

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670261

研究課題名(和文)人工制限酵素を用いたミトコンドリアDNAへの変異導入法の開発と確定診断への応用

研究課題名(英文)Development of mutagenesis to the mitochondrial DNA using artificial restriction enzyme and application to definitive diagnosis.

研究代表者

八塚 由紀子(YATSUKA, YUKIKO)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：20458524

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):ミトコンドリア呼吸鎖異常症患者のミトコンドリアDNA(mtDNA)全周解析により新規変異を同定した。従来、Cybrid作製による確定診断が行われてきたが、本研究ではミトコンドリア局在型人工制限酵素を使用した新たな診断法の構築を試みた。

本研究で作製したミトコンドリア局在型人工制限酵素は1塩基の違いでさえも正確に読み分け、mtDNA上の標的配列を認識・切断した。変異導入は実現できなかったが、heteroplasmy(変異を持たないmtDNAと変異を持つmtDNAが一定の割合で混在)の見られる細胞において、その存在比を調節することが可能となり、新たな確定診断法の開発に1歩近付いた。

研究成果の概要(英文):We performed whole mitochondrial DNA (mtDNA) sequence analysis in patients with mitochondrial respiratory chain disorder, and identified several plausible causative mutations. Here, we tried to produce mutant cell lines harboring the variants of unknown significance (VUSs) from normal cells using artificial nucleases in the aim for establishing a new method for definitive diagnosis for VUSs.

We applied TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) system, and engineered so that they localize to mitochondria and recognize the specific target sequence on mtDNA. Actually, the engineered mitochondria-targeted TALENs correctly recognized one-base -difference in the specific target sequence, and cut the proper site.

Although we've not achieved producing mutant cell lines from normal cells, our TALEN system cut the specific mtDNA site. This system can control the heteroplasmy rate inside the mitochondria, and will pave the way for establishing a new method for definitive diagnosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 遺伝子診断・治療 人工制限酵素 遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する研究室ではミトコンドリア呼吸鎖異常症 (Mitochondrial Respiratory Chain Disorder: MRCD) の原因遺伝子同定を目的とし、エキソーム解析およびミトコンドリア DNA (mtDNA) 全周配列解析を行っていた。mtDNA 全周配列解析実施例は 90 例を数え、そのうち 29 例には MRCD の原因になり得る変異が認められた¹。また、29 例中 14 例は過去に報告のない新規変異であったため、これらの変異が真に病気の原因であるのか検証する必要があった。筑波大学、林純一先生のご協力を得て、最も有効な検証手法である Cybrid を 2 例について作製し、病変変異の可能性を検証した。その結果、1 例の変異について「病因である」と確定できた。今後も mtDNA 全周配列解析の実施例数とそれに伴う mtDNA の新規変異同定数はさらに増加すると予測されるが、Cybrid による検証には「病因変異 mtDNA を持つ患者由来細胞が必須である」「細胞質ごと移植するため mtDNA 変異のみを純粹に見ているとは言い難い」など解決すべき課題点もあった。

一方で、人工制限酵素を用いたゲノム編集技術は (主に核ゲノムを対象として) 急速な発展を見せていた。正常な mtDNA への任意の変異導入は過去に例がなく、このシステムを構築することが出来れば、新規 mtDNA 変異の病因性を従来よりも、より早期に、確実に検証できると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者は上記の背景から Cybrid に代わる新規の mtDNA 変異検証法の構築に挑戦したいと考え、本研究を下記の目的で実施した。
人工制限酵素を用いたミトコンドリア DNA への変異導入法を開発する
新規 mtDNA 変異を病因として確定する

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア局在型 TALEN の作製

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) は、切断に必要な Fok-I ヌクレアーゼドメインと厳格な基質配列認識に必要な TALE リピートドメイン、核内で機能するために必要な核移行シグナル、の 3 つの機能ドメインを持つ。ミトコンドリア局在型 TALEN を作製するため、核移行シグナルを削除し、代わりにミトコンドリア移行シグナル (MTS) を付加した。MTS は複数のミトコンドリア局在タンパクの MTS 部分を TALEN に挿入し、ミトコンドリアへの移行効率を比較、検討した。

(2) ミトコンドリア局在型 TALEN の機能評価

-1 (認識配列デザインおよび活性測定)

MRCD 患者の皮膚繊維芽細胞あるいは血液からゲノム DNA を抽出し、mtDNA 全周配列解析を行った。TALEN は Left, Right が一組となったヘテロダイマーを形成して機能するが、Left-TALEN もしくは Right-TALEN のどちらか一方の認識配列内に、前述の解析の結果得られた変異を含むようデザインを行った。複数デザインの TALEN で活性測定を行い、活性の高いものを選んだ。

(3) ミトコンドリア局在型 TALEN の機能評価 -2 (MTDPS 観察)

完成したミトコンドリア局在型 TALEN を実際に細胞に導入し、MTDPS (ミトコンドリア DNA 欠乏状態) が起こることを確認する。

(4) ドナー DNA の輸送法構築

正常細胞の mtDNA へ変異導入を行うためには変異を持つドナー DNA を、ミトコンドリア局在型 TALEN と共にミトコンドリア内に運ぶ必要がある。ドナー DNA のミトコンドリア輸送法は確立されていないため、どのような方法で輸送出来るか調べた。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア局在型 TALEN の作製

TALEN オリジナルベクターとして pcDNA-TAL-NC2, および pCAGGS-TAL-NC2 を使用した。まず、TALEN オリジナルベクターから今回の実験に使用しない核移行シグナルと FLAG 配列を除去し、代わりに各種のミトコンドリア移行シグナル (MTS) と V5 タグを挿入した。MTS は、ミトコンドリア局在タンパクから MTS 部分のみを抜き出したものを合計 10 種用意した。この MTS 候補 10 種のアミノ酸残基数は、ミトコンドリア局在タンパク全体として 428~1,501 残基、MTS 部分として 16~43 残基であった。MTS と V5 タグを挿入した TALEN を HEK293FT 細胞に導入し、全細胞画分およびミトコンドリア画分を採取してウェスタンブロット解析に使用した。**その結果、いずれのプラスミドからも MTS-V5-TALEN が発現しているが、発現量あたりのミトコンドリア移行量には大きな差異があることが分かった (図 1)。**

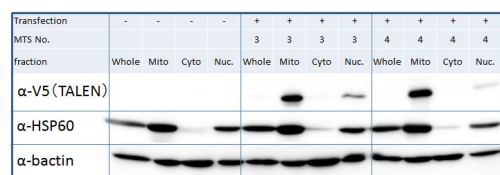


図1: ウェスタンブロット結果 (MTS3, MTS4のみ抜粋)

さらに V5 タグを使用した細胞免疫染色の結果、複数種の MTS-V5-TALEN がきちんとミトコンドリアに移行していることが確認された(図2)。ウェスタンブロット解析および細胞免疫染色の結果から、以降の実験で実際に使用する MTS を決めた。

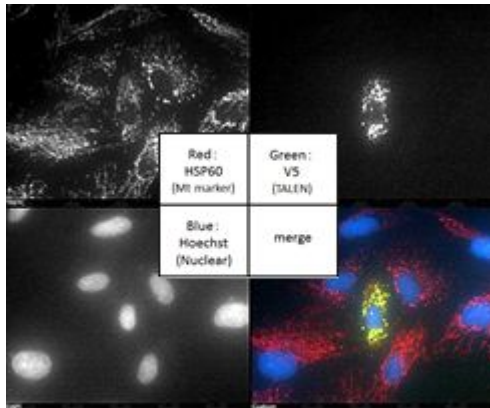
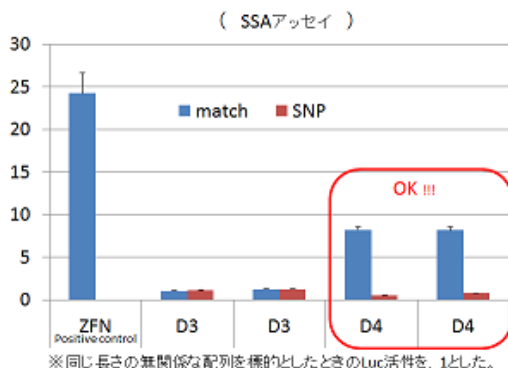


図2: 細胞免疫染色結果

(2) ミトコンドリア局在型 TALEN の機能評価-1 (認識配列デザインおよび活性測定)

MRCO 患者の皮膚線維芽細胞あるいは白血球の mtDNA 全周配列解析を行い、実際に MRCO 患者で同定された mtDNA 変異を本研究の対象とした。TALEN は Left, Right が一組となったヘテロダイマーを形成して機能する。両 TALEN の認識配列に挟まれた mtDNA の標的配列内に、前述の解析の結果得られた変異を含むようデザインした。mtDNA と核 DNA の配列には相同性の高い領域が多く存在するため、標的配列が mtDNA 特異的な配列であり核 DNA 上には存在しない、ということを中心の注意を払って確認した。デザイン完了後は複数デザインの TALEN を実際に作製した。作製法は広島大学大学院・分子遺伝学研究室が発表している方法に従った^{2,3}。作製した TALEN の「配列認識」および「切断活性」を測定するため、Single Strand Annealing (SSA) アッセイを行った。その結果、**1塩基の違いさえも読み分ける厳格な配列認識能**が確認でき(図3) ミトコンドリア局在型 TALEN が完成した。

図3: 配列認識特異性および切断活性の評価



また、Left-TALEN ベクターには緑色 (EGFP)、Right-TALEN ベクターには赤色 (mCherry) の蛍光タンパクを挿入し、ミトコンドリア局在型 TALEN と蛍光タンパクが同じ発現プラスミドから同時に発現するシステムを作製した。これは TALEN 導入細胞のセルソーティング等を行う際に非常に有用であった。

(3) ミトコンドリア局在型 TALEN の機能評価-2 (MTDPS 観察)

細胞内でミトコンドリア局在型人工制限酵素による mtDNA 切断が起こると、その細胞は一過性にミトコンドリア DNA 欠乏 (Mitochondria Depletion = MTDPS) の状態に陥ることが報告されている⁴。本研究で作製したミトコンドリア局在型 TALEN を HEK293FT 細胞に導入し、採取したミトコンドリア画分由来 DNA を定量 PCR で解析したところ、核 DNA に対する mtDNA の存在比の低下すなわち MTDPS が起こっていることが確認された。Morales は TALEN 導入細胞のみをソーティングで分取した後に定量 PCR を行っているが、今回ソーティングを行わなくとも彼らと同程度(約 60%)の MTDPS が確認された。

これは彼らで使用したヒト由来骨髄細胞様細胞株と比較して、今回使用した HEK293FT 細胞の遺伝子導入効率が非常に高いためであると考えられた。しかし、今後、ヒト線維芽細胞のようなトランスフェクションによる遺伝子導入効率が低い細胞を使用する場合は、エレクトロポレーションやウイルスによる遺伝子導入方法の検討も必要である。

(4) ドナーDNA のミトコンドリア輸送法構築

mtDNA への任意の変異導入を行うためには変異を持つドナーDNA を、ミトコンドリア局在型 TALEN と共にミトコンドリアに運ばなければならない。DNA のミトコンドリア輸送法については数例の報告があるものの、ゲノム編集の際のドナーDNA 輸送法として開発された例は 1 つもない。そこで今回、ミトコンドリアへの DNA 輸送方法の確立を試みた。最初に検討した方法は、ミトコンドリア局在型 TALEN と同じ輸送システム、すなわち、ミトコンドリア移行シグナル (MTS) を利用するという輸送法である。一般的に MTS はペプチドであるため、遺伝子組換え技術を用いて、融合タンパク質として TALEN を含むタンパク質に付加することは容易である。しかし、今回のように核酸に直接的に付加しようとすると工夫が必要になる。

ウェスタンブロットングから生細胞イメージングに至るまでパワフルなツールとして使われているプロテインタグ “Halo-Tag” に着目した。Halo-Tag とリ

ガンドの結合が**アフィニティ結合ではなく共有結合**だという点が着目した理由である。これをペプチド-DNA 間の結合に使用すれば二度と解離しないため利用しやすく、また DNA の合成配列のみ変えれば良いため汎用性がある。**Halo-Tag 融合 MTS** は通常の分子生物学的手法で発現プラスミドとして作製し、**HaloTag リガンド融合 DNA** は DNA 末端のアミノ基と HaloTag リガンドのスクシニイミジル基をカップリングして作製した。Halo-Tag 融合 MTS (A) および HaloTag リガンド融合 DNA (B) を細胞に導入し、全細胞画分およびミトコンドリア画分を採取して Halo-Tag 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、全細胞画分におけるウェスタンブロッティングでは (A) の分子量シフトが観察され、(A) と (B) は細胞内で期待どおり共有結合を形成していることが示唆された。一方、ミトコンドリア画分では (A) の分子量シフトを観察をすることが出来なかった。より直接的に局在を確かめるために細胞免疫染色を追加で施行したが、やはりミトコンドリア内への移行は確認できなかった。

当初目的としていた「mtDNA への変異導入」に必要な、ミトコンドリアへの DNA 輸送は実現に至らなかったが、**ミトコンドリア局在型 TALEN を自由にデザインし、mtDNA 上のわずか 1 塩基の違いを読み分けて切断、消去することが可能になった**。つまり heteroplasmy (変異を持たない mtDNA と変異を持つ mtDNA が一定の割合で混在) になっている MRCD 患者由来細胞あるいは Cybrid 細胞において、その heteroplasmy の割合を調節し、病因かどうか検証する等の研究目的に合致する細胞を作製することが出来るようになった。

現在、細胞内で形成された MTS-DNA がなぜミトコンドリア内に移行できないのか原因究明を進めるとともに、RNA シグナル配列を利用したミトコンドリアへの DNA 輸送の検討を開始している。輸送したいドナー DNA と同じ“核酸”をシグナルとして使用することで、前述のペプチドシグナルで生じた問題を克服できるのではないかと期待する。

<引用文献>

1. Uehara *et al.*, Ann Clin Transl Neurol. 2014 May;1(5):361-9. doi: 10.1002/acn3.59. Epub 2014 Apr 28. 「New MT-ND6 and NDUFA1 mutations in mitochondrial respiratory chain disorders.」
2. Sakuma *et al.*, Genes Cells. 2013 Apr;18(4):315-26. doi: 10.1111/gtc.12037. Epub 2013 Feb 6. 「Efficient TALEN construction and

evaluation methods for human cell and animal applications.」

3. Voytas *et al.*, Methods Mol Biol. 2015;1239:133-59. doi: 10.1007/978-1-4939-1862-1_7. 「Efficient design and assembly of custom TALENs using the Golden Gate platform.」
4. Moraes *et al.* Methods Enzymol. 2014;547:373-97. doi: 10.1016/B978-0-12-801415-8.00018-7. 「The use of mitochondria-targeted endonucleases to manipulate mtDNA.」

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)

1. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, (以下省略。著者計 35 名。) A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. PLoS Genetics. 2016 Jan 7;12(1):e1005679. 査読有 doi: 10.1371/journal.pgen.1005679. eCollection 2016 Jan.

[学会発表](計 3 件)

1. Masakazu Kohda, Yoshimi Tokuzawa, Yoshihito Kishita, Hiromi Nyuzuki, Yosuke Mizuno, Tomoko Hirata, Yukiko Yatsuka, Yzumi Yamashita-Sugahara, Yutaka Nakachi, Hidemasa Kato, Shunsuke Tamaru, Nurun Nahar Bornha, Takuya Fushimi, Masaru Shimura, Keiko Kaiho-Ichimoto, Hiroko Harashima, Taro Yamazaki, Masato Mori, Kei Murayama, Akira Ohtake, and Yasushi Okazaki
A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial respiratory chain complex deficiencies
第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 2015 年 11 月 19 日(木)
福井県国際交流会館(福井県・福井市)
2. 山崎太郎、原嶋宏子、伏見拓矢、志村 優、八塚由紀子、木下善仁、神田将和、岡崎康司、村山 圭、大竹 明
全エキソーム解析で病因を同定したミトコンドリア呼吸鎖異常症の出生前遺伝子診断
第 57 回日本先天代謝異常学会総会

2015年11月13日(金)
大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

3. 神田 将和、徳澤 佳美、木下 善仁、森山 陽介、水野 洋介、平田 智子、八塚 由紀子、菅原 泉、仲地 豊、加藤 英政、田丸 俊輔、入月 浩美、Nurun Nahar Borna、原嶋 宏子、山崎 太郎、森雅人、村山 圭、大竹 明、岡崎 康司
ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症のゲノム解析と新規原因遺伝子の発見
日本人類遺伝学会 第60回大会
2015年10月14日
京王プラザホテル(東京都・新宿区)

〔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
<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
八塚 由紀子(YATSUKA YUKIKO)
埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号: 20458524