

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590949
 研究課題名(和文) ミトコンドリア病治療を目的としたミトコンドリア内での外来遺伝子発現の基礎的研究
 研究課題名(英文) Towards gene therapy for mitochondrial disease: delivery and expression exogenous DNA in mitochondria.
 研究代表者
 松島 雄一 (Yuichi Matsushima)
 九州大学・医学研究院・助教
 研究者番号：20571342

研究成果の概要(和文)：動物ミトコンドリア内に遺伝子を導入・発現させる技術は確立されていないが、この技術はミトコンドリアDNAに変異を持つミトコンドリア病の治療法に応用出来る可能性がある。ミトコンドリア内に導入する外来DNAはミトコンドリア内での分解に抵抗性を示しかつDNAの遺伝子発現を阻害しない必要がある。本研究ではミトコンドリア内に導入する外来DNAの保護因子の評価を行い、ミトコンドリアDNA結合タンパク質TFAMが適切な候補である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The method for mitochondrial transgene expression in animal cells has not been established and this method might be applicable to the gene therapy for mitochondrial diseases, which are mainly caused by mitochondrial DNA mutations. For successful mitochondrial transgene expression, an optimal packaging exogenous DNA is an important issue. Here, we showed that TFAM is useful packaging protein for exogenous DNA to achieve mitochondrial transgene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：(1) ミトコンドリア病 (2) 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) ミトコンドリア病は遺伝子の変異により引き起こされるエネルギー代謝障害であり、現在までに有効な根治療法は存在しない。ミトコンドリア病の原因は核DNA変異とミトコンドリアDNA(mtDNA)の異常(欠失、重複、点変異、欠乏など)とに大別される。mtDNAの欠失や欠乏は核DNA変異に起因する 경우가多いが、現在までに遺伝子検査などにより明らか

にされているミトコンドリア病患者の原因の大半は mtDNA の点変異によって引き起こされたものである。

(2) mtDNAに変異を持つミトコンドリア病患者の細胞内では正常なmtDNAと変異mtDNAが混在している。変異mtDNAの割合がある閾値を超えると機能障害に至るが、たとえ変異mtDNAを一定量持っていたとしてもその割合が低け

れば機能障害には至らないと考えられている。一般的には正常なmtDNAが10-50%程度の割合で存在すれば機能障害を起こさないと考えられている。従って相対的に変異mtDNAの割合を下げることであれば機能障害を回避できる可能性がある。

(3) 患者のmtDNA変異部位に対応した正常な遺伝子を持つ外来遺伝子をミトコンドリアへ導入することにより、正常遺伝子を相対的に優位に立たせることができれば、ミトコンドリア病に対する遺伝子治療となりうる可能性がある。

(4) 現在までに動物ミトコンドリア内に遺伝子を導入および発現させる技術は確立されていない

2. 研究の目的

外来遺伝子をミトコンドリア内に導入および発現させるために必要な基盤的技術の獲得を目的とした。ミトコンドリアへの遺伝子導入のためには導入するDNAを安定的にミトコンドリアへ送達すること、ミトコンドリア内でのDNA分解に耐えること、さらにこのDNAがミトコンドリア内で転写されることが必要であると考えられる。そこで以下の課題に対し実験を行った。

(1) 外来遺伝子導入のための適切なDNAパッケージング因子選択

(2) ミトコンドリアでの外来遺伝子発現の検出方法の確立

3. 研究の方法

(1) DNAのパッケージング因子候補としてミトコンドリアDNA結合タンパク質TFAMを選択し解析を行った。ヒトTFAMタンパク質を用いてパッケージング因子としての評価を行った。

(2) 核への外来遺伝子導入時に用いられるDNAパッケージング因子プロタミンとTFAMの比較を行った。

(3) ミトコンドリアで翻訳されることにより検出可能となるレポーター遺伝子の構築を行った。

4. 研究成果

(1) ヒスチジンタグを持つヒトTFAMを組換え大腸菌を用いて発現させた後にアフィニティー精製法により大量調製した。以降の実験に用いた。(図1)

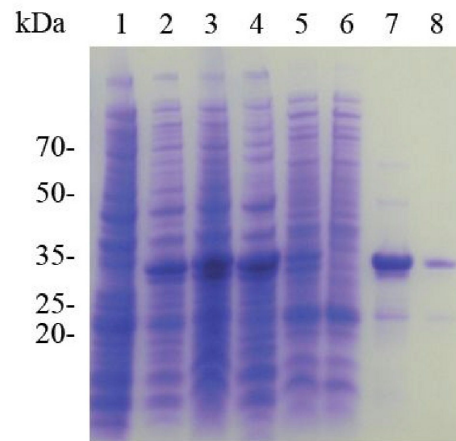
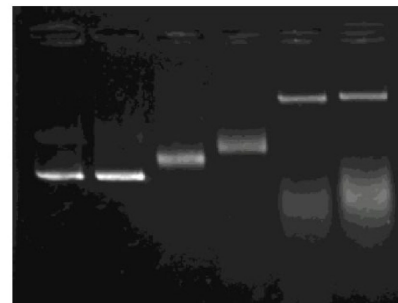


図1 ヒトTFAMの精製過程
レーン8に示す精製した組み換えヒトTFAMを以下の実験に用いた。

(2) TFAM/DNA複合体の粒子径はプロタミン/DNA複合体とほぼ同じであるが、より緩やかな構造を維持している。(図2)

(A) TFAM/plasmid DNA

Molar ratio 0 1 50 100 500 1000



(B) protamine/plasmid DNA

Molar ratio 0 1 50 100 500 1000

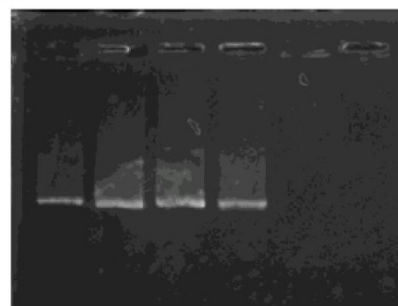


図2 ヒトTFAMとDNAの複合体形成
ヒトTFAMとDNAは複合体を形成する(A)。モル比1:1000の場合では、プロタミン/DNAは臭化エチジウムが入り込めないほど凝集化しているが、TFAM/DNAは臭化エチジウムがインターカレートしており、ゆるやかな構造をとっていると考えられる。

(3) TFAM/DNA複合体は極めて安定であり、電荷の置換や限外ろ過のような物理的な力で容易に乖離しない。

(4) TFAM/DNA複合体はTFAM/DNAのモル比が低い場合は転写活性化に寄与するが、TFAM/DNAの比率が大きくなる条件下では転写阻害効果を示した。一方、プロタミンでは低モル比では転写活性化効果は示さなかったが、高モル比ではTFAMより強い転写阻害効果を示した。(図3)

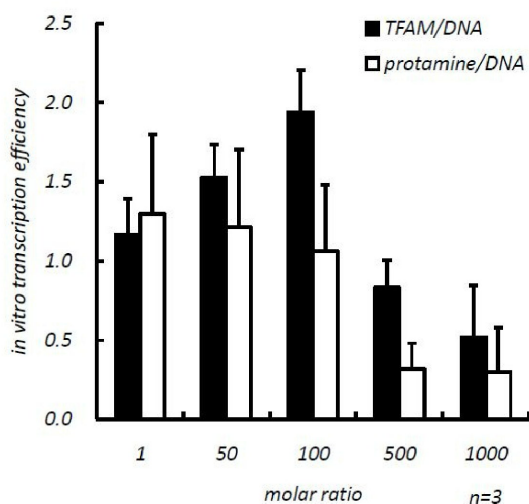


図3 TFAMによる転写活性化効果
ヒトTFAM又はプロタミンと複合体を形成させたDNAを鋳型にin vitro転写を行い転写活性化能を調べた。TFAM、プロタミン共にDNAに対するモル比が500以上で転写阻害効果を示し、特にプロタミンの転写阻害効果は顕著であった。一方、低いモル比のTFAM/DNA複合体では逆に転写活性化効果を示した。

(5) TFAM/DNA複合体では環状DNAと直鎖DNAともに約17bp当たりTFAM一分子の割合で結合している条件が最も高い転写活性化効果を示したが、プロタミン/DNA複合体ではいかなる割合においても転写活性化作用は示さなかった。

(6) 以上の結果は、ミトコンドリアへの外来遺伝子導入時に用いられるパッケージング因子としてTFAMが適切であることを示している。

(7) ミトコンドリアでの外来遺伝子発現の検出方法としてミトコンドリアコドンを持つ緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を構築した。この遺伝子は核コドンによる翻訳では途中で終止コドンが出現するためこの遺伝子がミ

トコンドリア外で転写されても正常なGFPが翻訳されることはなく、ミトコンドリア内で転写と翻訳が行われた場合にのみ正常なGFPが得られる。

(8) ミトコンドリアコドン型GFPを発現させるDNAをTFAMとの複合体として調製した。その後電気穿孔法等いくつかの方法で細胞内のミトコンドリアに導入を試み発現解析を行ったが明確なGFPの発現を検出できなかった。細胞には数千のmtDNAがすでに存在しているので、数多くの外来DNAを効率よくミトコンドリア内に送達することができなかったためにGFPの検出ができなかったと考えられる。

ミトコンドリアへの効率のよい送達技術の確立が、今後の動物ミトコンドリアにおける外来遺伝子発現系の確立に重要であると考えられる。

(9) 2013年現在、国内外においても安定的かつ再現性のある動物ミトコンドリアへの外来遺伝子導入法は確立されていない。動物ミトコンドリアにおける外来遺伝子の発現方法の確立が望まれている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Yuichi Matsushima, Laurie Kaguni, Matrix proteases in mitochondria DNA function. Biochemica et Biophysica Acta, 査読有り, 1819, (2012), 1080-1087. doi: 10.1016/j.bbagr. 2011.11.008

[学会発表] (計3件)

① Yuichi Matsushima, Protein Turnover in Regulation of Mitochondrial DNA Copy Number and Gene Expression. Euromit8, 2011年06月20~23日, AUDITORIO - PALACIO DE CONGRESOS サラゴサ (スペイン)

② Yuichi Matsushima, Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription. 第5回アジアフリーラジカル学会・第8回アジア&第11回日本ミトコンドリア学会合同大会, 2011年08月31日~09月04日, 鹿児島市民文化ホール (鹿児島)

③ Yuichi Matsushima, Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of TFAM, 第32回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月7~10日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 雄一 (Matsushima Yuichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20571342