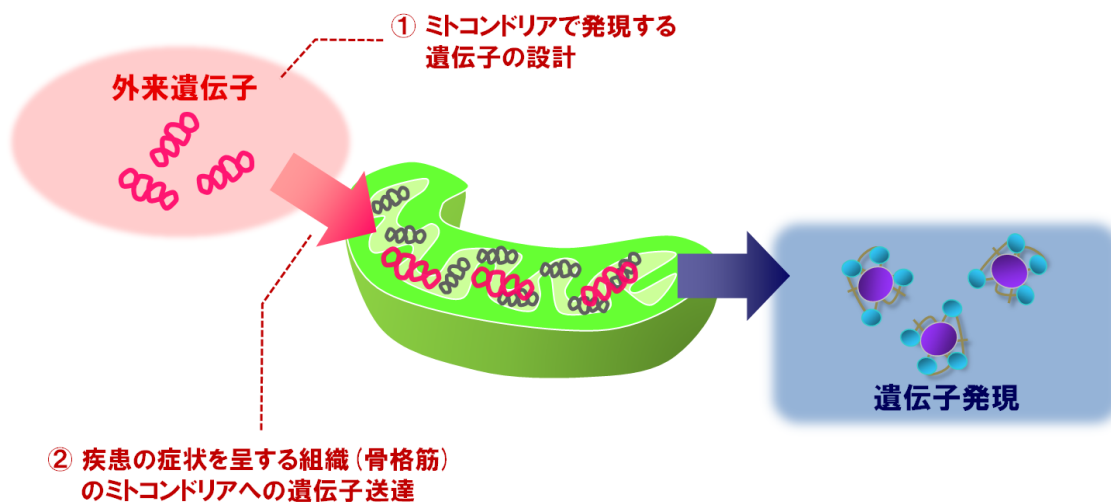


図 0-3. 本研究の目的

本研究では、自ら設計した遺伝子をミトコンドリアに直接導入し、発現・機能を得ることを目的とする。その達成のためには、①ミトコンドリア内で発現する遺伝子の設計と、②ミトコンドリアへの遺伝子導入が不可欠である。そのためには、ミトコンドリアで発現し得る遺伝子を構築し、現状で考え得る限り最も簡便にミトコンドリアに分子を導入可能と思われる方法で遺伝子を送達する必要がある。本研究では遺伝子の導入法としてハイドロダイナミクス法を用いることにした (第一章の序文に詳述)。また、特にミトコンドリア病の病態を呈する主な組織のひとつとして骨格筋に着目し、研究を進めた。

MITO-Porter の水相部にミトコンドリアで発現し得る遺伝子ベクターを搭載することで、ミトコンドリアの機能を改善することができる可能性がある。

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、その多くは細胞系 (*in vitro*) に限定され、かつ遺伝子設計には言及していない報告が主であった。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 (Ibrahim N *et al.*, 2011; Yu H *et al.*, 2012; Iyer S *et al.*, 2012)。

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。

そこで、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 (Liu F *et al.*, 1999; Zhang G *et al.*, 1999)。本法により得られる遺伝子発現は、キャリア等を用いるよりも簡便かつ高い遺伝子発現であることが明らかとなっている。本投与方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、またキャリア等を用いるよりも高感度に検出できると考えられる。

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。

本研究の達成によりミトコンドリアで発現する遺伝子を構築し、ミトコンドリア外来遺伝子発現が可能なキャリアの開発へと繋がることが期待できる。

第一章 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 (Heavy chain) ・L 鎖 (Light chain) 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 (Taylor RW *et al.*, 2005)。例外的に、サブユニットや mt-tRNA、mt-rRNA をコードしない 1 kbp 程度の領域は Dloop 領域と呼ばれ、mtDNA の遺伝子発現調節領域として知られている (図 1-1)。

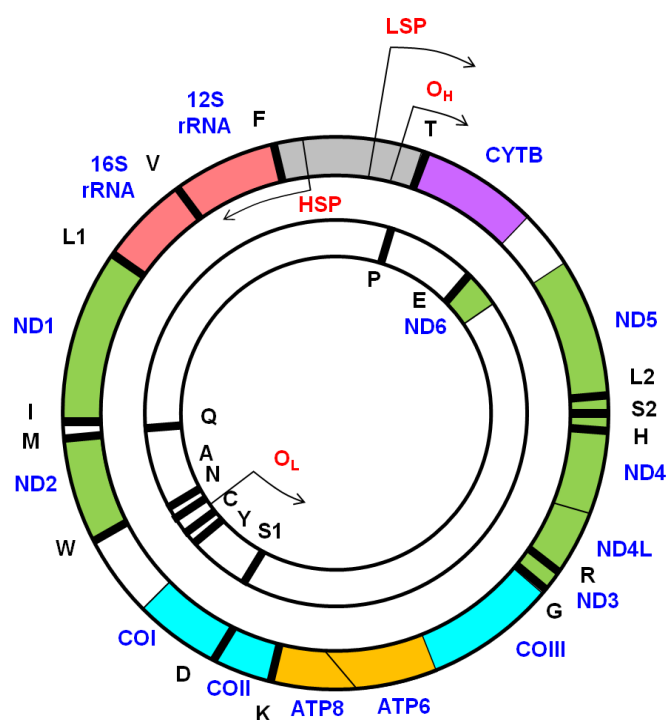
ミトコンドリアにおける外来遺伝子の発現について成功例がほとんどない理由のひとつとして、送達する遺伝子の品質が十分ではないことが考えられる。現在のところ、ミトコンドリアに外来 DNA を直接導入し、遺伝子発現を試みた例は、2 つのグループから報告されている (Lyrawati D *et al.*, 2011; Yu H *et al.*, 2012)。

筆者は、Yu らの報告した遺伝子を参考にして、オリジナルの遺伝子を設計した。彼らは、外来遺伝子が発現することを検証するために、アミノ酸配列 DYKDDDDK からなる FLAG タグを用いている。ただし、これらの報告では、特にミトコンドリアにおいて転写されていること、タンパク質がミトコンドリアで発現していること、の 2 点について、更なる検証が必要であると考えられたため (考察項で詳述)、本章ではこれらの点を含めて検討を加えることにした。

ミトコンドリアにおける外来タンパク質の発現検証が困難である理由として、検出感度の問題がある。すなわち、仮に転写・翻訳が起きていたとしても、その発現を検出する系の検出限界以下の場合には、発現していないと見做される。また、核のように確立した遺伝子導入方法は存在しないため、発現のポジティブコントロールをおくことができないことも、これらの研究の発展を妨げる要因になっている。従って、本研究では、可能な限り検出感度の高い方法でタンパク質の発現を評価する必要があった。

NanoLuc は、Luciferase と同様、タンパク質存在下に基質を添加することで、発光により遺伝子の発現量を測定できるレポータータンパク質である (Hall MP *et al.*, 2012)。NanoLuc は、Luciferase の 3 分の 1 のアミノ酸鎖長と 150 倍程度の発光活性を有することが報告されており、扱いやすく感度の高いレポータータンパク質である。なお、GFP をはじめとする蛍光タンパク質は、その検出のために励起光を照射する必要があるが、迷光を完全に除去することは極めて困難である。また、迷光の存在は、検出のバックグラウンドに直結する。この点で、発光は蛍光よりも微弱なシグナルの検出に適していると考えられている (Fan F, 2007)。これらの背景から、筆者は、NanoLuc をレポーター遺伝子として

本章では、遺伝子の送達量や質に関する考察を行うため、定量や活性に影響を及ぼし得るカチオン性脂質等のキャリアの使用を避け、かつミトコンドリア内に効率良く遺伝子を導入する方法が必要である。1999年に2つのグループから報告されたハイドロダイナミクス投与法 (hydrodynamic tail vein injection; HTV 法) は、プラスミド DNA (pDNA) をマウスの全血液量とほぼ等量の生理食塩水に希釈し、尾静脈から急速 (~5 sec) に投与する方法であり、肝臓の核へと効率良く遺伝子を導入することが可能である (Liu F *et al.*, 1999; Zhang G *et al.*, 1999)。本法は、*in vivo* 遺伝子解析 (McCaffrey AP *et al.*, 2002)、遺伝子発現持続性の評価 (Chen ZY *et al.*, 2003; Ochiai H *et al.*, 2010)、疾患モデル動物の作製など (Yang PL *et al.*, 2002)、様々な分野で利用されている。本法の詳細なメカニズムは不明な点



約 16.5 kbp の環状二本鎖 DNA。外側は H 鎖 (Heavy chain)、内側は L 鎖 (Light chain) を表す。グレーで示した tRNA タンパク質等をコードしない約 1 kbp の領域は D-loop 領域と呼ばれ、ミトコンドリア特異的プロモーターである HSP、LSP、および H 鎖複製開始点を含む。L 鎖複製開始点は tRNA^{Asn} と tRNA^{Cys} の間に存在する。ND1~ND6 は ComplexI、CYTB は ComplexIII、COI~COIII は ComplexIV、ATPase8 と ATPase6 は ComplexV のサブユニットタンパク質をそれぞれコードしている。黒で示したアルファベット 1 文字は各アミノ酸を結合する tRNA 配列部、青字はタンパク質サブユニットコード領域および rRNA 配列部を表す。(Tuppen HAL *et al.*, 2010 を参考に作製)

もあるが、一過的な膜透過性の亢進により (Andrianaivo F *et al.*, 2004; Crespo A *et al.*, 2005; Song YK *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2004; Zhang G *et al.*, 2004)、肝実質細胞の約 40%に遺伝子を導入できることが報告されている。筆者は、本法が肝臓のオルガネラ非特異的に遺伝子を導入し、核のみならずミトコンドリアへも遺伝子を送達可能なのではないかと考えた。そこで、まず遺伝子を HTV 法により投与し、回収した肝臓のミトコンドリアを分画した後、その中に投与遺伝子が存在するか否かを検証することにした。

1-1. 結果

1-1-1. ミトコンドリア遺伝子発現を可能とする遺伝子の設計

mtDNA の Dloop 領域内には、ミトコンドリア特異的プロモーターである HSP (heavy strand promoter)及び LSP (light strand promoter)が存在しており、特に mt-tRNA^{Phe} の転写開始点の上流にある AAACCCC 配列が HSP の機能に重要であることが報告されている (Chang DD *et al.*, 1984)。

Yu らは、ヒト ND4 をコードした設計遺伝子をマウスに対して投与していたが、筆者は、種差により発現が低下することで、検出感度が低下することをなるべく避ける必要がある

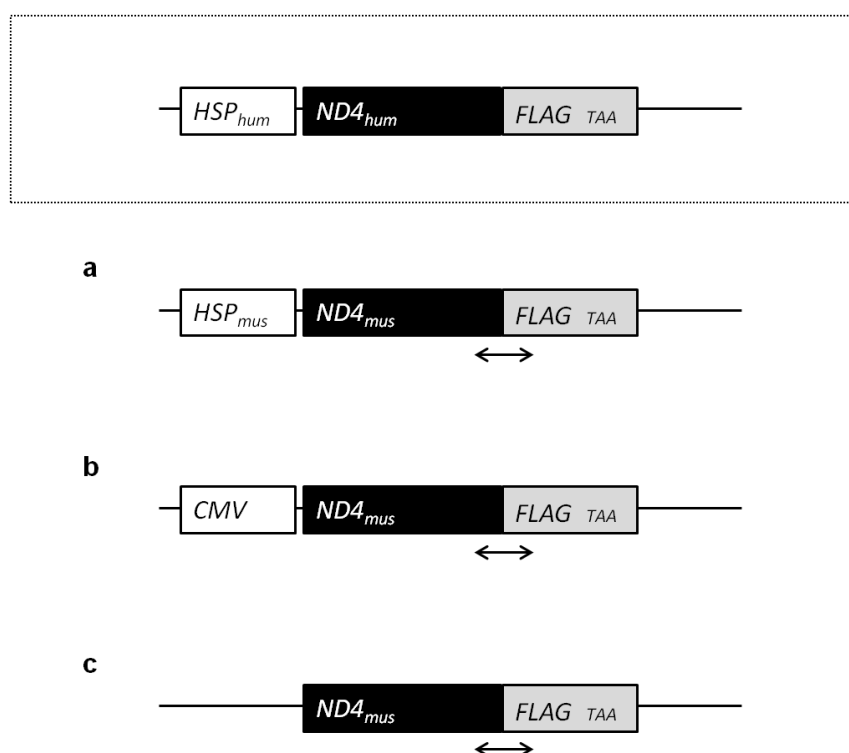


図 1-2. 外来遺伝子ミトコンドリア転写検証のための新規遺伝子設計

破線で囲んだ配列は、Yu らの報告した参考遺伝子配列 (Yu H *et al.*, 2012)を示している (1524 bp)。この配列では、ヒト mtDNA 由来の HSP を、ヒト ND4 遺伝子と FLAG タグ配列の前に付加していた。本研究では、参考遺伝子の配列を、マウス由来の HSP 配列および ND4 配列に置換した pHSP-ND4FLAG (a)を設計した。また、ミトコンドリアにおける転写検証 (1-1-3 節、図 1-6)を行う目的で、HSP プロモーターを核発現型の CMV プロモーターに置換した pCMV-ND4FLAG (b)、プロモーターを削除した pND4FLAG (c)の配列を設計した。各々の鎖長は、(a) 1620 bp、(b) 1998 bp、(c) 1422 bp である。(a~c)は、pBluescriptII SK (-)の MCS に挿入されており、大腸菌による大量培養が可能である。(↔)は PCR 法による転写検出のため増幅領域を表わす。

HSP; ミトコンドリア特異的プロモーター (heavy strand promoter)、ND4; ミトコンドリア内在性遺伝子 (NADH dehydrogenase, subunit 4)、FLAG; 外来導入遺伝子タグ (塩基配列は gat tac aag gat gac gat gac aag、アミノ酸配列は DYKDDDDK)を示す。

と考えた。

本研究では、マウス mt-tRNA^{Phe} の転写開始点の約 180 bp 上流にある AAACCCC 配列を含む 198 bp の配列を HSP として、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 (図 1-2)。また、HSP を核で発現する CMV に変更した pCMV-ND4FLAG、核とミトコンドリアのどちらにおいても発現しないようにプロモーターを削除した pND4FLAG、これら 2 つの遺伝子を転写評価の比較対象遺伝子として設計した (1-3 節)。

1-1-2. 送達検証

肝臓へのハイドロダイナミクス法である HTV 法により、ミトコンドリアに遺伝子を送達可能であるか否かを検証した。

HTV 投与後の肝臓サンプルからミトコンドリア及び核を分画単離し、抽出 DNA 中に含まれるプラスミド DNA (pDNA) を RealtimePCR 法により定量した。その結果、核・ミトコンドリア間に送達量の差は認められなかったが、投与量依存的に送達量が上昇していることが明らかとなった (図 1-3)。このことから、非特異的にはあるが、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。

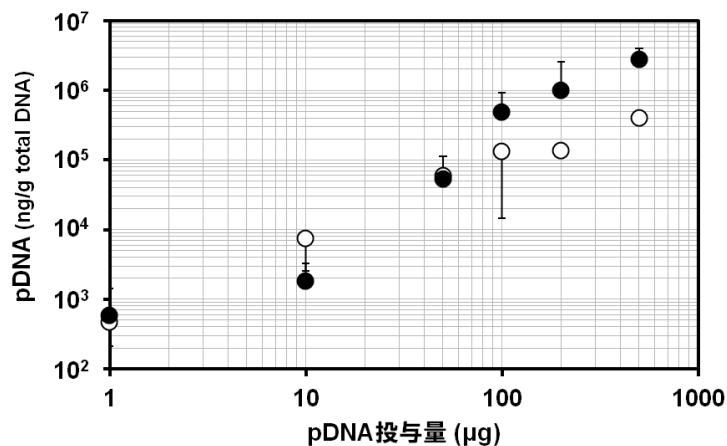


図 1-3. HTV 投与による肝臓ミトコンドリア及び核への遺伝子送達量

遠心分離によりミトコンドリアと核を分画し、送達された pDNA 量を定量的 PCR 法により測定した。この時使用したプライマーは、「実験試薬・材料」の項に記載した Ad5-Luc (+)/(-) および q-m_mtDNA F1/R1、q-mGapdh F2/R2 であり、それぞれ、pDNA、mtDNA、nDNA 特異的な配列を増幅可能である。これらのプライマーを用いて、各画分に含まれる遺伝子の絶対定量を行った。グラフには、各画分への pDNA 量を全 DNA 量で補正した値を示した。ミトコンドリア画分の pDNA 量 (黒丸)、核画分の pDNA 量 (白丸) を表す。pDNA; pcDNA3.1 (+)-luc、データは平均±SD として表わされている。(n=3)

1-1-3. 転写検証

設計した遺伝子がミトコンドリアにおいてタンパク質を発現するためには、ミトコンドリアで転写されなければならない。本節では、設計遺伝子がミトコンドリアにおいて転写されるか否かを検証することを目的とした。

まず、pHSP-ND4FLAG をマウス肝臓にハイドロダイナミクス法で導入し、RT-PCR にて *Nd4flag* 遺伝子の転写を評価した。このとき、mtDNA にコードされた遺伝子である *Nd6* を内標準として用いた。評価の結果、*Nd4flag* 遺伝子の転写産物と思われるバンドが検出された (図 1-4)。また、そのバンドは投与 2 時間後から認められ、24 時間後にピークを迎えていることが明らかとなった。なお、本評価では、RT 反応をかけていないサンプルではバンドが認められなかったことから、DNaseI 処理による DNA 分解の過程は適切に行われていたと判断できる。以上のことから、pHSP-ND4FLAG は細胞内で転写され、HSP 下流の

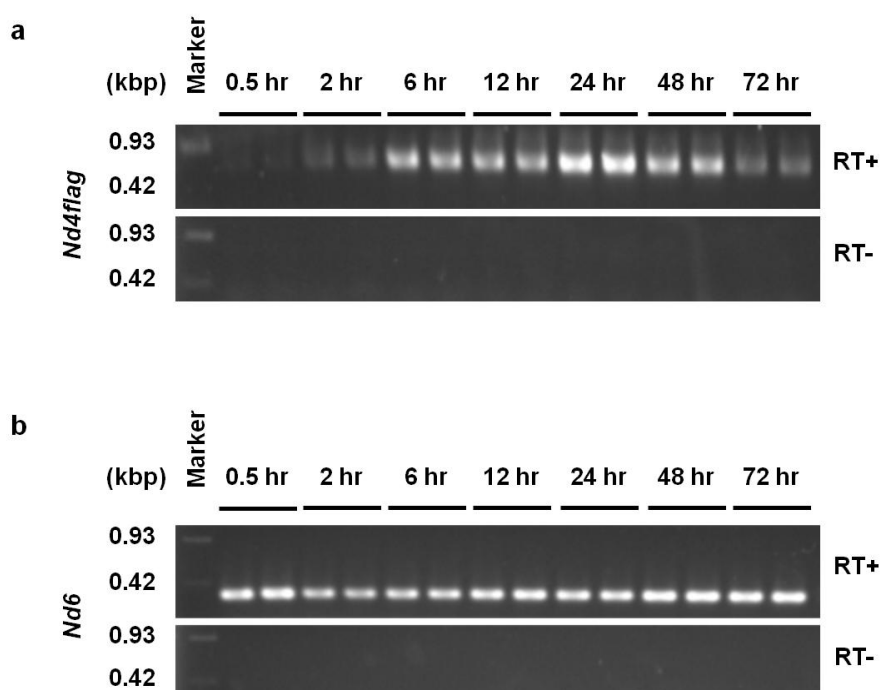


図 1-4. 肝臓 (細胞全体)における転写検証

100 μ g の pHSP-ND4FLAG 遺伝子を 2 mL の生理食塩水に希釈し、C57BL/6 (6wks、♂) に対し 5 秒で投与した。投与 0.5、2、6、12、24、48、72 時間後に肝臓サンプルを回収し、RNA 抽出及び DNase 処理を行った。抽出された mRNA は RT-PCR 法により増幅し、アガロース電気泳動にてバンドを検出した。*Nd4flag* は外来導入した遺伝子 (a)、*Nd6* は内因性の mtDNA にコードされた遺伝子 (b)に対するプライマーを用いて得られた結果を示す。RT+は逆転写酵素を添加して反応させたサンプル、RT-は逆転写酵素を添加せずに反応させたサンプルを表わす。

Nd4flag 遺伝子を転写可能であることが明らかとなった。しかしながら本結果からは、pHSP-ND4FLAG は核で転写され、ミトコンドリアで機能していない可能性も懸念された。

ミトコンドリアにおける遺伝子の転写は、*in vitro* ミトコンドリア転写により直接検証可能であると考えられる。しかしながら、哺乳類ミトコンドリアの *in vitro* 転写の実施は、Clayton ら、Falkenberg らのグループから報告があるものの (Fisher RP *et al.*, 1985; Falkenberg M *et al.*, 2002)、一般的に普及している方法ではなく、また特殊なタンパク質を複数用意する必要があり、その評価系の確立は非常に困難である。例えば、Falkenberg らの場合、HSP あるいは LSP を含む短鎖 mtDNA フラグメントをテンプレートとして、ミトコンドリア RNA ポリメラーゼである POLRMT (別標記 mtRNAP)、ミトコンドリア転写因子である TFAM (mitochondrial transcription factor A)、TFB1M (mitochondrial transcription factor 1B)、TFB2M (mitochondrial transcription factor 2B) の 4 因子を構築・精製して添加することで、*in vitro* ミトコンドリア転写を検証していた。また、環状の全長 mtDNA を用いて検証している報告例はない。

そこで筆者は、設計遺伝子のミトコンドリアにおける転写機能を、簡便に評価する方法を考えた。哺乳類細胞内で転写が起こり得るのは、転写装置が存在する核内あるいはミトコンドリア内である。また、HTV 投与法は、前節の送達検証の結果から、非特異的に遺伝子を核・ミトコンドリアに送達可能であることが示唆されている。以上のことから、HTV 投与後の肝臓サンプルから抽出した mRNA は、細胞全体の転写、すなわち核とミトコンド

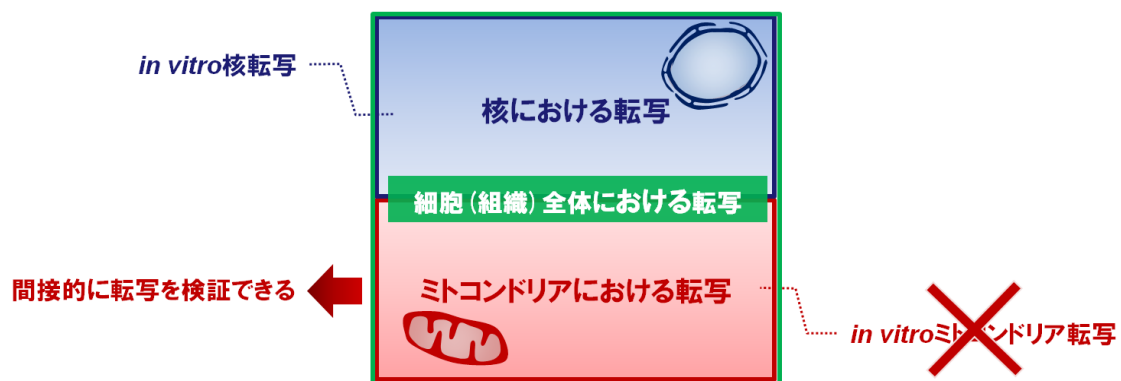


図 1-5. ミトコンドリアにおける転写の検証方法

細胞 (組織) 全体における転写は、核における転写とミトコンドリアにおける転写のいずれかである。ミトコンドリアにおける転写を *in vitro* で直接検証することは評価系確立の点から困難である。一方、核における転写を *in vitro* で評価することは可能である。従って、細胞全体の転写と核における転写を評価することで、ミトコンドリアにおける転写を間接的に評価可能である。

リアで生じた転写を反映していると考えられる。一方、核における転写は *in vitro* における評価方法が確立しており、直接検証可能である。従って、細胞全体における転写と核における転写活性の強さを調べることで、ミトコンドリアにおける転写活性を調べることができると考えた (図 1-5)。

pHSP-ND4FLAG、及び 1-1 節で設計した pCMV-ND4FLAG、pND4FLAG を核抽出液中にそれぞれ添加し、核における *in vitro* 転写量を RealtimeRT-PCR にて定量した。このとき、CMV プロモーターを有する pcDNA3.1 (+)-luc 遺伝子を各サンプルに等量添加し、同様に転写量を定量して、評価の内標準とした。*Nd4flag* 遺伝子の発現量を評価した結果、HSP による転写量は、CMV に比較して著しく低く (図 1-6)、核ではほぼ転写されていないことが示唆された。

以上の結果から、pHSP-ND4FLAG による転写は、細胞全体では検出された一方で、核ではほぼ転写されないことが明らかとなった。このことから、設計遺伝子 pHSP-ND4FLAG はミトコンドリアにおいて機能し、本遺伝子を投与した場合、*Nd4flag* 遺伝子がミトコンドリアにおいて転写されることが示唆された。

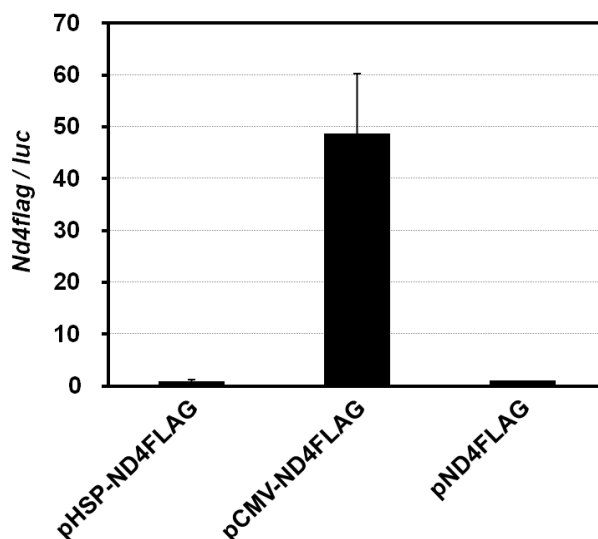


図 1-6. *in vitro* 核転写

10 ng の設計遺伝子 pHSP-ND4FLAG、pCMV-ND4FLAG、pND4FLAG をそれぞれ核抽出液中に添加した。更に、全てのサンプルに対して、核で発現する CMV プロモーターを有するルシフェラーゼコード遺伝子 pcDNA3.1 (+)-luc を 10 ng 添加して、本評価系の内標準とした。30℃、60 min インキュベートして *in vitro* 核転写反応をかけた後、RNA 抽出及び DNase 処理を行った。定量的 RT-PCR 法によりサンプル中の mRNA を定量し、相対的 *Nd4flag* 量をグラフに示した。データは平均±SD として表わされている。(n=3)

1-1-4. タンパク質発現検証

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、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、mt-tRNA 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 (Sanchez MIL *et al.*, 2011; Gagliardi D *et al.*, 2004) (図 1-7)。第二に、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 (ユニバーサルコドン)とは異なる対応をしている (Osawa S *et al.*, 1992)。従来の NanoLuc 配列では、45 番目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 stop がかかっており、このままの配列では発現しないこ

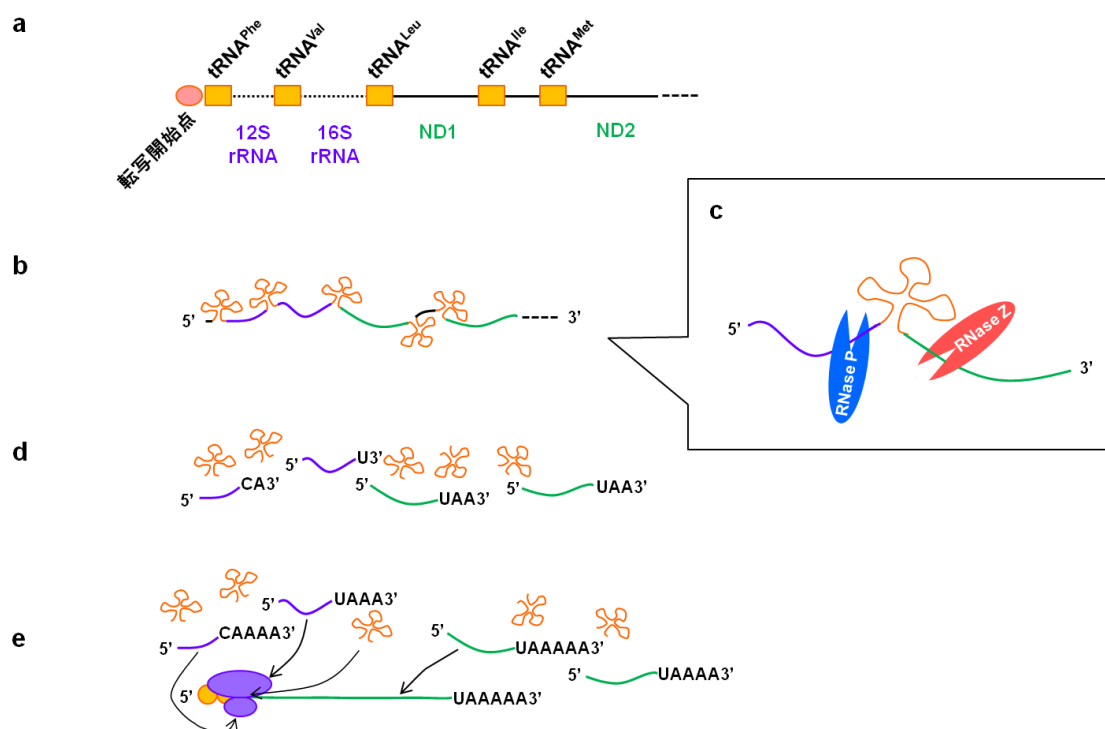


図 1-7. ミトコンドリアにおける転写-翻訳メカニズム

H 鎖から転写される模式図を示す。tRNA^{Phe} の上流に位置する転写開始点に転写開始複合体タンパク質が結合すると、mt-mRNA がポリシストロニックに転写され、一次転写産物が生じる (a)。一次転写産物は、タンパク質サブユニットをコードした mt-mRNA 領域の間にある mt-tRNA の部分で高次構造をとり (b)、この構造の 5'側を RNaseP、3'側を RNaseZ が認識することで (c)、機能単位へスプライシングされる (d)。mt-mRNA の 3'末端には polyA が付加され、mt-rRNA はミトコンドリアリボソームの構造の一部となる。成熟した mt-mRNA はミトコンドリアリボソームに結合し、タンパク質合成が行われる (e)。

となる。

そこで本実験では、RNA processing 過程及びミトコンドリアコドン対応を考慮し、更に、検出感度の向上と簡便化のために、レポーター遺伝子として NanoLuc 遺伝子を組み込んだ遺伝子の設計を行った。

pHSP-ND4FLAG を発現カセットと考え、その配列の遺伝子の下流に、NanoLuc レポーター遺伝子を組み込んだ。更に、RNA processing についてその過程を再現するために、NanoLuc 配列の下流に、マウス mtDNA 由来の tRNA^{Asp} およびその 5'UTR 配列を付加した。

次に、本配列がミトコンドリアで翻訳可能であることを確認する目的で、NanoLuc 遺伝子配列のコドン対応を調べた。その結果、NanoLuc 塩基配列の 45 番目に相当する AGG 配列 (以下、[AGG]⁴⁵ と表記) は、ユニバーサルコドンではアルギニンを指定する一方で、ミトコンドリアコドンではアミノ酸を指定しないことが明らかとなった。このことを受けて、ミトコンドリアコドン対応でアミノ酸 (トリプトファン) を指定するように、[AGG]⁴⁵ を [C*GG]⁴⁵ に改変した遺伝子を設計することにした。しかしながら、この配列の改変のみでは、核とミトコンドリアの両方で発現することになり、ミトコンドリアにおける発現のみを正確に検出することはできない。そこで、核で翻訳が停止するように、もう一つ変異を入れることを考えた。NanoLuc アミノ酸配列の 12 番目に相当する TGG 配列 (以下、[TGG]¹² と表記) は、ミトコンドリアコドンとユニバーサルコドンでは共にトリプトファンを指定する。[TGG]¹² を [TGA]¹² にすることで、ミトコンドリアコドンではトリプトファンを指定したままであるが、ユニバーサルコドンではストップコドンになる。このようにして、核では翻訳されず、ミトコンドリアでは翻訳されるミトコンドリア発現型遺伝子 pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TGA]¹²[C*GG]⁴⁵-tRNA (以下、p[TGA]¹²[C*GG]⁴⁵ と表記) を設計した (図 1-8a)。

一方、核とミトコンドリアのいずれにおいても発現しない遺伝子の構築を考えた。これは、pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TGA]¹²[C*GG]⁴⁵-tRNA のネガティブコントロールとなる遺伝子を投与し、その結果得られる NanoLuc 発光活性を比較することで、p[TGA]¹²[C*GG]⁴⁵ の投与による発光活性が、ミトコンドリアで翻訳された NanoLuc に起因するものであるか否かを検証できると考えたためである。NanoLuc の配列には、もともとミトコンドリアコドンで指定しない [AGG]⁴⁵ を有している。しかしながら、近年、ミトコンドリアコドンでは、確かに AGA 及び AGG はアミノ酸を指定しないが、実際の哺乳類細胞においては、UAA 及び UAG のみがストップコドンとして使用されているということが

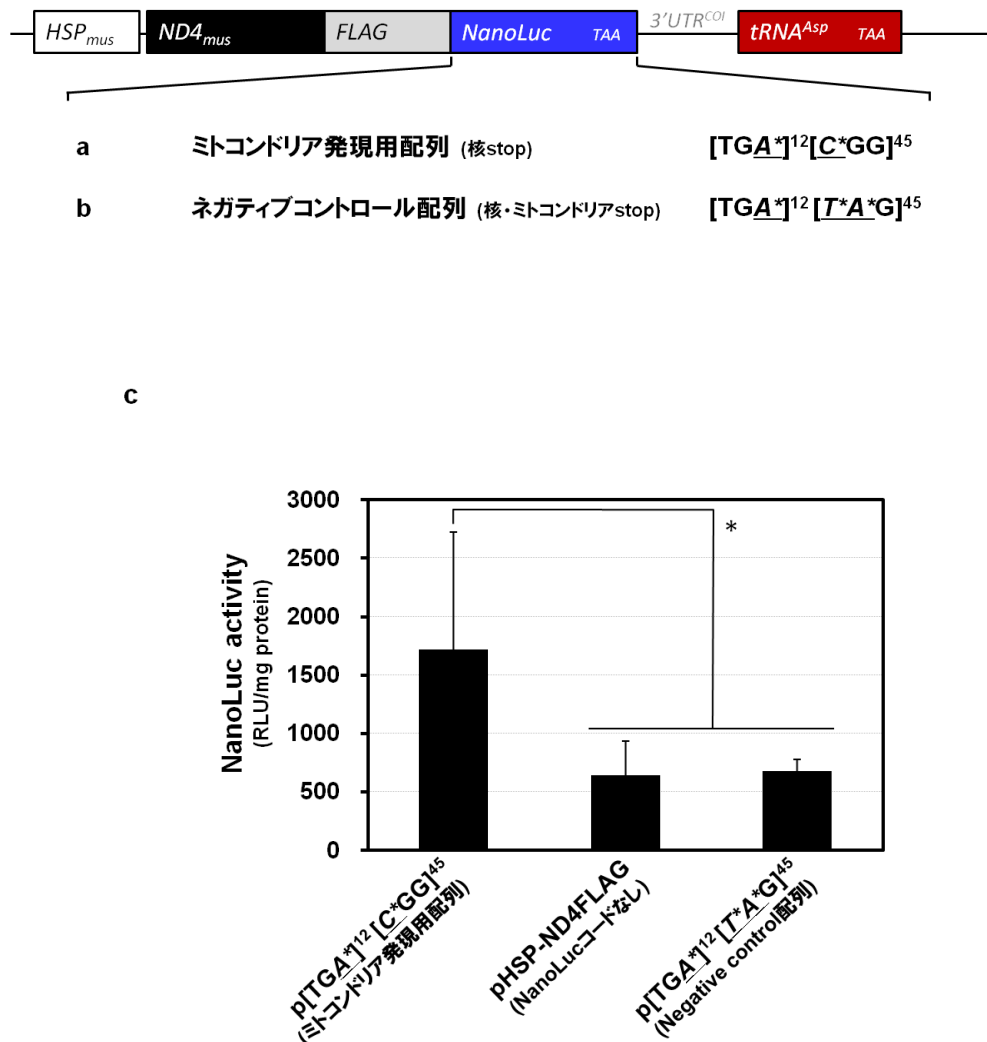


図 1-8. 外来遺伝子ミトコンドリア翻訳検証のための新規遺伝子設計およびタンパク質発現検証

pHSP-ND4FLAG 遺伝子の下流に、NanoLuc レポーター遺伝子、及びマウス mtDNA 由来の tRNA^{Asp} とその 5'UTR 配列を付加した。NanoLuc の通常配列はミトコンドリアでは翻訳ストップがかかると考えられる。ミトコンドリアで発現し、核では発現しない NanoLuc 配列を持つ遺伝子に改変するために、NanoLuc の 12 番目と 45 番目のアミノ酸を指定するコドンを書き換え、pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TGA¹²[C*GG]⁴⁵-tRNA (略記: p[TGA¹²[C*GG]⁴⁵)を設計した (a)。また、核とミトコンドリアのいずれでも発現しない遺伝子として、ネガティブコントロール配列 pHSP-ND4FLAGNanoLuc [TGA¹²[T*A*G]⁴⁵-tRNA (略記: p[TGA¹²[T*A*G]⁴⁵)を設計した (b)。これらの遺伝子は全て pBluescriptII SK (-) の MCS に挿入されており、大腸菌による大量培養が可能である。鎖長はともに 2273 bp である。A^{*}は、wild type の配列に対して変異を入れた塩基を示す。

100 µg の (a~b)及び pHSP-ND4FLAG 遺伝子を 2 mL の 5%Glucose 溶液に希釈し、C57BL/6 (6wks、♂)に対し 5 sec で投与した。投与 6 hr 後に肝臓サンプルを回収し、NanoLuc 活性を評価した。各々の値は、タンパク質量で補正してグラフに示した (c)。データは平均±SD として表わされている。(n=3-5, *P<0.05、ANOVA (Bonferroni))

報告されている (Temperley R *et al.*, 2010)。そこで、 $[C^*GG]^{45}$ を $[T^*A^*G]^{45}$ に変更し、核・ミトコンドリアのいずれでもストップする配列として、ネガティブコントロール配列 pHSP-ND4FLAGNanoLuc $[TG\text{A}^*]^{12}[T^*A^*G]^{45}$ -tRNA (以下、 $p[TG\text{A}^*]^{12}[T^*A^*G]^{45}$ と表記) を設計した (図 1-8b)。

ここまでで設計したミトコンドリア発現型遺伝子 $p[TG\text{A}^*]^{12}[C^*GG]^{45}$ と、核・ミトコンドリア非発現型遺伝子 $p[TG\text{A}^*]^{12}[T^*A^*G]^{45}$ 、並びに NanoLuc 非コード遺伝子 pHSP-ND4FLAG をマウスに HTV 投与し、発光活性を測定した。その結果、 $p[TG\text{A}^*]^{12}[C^*GG]^{45}$ 投与群の発光活性は、 $p[TG\text{A}^*]^{12}[T^*A^*G]^{45}$ 投与群、及び pHSP-ND4FLAG 投与群と比較して、有意に高いことが明らかとなった (図 1-8c)。このことから、ミトコンドリア発現コドンに書き換え設計した遺伝子 $p[TG\text{A}^*]^{12}[C^*GG]^{45}$ は、ミトコンドリアにおいて機能し、NanoLuc タンパク質を発現することが示唆された。

次に、本設計遺伝子を、ミトコンドリアの遺伝子治療・研究に重要な組織である骨格筋に適用することを考えた。骨格筋へのハイドロダイナミクス法である HLV 法については、マウスに適用した例もいくつか報告されているが (Guess MG *et al.*, 2013; Zhang G *et al.*, 2010; Itaka K *et al.*, 2010)、当研究室ではラットへの投与方法を確立しており、第二章で詳

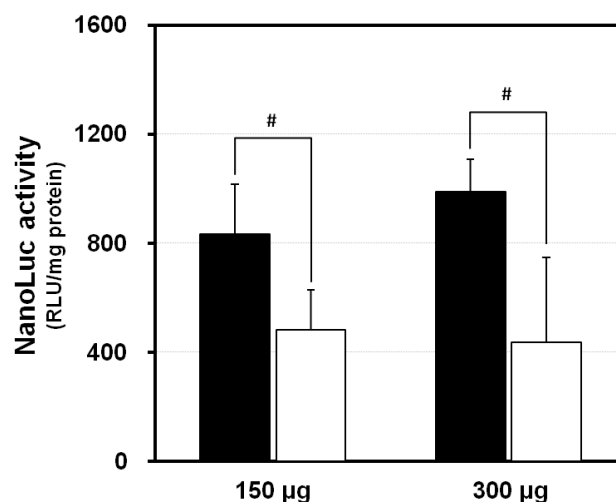


図 1-9. ラット骨格筋におけるミトコンドリア発現型外来遺伝子のタンパク質発現検証

150、300 µg のミトコンドリア発現用配列 $p[TG\text{A}^*]^{12}[C^*GG]^{45}$ 遺伝子及びネガティブコントロール配列 $p[TG\text{A}^*]^{12}[T^*A^*G]^{45}$ 遺伝子を、3 mL の生理食塩水に希釈し、Wister Hannover ラット (7wks (150-200 g)、♀) に対し 20 秒で投与した。投与 6 時間後に下腿筋サンプルを回収し、NanoLuc 活性を評価した。また、各々の値は、タンパク質量で補正した。ミトコンドリア発現用配列遺伝子投与群の値は黒いカラム (■)、ネガティブコントロール配列遺伝子投与群の値は白いカラム (□) で表されている。データは平均±SD として表わされている。(n=3-4, #P<0.05, Student's t-test)

述するが、骨格筋ミトコンドリアへと遺伝子を送達可能であることを報告している (Yasuzaki Y *et al.*, 2013)。従って、骨格筋への遺伝子導入検証にはラットを用いた。

150 μ g 及び 300 μ g の設計遺伝子を HLV 投与して検証した結果、HTV 法で導入した場合と同様、p[TGA]¹²[C*GG]⁴⁵ 投与群の発光活性は、p[TGA]¹²[T*A*G]⁴⁵ 投与群よりも有意に高いことが明らかとなった (図 1-9)。このことから、設計遺伝子 p[TGA]¹²[C*GG]⁴⁵ は、骨格筋ミトコンドリアに送達され、ミトコンドリアにおいて NanoLuc タンパク質を発現することが示唆された。更に、マウス-ラットの動物種間を超えて発現可能であることが示唆された。

1-2. 考察

Lyrawati らは、ミトコンドリア親和性リボソームとして報告されている DQAsome (D'Souza GG, 2003; D'Souza GG, 2004) をキャリアとして用い、pDNA の複合体を形成することでミトコンドリアへの外来遺伝子導入を試みていた (Lyrawati D *et al.*, 2011)。送達遺伝子としては、マウスマクロファージ由来株化細胞 RAW264.7 の mtDNA の配列に由来する、D-loop 領域の一部配列 (H 鎖複製開始点を含む) と L 鎖複製開始点を含む配列の間に、ミトコンドリアコドンに書き換えた GFP 配列を挿入した pDNA (pmtGFP) を作製して用いていた。pDNA のミトコンドリア送達については、FISH や PCR を用いて検証しており、また発現については、生細胞における GFP の発現を見ていた。しかしながら、送達した pDNA と内在性の mtDNA と共に FISH で検出し、その共局在により pDNA のミトコンドリアへの送達を示していたが、内在性の mtDNA のシグナルが一分子ずつを示すように観察されていなかった。従って、DQAsome によってミトコンドリア内部に pDNA が送達され、発現するという仮説を示す上では、実験条件に関して更に詳細な検討が必要であると思われた。加えて、GFP がミトコンドリアの形態に沿って発現していることを示すデータはなかった。このようなデータから、筆者は、本論文におけるレポーター遺伝子の発現について、更なる検証が求められると考えた。

一方、Yu らは、アデノ随伴ウィルスベクターのひとつである AAV2 ベクターのカプシドタンパク質 VP1~3 のうち、VP2 の先端に、Cox8 タンパク質のミトコンドリア指向性シグナル (mitochondria targeting signal; MTS) を付加させたベクターを用いることで、内封した遺伝子の導入に成功したと報告している (Yu H *et al.*, 2012)。その内封遺伝子は、ミトコンドリア特異的プロモーターとして知られている HSP と、ヒトミトコンドリア内因性タンパク質である ND4 を有し、その配列の下流には、内因性遺伝子と外来性遺伝子の発現の区別をつけるための FLAG タグを配している。彼らは、このベクターをマウスに局所投与し、眼組織全体における外来遺伝子の転写を逆転写 PCR 法によって示していた。また、タンパク質の発現については主に *in vivo* における治療効果によって検証していた。しかしながら、Yu らの報告には、まだ検討すべき事項が残っていると考えられる。例えば、導入した遺伝子のミトコンドリアへの送達に関しては示されていない。また、導入したとされている遺伝子は核で発現する可能性も否定できないが、ミトコンドリアにおいて転写が起きていることの検証実験は実施していなかった。更に、*in vivo* における治療効果を検証していたが、疾患モデルの作出方法に疑問が残る。彼らは、正常マウスに対し、アロトピック発現によってドミナントネガティブ変異を入れた ND4 タンパク質を発現させることで、病態

モデルを作製している。正常型の ND4 のアロトピック発現に関しては、他の研究グループからも治療効果が認められたとの報告がある (Ellouze S *et al.*, 2008)。しかし、アロトピック発現に関しては、酵母において成功しているものの (Nagley P *et al.*, 1988)、哺乳類細胞においてはその成否に疑問を投げかける論文がいくつか報告されている (Oca-Cossio J *et al.*, 2003; Perales-Clemente E *et al.*, 2011; Figueroa-Martínez F *et al.*, 2011)。特に Oca-Cossio らは、COS-7 細胞に対し、ATPase8 のアロトピック発現には成功したが、ND4、apocytochrome *b* の発現は困難であり、むしろ毒性を誘起することを報告している。

本研究では、設計遺伝子 pHSP-ND4FLAG について、まずミトコンドリアにおいて転写されることを検証した。*in vitro* ミトコンドリア転写を直接検証することは困難であるため、細胞全体における転写と核における転写から示す方法を考えた。

その過程で、*in vitro* 核転写において、核で転写されるポジティブコントロールとしてのプロモーターに CMV を選択し、一方でネガティブコントロールとしてプロモーターを削除した遺伝子を用いて、HSP による転写活性強度の比較を行った。ネガティブコントロールとの顕著な転写活性の差が認められなかった点で、HSP は核ではほぼ機能しないと考えられる。しかしながら、CMV は非常に強力な活性を有するプロモーターであるため、仮に HSP が核で弱い転写活性化能を有していたとしても、その値がマスクされてしまう可能性も考えられる。従って、CMV だけでなく、ヒトポリペプチド鎖伸長遺伝子プロモーター EF-1 α や、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター hTERT、サルポリオーマウィルス 40 プロモーター SV40 など、その他の代表的なプロモーターに関しても比較することは、今後の検討課題の一つとして考えられる。

翻訳に関しては、NanoLuc タンパク質を発現させることによって、感度良くミトコンドリア外来タンパク質発現を検出できる系の構築に加え、酵素としての機能をもつタンパク質を発現させることにはじめて成功した。ミトコンドリアで NanoLuc が発現していることについては、ミトコンドリアストップコドンを入れた遺伝子、及び入れない遺伝子を投与した際の、発光活性の比較によって示している。

外来遺伝子導入によるタンパク質発現は、他の方法によっても調べることが可能であり、例えばウェスタンブロッティングや免疫組織学的手法による検証が挙げられる。今回発現に成功したと考えられるタンパク質には FLAG タグを配しており、ウェスタンブロッティングの検証を試みた。しかしながら、数種類の抗 FLAG 抗体 (ab1162、ab21536 (abcam))

及び F3165 (SIGMA))を用いても検出できず、また、免疫反応促進薬 (Can get signal (TOYOBO))により検出感度の上昇を試みた場合、非特異的なバンドが検出されるなどの問題が生じた。FLAG のタンデム付加など、その他の手法により検出感度の改善の余地も見込めるが、少なくとも筆者のこれまでの試みでは、FLAG の検出は非常に困難であった。その一因としては、非常に微量のタンパク質発現であるため、もともと検出が困難であり、NanoLuc の発光の方が、わずかに検出感度が良かった可能性が考えられる。この場合、更に発現活性を上昇させることにより、免疫学的手法によるタンパク質発現の証明も可能であると思われるため、今度の更なる検証が期待される。なお、マウス ND4 に対する抗体、および NanoLuc に対する抗体は市販されていないため、これらに対する抗体を用いた発現検証は実施することはできなかった。

活性の絶対値としては非常に低い値であるため、構築遺伝子のタンパク質発現をより強く主張するべく、更にいくつかの方法を考察した。一つ目は、ミトコンドリアの生合成を向上させることである。今回設計した遺伝子は、ミトコンドリアの内在性のシステムを活かして転写・翻訳すると考えられる。内在性の mtDNA コードタンパク質の産生は、様々な因子でコントロールされているが、ミトコンドリアタンパク質の産生が向上する環境下では、設計した外来遺伝子も同様に発現が向上すると考えられる。例えば、レスベラトロールの投与は、ミトコンドリア生合成を向上させることが報告されている (Csiszar A *et al.*, 2009; López-Lluch G *et al.*, 2008)。このような薬物の投与によって更に発光活性が向上すれば、設計遺伝子がタンパク質発現していることを支持するデータになり得る。二つ目には、阻害剤を用いた検証法が考えられる。クロラムフェニコールは、真核生物のリボソームには結合しないが、細菌のリボソームに結合してペプチジルトランスフェラーゼを阻害する。一方、ミトコンドリアは細菌と類似するリボソームを有するため、本薬物はミトコンドリアのタンパク質合成を特異的に阻害することが知られている (Vogel RO *et al.*, 2007)。また、シクロヘキシミドは真核生物の核由来の翻訳を特異的に阻害する (Foury F *et al.*, 1973; Terpstra P *et al.*, 1979)。従って、本薬物を投与し、発光活性が低下することにより示すことも可能であると考えられる。

Yu らは、ヒト mtDNA の配列を基準として人工遺伝子を作製し、マウスに投与して発現を検証していた (Yu H *et al.*, 2012)。一方、本研究では、マウス mtDNA の配列を基準として人工遺伝子を作製し、マウスミトコンドリアにおける転写・翻訳、ヒト核における転写、並びにラットミトコンドリアにおける翻訳の検出を行った。いずれの配列に関しても、種

差間の発現について定量的な解析は行われていないが、少なくとも、mtDNA の基本骨格によらず、種差を超えて発現することが示唆された。GENETYX software ver.11 を用いてヒト、マウス、ラット間の D-loop 領域の相同性を解析した。その結果、マウス・ヒト間で 64%、ヒト・ラット間で 61%、ラット・マウス間で 75%の相同性が認められた。従って、Yu らの報告では、マウス・ヒト間の差がありながらも少なくとも転写は生じていることから、ラット・マウス間で検証した場合でも、タンパク質が発現することは十分考え得る事象である。

本研究では、NanoLuc による発光を微量検出することにより、外来遺伝子の発現を示すことができた。しかしながら、現在のシステムをレポーターアッセイ系として使用する場合には、まだ感度としては不十分であると考えられる。今後、以下に示すような遺伝子の改変によって、遺伝子の発現が向上することが期待できる。一つ目には、遺伝子の minicircle 化が挙げられる。minicircle は、 ϕ C31 integrase を用いて、pDNA 中の大腸菌に由来するバックボーンを発現カセットから排除し、発現カセットのみを環状化した遺伝子である (Chen ZY *et al.*, 2003; Kay MA *et al.*, 2010)。核の遺伝子発現において、持続的かつ高い遺伝子発現を有することが明らかとなっている。核とミトコンドリアの遺伝子発現メカニズムには異なる点があるため、同様の効果が得られるとは限らない。しかしながら、少なくとも mtDNA の場合はポリシストロニックに転写されるため (Barth C *et al.*, 1999; Fernández-Silva P *et al.*, 2003)、短鎖長にすることで転写に係る時間が短縮され、外来遺伝子からの mt-mRNA 量は増加すると考えられる。従って、発現に関連のない配列の削除は、遺伝子発現に有利に働く可能性がある。二つ目には、DNA の linear 化が考えられる。哺乳類では、ds 及び ss linear DNA に関して、何らかの能動的な DNA 取り込みメカニズムが存在している可能性が示唆されている (Koulintchenko M *et al.*, 2006)。外来遺伝子が発現する能力に関して、linear と circular でどちらが優れているかについては今後検証する必要はあると思われるが、DNA 取り込みメカニズムの存在は、DDS の観点から、発現上昇に寄与する可能性がある。三つ目には、ミトコンドリア標的キャリアに搭載することが挙げられる。当研究室では、ミトコンドリアマトリクスに内封物を送達可能な MITO-Porter の開発を行っている (Yamada Y *et al.*, 2008; Yasuzaki Y *et al.*, 2010)。また、生細胞においてミトコンドリア近傍に pDNA を送達可能な DQAsome や (D'Souza GG *et al.*, 2003; D'Souza GG *et al.*, 2004)、正常型 mtDNA を導入可能な Ptorofection 法 (Keeney PM *et al.*, 2009) など、いくつかのミトコンドリア送達遺伝子キャリアの報告がある。これらのキャリアで搭載遺伝子を積極的にミトコンドリアに導入することにより、効率的な外

来遺伝子発現が得られる可能性がある。なお、DQAsome を用いた場合、linear DNA は、circular DNA よりもミトコンドリアに近接するという報告があることから (D'Souza GG *et al.*, 2005)、投与遺伝子の形態とキャリアの相性が存在する可能性もある。

当研究室で開発された MITO-Porter は、これまで DNaseI や GFP などのタンパク質を送達したことを報告しているが (Yamada Y *et al.*, 2008; Yamada Y *et al.*, 2012)、遺伝子に関しては検証されていない。従って、仮に、設計した遺伝子の発現が認められなかった場合、その原因は遺伝子の質によるものなのか、ミトコンドリアへの送達量が少なかったことに起因することなのかを判断することは困難である。本研究の目的遂行のために重要な点は、筆者が実施可能な実験手技で、かつ現状で最もミトコンドリアに遺伝子を送達し得る方法で設計した遺伝子を導入し、発現を検証することである。従って、一般的に核への遺伝子導入・発現が生細胞実験よりも高く得られるハイドロダイナミクス法を、その導入法として選択した。本法で設計した遺伝子を導入し、僅かながら発現が認められたことから、今後は発現活性の上昇を目指すと共に、MITO-Porter による導入検証を遂行可能であると考えている。

筆者は、転写の検証から翻訳の検証に移行する際、ND4 の遺伝子をそのまま保持して NanoLuc を付加した。これは、翻訳のメカニズムを考慮した結果である。ミトコンドリア翻訳について、mt-mRNA 側の特徴と翻訳メカニズムに関する現在までの知見を、以下にまとめる。

まず、mt-mRNA の特徴には、5' UTR の長さが重要であることが報告されている。このことについては、HeLa 細胞の内在性 mt-mRNA においては、開始コドンに先行する 5' UTR が長くても 3 塩基であるという背景から研究が進んだ (Montoya J *et al.*, 1981)。5' UTR の長さを人工 mt-mRNA によって変更した際の翻訳開始複合体形成能を調べたところ、5' UTR が長いほど減少することが見出された (Christian BE *et al.*, 2010)。また、熱力学的自由エネルギーを基にした RNA の構造予測 (Mathews DH *et al.*, 2004)、並びに RNA2 次構造解析 (Wilkinson KA *et al.*, 2006)のいずれの結果においても、mt-mRNA の 5' 末端側は高次構造を形成しにくいことが明らかとなった (Jones CN *et al.*, 2008)。このことは、ミトコンドリアリボソームの構造的特徴と関係があると考えられる。すなわち、ミトコンドリアリボソームの mt-mRNA entrance site には、真核細胞には存在しないタイトな三角形ゲートライク構造があり (Sharma MR *et al.*, 2003)、高次構造を有する mt-mRNA はリボ

ソームに入り込めないことが示唆されている。当然ながら、哺乳類の mt-mRNA は、真核細胞の 5' UTR にあるような SD 配列（あるいは Kozak 配列）、anti-SD 配列を有さず、5' Cap による保護も受けていない (Anderson S *et al.*, 1982)。

一方、ミトコンドリアリボソームがクリステ側の内膜に存在することが示唆されていること (Vogel F *et al.*, 2006)、ミトコンドリア翻訳関連膜タンパク質である Oxa1 は mt-rRNA の LSU に結合すること (Ott M *et al.*, 2006)、Oxa1 の C 末端がミトコンドリアリボソームの Exit tunnel に近接していること (Jia L *et al.*, 2003; Szyrach G *et al.*, 2003)、mt-mRNA は翻訳アクチベーターによって内膜に結合すること (Naithani S *et al.*, 2003)、などの種々の情報から、ミトコンドリア翻訳は内膜にタンパク質を挿入しながら進行する可能性が示唆されている。なお、mtDNA には脂溶性の高いミトコンドリア内膜タンパク質がコードされているため、本メカニズムは実に合理的であると考えられる。

これらの知見から、ミトコンドリアの内在メカニズムに則って外来遺伝子の翻訳が進行することを想定した場合、mt-mRNA の 5' 末端は重要な配列であることが予想される。そこで、筆者は、転写検証で利用した ND4 の配列をそのままリーダー配列として用い、その後続く様に NanoLuc を挿入することにした。配列の順序を変えた場合の検証は行っていないが、これらの工夫が遺伝子発現達成に寄与した可能性がある。

しかしながら、ND4 タンパク質の全ての配列が重要であるとは限らない。従って、例えば ND4 の 3' 末端側から徐々に配列を削り、翻訳に必要な 5' 末端側の最小機能単位を見出すことも可能であると考えられる。必要のない配列の除去は、遺伝子の導入コピー数を増やせるため、遺伝子配列改善のポイントであると思われる。

近年のレーザー顕微鏡技術の発展に伴い、単一細胞で起こる遺伝子発現を単一分子レベルで検出することが可能になってきた (Yu J *et al.*, 2006; Golding I *et al.*, 2005)。このような背景から、単一分子に着目した生物学分野が非常に注目を集めている。その中で、遺伝子からのタンパク質発現について、興味深い報告がある。内在性の遺伝子は通常 1 細胞あたり 2 コピーしか存在しないにも関わらず、生体では 0.1~10000 個の範囲でその内在タンパク質発現量を調節している。一方で、蛍光タンパク質 Venus を用いた発現数の定量解析の結果、その 6 割の pDNA は 10 個以下のタンパク質しか発現していない (Taniguchi Y *et al.*, 2010)。その理由等については未だ解明されていないが、本分野の研究の発展により、この発現調節メカニズムの本質が明らかになることで、ミトコンドリアにおける外来遺伝子の発現量が低いことの原因解明や、制御する方法論の確立が期待できる。

第二章 骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達

骨格筋は、MELAS や MERRF をはじめとするミトコンドリア病の病態を呈する主な組織であるが、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 (Zhang G *et al.*, 2010) 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 法は、げっ歯類や大型哺乳動物に対する骨格筋核への遺伝子導入法として、基礎・前臨床研究に応用されている投与方法である (Kamimura K *et al.*, 2009)。下肢の付け根から末端側の血流を一時的に駆血した状態で、足背静脈から体幹側に向かって、大容量の naked pDNA 溶液を急速投与する (図 2-1a)。現在のところ、物理的な圧力によって一過的な膜透過が誘起されることで、pDNA が血管外に漏出し、骨格筋細胞内に送達されると考えられている。更に、核へ近接した pDNA が、能動的な遺伝子の輸送機構、あるいは核膜の一過的な不安定化などの何らかのメカニズムによって、pDNA が核内へと送達されると考えられている。筆者は、pDNA の骨格筋細胞内への送達は非特異的であり、核へ pDNA が送達されるのであれば、ミトコンドリアにも送達され得るという仮説を立てた。

これまでいくつかのミトコンドリアへの遺伝子導入が検証されてきたが、外来遺伝子の導入によるタンパク質発現は、明確に示されていなかった。その一因として、DDS の観点からは、遺伝子の送達量が、発現したタンパク質の検出に十分量ではなかったことが考えられる。近年、遺伝子をミセル化して HLV 投与した場合、naked の状態で投与した時よりも、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 (Itaka K *et al.*, 2010)。一方、当研究室では、pDNA をポリカチオンで凝縮化する技術を確認している (Kogure K *et al.*, 2004)。筆者は、凝縮化 pDNA を HLV 投与することで、ミトコンドリアへの遺伝子の送達量が向上し、遺伝子発現の向上に寄与するのではないかと考えた。

そこで、本章では、HLV による骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達および機能検証、そして送達量上昇への試みについて述べ、更に投与によるミトコンドリアへの毒性検証結果を提示する。

2-1. 結果

2-1-1. pDNA の骨格筋ミトコンドリア送達評価

HLV 法を世界に先駆けて報告した Wolff らは、ラット下肢に対して遺伝子を導入する方法を確立している (Hagstrom JE *et al.*, 2004)。まず、HLV 投与による遺伝子導入法が適切に再現できることを確認するために、核発現型ルシフェラーゼ遺伝子コード pDNA を用いて、ラット下肢を駆血して HLV 投与し、遺伝子発現検証を行った。

HLV 投与の体積・投与速度の条件については、Wolff らの報告に則り、3 mL を 20 秒で投与した (Hagstrom JE *et al.*, 2004)。投与 2 分後に駆血帯をはずし、24 時間後に下肢骨格筋を回収して、ルシフェラーゼの発光活性を測定した。このときのサンプルは、膝蓋より上部にある大腿四頭筋、その下部にある大腿屈筋、そして膝蓋より足底側に位置する下腿筋の、3 つの部位に分けて回収し、評価した (図 2-1b)。

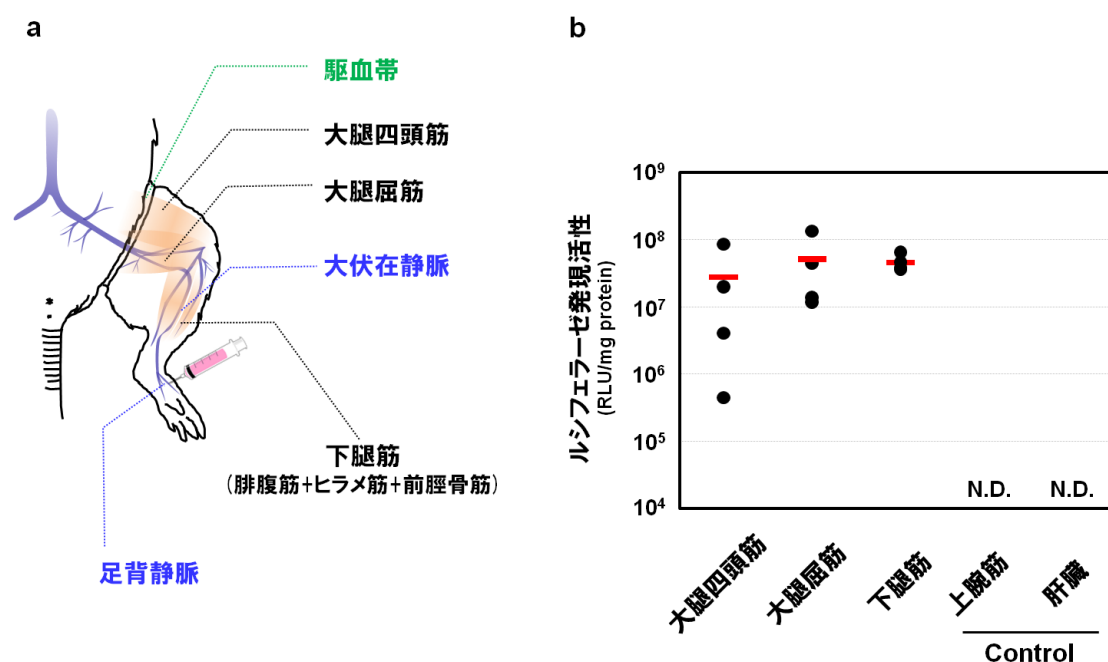


図 2-1. HLV 投与概略図と骨格筋核各部位への遺伝子導入・発現検証

HLV 投与は、ラット後肢の付け根を駆血帯で締め、血流を一時的に制限した状態で、足背静脈から高容量の遺伝子溶液を急速投与する 方法である (a)。184 μ g のルシフェラーゼコード pDNA を、3 mL の生理食塩水に希釈し、Wistar Hannover ラット (7-8wks、150~200 g、♀) に対して 20 sec かけて足背静脈から遺伝子溶液を HLV 投与した。投与 24 hr 後の、後肢骨格筋を摘出し、大腿四頭筋、大腿屈筋、下腿筋 (腓腹筋+ヒラメ筋+前脛骨筋) の 3 つの部位に分けて回収した。先行の報告では、大伏在静脈から投与したが、本研究ではさらに末端側の足背静脈から投与した。また、比較対象サンプルとして、上腕骨格筋及び肝臓についても同様に採取した。これらのサンプルをホモジェナイズし、上清を用いてルシフェラーゼ活性を測定した (b)。(one-way ANOVA, $P = 0.69$, $n = 3-4$, N.D.; not detected)

測定の結果、どの部位でも $10^7 \sim 10^8$ RLU/mg protein 程度の一様な遺伝子発現が認められ、各部位間の値に統計学的に有意な差は認められなかった ($p=0.69$)。また、投与部位以外の肝臓や上肢骨格筋では発光活性は認められなかった。このことから、遺伝子発現は骨格筋に限局して生じていることが示唆された。更に、特に下腿筋において安定した遺伝子発現が認められた (図 2-1b)。安定した遺伝子発現量は、その部位に送達された遺伝子の量も安定した値をとると考えられる。従って、以降の検証においては、下腿筋のみを用いて評価を行うことにした。

次に、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検証した。具体的には、pDNA を HLV 投与した下腿筋から、ミトコンドリアを単離し、その中に含まれる遺伝子を PCR で増幅することで、pDNA が検出されるか否かを評価した。

ミトコンドリアの単離は、回収した下腿筋をホモジェナイズし、過去に報告のある遠心分離を用いた一般的な方法により実施した (実験操作・方法項に詳述)。まず、評価対象の骨格筋ミトコンドリアが単離されていることは、ウェスタンブロッティングによるマーカータンパク質の検出により検証した。その結果、骨格筋組織全体から抽出されたタンパク質には、細胞質、核及びミトコンドリアのマーカータンパク質のバンドが検出された一方

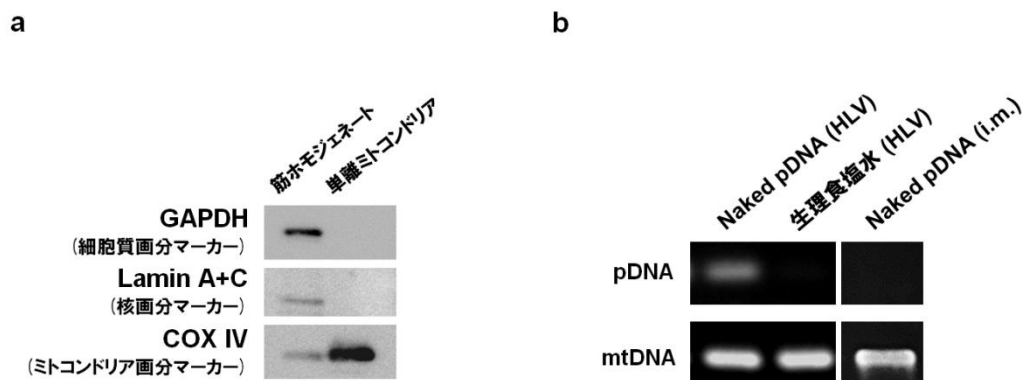


図 2-2. 骨格筋ミトコンドリアへの pDNA 送達評価

骨格筋サンプルからミトコンドリアを単離し、ウェスタンブロット法によりマーカータンパク質の検出を行った。それぞれのサンプルについて、3 μ g のタンパク質をアプライして検証を行った (a)。GAPDH; 細胞質画分マーカー、Lamin A+C; 核画分マーカー、COXIV; ミトコンドリア画分マーカーを表す。(b)pDNA を骨格筋内に局所投与、または HLV 投与した場合の、ミトコンドリアへの pDNA 送達を検証した。投与 24 時間後の骨格筋からミトコンドリアを単離して、投与 pDNA に対する特異的プライマーを用いて PCR 法により pDNA 断片を増幅し、アガロース電気泳動にてバンドの検出を試みた。なお、mtDNA の D-loop に対する特異的プライマーを用いて、内標準配列の増幅も併せて行った。また、比較対象として、生理食塩水を HLV 投与したサンプルについても同様の処理を行った。レーン 1; naked pDNA の HLV 投与サンプル、レーン 2; 生理食塩水の HLV 投与サンプル、レーン 3; naked pDNA の骨格筋局所投与サンプルを泳動した結果をそれぞれ表す。i.m.; 筋肉内投与。

で、ミトコンドリア単離画分からはミトコンドリアマーカールのみが検出された (図 2-2a)。このことから、本単離操作によって、骨格筋サンプルから高純度のミトコンドリア画分を分画可能であることが明らかとなった。

続いて、pDNA を投与したサンプルの単離ミトコンドリア画分から DNA を抽出し、このサンプルをテンプレートとして PCR で増幅することにより、投与遺伝子の検出を試みた。なお、本評価では 184 μg の pDNA を投与し、24 時間後に回収した下腿筋サンプルを用いた。また、送達の比較対象として、等量の pDNA を下腿筋に局所投与したサンプル、及び生理食塩水 HLV 投与サンプルを用意し、同様の評価を行った。局所投与容量については、欧州連邦製薬工業協会並びに欧州代替法バリデーションセンターによる「実験動物の被検物質の投与 (投与経路、投与容量) 及び採血に関する手引き」の推奨に則り、100 μL とした (ref.5)。pDNA の検出にはルシフェラーゼ遺伝子、内標準の検出には mtDNA の D-loop 領域を、それぞれ特異的に増幅するプライマーセットを用いた。

増幅した PCR サンプルをアガロース電気泳動した結果を図 2-2b に示す。HLV 投与サンプルにおいて、pDNA 増幅断片のバンドが認められた一方で、局所投与サンプル及び生理

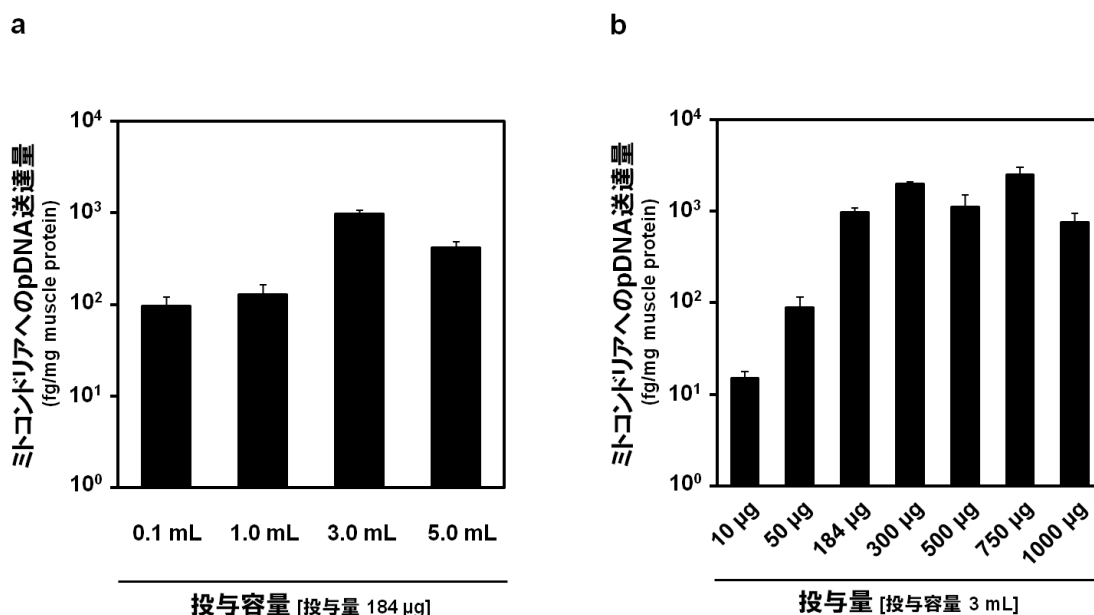


図 2-3. HLV によるミトコンドリアへの外来遺伝子送達における投与容積・投与量の影響

投与容積(a)及び pDNA 投与量(b)を変化させた時のミトコンドリアへの pDNA 送達量を評価した。投与は全て 20 sec かけて行った。投与容積については、投与量を 184 μg で一定とし、0.1、1、3、5 mL で評価した。投与量については、投与容量を 3 mL で一定とし、10、50、184、300、500、750、1000 μg で評価した。ラットに各条件で投与して、24 時間後の下腿筋サンプルからミトコンドリアを単離し、DNA を抽出して、定量的 PCR 法により pDNA を測定した。内標準には mtDNA と nDNA を用い、これらの値から求められた total DNA 量を基に算出した。データは平均 $\pm$ SE として表わされている。(n=3~7)

食塩水投与サンプルでは、バンドは認められなかった。このことから、HLV 投与によって、pDNA はミトコンドリアに送達されることが示唆された。

2-1-2. pDNA の最適な投与容量・投与量の検討

送達された pDNA を定量的に扱い、また最適な投与条件を決定するために、投与量及び投与容積について検討し、定量的 PCR 法による評価をもとに検証した。

その結果、184 µg 以上を投与した場合では、ミトコンドリアへの遺伝子送達量は飽和すること、そして、3 mL の投与容積において、最も高いミトコンドリアへの遺伝子送達量を示すことが明らかとなった (図 2-3)。以上の結果から、184 µg (約 200 µg) の pDNA を 3 mL に希釈して投与することで、最も効率的に遺伝子を送達可能であると考えられる。以降の HLV 投与検証は、本投与条件をもとに行うことにした。

2-1-3. ミトコンドリア内への pDNA 送達検証

ミトコンドリアを分画して pDNA の送達を定量する本評価では、ミトコンドリア膜外の pDNA を検出することで、送達されていない pDNA を定量してしまうことが懸念される。そこで、pDNA を HLV 投与後の骨格筋ミトコンドリアサンプルを DNase I で処理することにより、膜外の pDNA を消化し、DNase 未処理群との値を比較した。

まず、DNase I 処理条件の検討を行った。種々の量の pDNA を 20 µg protein の単離ミトコンドリアと混合し、更に DNase I を添加して、37°C で 30 分間処理し、EDTA を添加することで反応を停止させた。本サンプル中の DNA を抽出し、mtDNA を内標準として用いて、定量的 PCR 法により pDNA の残存量を定量した。その結果、1 ng の pDNA は、本プロトコルによって、残存率 2.9% まで消化されることが明らかとなった (図 2-4a)。評価のためには十分量であると判断し (考察の項を参照)、次の実験を行った。

pDNA を最適化した条件で HLV 投与し、24 時間後の下腿筋サンプルから単離したミトコンドリアを用いて、DNaseI 処理サンプル及び未処理サンプルを調製し、先と同様に DNA を抽出した。このサンプル中に含まれる pDNA を定量した結果を図 2-4b に示す。

検証の結果、両者の定量値の間に有意な差は認められなかった ($p=0.71$)。従って、ミトコンドリア膜外に存在していたと考えられる pDNA は、単離ミトコンドリアサンプル中には存在せず、定量に影響がないことが示唆された。その結果を説明する理由のひとつには、pDNA の電荷が考えられる。pDNA とミトコンドリアは、ともに負の電荷を有しており、共存下では静電的に反発すると考えられる。従って、ミトコンドリア分画プロトコル中の洗浄操作によって、pDNA は検出限界以下まで除去される可能性がある。また、本分画プ

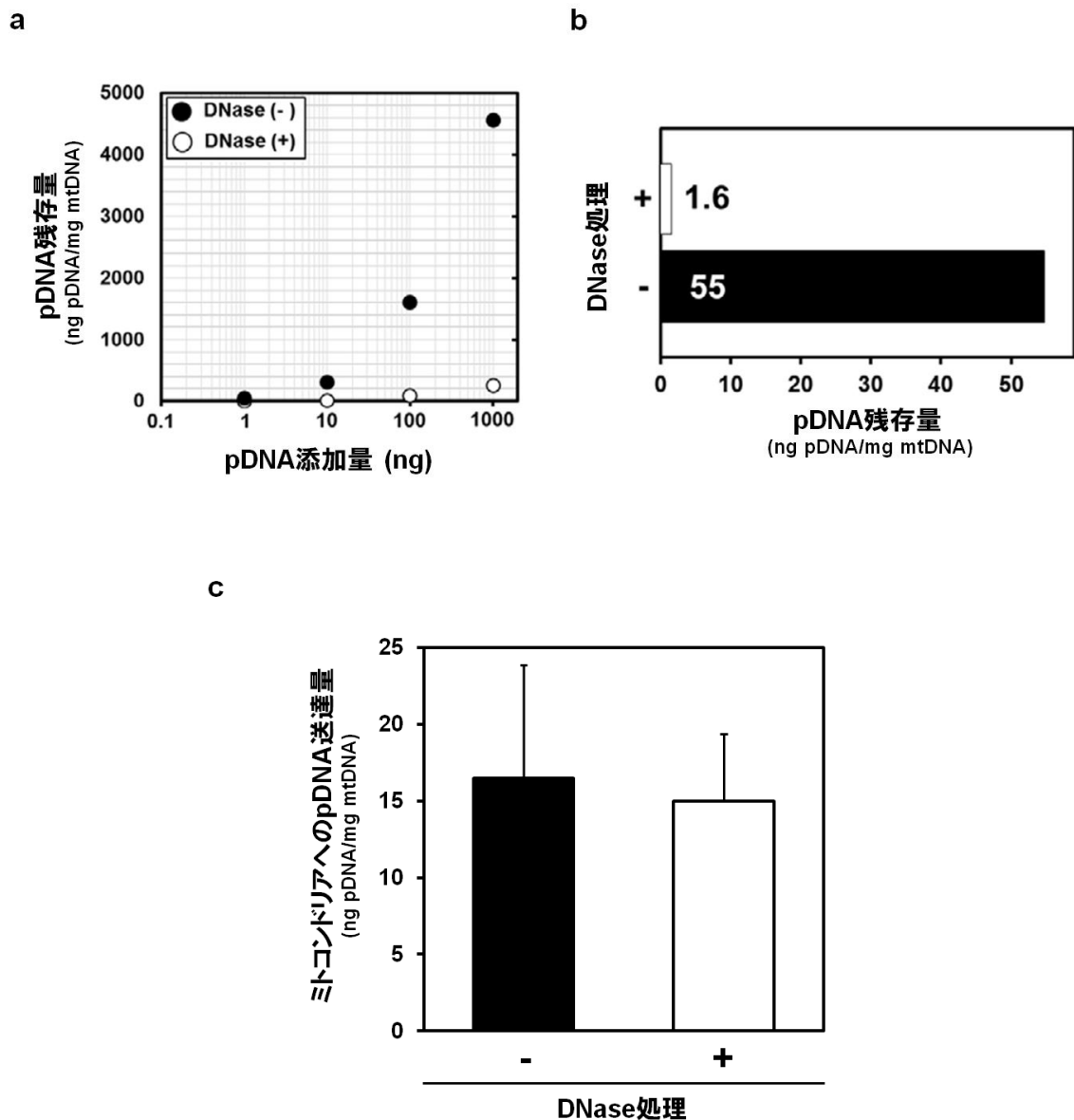


図 2-4. ミトコンドリア内に送達された pDNA の定量

ミトコンドリア膜外に存在する可能性のある pDNA を、DNase で処理した後の、ミトコンドリア内に存在する pDNA の定量を行った。まず、DNaseI が処理できる pDNA を検討した。単離ミトコンドリアに 1、10、100、1000 ng の pDNA を添加し、20U の DNase を加え、37℃ で 30 分間処理して、残存する pDNA 量を定量的 PCR 法により測定した(a)。このとき、DNase を添加しないサンプルも用意し、同様に評価した。pDNA を 1 ng 添加した時の DNase 添加サンプルは、未添加サンプルの 2.9% (絶対値として 55 から 1.6)まで消化されていた (b)。closed circle (●)は DNase 非添加群、open circle (○)は DNase 添加群の pDNA 残存量の定量値を表わす。

続いて、pDNA の HLV 投与サンプルからミトコンドリアを単離し、DNase 処理を施してから DNA を抽出し、mtDNA を内標準として、pDNA の定量を行った (c)。この時、DNase を添加しないサンプルをコントロールサンプルとして用意し、同様に評価した。データは平均 ±SD として表わされている。(P=0.71, Student's t-test, n=3)

ロトコル中には、EDTA を含まないバッファーに置換する行程があり、組織にもともと含まれていた DNase などの影響によって分解を受ける可能性も考えられる。以上のことから、本定量評価においては、ミトコンドリア膜外に存在する pDNA は分解あるいは除去されるため、定量値に影響しないことが明らかとなった。

2-1-4. pDNA 動態の組織学的評価

非特異的なミトコンドリア送達であるという仮説を検証するため、HLV 投与による遺伝子導入を組織学的に評価した。pDNA は Cy5 や Cy3、各種 Q-Dot など直接標識が可能であるが、当研究室の以前の検討で、1 分子の蛍光標識核酸を検出することは非常に困難であることが示唆されていた (Hama S *et al.*, 2006; Umetsu Y *et al.*, 2011)。また、標識による pDNA の細胞内動態の変化も懸念された。そこで、本検証では、Immuno-FISH による検出を試みた。本法では、投与後のサンプルに対して処理を施すため、動態の変化についての懸念はない。また、FISH は細胞内の染色体の異数体を検出する用途にも用いられているため (Pang MG *et al.*, 1999; Pinkel D *et al.*, 1986)、1 分子の DNA を検出可能であるという実績がある。

HLV 投与 24 時間後の骨格筋からヒラメ筋 (下腿筋の一部) を回収し、凍結組織切片と作製した。ミトコンドリアについては免疫染色 (一次抗体: COXIV、二次抗体: Alexa-594 標識

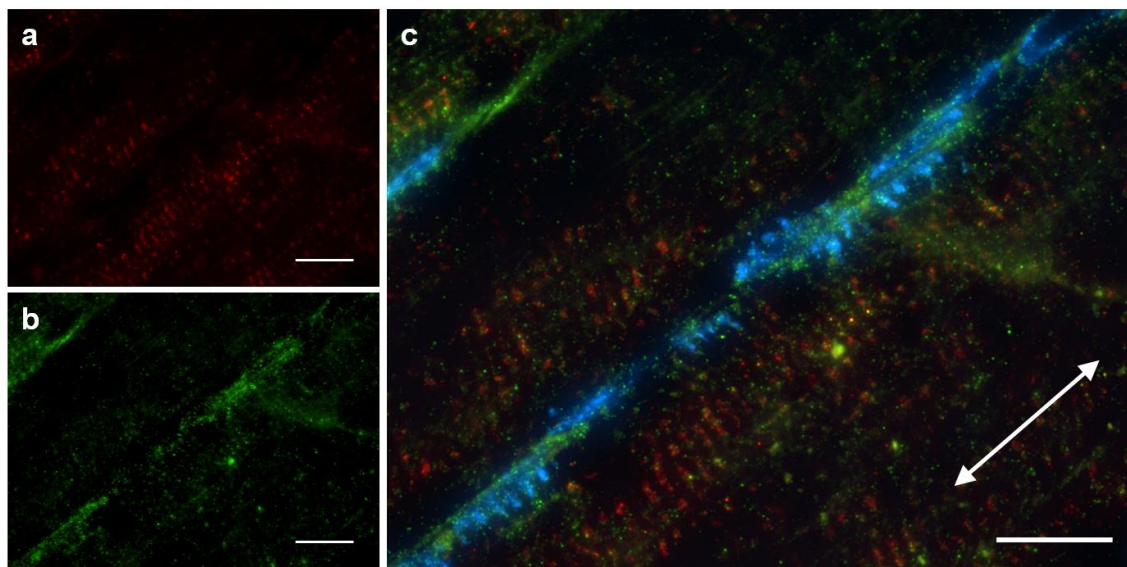


図 2-5. HLV 投与骨格筋における pDNA の組織内動態評価

FISH と免疫染色により、1 分子レベルでの pDNA の検出を行った。画像は疑似カラーで表わしている。(a) 赤; ミトコンドリア (1 次抗体; COXIV、2 次抗体; Alexa594-conjugate)、(b) 緑; pDNA (Cy3-conjugate の FISH プローブ) をそれぞれ表す。(c) は、(a) と (b)、及び DAPI 染色した核の像を重ね合わせた画像。(↔) は筋線維の方向を表す。スケールバーは 10 μ m を表す。

抗体)を施し、pDNA については Cy3 標識 FISH プローブで処理することで、蛍光染色を行った。本サンプルを CLSM で観察した結果を図 2-5 に示した。

その結果、pDNA は骨格筋サンプル中に一様に分散しており、仮説を支持する結果となった。また、そのいくつかはミトコンドリアとも共局在することが明らかとなった。顕微鏡の分解能の限界から、ミトコンドリア内部に pDNA が存在することは本結果からは判断できない。しかしながら、少なくとも HLV 投与によって、pDNA はミトコンドリアに近接し得ることが明らかとなった。また、骨格筋組織内全体に分散することから、膜透過性の一過的な亢進により直接導入される可能性も考えられる。

2-1-5. ミトコンドリアへの pDNA 送達量上昇の試み

これまでの結果から、naked pDNA を HLV 投与することで、ミトコンドリアへ遺伝子が送達されることが示唆された。しかし、定量的なデータを得ることで、mtDNA のコピー数の 1 万～10 万分の 1 程度の pDNA 送達量であることが明らかとなった。換言すると、1 細

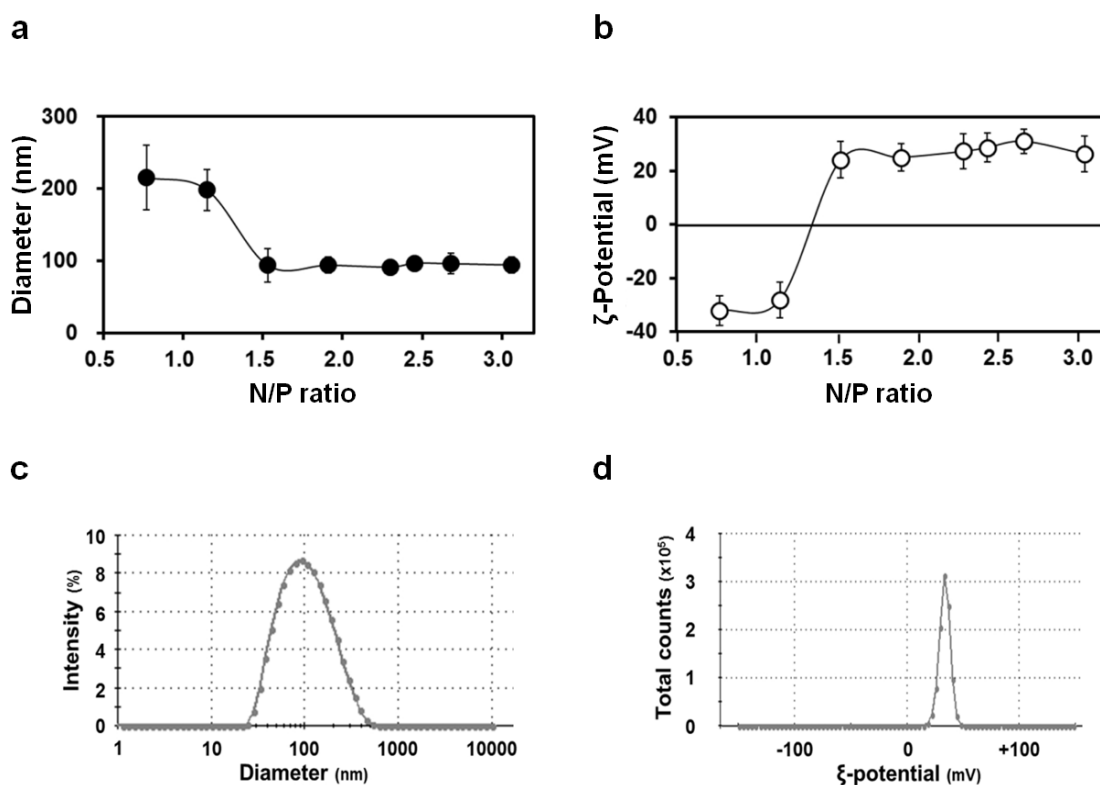


図 2-6. プロタミンによる pDNA の凝縮化ナノ粒子の調製検討

種々の割合で pDNA とプロタミンを混合し、調製した粒子の物性について、粒子径 (a) と ζ 電位 (b) を測定した。データは、平均 $\pm$ SD で表わされている ($n=4$)。N/P 比 2.3 でどちらも安定な値をとることから、この条件で粒子を調製することにした。N/P 比 2.3 の時に調製される粒子の (c) 粒子径、(d) ζ 電位 をそれぞれ表す。

胞あたりの mtDNA が 1000 コピーであると仮定した場合、10~100 細胞に 1 コピーの割合で pDNA がミトコンドリアに送達されたことになる。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、送達量の向上が非常に重要であると考えられる。

当研究室で構築された pDNA のポリカチオン凝縮体は、100 nm 以下で正の電荷を有するナノ粒子である。先に報告のあったミセル化ナノ粒子の HLV 投与の場合、核への能動的な導入に関する工夫は一切なかったため (Itaka K *et al.*, 2010)、形態的要因によって骨格筋細胞内への導入量が増えれば、ミトコンドリアへの送達量も上昇することが期待できる。また、ミトコンドリアは最も負に帯電しているオルガネラであるため (Reers M *et al.*, 1991)、正電荷を帯びたナノ粒子は、ミトコンドリアに近接しやすいと考えられる。これらの理由から、pDNA をナノ粒子化して HLV 投与し、ミトコンドリアへの送達量を検証することにした。

ポリカチオンと pDNA の混合比は、一般的に、ポリカチオンのアミノ基 (N) のモル数と、pDNA のリン酸基 (P) のモル数の比、すなわち N/P 比として表す。まず、種々の割合で pDNA とポリカチオンを混合し、最適な粒子調製条件を検討した (図 2-6)。この結果から、安定した粒子径及び ζ 電位が得られ始める N/P 比 2.3 で、今後の検討を行うことにした。この粒子は、平均粒子径約 88 ± 2.3 nm (図 2-6c)、平均 ζ 電位 26 ± 7.3 mV (図 2-6d) 程度の物性を

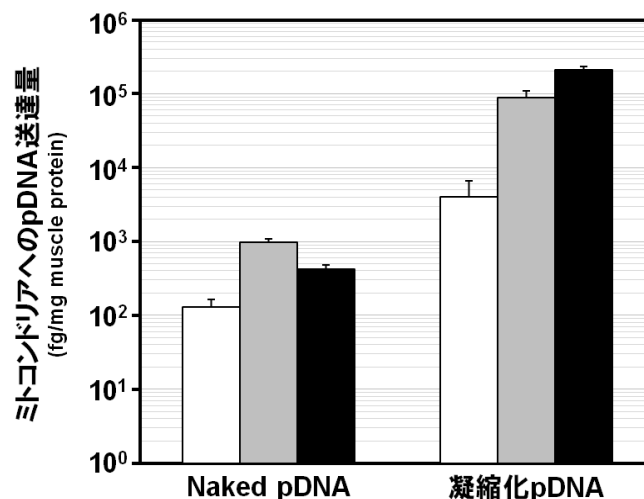


図 2-7. naked pDNA 及び凝縮化 pDNA 投与時のミトコンドリアへの pDNA 送達量

投与量は 184 μ g として固定し、naked pDNA 及び凝縮化 pDNA を HLV 投与した時の、ミトコンドリアへの pDNA 送達量を比較した。この時、投与容量についても、1、3、5 mL として併せて検討した。白いカラム (□) は 1 mL、グレーのカラム (■) は 3 mL、黒いカラム (■) は 5 mL の投与容積で評価した値を表す。データは、平均 $\pm$ SE として表わされている。(n=3~6)

有していた。

次に、凝縮化ナノ粒子または naked pDNA を HLV 投与し、下腿筋からミトコンドリアを単離して、pDNA の送達量を定量して比較した。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 (図 2-7)。この結果から、遺伝子を凝縮化することで、1 細胞中のミトコンドリアに、約 1~10 コピー程度の pDNA を送達することに成功したと考えられる。

2-1-6. ミトコンドリア毒性の評価

ミトコンドリアへの毒性は、活性酸素の過剰産生によるミトコンドリア生合成の低下などを引き起こす可能性がある (Cadenas E *et al.*, 2000)。ミトコンドリアの生合成の低下には、mtDNA にコードされたタンパク質サブユニットの転写・翻訳機能の低下も含まれる。第一章で設計した遺伝子は、ミトコンドリア内因性遺伝子と同じメカニズムで転写・翻訳されることを想定して設計している。従って、ミトコンドリア生合成の低下は、導入した設計遺伝子の発現効率の低下に繋がり、検出を困難にする可能性がある。そこで、HLV 投与後の骨格筋サンプルについて、ミトコンドリア毒性が生じているか否かを検証した。

まず、COX (チトクロム c 酸化酵素)染色による評価を行った。本評価は、ミトコンドリアの活性を知る目的で一般的に用いられる方法である。生理食塩水、naked pDNA、凝縮化 pDNA を投与して 24 時間後に骨格筋を回収し、染色操作を施した切片を、光学顕微鏡を用いて観察した (図 2-8)。また、未処理サンプルについても同様に観察した。なお、各投

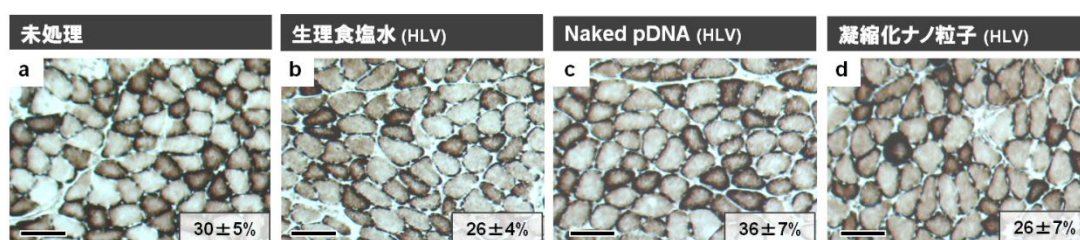


図 2-8. COX 活性染色

HLV 投与 24 時間後または未処理の骨格筋を回収してイソペンタン中で凍結させ、10 μ m の薄切切片を作製した。各サンプルで COX 染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。(a)未処理群、(b)生理食塩水の HLV 投与群、(c)naked pDNA の HLV 投与群、(d)凝縮化ナノ粒子の HLV 投与群をそれぞれ表す。観察には、対物 10 $\times$ 、接眼 4 $\times$ のレンズを用いた。各投与サンプルについては 3~4 切片を作製し、1 切片については切片の大きさに応じて 2~4 か所の視野をランダムに観察して画像を取得した。スケールバーは 100 μ m を表す。濃染された筋線維を COX (+) とし、画像中の全ての筋線維に対する COX (+)筋線維の割合を、活性の指標 (%)として算出した。1 切片の平均を例数 1 とした。各データは平均 $\pm$ SD として表わされている。(p=0.11, ANOVA, n=3~4)

与サンプルについては 3~4 切片を作製し、1 切片については切片の大きさに応じて 2~4 か所の視野をランダムに観察して画像を取得した。濃染された筋線維を COX (+)とし、画像中の全ての筋線維に対する COX (+)筋線維の割合を、COX 活性の指標とした。1 切片の平均を例数 1 とした。評価の結果、各投与群及び未処理群の活性値の間には有意な差は認められなかった ($p=0.11$)。

次に、ミトコンドリアの膜電位について調べた。膜電位も、代表的なミトコンドリアの活性指標のひとつである。今回は、ミトコンドリア膜電位染色蛍光試薬である TMRM の染色度合いから、活性を評価した。なお、コントロール染色としてミトコンドリア膜電位非依存性染色蛍光試薬の MitoTracker Deep Red を用いた。生理食塩水、naked pDNA、凝縮化 pDNA を投与して 24 時間後に骨格筋を回収し、TMRM と MitoTracker Deep Red のカクテル染色溶液に浸漬して染色操作を施した切片を、CLSM を用いて観察した (図 2-9)。また、ミトコンドリア膜電位脱分極試薬である FCCP 処理サンプル、並びに未処理サンプルについても同様に染色操作し、観察した。

その結果、MitoTracker Deep Red ではどのミトコンドリアも染色されていたが、TMRM による染色では、FCCP 処理を施したサンプルでのみ、明確なミトコンドリア染色像が取得できなかった。ミトコンドリア膜電位が保持されている場合には、TMRM はミトコンドリアに集積したままであると考えられるが、膜電位が低下している際には、TMRM は細胞

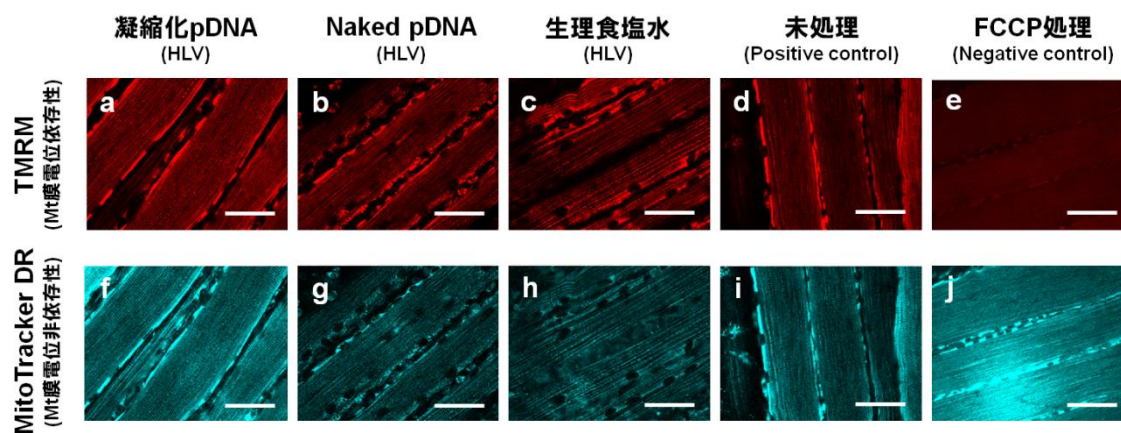


図 2-9. ミトコンドリア膜電位染色

HLV 投与 24 時間後または未処理の骨格筋を回収して、TMRM 及び MitoTracker DeepRed カクテル染色試薬中に浸漬し、CLSM にて観察を行った。TMRM はミトコンドリアを膜電位依存的に染色し (a~d)、MitoTrackerDeepoRed は膜電位非依存に染色する (e~j)。観察対象の投与サンプルは、凝縮化 pDNA の HLV 投与群 (a, f)、naked pDNA の HLV 投与群 (b, g)、生理食塩水の HLV 投与群 (c, h)とした。また、ポジティブコントロールとして未処理群 (d, i)、ネガティブコントロールとしてミトコンドリア膜電位脱分極試薬 FCCP 処理群 (e, j)を用いし、観察した。スケールバーは 50 μm を表す。

や組織に拡散し、S/N 比が低くなることによって、検出が困難になったと考えられる。従って、FCCP 処理サンプルは、ネガティブコントロールとして機能していることが確認された。その一方で、各種 HLV 投与サンプルでは TMRM による明確なミトコンドリア染色像が認められ、未処理サンプルと同様の染色像が得られた。このことから、HLV 投与によって顕著な膜電位低下は認められず、pDNA やポリカチオンによる影響もほとんどなかったと考えられる。

以上の COX 活性測定及びミトコンドリア膜電位染色の結果から、HLV 投与による pDNA 送達には、顕著なミトコンドリア毒性は認められなかったと考えられる。

2-2. 考察

現在までに、いくつかのグループがミトコンドリア RNA デリバリーについて報告している (Mahata B *et al.*, 2006; Wang G *et al.*, 2012; Kolinsnikova *et al.*, 2004)。DNA デリバリーの報告がほとんどない中で、RNA デリバリーの分野の進展が目覚ましい最大の要因は、ミトコンドリアが RNA シグナルタグシステムに基づいた RNA 輸送機構を元来有しており、そのシステムを利用する戦略が可能であるためである (Endo T *et al.*, 2010; Wang G *et al.*, 2010)。また、アロトピック発現による遺伝子発現戦略についても、複数のグループから報告がある (Won YW *et al.*, 2011; Ellouze S *et al.*, 2008)。ミトコンドリアを構成するタンパク質の約 90%は核にコードされたタンパク質であり、これらのタンパク質はミトコンドリア標的シグナル (mitochondrial targeting signal; MTS)によってミトコンドリアへと輸送される。アロトピック発現戦略は、核で発現するようにミトコンドリア遺伝子のコドンを書き換え、その発現させたいタンパク質コード領域の上流に、核コード内因性ミトコンドリアタンパク質の MTS (Atp6 や Cox8 などの由来が多い)を付加して、ウィルスベクターなどで核に遺伝子を導入することで、タンパク質を発現させる方法である。しかしながら、これらのシグナルタグを用いた戦略にはいくつか問題点がある。例えば、ミトコンドリアの機能が低下した患者の細胞においては、これら内因性の機構がほとんど働かないことが挙げられる (Tranebjaerg L *et al.*, 1995)。これは、ミトコンドリアの機能は、nDNA にコードされたタンパク質と mtDNA にコードされたタンパク質がバランスをとって発現しており、病態モデルのミトコンドリアのバイオジェネシス自体が減少しているためと考えられる。また、特にアロトピックの戦略に関しては、本来の MTS システムでは立体構造が折りたたまれずにタンパク質が輸送される一方、mtDNA には非常に疎水性の高いタンパク質がコードされているため、正常な輸送機構が働かない可能性が示唆されている (Owen RI *et al.*, 2000)。

本章では、HLV 投与によって骨格筋ミトコンドリアに遺伝子が送達される可能性を示した。投与法の工夫のみでミトコンドリアへの遺伝子送達が可能であることを示唆しており、遺伝子の種類によらず、また上述のような遺伝子送達機構に依存しない点で、今後のミトコンドリア研究への応用価値が高いと考えられる。

2004 年の Wolff らは、HLV 投与した後の骨格筋の各部位における遺伝子発現は、投与部位に近いほど高い傾向が認められたと報告している (Hgstrom JE *et al.*, 2004)。本研究では、大腿四頭筋、大腿屈筋、下腿筋の 3 つの部位に分けて評価しており、どの部位でもほ

ほぼ一様に遺伝子発現が認められた。しかしながら、投与部位に近い下腿筋において、より安定かつ比較的高い値が得られたことから、彼らの結果とほぼ一致するものであると考えられる。なお、本研究では足の甲に相当する足背静脈より投与しているが、彼らの実験条件では、足背静脈よりも体幹側に位置し、下腿筋にさしかかる大伏在静脈の末梢側から投与している。これらは血管として繋がっているため、メカニズムに大きな差異はないと思われるが、より骨格筋に近い部位から投与したことで、Wolff らの系では部位間に差が認められやすかった可能性が考えられる。

2-1-1～2-1-3 節において、ミトコンドリアへの遺伝子送達の評価系を構築し、HLV 投与によってミトコンドリアに遺伝子を送達可能であることを初めて示した。そこで、本評価系の妥当性について、特に 2-2-2 節の結果から議論する。

投与量を固定し、投与容量について検討した結果から、3 mL の容量で投与した場合に最も高いミトコンドリアへの pDNA 送達量を示し、それ以上の容量で投与した場合には、送達量は減少することが明らかとなった。Hagstrom らは、核で発現するルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を HLV 投与し、投与容量とルシフェラーゼ産生量の関係を調べた際、投与容量に最適値が存在したことを報告している (Hagstrom JE *et al.*, 2004)。一方、投与容量を固定し、投与量について検討した結果から、投与量が約 200 µg を越えたあたりで飽和することが明らかとなった。Wooddell らは、核で発現する LacZ 遺伝子をコードした pDNA を HLV 投与し、LacZ を発現した筋線維の割合を評価しており、pDNA の過量投与は筋線維に毒性をもたらし、遺伝子発現活性の飽和または減少が認められたことを報告している (Wooddell CI *et al.*, 2011)。また、2-2-3 節の結果から、HLV 法によって、遺伝子はオルガネラ非特異的に送達されることが示唆されている。以上のことから、核における遺伝子発現とミトコンドリアへの pDNA 送達量の間と同様の傾向が認められ、最適値が存在することは、妥当な結果であると考えられる。

なお、ミトコンドリアへの送達量が投与量に依存したことは、今後の戦略に役立つ情報である。将来的には遺伝子のサイズを小さくして、投与遺伝子のコピー数を増やすことで、より効果的な遺伝子送達、並びに遺伝子発現が見込めると考えられる。

送達された pDNA がミトコンドリア内部に到達するメカニズムについては、今回の検討のみでは不明である。そこで、いくつかの可能性を考察した。

linear DNA は、植物 (Koulintchenko M *et al.*, 2003)、哺乳類 (Koulintchenko M *et al.*,

2006)、酵母 (Weber-Lotfi F *et al.*, 2009)などの単離ミトコンドリア中に送達されることがこれまでに報告されている。特に植物については、linear DNA の輸送機構が生来備わっていることが知られており (Sato H *et al.*, 2004)、11.6 kbp のカブ mitochondrial pDNA が、配列非依存的にヒト単離ミトコンドリア内部に送達されるという報告も存在する (Ibrahim N *et al.*, 2011)。これらはミトコンドリアへと DNA が能動的に送達される可能性を示す報告であり、本章において、水力学的な力で細胞質内に送達された pDNA が、ミトコンドリア内に送達されるメカニズムの一つである、と考え得る根拠を提示するものである。しかしながら、植物においては、circular pDNA はミトコンドリア内に送達されないことが報告されている (Koulintchenko M *et al.*, 2003)。なお、筆者が本研究で扱っている遺伝子は circular pDNA である。哺乳類ミトコンドリアへの circular pDNA 送達メカニズムについては、同様の信頼に足る検証報告はまだないが、他の可能性を考える必要がある。

もう一つには、水力学的な力によって、ミトコンドリアに一過性の小孔が開く場合が考えられる。ハイドロダイナミクス法のメカニズムには、少なくとも細胞膜には一過的な小孔が開くことが報告されているため (Wolff JA *et al.*, 2005)、ミトコンドリア膜に関しても同様の現象が起きている可能性がある。

更に、細胞内におけるミトコンドリアの融合分裂 (Bereiter-Hahn M *et al.*, 1994; Westermann B, 2010)の過程に起因するメカニズムも考えられる。細胞質内に分散する pDNA が、ミトコンドリアの融合分裂の過程で巻き込まれることでミトコンドリア内部へ入り込む可能性がある。

現在のところ、HLV 法に関しては HTV 法よりも情報が少なく、また、ミトコンドリアへの取り込みのメカニズムは未だ不明である。しかしながら、メカニズムの解明によって、更なる導入効率の上昇を可能とする糸口が見つかる可能性がある。今後、詳細なメカニズムの検証が期待される。

pDNA がミトコンドリア内に送達されたことについては、DNaseI 処理を実施することでミトコンドリア膜外の pDNA を消化し、評価することができた。しかしながら、pDNA がミトコンドリアの膜間腔に留まっている可能性があり、今回得られた pDNA 送達の定量値は、実際にマトリクスへ送達できている遺伝子量よりも多く見積もられている可能性がある。この点について言及するためには、更なる検証が必要である。ミトコンドリアの外膜は、適切な濃度のジギトニンで処理することにより剥離可能であり、本操作によって内膜のみの構造体 (マイトプラスト)を得ることができる。筆者は、このマイトプラストの状態

で DNaseI 処理を行うことで、マトリクスに送達された遺伝子のみを定量出来ると考えている。

凝縮化した遺伝子の投与によって、100~1000 倍程度のミトコンドリアへの送達量の上昇が認められた。この値の上昇には、凝縮化することによるミトコンドリアへの導入量の直接的な上昇のみならず、投与 24 時間後における分解からの保護も影響している可能性が考えられる。当研究室の Ochiai らは、ハイドロダイナミクス法により導入された naked pDNA が、核内において投与直後から 24 時間の間に約 1/10 量まで減少することを報告している (Ochiai H *et al.*, 2010)。臓器、オルガネラの差異はあるが、いずれも遺伝子を保持する環境下であることを考慮して、ミトコンドリア内でも同様の分解が起き得ると仮定する。この場合、分解の保護によって説明されるのは 10 倍程度の値の上昇であり、実際に認められた 100~1000 倍の値の上昇については分解の保護のみでは説明が困難である。従って、凝縮化は pDNA の分解の保護だけでなく、やはり直接的な導入量の上昇にも寄与していると考えられる。なお、本研究で用いた凝縮化ナノ粒子の表面電荷は正の値を有しており、細胞内で最も負に帯電したオルガネラであるミトコンドリアに対し、アクセスが容易であったことも考えられる。この点の詳細については、例えば、表面電荷負が負の凝縮化ナノ粒子を投与した際の送達量を調べることにより、電荷の影響が重要なのか、遺伝子の形態を粒子化すること自体が重要なのか、といった点について考察を深めることができると思われる。

HLV 法は、高容量 (3 mL)、高速度 (10 mL/min) で遺伝子を投与する、非常に過酷な投与方法である。従って、本法による治療用途への可能性を考慮すると、毒性評価は非常に重要な評価項目であると考えられる。これまでに、Wolff らのグループによって、HLV 投与による詳細な毒性検証が報告されている。彼らは、病理学的解析、クレアチンキナーゼ (CPK) 量測定、T₂ 強調 MRI 画像などの結果から、最も毒性が低く、かつ一過的な傷害で済む条件を見出している (Toumi H *et al.*, 2006; Vigen KK *et al.*, 2007)。また、Itaka らは、HLV 投与後の CPK 及び TNF α をタンパク質レベルで測定し、投与 6 日後にはほとんど傷害がないことを報告している (Itaka K *et al.*, 2010)。しかしながら、ミトコンドリア毒性に関する検証は、今まで報告されてこなかった。

2-1-6 節において、ミトコンドリアの活性指標の代表である COX 活性、並びにミトコンドリア膜電位活性を評価した。これらの検証結果から、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。ただし、本評価は回収のタイムポイントに併せて活性評価を行っているため、投与時における傷害については評価していない。投与の瞬間のミトコンドリアへの毒性を評価することは困難であるが、仮に、ミトコンドリアへの pDNA 送達が一過的な膜透過性の亢進に起因していると考えた場合、一時的にはミトコンドリアの膜電位の低下や活性酸素の発生に伴う傷害が生じていると考えられる。しかしながら、少なくとも投与 24 時間後においてミトコンドリア活性に顕著な影響は認められなかった。このことは、一時的に受けたと思われる傷害を、融合分裂等により分散あるいは相補させた結果であると考察できる。

総括

1. 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。
 2. ハイドロダイナミクス投与により、骨格筋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を骨格筋のミトコンドリアへ送達することに初めて成功した (Yasuzaki Y et al, 2013)。
 3. 遺伝子の凝縮化により、ミトコンドリアへの遺伝子送達量を100~1000倍促進することに成功した。
 4. *in vivo* 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。
-

本研究では、母系遺伝性疾患であり、日本においては難治性疾患として指定されているミトコンドリア病に対する治療法の足がかりとなるべく、外来遺伝子を導入し、発現させることを目的に研究を遂行した。第一章においてミトコンドリアで発現し得る外来遺伝子を構築し、第二章ではミトコンドリア病の病態を生じる骨格筋ミトコンドリアへの遺伝子送達を達成し、また、骨格筋において外来遺伝子の発現を得ることにはじめて成功した。

本研究のオリジナリティは、タンパク質発現を得るために、内在性の mtDNA からの転写-翻訳過程を模倣した遺伝子を設計した点にある。このような工夫により、ミトコンドリアに遺伝子を導入して、酵素活性を有する機能性のタンパク質を発現させることにはじめて成功した点は、特筆すべき成果である。また、検証が困難なミトコンドリア転写について、細胞全体と *in vitro* 核転写から簡便にプロモーター活性を評価した点からも、独創的な研究であると言える。更に、ミトコンドリアへの外来遺伝子の送達、送達された遺伝子の転写、そしてタンパク質翻訳、という遺伝子発現の素過程を詳細に検証したことは、前例が非常に少ない先行研究の妥当性を精査する上で、重要な情報を与えたと思われる。

ここで、ミトコンドリアに外来遺伝子を導入して発現させることのメリットについて考察する。筆者は、この意義について大きく分けて 2 つあると考えている。一つ目は、先述のように、ミトコンドリアの遺伝子治療に貢献できることであり、正常な遺伝子を導入することで、将来的には正常なミトコンドリア機能を回復することができると考えられる。その達成のためには、発現活性のより強い遺伝子の構築や、キャリアによる送達などが今

後の課題であると考えられる。二つ目は、ミトコンドリアの分子生物学に貢献できることである。今、世界中の研究者が当たり前のように駆使し、研究に利用している核への遺伝子導入技術は、今日の生命科学研究にとって欠かせないツールとなっており、これらの技術によって生命現象の解明が飛躍的に進んだことは明白な事実である。ミトコンドリアに関しては、これまで、発現する遺伝子や送達法の確立が非常に困難であった。しかし、本研究の発展により、ミトコンドリア遺伝子についても核遺伝子と同様に遺伝子を操作することができると考えられ、任意の疾患モデルの作出や、ミトコンドリア遺伝子に関連する未知の生命現象の原因/結果の解明などが可能になることが期待される。

本研究が、ミトコンドリア遺伝子治療、未知の生命現象の解明に貢献する、小さな一歩であり、大きな意義のある研究成果になることを願い、本稿を終える。

実験試薬・材料

培養

Bacto Trypton 及び Yeast Extract は Becton-Dickinson より購入した。アンピシリンナトリウムは和光純薬より購入した。PBS (-)は日水製薬株式会社より購入した。

電気泳動

Agarose S、One STEP Marker 6 (λ /StyI)は株式会社ニッポンジーンより購入した。EtBr はコスモバイオより購入した。アクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、過硫酸アンモニウム (APS)は和光純薬株式会社より購入した。Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range は BIO-RAD より購入した。

酵素

*Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I *Sma*I は宝酒造株式会社より、DNase free RNaseA は Sigma Aldrich より、Ligation high (T4 DNA ligase)、KOD FX Neo、2× SYBR GREEN PCR Master Mix は東洋紡績株式会社より、RNase-free Recombinant DNaseI (ミトコンドリア膜外 DNA の消化実験に使用)は TaKaRa より、Turbo DNA-free Kit は Ambion より、High Capacity RNA-to-cDNA Kit は Applied Biosystems より、GoTaqGreen Master Mix Kit は Promega よりそれぞれ購入した。

核酸精製

EndFree Plasmid Mega/Giga Kit、Rneasy Mini Kit、RNase-Free DNase Set (mRNA 抽出に使用)は QIAGEN より、RNAlater、TRIzol reagent は Ambion より、NUCLEI PURE PREP NUCLEI ISOLATION KIT、GenElute Plasmid Miniprep Kit は Sigma Aldrich より、グリコーゲン、Ph/Ch/IA (25:24:1, pH5.2)、TE 飽和フェノールは nacalai tesque より、SepaGene は三光純薬株式会社より、骨格筋破碎用ジルコニアビーズチューブ (Precellys CK mix kit tubes 2 mL)は bertin technologies より、肝臓破碎用ジルコニアビーズ (5.0 ϕ) は TOMY より、肝臓破碎用 2 mL スクリューキャップマイクロチューブはザルスタット株式会社より購入した。

遺伝子導入

生理食塩水は大塚製薬株式会社より、D-Glucose は和光純薬株式会社より、サフィードエ

クステンションチューブ、注射針、シリンジはテルモより、マイクロ尖刀、ピンセット、手術用はさみはナツメより購入した。

抗体・ウェスタンブロッティング

Anti-Gapdh [6C5]抗体 (mouse monoclonal、ab8245)、Anti-LaminA+C [131C3]抗体 (mouse monoclonal、ab8984)、Anti-COXIV [20E8C12]抗体 (mouse monoclonal、ab14744) は Abcam より、ECL Anti-mouse IgG HRP linked whole antibody from sheep (NA931V) は GE Healthcare より、ECL Plus Western Blotting Detection System は Amersham より購入した。

in vitro 転写

HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* Transcription System (Nuclear Extract、1× Transcription buffer、50 mM MgCl₂、25× rNTP Mix、Stop Solution、Nuclease-free DDW)は Promega より購入した。

染色試薬

TMRM、MitoTracker Deep Red は invitrogen より、Hoechst33342 は Dojindo より、HBSS は invitrogen より、HBSS phenol red free は和光純薬よりそれぞれ購入した。

レポーターアッセイ試薬

Luciferase Assay System、Nano-Glo Luciferase Assay System は Promega より、BCA Protein Assay Kit は PIERCE より購入した。

オリゴヌクレオチド

Sigma Genosys Japan に下記の配列 (全て 5'→3'として記載)で合成を依頼し、100 μM、脱塩として購入した。

[外来遺伝子]

ND4_{mus}-FLAG の定量的 PCR 検出用 (*リバーズ側はバンド検出用と同じ)

q_mHSP-mND4-FLAG F1	AACCCTCACACACGAGAACT
q_mHSP-mND4-FLAG R1	CGTCGTCATCCTTGTAATCTATTG

luciferase の定量的 PCR 検出用

Ad5-Luc (+)	GGTCCTATGATTATGTCCGGTTATG
Ad5-Luc (-)	ATGTAGCCATCCATCCTTGTC AAT

ND4_{mus}-FLAG のバンド検出用*

b_mHSP-mND4-FLAG F4	TACCAAAAGCCCATGTTGAAGC
q_mHSP-mND4-FLAG R1	CGTCGTCATCCTTGTAATCTATTG

luciferase のバンド検出用

pGL3-1 (+)	TCAAAGAGGCGAACTGTGTG
pGL3-1 (-)	TTCCGTGCTCCTCAAACAAC

[マウス内在性遺伝子]**COI_{mus} の定量的 PCR 検出用**

q-mus_mtCOI F1	GTGCTAGCCGCAGGCATT
q-mus_mtCOI R1	TCCTCCAGCGGGATCAAAG

D-loop_{mus} の定量的 PCR 検出用

q-m_mtDNA F1	CTGCCAATAGAACTTCCAATCCGTATAT
q-m_mtDNA R1	AAGGTTAACGCTCTTAGCTTCATAGTGAAA

Gapdh_{mus} の定量的 PCR 検出用 (ラットにも使用可)

q-mGapdh F2	TTGTGATGGGTGTGAACCAC
q-mGapdh R2	GTTGTCATGGATGACCTTGG

ND4_{mus} バンド検出用

musND4 F1	TCCTCAGACCCCCTATCCAC
musND4 R1	TGGTTCCTCATCGGGTAATAA

ND6_{mus} バンド検出用

musND6 F1	GGTTAGCATTAAGCCTTCACCT
musND6 R1	CATCAACCAATCTCCCAAACCAT

[ラット内在性遺伝子]**D-loop_{rat} の定量的 PCR 検出用**

Rat D1 (+)	GCTTCTTCGCATTCCACTTC
Rat D2 (-)	TCGGAGTTTAATCCTGTGGG

Gapdh_{rat} の定量的 PCR 検出用

Gapdh-AF106860 F	GGCAAGTTCAACGGCACAGT
Gapdh-AF106860 R	ATGGGTTTCCCGTTGATGAC

ND4_{rat} のバンド検出用

Rat ND4-1 (+)	TGAGGCAACCAAACAGAACG
Rat ND4-1 (-)	AAGCCGTGGGCGATTATTAG

プラスミド DNA

pHSP_{mus}-ND4_{mus}FLAG、pCMV-ND4_{mus}FLAG、pND4_{mus}FLAG、pHSP_{mus}-ND4_{mus}FLAG NanoLuc [TGA]¹²[C*GG]⁴⁵、pHSP_{mus}-ND4_{mus}FLAG NanoLuc [TGA]¹²[T*A*G]⁴⁵ は、設計図を基に合成、及び設計した発現カセット部分の pBluescript II SK (-)への導入状態での納品を BIOMATIK 社に依頼した。

実験動物

C57BL/6N マウス (C57BL/6NCrSlc)、Wistar Hannover ラット (Slc:Wistar Hannover/Rcc)は三協ラボサービスより購入した。なお、Slc:Wistar Hannover/Rcc は、2013 年よりハーランラボラトリーズで委託生産された RccHan:WIST として納品されている（系統的には同一）。本研究における動物実験は、北海道大学薬学部動物実験委員会の承認を得て行われた。

その他の試薬は、市販の特級のものをを用いた。

一般試薬調製

本研究で使用した試薬組成および調製法を以下に示す。必要に応じて滅菌操作を行った。オートクレーブによる滅菌 (A.C.) は 121°C、20 min で、またフィルターろ過による滅菌は (F) は DISMIC-25 0.2 μm (ADVANTEC) または Bottle-Top Filter 0.22 μm (IWAKI) を用いて行った。

[細胞溶解液調製用及びオルガネラ単離用試薬]-----

Tissue lysis buffer (A.C.)

Tris 6.06 g、EDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H₂O 372 mg を DDW に溶解し、1 N HCl で pH 7.8 に調整し、500 mL にメスアップした。A.C 後、Triton X-100 μL 加え穏やかに撹拌した。

核単離 buffer (A.C.)

Tris 605.7 mg、NaCl 292.2 mg、MgCl₂ $\cdot$ 6H₂O 304.95 mg を DDW に溶解し、1 N HCl で pH 7.4 に調整し、500 mL にメスアップした。A.C. 後、IGEPAL-CA630 (NP-40) 2.5 g を加え静かに撹拌した。

4 $\times$ MIB (-) (F)

Sucrose 342.3 g、Tris 484.6 mg を DDW に溶解し、6 N HCl で pH 7.4 に調整し、1 L にメスアップした。フィルターろ過後、適宜希釈して使用した。

100 mM EDTA

3.72 g の EDTA $\cdot$ 2Na を DDW に溶解し、100 mL とした。

MIB (-)

4 $\times$ MIB (-) を DDW で 4 倍希釈した。

MIB (+)

250 mL の 4 $\times$ MIB (-)、10 mL の 100 mM EDTA を混合し、DDW で 1 L にメスアップした。

[培養関連試薬]-----

LB 培地 (A.C.)

Bacto Tryptone 25 g、Yeast extract 12.5 g、NaCl 25 g を DDW に溶解し、1N NaOH 2.5 mL を加えて 2.5 L にメスアップし、A.C.した。用途に応じてアンピシリン、カナマイシンを最終濃度 50 µg/mL となるように加えた。

LB 寒天培地

Bacto Tryptone 5.0 g、Yeast extract 2.5 g、NaCl 2.5 g、Agar 7.5 g を DDW に溶解し、1N NaOH 800 µL を添加して 500 mL にメスアップし、A.C.後、室温で 40℃ 強程度になるまでスターラーで攪拌した。用途に応じて、アンピシリン (50 µL/mL)、IPTG (0.1 mM)、X-gal (0.004%) となるようにフィルターろ過した試薬を加えて攪拌した。10 cm プレートに分注 (20 枚程度) して、30 min 程度乾燥させ、使用時まで 4℃ にて保存した。

[核酸精製用試薬]-----

TE (10, 1) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH8.0) 2 mL、0.5 M EDTA 400 µL を DDW に溶解し、1 N HCl で pH8.0 とした後 A.C.した。

TE (10, 0.1) (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH8.0) 2 mL、0.5 M EDTA 40 µL を DDW に溶解し、1 N HCl で pH8.0 とした後 A.C.した。

Sol I (50 mM glucose1, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)

1 M Tris-HCl (pH8.0) 2.5 mL、0.5 M EDTA 2 mL を DDW に溶解し、95 mL にメスアップして A.C.した。A.C.後、1 M glucose 5 mL を加えた。

Sol II (0.2 M NaOH, 1%SDS, fresh)

NaOH 0.4 g、10% SDS 5 mL を DDW に溶解し、50 mL にメスアップした。

Sol III (3M AcOK)

AcOK 29.44 g、AcOH 11.5 mL を DDW に溶解し、100 mL にメスアップした。

10 mg/mL RNase A 溶液

DNase free RNase 100 mg を RNase Buffer (10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl, pH 7.5) 10

mL に溶解した後、500 μ L ずつ分注し、100°C、15 min 処理して-20°Cで保存した。

R-TE (1 mg/mL RNase in TE)

TE (10, 1) 900 μ L に 10 mg/mL RNase A 100 μ L 加えた。

4M NaCl

NaCl 234 mg を DDW 1 mL に溶解した。

[電気泳動関連試薬]-----

10× TAE (A.C.)

Tris 48.44 g, gracial AcOH 11.42 g, EDTA $\cdot$ 2Na $\cdot$ 2H₂O 3.72 g を DDW に溶解した後、1 L にメスアップして A.C.した。AGE に使用する際は、DDW で 10 倍に希釈して用いた。

Loading dye (5×) (F)

Sucrose 20 g, BPB 125 mg, 0.5 M EDTA 100 μ L を DDW に溶解し、50 mL にメスアップしてフィルターろ過した。

30%アクリルアミド (A 液)

アクリルアミド 29.2 g, N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.8 g を DDW に溶解し、200 mL にメスアップした。

B 液

Tris 18.2 g を DDW に溶解し、6 N HCl で pH 8.8 とした後 100 mL にメスアップした。

C 液

Tris 6.1 g を DDW に溶解し、6 N HCl で pH 6.8 とした後 100 mL にメスアップした。

12.5%SDS ポリアクリルアミドゲル

A 液 2.9 mL、B 液 1.75 mL、10% SDS 70 μ L、10% APS 25 μ L を DDW に溶解し 7 mL にメスアップした。TEMED 3.5 μ L を加えた後、ゲル板に注ぎ、静置して固化させ、分離ゲルとした。一方、A 液 0.45 mL、C 液 0.75 mL、10 % SDS 30 μ L、10% APS 15 μ L を DDW に溶解し、3 mL にメスアップした。TEMED 3.5 μ L を加えた後、分離ゲルに重層し、固化させ、濃縮ゲルとした。

2× SDS sample buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 20 mL、SDS 4 g、Glycerol 20 mL、Pyronin Y 0.24 g を DDW に溶解し、88 mL にメスアップした。使用時に 880 μ L に対し、 β -mercaptoethanol 120 μ L を加えた。

SDS PAGE 泳動用 buffer

Tris 3 g、Glycine 14.4 g、SDS 1 g を DDW に溶解し、1 L にメスアップした。

5× Blotting buffer

Tris 18.75 g、Glycine 45 g、SDS 3.125 g を DDW に溶解し、500 mL にメスアップした。使用時に 5 倍希釈し、本溶液 100 mL に対してメタノール 25 mL を加えた。

500 mM Na-Pi buffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 89.54 g を DDW に溶解し、500 mL にメスアップした (500 mM 2Na 溶液)。また、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.60 g を DDW に溶解し、500 mL にメスアップした (500 mM 1Na 溶液)。2Na 溶液に 1Na 溶液を加え、pH 7.4 とした。

Tween solution (TS)

500 mM Na-Pi buffer 40 mL、5 M NaCl 30 mL、50% Tween 20 10 mL を DDW に溶解し、1 L にメスアップした。

4%スキムミルク溶液

スキムミルク 4 g を TS に溶解し、100 mL にメスアップした。

[その他の試薬]-----

PBS (-) (A.C.)

ダルベッコ PBS (-)粉末 4.8 g を DDW に溶解し、500 mL にメスアップして A.C.した。

5% (または 10%)グルコース溶液 (F)

D-Glucose 2.5 g (または 5 g)を DDW に溶解し、50 mL にメスアップしてフィルターろ過した。なお、遺伝子投与時には、遺伝子溶液と等量の 10%グルコース溶液を混合し、5%グルコース溶液で必要量までメスアップした。

10 mM HEPES Buffer (F)

HEPES 238 mg を少量の DDW に溶解後、1 N NaOH にて pH 7.4 に調整し、100 mL にメスアップした後、フィルターろ過滅菌を行った。

実験機器

[培養関連]

恒温振盪培養機 (BR-11UM, TAITEC)

恒温振盪培養機 (BR-11FM, TAITEC)

小型振盪恒温機 (PIC-100S, AS ONE)

恒温振盪機 (シェーカー) (SHAKING INCUBATOR SI-300C, AS ONE)

オートクレーブ (BS-235, TOMY)

オートクレーブ (BS-325, TOMY)

[顕微鏡関連]

共焦点イメージングシステム (A1Rsi, Nikon)

顕微鏡 (TiE, Nikon)

対物レンズ (Plan Apo VC 60× 1.20 PFS WI, Nikon)

レーザー (Diode Laser 405 nm 36 mW, Ar Laser 457/488/514 40 mW, DPSS Laser 561 nm 10 mW, Diode Laser 640 nm 10 mW, Nikon)

ダイクロイックミラー (405/488/561/640, Nikon)

フィルターセット (450/50, 525/50, 595/50, 700/75, Nikon)

[遠心関連]

マイクロ冷却遠心機 (3700, KUBOTA)

冷却遠心機 (EX-125, TOMY)

冷却遠心機 (MX-200, TOMY)

冷却遠心機 (himac CR22E)

小型遠心機 (CHIBITAN-R)

超遠心機 (OPTIMA L-90K Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER)

フロア型超遠心機用ロータ (SW 60 Ti, BECKMAN COULTER)

[測定機器]

Zeta Sizer (Nano-ZS, Malvern)

NanoDrop (ND-2000, Thermo)

蛍光・吸光プレートリーダー (En Spire, Perkin Elmer)

ルミノメーター (Luminescener AB-2200, ATTO)

[PCR 関連]

サーマルサイクラー (C1000 Touch Thermal Cyclers, BIORAD)

サーマルサイクラー (S1000 Thermal Cyclers, BIORAD)

リアルタイム PCR システム (Light Cycler 480, Roche Applied Science)

リアルタイム PCR システム (Mx3000P QPCR System, Agilent Technologies)

リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 7500, Applied Biosystems)

[その他]

バリカン (THRIVE 2000AD, Natsume)

細胞破壊装置 (Precellys, Bertin technologies)

細胞破碎装置 (POLYTRON, KINEMATICA)

ポッター型ホモジェナイザー (DIGITAL HOMOGENIZER, Iuchi)

アガロースゲル電気泳動槽 (Mupid ミニゲル電気泳動槽, アドバンス)

アップライト型超低温槽 (Ultima-II, REVCO)

卓上型冷却トラップ装置 (UT-1000, EYELA)

マルチヒーター (MH-36, WAKAMORI)

卓上型超音波洗浄機 (AU-25C, アイワ医科工業)

ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2, Scientific Industries)

pH メーター (Docu-pH Meter, sartorius)

ユニット恒温槽 (SM-05, TAITEC)

トランスイルミネーター (ImageQuant LAS4000, GE ヘルスケア)

ゲルイメージャー (Gel Doc EZ Imager, BIO RAD)

遺伝子情報処理ソフトウェア (GENETYX ver.11, ゼネティックス)

実験操作・方法

EtOH (エタノール)沈殿

DNA または RNA サンプル溶液に対し、2.5 倍量の EtOH を加え（約 70% EtOH 溶液となる）、混和した。必要に応じて、20 mg/mL グリコーゲン 1 μ L あるいは 1/16 倍量の 4 M NaCl を添加し、-80°C で静置した（収量が十分と思われるときは各操作を省略可）。14000 $\times g$ 、10 min、4°C にて遠心分離後、上清を除去した。更に、塩を洗浄する必要がある場合には、70% 冷 EtOH を 1 mL 添加し、ペレットを洗浄した後、14000 $\times g$ 、10 min、4°C にて遠心分離し、上清を除去した後、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させた。

なお、本稿のプロトコルで行う EtOH 沈殿は、本操作を基本として、少しずつ改変したものを用いている場合がある。

PhOH/CHCl₃ (フェノール/クロロホルム)抽出

粗 DNA 溶液と等量の TE 飽和 PhOH/CHCl₃ (1:1)を加えて、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌した。r.t.、12000 rpm、2 min 遠心分離し、上清を回収した。

Ph/Ch/IA (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール)抽出

粗 RNA 溶液に、等量の Ph/Ch/IA (25:24:1, pH5.2)を添加して 1 min ボルテックスした。14000 $\times g$ 、5 min、r.t.にて遠心後、上清の水層を分取した。

大腸菌への pDNA 導入 (ヒートショック)

合成設計遺伝子を TE で希釈し、0.2 pg (0.1 pg/ μ L を 2 μ L)の遺伝子溶液を DH5 α コンピテントセル 50 μ L に添加し、氷上に 30 min 静置した。42°C で 50 sec インキュベート後、氷上で 2 min 静置した。37°C に温めた SOC 450 μ L を添加し、シェーカーを用いて 37°C、1200 rpm、1 hr で振盪後、100~300 μ L を LB プレート (Amp+)に播種し、37°C で一晩インキュベートした。更に用途に応じて、コロニーをアイソレーションした。導入の確認は、アルカリ溶菌法・制限酵素処理により DNA 断片を得て解析した。目的の E.Coli は抗生物質存在下で適宜小スケール培養し、グリセロールストックを作製した。尚、ストックから更に小スケールで培養し、目的の pDNA が得られることを再度確認した。

アルカリ溶菌法による pDNA の精製

50 μ g/mL のアンピシリンを含む LB 培地 1.8 mL を 2 mL エッペンドルフチューブにとり、白金耳を用いてコロニーあるいはグリセロールストックを植菌して、シェーカーを用

いて 37°C、1200 rpm で一晩振盪培養した。(あるいは、50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地 4 mL をガラス試験管にとり、白金耳を用いてコロニーあるいはグリセロールストックを植菌して、37°C、160 rpm にて一晩振盪培養した。) 4°C、12000 rpm、2 min 遠心分離し、菌体を回収した。Sol I 100 µL を添加し、ボルテックスミキサーを用いて再懸濁した。Sol II 200 µL を加え穏やかに転倒混和した後、4°C に冷却した Sol III 150 µL を加えた。氷上で 2 min 静置した後、4°C、15000 rpm、15 min 遠心分離した。上清を回収し、等量 (450 µL) の TE 飽和 PhOH/CHCl₃ (1:1) を加えて、PhOH/CHCl₃ 抽出を行った。上清の 2.5 倍量の EtOH を加え、室温で 2 min 静置した後、4°C、12000 rpm、20 min 遠心分離した。上清を捨て、沈殿に -20°C に冷却した 70%EtOH 1 mL を加えた。4°C、12000 rpm、2 min 遠心分離した後、上清を捨て、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させた。滅菌 DDW 20 µL に溶解させるか、必要に応じて以下の RNase A 処理を行った。

RNaseA 処理

アルカリ溶菌法により精製した pDNA を、R-TE 100 µL に溶解させ、37°C、30 min インキュベートした。4 M NaCl 40 µL、20 mg/mL グリコーゲン 1 µL を加えた後、-80°C で 10 min 静置した。4°C、12000 rpm、2 min 遠心分離した後、上清を捨て、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させ、滅菌 DDW 20 µL に溶解させた。

pDNA の大量調製

各種 pDNA を用いて形質転換した E.coli DH5α 株を、50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地 4 mL に、白金耳を用いて植菌し、37°C で 8 hr 振盪培養した。この培養液を 50 µg/mL のアンピシリンを含む LB 培地 2.5 L (続く操作で Mega Kit の場合は 1 L) に移し、37°C で 16 hr 振盪培養した。4°C、6000×g、15 min 遠心分離し、菌体を回収した後、Endfree Plasmid Giga (または Mega) Kit を用い、キットのプロトコルに従って精製した。プラスミド DNA 溶液の吸光度測定により濃度を算出し、また適当な制限酵素で処理後、アガロース電気泳動により、分子量及び純度の確認を行った。本方法により調整した oDNA はマウス・ラットへの遺伝子導入に用いた。

アガロースゲル電気泳動

1%アガロースゲル (1x TAE で希釈) を調製し、高温で溶解させた後、オスグッド式ゲル作製機を用いてゲルを作製した。DNA サンプル (100~500 ng が目安) と適量の Loading Solution を混合し、ゲルにアプライした。泳動緩衝液として TAE を用い、100V、30 min

電気泳動を行った。泳動後のゲルは、1 $\mu\text{g/mL}$ EtBr 100 mL 中に 20 min 浸漬させることで EtBr 染色を行った後、ゲルイメージャーにて目的のバンドを検出した。

RNA 抽出 (第 1 章 図 1-4、マウス肝臓全体における転写検出)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 及び RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いた。肝臓を摘出して細かく切り、200 μL 体積以下のサンプルを、1 mL の RNeasy lysis buffer 中に回収して使用時まで 4°C で保存した。10~20 mg をジルコニアビーズチューブにとり、600 μL の Buffer RLT を添加し、4°C、3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した。ホモジェネート溶液を 4°C、15000 rpm、3 min で遠心分離した。上清を 350 μL 回収し、同量の 70% EtOH を添加してピペッティングにより混和した後、2 mL コレクションチューブにセットした RNeasy スピニングカラムに全量の混和サンプルをアプライし、8000 $\times g$ 、15 sec で遠心分離した。(単離ミトコンドリアサンプルの場合は 100 μL の Buffer RLT を添加してピペッティングで良く懸濁した後、更に 100 μL の Buffer RLT を添加し、15000 rpm、3 min で遠心分離した。以下、上清回収からは同じ操作。) RNeasy スピニングカラムに 350 μL Buffer RW1 を添加し、再度 8000 $\times g$ 、15 sec 遠心分離して洗浄後、Buffer RDD で 8 倍希釈した DNaseI 溶液を 80 μL スピニングカラム上で添加し、30°C、45 min でインキュベートした。スピニングカラムに 350 μL Buffer RW1 を添加し、8000 $\times g$ 、15 sec で洗浄後、500 μL の Buffer RPE を添加し、8000 $\times g$ 、15 sec で洗浄した。最後に、スピニングカラムに 500 μL の Buffer RPE を添加し、8000 $\times g$ 、2 min で洗浄後、新しい 2 mL コレクションチューブにセットし、15000 rpm、1 min で遠心して、フロースルーを完全除去した。RNeasy スピニングカラムを新しい 1.5 mL コレクションチューブにセットし、RNase free 水 30 μL 添加して、8000 $\times g$ 、1 min 遠心し、RNA を溶出した。

マウス肝臓からのミトコンドリアおよび核の同時単離 (第 1 章 図 1-3)

肝臓を摘出して細断した後、ジルコニアビーズチューブに 250 mg とり、1.3 mL MIB (+) を添加した。3000 rpm、10 sec で 3 回調製したホモジェネート溶液を 500、500、10 μL に分け、それぞれ、ミトコンドリア分画用、核分画用、全体用の核酸抽出サンプルとし、余ったサンプルは、タンパク定量用とした。

ミトコンドリア単離サンプルについて、更に MIB (+) を 500 μL 添加し、800 $\times g$ 、5 min、4°C にて遠心し、2 mL エッペンに上清 500 μL 分取した。この操作を 2 回繰り返した。その後、MIB (+) を 500 μL 添加し、7500 $\times g$ 、10 min、4°C にて遠心し、上清をピペットで除去した。次に、1 mL の MIB (-) を添加してゆるやかにピペッティング後、10000 $\times g$ 、10 min、4°C にて遠心し、上清をピペットで除去して DNA 抽出サンプルとした。

核単離サンプルについて、MIB (+)を 500 μ L 添加し、800 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、デカントで上清除去した。ペレットに PBS (-)を 1 mL 添加し、2000 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心し、上清除去した。核単離バッファーを 500 μ L 添加してピペッティング後、1400 $\times g$ 、5 min、r.t.にて遠心し、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返して、核単離サンプルとした。

ラット骨格筋からのミトコンドリア単離

ラットを頸椎脱臼により処置し、下腿筋を摘出した。氷上で臓器を細かく切り、均一に混ぜた。ジルコニアビーズチューブに約 250 mg 入れ、1 mL MIB (+)を添加した。Precellys 細胞破碎装置を用いて、4 $^{\circ}$ C、3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した後、800 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心分離し、上清 500 μ L をエッペンドルフチューブに分取した。分取した上清に MIB (+)を 500 μ L 添加し、再び 800 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心分離し、上清 500 μ L をエッペンドルフチューブに分取し、筋組織片を除去した。更に MIB (+)を 500 μ L 添加し、7500 $\times g$ 、10 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心した。上清をピペットで除去し、1 mL の MIB (-)を添加してピペッティングでゆっくりしっかり懸濁した。これを 10000 $\times g$ 、10 min、4 $^{\circ}$ Cにて遠心した後、上清をピペットで除去し、DNA 抽出サンプルとした。なお、引き続く DNA 抽出は当日中に行った。

ウェスタンブロッティング

組織ホモジェネート溶液をエッペンドルフチューブに適当量 (50 μ L 容積以下)用意し、PBS (-) 400 μ L、5 $\times$ Lysis Buffer 100 μ L 入れ、-80 $^{\circ}$ Cで 15 min 置いた。更にペッスルでホモジェナイズ、あるいはジルコニアビーズチューブ中に移して Precellys 細胞破碎装置を用いて、4 $^{\circ}$ C、3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した後で破碎した後、氷上にて 10 min インキュベートし、4 $^{\circ}$ C、1000 $\times g$ 、3 min で遠心分離した上清を 400 μ L 回収し、適当に希釈 (骨格筋の場合は 25 倍希釈)して、BCA 法にてタンパク定量を行った。ここからは核・ミトコンドリア単離サンプルも同様に処理した。

タンパク定量後、各サンプルを 2 mg protein/mL に PBS (-)で希釈して 20 μ L とり、2 $\times$ sample buffer を等量混合して、98 $^{\circ}$ C、5 min で熱変性させた。室温、12000 rpm、2 min で遠心分離した後、上清 5 μ L (マーカーは 2.5 μ L)を 12.5%SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、SDS PAGE 泳動用緩衝液中で泳動して分離した。分離タンパク質を Blotting buffer 中、100 mA の低電流で 60 min 通電し、PVDF 膜に転写した。転写後の膜を 4%スキムミルク中で、r.t.、30 min 振盪した後、各種一次抗体を希釈した 4%スキムミルク中に

移し、r.t.にて適当な時間振盪した（抗 COXIV 抗体…1:1000 (3.5 hr)、抗 LaminA+C 抗体…1:100 (12 hr)、抗 Gapdh 抗体…1:10000 (1 hr)）。TS で 5 min、3 回洗浄後、HRP 標識抗マウス IgG 抗体を 4%スキムミルクに希釈して (1:1000)、r.t.、1 hr 振盪した。TS で 5 min 毎に 5 回洗浄後、ECL Plus 検出システムおよび増感させ、LAS4000 により化学発光検出を行った。

ミトコンドリアまたは核からの DNA 抽出

SepaGene キットを用いた。ミトコンドリアまたは核を単離して得た DNA 抽出用のペレットに試薬 I を 100 μ L 加え、ピペッティングで均一に懸濁させた。r.t.、5 min でインキュベートした後、試薬 II を 100 μ L 添加し、ピペッティングで緩やかに混和した。試薬 III を 700 μ L と試薬 IV を 400 μ L を添加し、マイクロチューブの蓋を閉め、乳濁化するまで約 10 sec 転倒混和した。15000 rpm、15 min、4°C で遠心後、核酸を含む上層（水層）を 500 μ L とり、別のチューブに移した。水層の 1/10 量に相当する試薬 V (50 μ L)を加え、更に水層と試薬 V の合計量 (550 μ L)と等量のイソプロピルアルコールを加え、軽く転倒混和した。必要に応じて、共沈剤として 20 mg/mL グリコーゲンストックを 1 μ L 入れ、15000 rpm、10 min、4°C で遠心し、ピペットで上清を静かに除去し、70%EtOH を 1 mL 添加して、軽く転倒混和した。15000 rpm、15 min、4°C で遠心後、ピペットで上清を静かに除去し、核酸ペレットを軽く乾燥させた。20 μ L の DDW に溶解し、Nano Drop で核酸定量して PCR 用サンプルとした。

ラット mtDNA の抽出（第二章に用いた定量的 PCR 法の基準溶液調製法）

ラットを頸椎脱臼により処置し、頸動脈を切断して、切断部を流水に当てながら心臓マッサージして十分に脱血させた。開腹して肝臓を摘出し、肝臓に脂肪が付着していた場合は切除した。以降の操作は全て氷上で行った。肝臓をビーカーに入れ、並行に持ったハサミ 2 本で細かく切り、50 mL ポッター型ホモジェナイザーに試料を移し、550 rpm でペッスルを 3 回上下させてホモジェネートした。ホモジェネートした試料液はメスシリンダーに入れて 10%w/v にメスアップした。冷却した遠心管に移し、800 $\times g$ 、5 min、4°C (accel-deccel/9,3)にて遠心分離した後、上清だけ分取した。この操作を 2 回繰り返した。続いて、上清を冷却した遠心管に移し、7500 $\times g$ 、10 min、4°C（以降、accel-deccel/9,9)にて遠心分離した。上清をデカントで捨て、壁に付着した脂肪分をキムワイプで拭き取り、ペッスルで赤色・白色の沈殿物を除去し、5 mL の MIB (+)を添加し、ペッスルでかきとって懸濁した。30 mL ポッター型ホモジェナイザーに入れて 2-3 回ホモジェネートした後、冷

却した遠心管に移し、 $7500\times g$ 、10 min、 4°C にて遠心分離した。遠心後、遠心管を軽く振り、Light mitochondria をデカントで捨て、更にペッスルで赤色・白色の沈殿物を除去した。5 mL の MIB (-) を添加し、ペッスルでかきとって懸濁し、別の 30 mL ポッター型ホモジェナイザーに入れて同様の操作を行った。Light mitochondria や不要な沈殿物を除去した後、5 mL の MIB (-) を添加し、ペッスルでかきとって懸濁した。30 mL ポッター型ホモジェナイザーに入れて懸濁した後、1 mL 分をとって 2 mL エッペンドルフチューブに移し、 $7500\times g$ 、10 min、 4°C にて遠心分離した。

上清を除去した後、200 μL の Sol I に懸濁し、氷上に置いた。400 μL の Sol II をサンプルにゆっくり加え、5 回程度転倒混和して、氷上で 5 min 静置した。氷上に置いた Sol III を 300 μL 加え、エッペンドルフチューブを逆さまにして穏やかに 10 sec ボルテックスし、 -80°C で 2 min 静置した後、 $10000\times g$ 、10 min、 4°C で遠心分離し、残渣を落とした。上清を新しい 1.5 mL エッペンに 750 μL とり、450 μL のイソプロパノールを添加し、 -80°C で 5 min 静置した後、 $10000\times g$ 、10 min、 4°C で遠心分離した。上清を除去し、70%冷 EtOH を静かに 1 mL 加え、エッペンドルフチューブを逆さまにして穏やかに 10 sec ボルテックスし、 $10000\times g$ 、10 min、 4°C で遠心分離した。上清を除去し、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させた後、R-TE-1 を 300 μL 加え、 37°C 、30 min インキュベートした。TE 飽和フェノールを 600 μL 加え、1 min ボルテックスし、 $10000\times g$ 、10 min、r.t.で遠心分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移した (270 μL 程度)。再度 TE 飽和フェノールを 600 μL 加え、1 min ボルテックスし、 $10000\times g$ 、10 min、r.t.で遠心分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移した (230 μL 程度)。diethyl ether を 600 μL 加え、1 min ボルテックスした。 $10000\times g$ 、10 min、r.t.で遠心分離し、下層を別のエッペンドルフチューブに移した (200 μL 程度)。EtOH 沈殿操作後、上清を除去し、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させ、100 μL の TE-2 を加え、DNA を溶解させた。NanoDrop にて濃度・純度の測定を行った。

※一連の操作は、当日中に行う必要がある。ミトコンドリアペレットを一度凍結させたサンプルからの mtDNA 抽出は非常に困難であり、好ましくない。

※第 1 章では別途合成した COI を含む pDNA (濃度既知) をスタンダードとして用いた。

ラット・マウス nDNA の抽出 (第一章、第二章に用いた定量的 PCR 法の基準溶液調製法)

核の単離には、NUCLEI PURE PREP NUCLEI ISOLATION KIT (Sigma) を用いた。ラットの場合は、頸椎脱臼により処置し、頸動脈を切断して、切断部を流水に当てながら心臓マッサージして十分に脱血させた。開腹して肝臓を摘出し、肝臓に脂肪が付着していた

場合は切除した。マウスの場合は、頸椎脱臼により処置し、開腹後、下大静脈を切断してキムワイプを当て、心臓マッサージして十分に脱血させ、肝臓を摘出した。氷上で細かく切った後、約 200 mg のサンプルをジルコニアビーズチューブ中にとり、Lysis Buffer を 500 μ L 添加し、Precellys にて 3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した。100 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心分離し、上清 400 μ L をとり、ここに 720 μ L の Cushion Buffer を添加した。BECKMAN tube に Cushion Buffer を 2 mL 入れ、サンプルを静かに重層した後、超遠心機を用いて 30000 $\times g$ 、45 min、4 $^{\circ}$ C で遠心分離した後、上清を 1 層目から順に除去してペレットを得た。軽くボルテックスした後、Storage Buffer 100 μ L を添加し、再びボルテックスにて懸濁し、更に Storage Buffer 400 μ L を添加して混合し、500 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}$ C にて遠心した。上清を除去し、20 μ L の Storage Buffer に懸濁して DNA 抽出サンプルとした。4 $^{\circ}$ C 保存し、24 hr 以内に DNA 抽出を行った。

核からの DNA 抽出には、GenElute 核酸抽出キットを用いた。単離核 DNA 抽出サンプルに Resuspension solution 200 μ L を加え、5 回ピペッティングで均一に懸濁させ、RNase Solution 20 μ L を添加し、低速でボルテックスした。37 $^{\circ}$ C、10 min インキュベーションの後、20 mg/ mL Proteinase K を添加し、Lysis Solution 200 μ L を添加し、低速でボルテックスした後、70 $^{\circ}$ C、30 min インキュベーションした。この間、Column Preparation Solution 500 μ L をカラムに添加し、12000 rpm、1 min、r.t にて遠心分離した。サンプルを r.t. まで冷却後、ice cold 100% EtOH を 200 μ L 添加してボルテックスし、全量をカラムに添加し、6500 $\times g$ 、r.t.、1 min にて遠心分離した。Wash Solution を 500 μ L 添加し、6500 $\times g$ 、r.t.、1 min にて遠心分離し、更に Wash Solution を 500 μ L 添加し、15000 $\times g$ 、r.t.、3 min にて遠心分離してフロースルーを完全に除去した。エッペンドルフチューブにカラムを移し替え、Elution Buffer 20 μ L を添加し、r.t.、5 min インキュベーション後、6500 $\times g$ 、r.t.、1 min にて遠心する操作を 2 回繰り返し、DNA をカラムより抽出した。Nano Drop で純度、濃度を定量した。

***in vitro* transcription**

HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* Transcription System (Promega)を用いた。Nuclear Extract を氷上で溶解し、下記組成でエッペンドルフチューブ中に混合した。

Nuclear Extract	X μ L (8 Unit 活性を与える容積)
1 $\times$ Transcription buffer	11-X μ L
50mM MgCl ₂	1.5 μ L
25 $\times$ rNTP Mix	1 μ L
10 ng template pDNA	Y μ L
10 ng control template pDNA	Z μ L
<u>Nuclease-free DDW</u>	<u>11.5- (Y+Z) μL</u>
Total volume	25 μ L/tube

30℃、60 min で転写反応後、25℃、60 min でブレインキュベートした Stop Solution を 175 μ L 添加した。Ph/Ch/IA 抽出後、2.5 倍量のエタノールを添加してボルテックスした後、-80℃にて 15 min～O/N インキュベートした。14000 $\times g$ 、10 min、4℃にて遠心分離後、上清を除去し、ペレットを乾燥させ、DDW を 26.5 μ L 添加して溶解し、粗 RNA サンプルとした (-20℃保存可)。

DNase 処理 I (粗 RNA 抽出後、RT 反応前)

Turbo DNA-free Kit (Ambion)を用いた。下記組成でエッペンドルフチューブ中に混合した。

粗 RNA	26.5 μ L
10 $\times$ DNase buffer	3 μ L
<u>Turbo DNase</u>	<u>0.5 μL</u>
Total volume	30 μ L

37℃、30 min でインキュベート後、Inactivation buffer を 3 μ L 添加し、r.t.、1～2 min おきに 3 回ボルテックスした。4℃、15000 rpm、5 min で遠心分離した後、上清を 20 μ L 回収し DDW を 280 μ L 添加した。Ph/Ch/IA 抽出で上清を 200 μ L 分取した後、500 μ L のエタノール、及び 20 mg/mL グリコーゲン を 1 μ L を添加してボルテックスし、-80℃にて 15 min-O/N インキュベートした (EtOH 沈殿)。4℃、15000 rpm、5 min で遠心分離した後、上清除去し、風乾、または、減圧遠心濃縮器を用いて乾燥させた。DDW を 12 μ L 添加し、RNA を溶解させた後、NanoDrop にて濃度・純度の測定を行った。

逆転写 (RT)反応

High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ABI)を用いた。下記組成でエッペンドルフチューブ中に混合した。

Template RNA (1 µg)	4.5 µL
2× RT buffer	5.0 µL
20× RT Enzyme Mix	0.5 µL
Total	10.0 µL/tube

RT buffer 添加後にタッピング・スピンドウンし、65°C/5 min → 4°Cキープしたまま、RT Enzyme Mix を添加し、ピペッティングした。25°C/5 min → 42°C/60 min → 95°C/5 min → 4°Cとして cDNA を調製し、10 倍希釈して使用時まで-20°Cで保存した。

PCR 法 (バンド検出用)

GoTaqGreen Master Mix Kit (Promega)を用いた。下記組成でエッペンドルフチューブ中に混合し、マスターミックスを調製した。

Template DNA	1.0 µL (RT 後サンプルを 10 倍希釈したもの)
10 µM Forward primer	1.25 µL
10 µM Reverse primer	1.25 µL
2× Master Mix	6.25 µL
DDW	2.75 µL
Total	12.5 µL/tube

95°C/2 min → [95°C/30 sec → 60 or 65°C/30 sec → 72°C/45 sec]x(25 or 26 cycle) → 72°C/5 min で増幅を行った。増幅後のサンプル 5 µL を 1 or 1.5%アガロースゲルにアプライし、電気泳動を行った。

※ND4F: 25 cycle, annealing 60°C

※ND6: 26 cycle, annealing 65°C

定量的 PCR 法

各遺伝子の基準溶液を用意し、絶対定量を行った。各増幅領域を持つ基準遺伝子溶液濃度 1 ng/μL を基準として、4 倍希釈系列で 5 つのサンプルを用意した（測定する遺伝子の多少により適宜変更可能）。調製した基準溶液、および適当に希釈した測定サンプル溶液をプレートとし、Realtime PCR 反応には SYBR GREEN PCR Master Mix (TOYOBO) を用いて、下記組成で 96 well または 384 well プレート中に混合した。

[96well の場合] Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies) で定量

Template DNA	5.0 μL
10 μM Forward primer	0.5 μL
10 μM Reverse primer	0.5 μL
2× Master Mix	12.5 μL
DDW	6.5 μL
Total	25.0 μL/tube

[384well の場合] Light cycler480 (Roche) で定量。

Template DNA	2.0 μL
10 μM Forward primer	0.1 μL
10 μM Reverse primer	0.1 μL
2× Master Mix	2.5 μL
DDW	0.3 μL
Total	5.0 μL/tube

95°C/10 min → [95°C/15 sec → 60°C/1 min] x40 cycle で増幅・測定を行った。

※テンプレートに関して: RT 反応からのサンプル、または mtDNA や nDNA などの内因性遺伝子を増幅する場合は、抽出溶液の 10 倍希釈、pDNA 測定サンプルは抽出原液を測定に用いると、ちょうど良い場合が多い。

DNase 処理 II (第 2 章 図 2-4、ミトコンドリア膜外の pDNA 消化)

RNase-free Recombinant DNaseI (TaKaRa) を用いた。「ラット骨格筋からのミトコンドリア単離」プロトコルに従い、pDNA 投与後の下腿筋から、DNA 抽出用ミトコンドリアペ

レットを得た。38 μ L の MIB (-)に懸濁した後、下記組成でエッペンドルフチューブ中に混合した。

ミトコンドリア懸濁液	38 μ L
10 $\times$ DNaseI buffer	5 μ L
DNaseI	4 μ L (未処理の場合は DDW に置換)
<u>DDW</u>	<u>1 μL</u>
Total	48 μ L/tube

37 $^{\circ}$ C、30 min インキュベートにて DNA を消化した後、0.5 M EDTA を 2 μ L 添加することで、DNaseI 活性を阻害し、更に 80 $^{\circ}$ C、2 min 処理にて DNaseI を失活させた。

引き続き、本サンプルに SepaGene キット試薬 I を 50 μ L 添加して 100 μ L の懸濁液とし、「ミトコンドリアまたは核からの DNA 抽出」の操作に従って DNA を抽出した。

ラット HTV 投与

エーテル麻酔、およびペントバルビタール麻酔をかけたラットを用い、下肢をバリカンで剃毛した。0.20 μ m のフィルターでろ過した生理食塩水または 5%Glucose 溶液で遺伝子を適当量に希釈した。5 mL シリンジにエクステンションチューブを接続して遺伝子溶液を注入し、27G 針を接続して、シリンジの目盛りで 3 mL に合わせた (第 2 章 図 2-3 では最適投与容量を検証)。ゴム紐で脚部上部を駆血し、足甲部の毛をマイクロ尖刀で軽く削いだ後、足背静脈がよく見える状態を保ち、27G 針を血管内に慎重に挿入した。軽くシリンジを押し、皮下に漏れがないことを確認した後、20 sec で遺伝子溶液を投与した。投与直後は針およびシリンジを固定し、2 min 後に抜針および駆血帯をはずした。

※血管に針を入れて投与中に固定する者と、シリンジの投与者の 2 人で実施することが好ましい。

マウス HLV 投与

遺伝子のストック溶液 (DDW に溶解)と等量の 10%Glucose 溶液を混合し、5%Glucose 溶液で適当量までメスアップした。5 mL シリンジに遺伝子溶液を注入し、シリンジの目盛りで 2 mL に合わせた。27G の針を用いて C57BL/6N マウス (6 wks、♀)の尾静脈内へ 5 sec で投与した。

Luciferase assay

マウスを頸椎脱臼により処置し、開腹して肝臓を摘出した。氷上で臓器を細かく切り、均一に混ぜた。約 200 mg をジルコニアビーズチューブにとり、Lysis buffer を 1 mL 添加し、Precellys 細胞破碎装置を用いて 4°C、3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した。本サンプルを 15000×*g*、10 min、4°C で遠心分離して上清 200 μL をエッペンに取り、測定サンプルとした。Luciferase assay reagent を 20 μL ずつアシストチューブに入れ、サンプルを 50 μL ずつ添加し、Luminescencer AB-2200 (ATTO)にて、Analysis Time: 15 sec、Integral Time: Start 6 sec End 15 sec で測定した。更に、残りのサンプルを BCA protein assay reagent を用いてプロトコルに従い、タンパク質を定量し、Luciferase 活性の補正を行った。

なお、Luciferase assay reagent は、プロトコルに従い調製した溶液 (約 10 mL) を 155 μL ずつ分注して-80°C で保存したものを、使用時に溶解して assay に用いた。凍結・融解をなるべく避けるため、小分けでストックしたものについては、使い切ることとした。

NanoLuc assay

マウスを頸椎脱臼により処置し、開腹して肝臓を摘出した。氷上で臓器を細かく切り、均一に混ぜた。約 200 mg をジルコニアビーズチューブにとり、Lysis buffer を 1 mL 添加し、4°C、3000 rpm、10 sec で 3 回破碎した (各回の間は 10 sec のインターバルを置き、破碎による熱の産生に伴う活性低下を回避した)。本サンプルを 15000×*g*、10 min、4°C で遠心分離して上清 400 μL をエッペンに取り、測定サンプルとした。NanoLuc assay reagent を 100 μL ずつアシストチューブに入れ、サンプルを 100 μL ずつ添加し、Luminescencer AB-2200 (ATTO)にて、Analysis Time: 15 sec、Integral Time: Start 6 sec End 15 sec で測定した。更に、残りのサンプルを BCA protein assay reagent を用いてプロトコルに従い、タンパク質を定量し、NanoLuc 活性の補正を行った。

なお、NanoLuc assay reagent は、プロトコルに従い調製した溶液を 10 mL ずつ分注して-80°C で保存した。必要に応じて更に解凍し、200 μL ずつ分注して-80°C で保存したものを、使用時に溶解して assay に用いた。

BCA 法によるタンパク質定量

BCA Standard 及び希釈サンプルをそれぞれ 25 μL とり、BCA 試薬 (A:B=50:1 で混和したもの) を 200 μL 加えた。37°C、30 min でインキュベート後、562 nm における吸光度を測定した。なお、骨格筋サンプルは 50 倍希釈、肝抽出ミトコンドリアサンプルは 100 倍希釈、筋抽出ミトコンドリアサンプルは 10 倍希釈を目安とし、いずれも終濃度 1% の SDS を

含む測定サンプルを調製した。

TMRM/MitoTracker Deep Red 染色

HLV 投与 24 hr 後の骨格筋サンプルを HBSS 中に回収した。Hoechst33342 (40 μ M)、TMRM (1 μ M)、MitoTracker Deep Red (500 nM)として HBSS (phenol red free)中に希釈して染色液カクテルを調製し、サンプルを浸漬して、r.t.、30 min インキュベーションした。FCCP 処理サンプル (ネガコン)の場合は、インキュベーション終了 10 min 前に FCCP を添加し、100 nM FCCP を含む溶液とした。染色操作後、HBSS (phenol red free)で洗浄し、CLSM にて観察した。

観察条件は、実験機器の項を参照。

COX 活性染色および活性評価方法

回収した骨格筋をイソペンタン中で凍結させ、10 μ m の薄切切片を作製した。染色操作は、札幌総合病理研究所に依頼した。

核投与サンプルについては 3~4 切片を作製し、1 切片については切片サンプルの大きさに応じて 2~4 か所の視野を油性ペンでランダムにドットを打ち、そのドットが視野の左上端に入るように観察して画像を取得した。観察には、対物 10 $\times$ 、接眼 4 $\times$ のレンズを用いた。濃染された骨格筋を COX (+)とし、画像空の全ての筋線維に対する COX (+)筋線維の割合を、活性の指標 (%)として算出した。1 切片の平均を例数 1 とし、統計処理を行った。

FISH による pDNA 検出とミトコンドリア免疫染色

回収した骨格筋サンプルを 4%PFA に浸漬して固定した。その後、札幌総合病理研究所にパラフィン包埋および 10 μ m の薄切切片作製を依頼し、FISH および免疫染色による検出をクロモソームサイエンスラボに依頼した。pDNA を検出する FISH プローブは Cy3-conjugate として標識され、ミトコンドリアは 1 次抗体 COXIV、2 次抗体 Alexa594-conjugate を用いて標識された。サンプルを CLSM にて観察した。

観察条件は、実験機器の項を参照。

参考文献

[非学術情報]-----

- ref.1 公益財団法人 難病医学研究財団/難病情報センターHP
<http://www.nanbyou.or.jp/entry/194>
- ref.2 大日本住友製薬株式会社 HP
<http://www.ds-pharma.co.jp/news/2013/20130329.html>
- ref.3 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センターHP
http://www.ncnp.go.jp/press/press_release130809.html
- ref.4 アステラス製薬株式会社 HP
<http://www.astellas.com/jp/corporate/news/detail/post-195.html>
- ref.5 東北大学大学院医学系研究科付属動物実験施設 HP への転載内容より
http://www.ilas.med.tohoku.ac.jp/committee/rule_hiken.html

[学術文献]-----

Anderson, S. A., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F., & Young, I. G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of molecular biology*, 156(4), 683-717.

Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M., Peralta, S., & Moraes, C. T. (2013). Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nature medicine*, 19(9), 1111-1113.

Barth, C., Greferath, U., Kotsifas, M., & Fisher, P. R. (1999). Polycistronic transcription and editing of the mitochondrial small subunit (SSU) ribosomal RNA in *Dictyostelium discoideum*. *Current genetics*, 36(1-2), 55-61.

Bates, M. G., Bourke, J. P., Giordano, C., d'Amati, G., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2012). Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. *European heart journal*, 33(24), 3023-3033.

Bereiter - Hahn, J., & Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique*, 27(3), 198-219.

Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W., & Clayton, D. A. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26(2),

167-180.

Bogenhagen, D., & Clayton, D. A. (1974). The Number of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Genomes in Mouse L and Human HeLa Cells QUANTITATIVE ISOLATION OF MITOCHONDRIAL DEOXYRIBONUCLEIC ACID. *Journal of Biological Chemistry*, 249(24), 7991-7995.

Bosemani, T., Anghelescu, C., Boltshauser, E., Hoon Jr, A. H., Pearl, P. L., Craiu, D., Johnston, M. V., Huisman, T. A. G. M., & Poretti, A. (2013). Subthalamic nucleus involvement in children: A neuroimaging pattern-recognition approach. *European Journal of Paediatric Neurology*.

Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.

Chang, D. D., & Clayton, D. A. (1984). Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell*, 36(3), 635-643.

Chen, Z. Y., He, C. Y., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Molecular therapy*, 8(3), 495-500.

Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2010). Preferential selection of the 5'-terminal start codon on leaderless mRNAs by mammalian mitochondrial ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28379-28386.

Csiszar, A., Labinskyy, N., Pinto, J. T., Ballabh, P., Zhang, H., Losonczy, G., Pearson, K., de Cabo, R., Pacher, P., Zhang, C., & Ungvari, Z. (2009). Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), H13-H20.

Curto, N., Tremolizzo, L., Mattavelli, L., Piatti, M. L., Marzorati, L., Guerra, L., Grassi, M. G., & Ferrarese, C. (2006). A case of Melas (A3243G) on chronic dichloroacetate treatment. *European neurology*, 55(1), 37-38.

Davis, A. F., & Clayton, D. A. (1996). In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 883-893.

D'Souza, G. G., Rammohan, R., Cheng, S. M., Torchilin, V. P., & Weissig, V. (2003). DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells.

Journal of controlled release, 92(1), 189-197.

D'Souza, G. G., & Weissig, V. (2004). Approaches to mitochondrial gene therapy. *Current gene therapy*, 4(3), 317-328.

D'Souza, G. G., Boddapati, S. V., & Weissig, V. (2005). Mitochondrial leader sequence-plasmid DNA conjugates delivered into mammalian cells by DQAsomes co-localize with mitochondria. *Mitochondrion*, 5(5), 352-358.

Ellouze, S., Augustin, S., Bouaita, A., Bonnet, C., Simonutti, M., Forster, V., Picaud, S., Sahel, J. A., & Corral-Debrinski, M. (2008). Optimized Allotopic Expression of the Human Mitochondrial *ND4* Prevents Blindness in a Rat Model of Mitochondrial Dysfunction. *The American Journal of Human Genetics*, 83(3), 373-387.

Endo, T., Yamano, K., & Yoshihisa, T. (2010). Mitochondrial Matrix Reloaded with RNA. *Cell*, 142(3), 362-363.

Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature genetics*, 31(3), 289-294.

Figuerola-Martínez, F., Vázquez-Acevedo, M., Cortés-Hernández, P., García-Trejo, J. J., Davidson, E., King, M. P., & González-Halphen, D. (2011). What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric *Cox3* and *Atp6* genes. *Mitochondrion*, 11(1), 147-154.

Fisher, R. P., & Clayton, D. A. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy-and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 260(20), 11330-11338.

Fulda, S., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 9(6), 447-464.

Gagliardi, D., Stepien, P. P., Temperley, R. J., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2004). Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends in Genetics*, 20(6), 260-267.

Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S. M., & Cox, E. C. (2005). Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell*, 123(6), 1025-1036.

Goto, Y. I., Nonaka, I., & Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA^{Leu} (UUR)

gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies.

Guess, M. G., Barthel, K. K., Pugach, E. K., & Leinwand, L. A. (2013). Measuring microRNA reporter activity in skeletal muscle using hydrodynamic limb vein injection of plasmid DNA combined with in vivo imaging. *Skeletal muscle*, *3*(1), 1-9.

Hagstrom, J. E., Hegge, J., Zhang, G., Noble, M., Budker, V., Lewis, D. L., Herweijer, H., & Wolff, J. A. (2004). A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Molecular therapy*, *10*(2), 386-398.

Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P., & Wood, K. V. (2012). Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chemical Biology*, *7*(11), 1848-1857.

Hama, S., Akita, H., Ito, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., & Harashima, H. (2006). Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Molecular Therapy*, *13*(4), 786-794.

Holt, I. J., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies.

Holt, I. J., Harding, A. E., Petty, R. K., & Morgan-Hughes, J. A. (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *American journal of human genetics*, *46*(3), 428.

Ibrahim, N., Handa, H., Cosset, A., Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., Lightowlers, R. N., Dietrich, A. & Weber-Lotfi, F. (2011). DNA delivery to mitochondria: Sequence specificity and energy enhancement. *Pharmaceutical research*, *28*(11), 2871-2882.

Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., & Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *301*(4), 891-898.

Itaka, K., Osada, K., Morii, K., Kim, P., Yun, S. H., & Kataoka, K. (2010). Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *Journal of Controlled Release*, *143*(1), 112-119.

Iyer, S., Khan, S., Portell, F., Thomas, R., Borland, K., Quigley, C., Dunham, L., & Bennett Jr, J. P. (2009). 5. Protein-mediated mtDNA Transfection ("Protofection®") Increases Respiration and Mitochondrial DNA Gene Copy Numbers and Expression in G11778A LHON Cybrids. *Mitochondrion*, 9(1), 62.

Iyer, S., Bergquist, K., Young, K., Gnaiger, E., Rao, R. R., & Bennett Jr, J. P. (2012). Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A Leber's hereditary optic neuropathy and T8993G Leigh's syndrome cells. *Human gene therapy*, 23(6), 647-657.

Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., & Stuart, R. A. (2003). Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *The EMBO journal*, 22(24), 6438-6447.

Jones, C. N., Wilkinson, K. A., Hung, K. T., Weeks, K. M., & Spremulli, L. L. (2008). Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *RNA*, 14(5), 862-871.

Kamimura, K., Zhang, G., & Liu, D. (2009). Image-guided, intravascular hydrodynamic gene delivery to skeletal muscle in pigs. *Molecular Therapy*, 18(1), 93-100.

Karicheva, O. Z., Kolesnikova, O. A., Schirtz, T., Vysokikh, M. Y., Mager-Heckel, A. M., Lombès, A., ... & Tarasov, I. (2011). Correction of the consequences of mitochondrial 3243A> G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic acids research*, 39(18), 8173-8186.

Kaufmann, P., Engelstad, K., Wei, Y., Jhung, S., Sano, M. C., Shungu, D. C., Millar, W.S., Hong, X., Gooch, C. L., Mao, M., Pascual, J. M., Hirano, M., Stacpoole, P. W., DiMauro, S & De Vivo, D. C. (2006). Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS A randomized, controlled clinical trial. *Neurology*, 66(3), 324-330.

Kay, M. A., He, C. Y., & Chen, Z. Y. (2010). A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature biotechnology*, 28(12), 1287-1289.

Keeney, P. M., Quigley, C. K., Dunham, L. D., Papageorge, C. M., Iyer, S., Thomas, R. R., Schwarz, K. M., Trimmer, P. A., Khan, S. M., Portell, F. R., Bergquist, K.E., & Bennett Jr, J. P. (2009). Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model. *Human gene therapy*, 20(8), 897-907.

Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Povalko, N., Tanabe, Y., Fujimoto, S., & Matsuishi, T. (2005). L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology*, *64*(4), 710-712.

Koga, Y., Akita, Y., Junko, N., Yatsuga, S., Povalko, N., Fukiyama, R., Ishii, M., & Matsuishi, T. (2006). Endothelial dysfunction in MELAS improved by l-arginine supplementation. *Neurology*, *66*(11), 1766-1769.

Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Povalko, N., Katayama, K., & Matsuishi, T. (2007). MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion*, *7*(1), 133-139.

Kogure, K., Moriguchi, R., Sasaki, K., Ueno, M., Futaki, S., & Harashima, H. (2004). Development of a non-viral multifunctional envelope-type nano device by a novel lipid film hydration method. *Journal of controlled release*, *98*(2), 317-323.

Kolesnikova, O. A., Entelis, N. S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Lightowlers, R. N., Martin, R. P., & Tarasov, I. (2004). Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Human molecular genetics*, *13*(20), 2519-2534.

Koulintchenko, M., Konstantinov, Y., & Dietrich, A. (2003). Plant mitochondria actively import DNA via the permeability transition pore complex. *The EMBO journal*, *22*(6), 1245-1254.

Koulintchenko, M., Temperley, R. J., Mason, P. A., Dietrich, A., & Lightowlers, R. N. (2006). Natural competence of mammalian mitochondria allows the molecular investigation of mitochondrial gene expression. *Human molecular genetics*, *15*(1), 143-154.

Kren, B. T., Wong, P. Y., & Steer, C. J. (2003). Short, single-stranded oligonucleotides mediate targeted nucleotide conversion using extracts from isolated liver mitochondria. *DNA repair*, *2*(5), 531-546.

Kyriakouli, D. S., Boesch, P., Taylor, R. W., & Lightowlers, R. N. (2008). Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene therapy*, *15*(14), 1017-1023.

López-Lluch, G., Irusta, P. M., Navas, P., & de Cabo, R. (2008). Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Experimental gerontology*, *43*(9), 813-819.

Lyrawati, D., Trounson, A., & Cram, D. (2011). Expression of GFP in the mitochondrial compartment using DQAsome-mediated delivery of an artificial mini-mitochondrial genome. *Pharmaceutical research*, 28(11), 2848-2862.

Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A., & Adhya, S. (2006). Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science*, 314(5798), 471-474.

Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M., & Turner, D. H. (2004). Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7287-7292.

Minczuk, M., Papworth, M. A., Miller, J. C., Murphy, M. P., & Klug, A. (2008). Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic acids research*, 36(12), 3926-3938.

Montoya, J., Ojala, D., & Attardi, G. (1981). Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*, 290, 465-470.

Nakada, K., Sato, A., & Hayashi, J. I. (2009). Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10), 1907-1913.

Oca-Cossio, J., Kenyon, L., Hao, H., & Moraes, C. T. (2003). Limitations of allotopic expression of mitochondrial genes in mammalian cells. *Genetics*, 165(2), 707-720.

Ochiai, H., Harashima, H., & Kamiya, H. (2010). Positive feedback system provides efficient and persistent transgene expression. *Molecular Pharmaceutics*, 7(4), 1125-1132.

Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K., & Muto, A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological Reviews*, 56(1), 229.

Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., & Herrmann, J. M. (2006). Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. *The EMBO journal*, 25(8), 1603-1610.

Owen Iv, R., Lewin, A. P., Peel, A., Wang, J., Guy, J., Hauswirth, W. W., Stacpool,

P. W., & Flotte, T. R. (2000). Recombinant adeno-associated virus vector-based gene transfer for defects in oxidative metabolism. *Human gene therapy*, 11(15), 2067-2078.

Pang, M. G., Hoegerman, S. F., Cuticchia, A. J., Moon, S. Y., Doncel, G. F., Acosta, A. A., & Kearns, W. G. (1999). Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 14(5), 1266-1273.

Perales-Clemente, E., Fernández-Silva, P., Acín-Pérez, R., Pérez-Martos, A., & Enríquez, J. A. (2011). Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task?. *Nucleic acids research*, 39(1), 225-234.

Pikó, L., & Taylor, K. D. (1987). Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Developmental biology*, 123(2), 364-374.

Pinkel, D., Straume, T., & Gray, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(9), 2934-2938.

Polosa, P. L., Deceglie, S., Roberti, M., Gadaleta, M. N., & Cantatore, P. (2009). Methods for Studying Mitochondrial Transcription Termination with Isolated Components. In *Mitochondrial DNA* (pp. 127-141). Humana Press.

Fernández-Silva, P., Enríquez, J. A., & Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology*, 88(1), 41-56.

Qiao, C., Li, J., Zheng, H., Bogan, J., Li, J., Yuan, Z., Zhang, C., Bogan, D., Kornegay, J., & Xiao, X. (2009). Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth. *Human gene therapy*, 20(1), 1-10.

Reers, M., Smith, T. W., & Chen, L. B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30(18), 4480-4486.

Robin, E. D., & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of cellular physiology*,

136(3), 507-513.

Sanchez, M. I. L., Mercer, T. R., Davies, S. M., Shearwood, A. M. J., Nygård, K. K., Richman, T. R., Mattick, J. S., Rackham, O., & Filipovska, A. (2011). RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle*, 10(17), 2904-2916.

Sato H, Saito C, Handa H. Mitochondrial DNA decreases during pollen development in rapeseed (*Brassica napus* L.), but mitochondrial linear-plasmid-encoded RNA polymerase persists in mature pollen. *Protoplasma*. 2004;224:179-85.

Sadun, A. A., Chicani, C. F., Ross-Cisneros, F. N., Barboni, P., Thoolen, M., Shrader, W. D., Kubis, K., Carelli, V., & Miller, G. (2012). Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Archives of neurology*, 69(3), 331.

Schapira, A. H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*, 368(9529), 70-82.

Shanske, S., Moraes, C. T., Lombes, A., Miranda, A. F., Bonilla, E., Lewis, P., Whelan, M. A., Ellsworth, C. A., & DiMauro, S. (1990). Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns - Sayre syndrome. *Neurology*, 40(1), 24-24.

Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 115(1), 97-108.

Shoffner, J. M., Lott, M. T., Lezza, A., Seibel, P., Ballinger, S. W., & Wallace, D. C. (1990). Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell*, 61(6), 931-937.

Stacpoole, P. W., Nagaraja, N. V., & Hutson, A. D. (2003). Efficacy of Dichloroacetate as a Lactate - Lowering Drug. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 43(7), 683-691.

Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO journal*, 22(24), 6448-6457.

Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389-402.

Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G. W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., & Xie, X. S. (2010). Quantifying E. coli proteome and transcriptome with single-molecule

sensitivity in single cells. *Science*, 329(5991), 533-538.

Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389-402.

Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science*, 327(5963), 301-301.

Terpstra, P., & Butow, R. A. (1979). The role of var1 in the assembly of yeast mitochondrial ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 254(24), 12662-12669.

Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R. E., May, M., Arena, F., & Barker, D. (1995). A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *Journal of medical genetics*, 32(4), 257-263.

Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology*, 175(2), 237-247.

van der Bliek, A. M., Shen, Q., & Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6).

Vogel, R. O., Dieteren, C. E., van den Heuvel, L. P., Willems, P. H., Smeitink, J. A., Koopman, W. J., & Nijtmans, L. G. (2007). Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUFS3 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 7582-7590.

Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283(5407), 1482-1488.

Wang, G., Chen, H. W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E. L., Smith, G. M., Fan, K. C., Hong, J. S., French, S. W., McCaffery, J. M., Lightowlers, R. N., Morse III, H. C., Koehler, C. M., & Teitell, M. A. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell*, 142(3), 456-467.

Wang, G., Shimada, E., Zhang, J., Hong, J. S., Smith, G. M., Teitell, M. A., & Koehler, C. M. (2012). Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4840-4845.

Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Boesch, P., Cosset, A., Konstantinov, Y.,

Lightowlers, R. N., & Dietrich, A. (2009). Developing a genetic approach to investigate the mechanism of mitochondrial competence for DNA import. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 320-327.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(12), 872-884.

Wilkinson, K. A., Merino, E. J., & Weeks, K. M. (2006). Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nature protocols*, 1(3), 1610-1616.

Wolff, J. A., & Budker, V. (2005). The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Advances in genetics*, 54, 1-20.

Won, Y. W., Lim, K. S., & Kim, Y. H. (2011). Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 152(1), 99-109.

Wooddell, C. I., Hegge, J. O., Zhang, G., Sebestyén, M. G., Noble, M., Griffin, J. B., Pfannes, L. V., Herweijer, H., Hagstrom, J. E., Braun, S., Huss, T., & Wolff, J. A. (2011). Dose response in rodents and nonhuman primates after hydrodynamic limb vein delivery of naked plasmid DNA. *Human gene therapy*, 22(7), 889-903.

Yamada, Y., Akita, H., Kamiya, H., Kogure, K., Yamamoto, T., Shinohara, Y., Yamashita, K., Kobayashi, H., Kikuchi, H., & Harashima, H. (2008). MITO-Porter: a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(2), 423-432.

Yamada, Y., Furukawa, R., Yasuzaki, Y., & Harashima, H. (2011). Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Molecular Therapy*, 19(8), 1449-1456.

Yamada, Y., & Harashima, H. (2012). Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials*, 33(5), 1589-1595.

Yasuzaki, Y., Yamada, Y., & Harashima, H. (2010). Mitochondrial matrix delivery using MITO-Porter, a liposome-based carrier that specifies fusion with mitochondrial membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(2), 181-186.

Yasuzaki, Y., Yamada, Y., Kanefuji, T., & Harashima, H. (2013). Localization of exogenous DNA to mitochondria in skeletal muscle following hydrodynamic limb vein injection. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 805-811.

Yu, H., Koilkonda, R. D., Chou, T. H., Porciatti, V., Ozdemir, S. S., Chiodo, V., Boye, S. L., Boye, S. E., Hauswirth, W. W., Lewin, A. S., & Guy, J. (2012). Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), E1238-E1247.

Yu, J., Xiao, J., Ren, X., Lao, K., & Xie, X. S. (2006). Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*, 311(5767), 1600-1603.

Zhang, E., Zhang, C., Su, Y., Cheng, T., & Shi, C. (2011). Newly developed strategies for multifunctional mitochondria-targeted agents in cancer therapy. *Drug discovery today*, 16(3), 140-146.

Zhang, G., Budker, V., & Wolff, J. A. (1999). High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Human gene therapy*, 10(10), 1735-1737.

Zhang, G., Wooddell, C. I., Hegge, J. O., Griffin, J. B., Huss, T., Braun, S., & Wolff, J. A. (2010). Functional efficacy of dystrophin expression from plasmids delivered to mdx mice by hydrodynamic limb vein injection. *Human gene therapy*, 21(2), 221-237.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究科 薬剤分子設計学研究室教授・原島秀吉先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、その魅力を教えていただき、また、終始多大なる時間を割いて直接の御指導と有益なる御助言を賜りました、北海道大学大学院薬学研究科 薬剤分子設計学研究室助教・山田勇磨先生に心から感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、御教示、御指導と有益なるご助言を賜りました、愛媛大学大学院理工学研究科 環境機能科学分野教授・紙谷浩之先生、北海道大学大学院薬学研究科 薬剤分子設計学研究室准教授・秋田英万先生、同助教・中村孝司先生、ならびに未来創剤学研究室特任准教授・梶本和昭先生、同特任助教・兵藤守先生、畠山浩人先生、林泰弘先生、櫻井遊先生に深く感謝致します。

本論文を審査して頂き、貴重なご指導を賜りました、北海道大学大学院薬学研究科生体分子機能学研究室教授・前仲勝実先生、同准教授・尾瀬農之先生に深く感謝致します。

HLV injection 法について、手技確立のための貴重な機会を与えて頂き、御指導・御助言を賜りました University of Georgia (前 University of Pittsburgh)教授・Dexi Liu 先生、同研究室の皆様、新潟大学大学院 医歯学総合研究科・兼藤努先生、並びに Pittsburgh での滞在を不安なく過ごせるよう支えて下さいました兼藤ともこ様に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご意見と快適な実験環境を提供していただき、また筆者の実験を気にかけてくださりました、北海道大学大学院薬学研究科 薬剤分子設計学分野の皆様心から感謝致します。

最後に、如何なる時でも筆者の支えとなってくれた両親に、心より感謝致します。

2014.2.5 安崎 友香理