

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640057

研究課題名(和文)哺乳類ミトコンドリアゲノム操作技術の開発

研究課題名(英文)Development of gene manipulation for mammalian mitochondrial DNA

研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員

研究者番号：30142110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、人工ヌクレアーゼをmtDNAに直接作用可能な遺伝子操作技術を開発することである。そこで、TALEN法を応用し、TALEN cDNAにミトコンドリア移行シグナルとHA-tagなどを付加したミトコンドリア局在型TALENの発現ベクターを構築した。本ベクターで形質転換した培養細胞で免疫染色を行ったところ、TALEN蛋白がミトコンドリアに局在することを確認した。次いで、mtDNA上の標的配列に対する切断効果を検証するために、本ベクターからRNAを合成し、マイクロインジェクション法によってマウス初期胚へ導入したが、現在までに明らかな切断効果は認められておらず、さらなる検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：As an extension of genome editing technique, we have developed a technique for direct manipulation of mtDNA in mammalian cells and/or individuals. We have generated expression vectors containing cDNA encoding TALEN protein with mitochondrial signal sequence in conjunction with HA-tag. By immuno-fluorescent staining, we detected strong signals exclusively restricted to mitochondria, which were stained with mitochondria-specific fluorescent dye, in mammalian cells transformed with the expression vector. These results show that TALEN protein was transported into mitochondria. Then, to investigate whether the mitochondrially-restricted TALEN protein does work directly to mtDNA as we had expected, RNAs for tagged-TALEN were synthesized using these vector as templates, injected into pronucleus of mouse fertilized eggs. Currently, we are examining the reliability of data so far obtained. The experiment to see if the mitochondrially-restricted TALEN protein did work to mtDNA is in progress.

研究分野：哺乳類遺伝学

 キーワード：mtDNA 遺伝子操作 人工ヌクレアーゼ ミトコンドリア内局在型 マウス トランスジェニックマウス
TALEN

1. 研究開始当初の背景

哺乳類ミトコンドリアに存在するゲノム、ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、ヒトでは約 16.5 kb、マウスでは 16.3 kb の環状の DNA で、ミトコンドリア独自の蛋白合成系を担う 2 種類の rRNA、22 種類の tRNA と共に、その系によって合成されたミトコンドリア機能を担う 13 種類のタンパク質をコードしている。これらの rRNA、tRNA、そしてタンパク質はミトコンドリア機能の維持に全て必須で有り、その 1 種類が欠けてもミトコンドリア機能に致命的で有り、その結果個体としての生命活動は維持できない。mtDNA の核 DNA とは異なる特徴として、1 個の細胞には 1,000-10,000 の mtDNA 分子が含まれており、また変異率が高いことなどが知られている。mtDNA 上に生じた変異が病的変異の場合には、例えば MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) や CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia,) などのいわゆるミトコンドリア病と称される重篤な症状を引き起こすこともあり、遺伝子治療などを含め様々な治療法が検討されている。これらミトコンドリア病はミトコンドリアが担う最も重要な機能である酸化リン酸化による ATP 産生に対する機能低下、あるいは機能不全がもたらすものである。

一方、最近では呼吸機能以外のミトコンドリア機能が重要視されてきている。例えば、ミトコンドリアが深く関係するアポトーシスは、内在性刺激による細胞の自除作用の他に、指などの器官形成、ウイルス感染による防御作用など、種々の重要な生体機能と結びついている(引用文献)。さらに 2001 年に林純一らによって開発された異なる mtDNA を外部から導入する技術、trans-mitochondria 技術とそれによって作製されたマウス mice (いわゆる mito-mice) の樹立によって、核の影響を除いた mtDNA と表現型の直接的因果関係が解析できるようになった(引用文献)。この技術により、これまで不明であったミトコンドリア機能欠損による ROS の増加とがん転移との関係、ミトコンドリアと自然免疫との関係等が次第に明らかになってきた。

しかし、この mtDNA の突然変異と表現型をみる trans-mitochondria 技術は非常に有用ではあるが、もともと自発突然変異を起した mtDNA をミトコンドリアごと個体に移植する技術で、mtDNA 自体には何らの人為的操作を加えていない。もし、この mtDNA の任意の個所に突然変異を誘発可能な技術、すなわち、mtDNA 上の配列を直接操作するような技術が開発されれば、mtDNA の変異と表現型との因果関係がこれまで以上に解明できることは十分に期待できる。しかしながら、いわゆる遺伝子改変技術については、核 DNA と比較した場合、一般的な技術として確立するまでには至っていない。しかし、生命科学分野にお

いて核 DNA 遺伝子改変技術が果たしてきた役割を考慮しても、mtDNA 遺伝子操作技術の確立によって、ミトコンドリアが関与する生命現象の理解が飛躍的に前進することが期待される。例えば、mtDNA 上の任意の領域に変異導入できれば、その遺伝子(産物)のオルガネラ・細胞・個体の各レベルにおけるそれらの生理機能の解明、また様々な変異型 mtDNA の遺伝モデル動物の樹立が可能になると考えられる。また、ミトコンドリア病に対する遺伝子治療への応用など、幅広い分野への貢献が期待される。

これまでの mtDNA 上の遺伝子を取り扱う関連した技術としては、塩基配列の異なる mtDNA 分子を有する他細胞種・個体を用いて、細胞融合やマイクロインジェクションなどによって目的の宿主にそのミトコンドリアを導入することが行なわれている。しかし、これらの方法は 2 種類(以上の) mtDNA 分子種が同一の細胞内に存在するヘテロプラスミーの状態を再現していることにはなるが、mtDNA を直接改変する技術にはあたらない。他の方法としては、制限酵素をミトコンドリア内に局在させることで、目的の変異を有する mtDNA のみを切断する技術が報告されている。この方法は直接的に mtDNA 上の配列を操作しているが、mtDNA 上に制限酵素が認識可能な塩基配列を有する場合にのみ適用可能なため、任意の塩基配列を操作する技術としては大幅に制限を受けるとした課題が残されている(引用文献)。

2. 研究の目的

本研究では、急速に発展してきている人工ヌクレアーゼの技術や、mtDNA 遺伝原理に基づく mtDNA 量の制御技術により、mtDNA に対する変異導入、外来性遺伝子導入などを人為的に可能とするような遺伝子改変技術の開発とその確立を目的とした。特に、マウスをモデルとして用いて、細胞レベルにおける技術開発、個体レベルへの応用にまで展開させることを目的とした。具体的に、遺伝子改変を行う人工ヌクレアーゼの技術原理としては、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) を採用し、mtDNA 上の任意の配列について切断し、変異を導入する技術の確立を目指した(図 1)

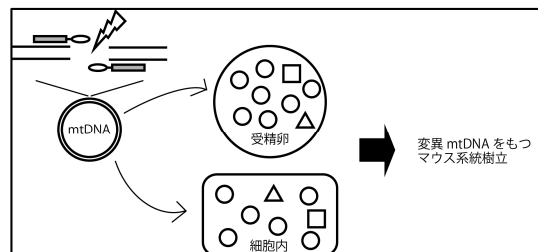


図 1 人工ヌクレアーゼによる mtDNA への変異導入のモデル

人工ヌクレアーゼ (TALEN) により受精卵、細胞内において mtDNA 上の標的配列に変異を

導入し、変異 mtDNA を有するマウス系統の樹立を図る。細胞内のは野生型 mtDNA を、と は変異が導入された mtDNA を示す。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターの構築

mtDNA 上の標的配列を認識するように、TALEN を設定した。設定した TALEN タンパクがミトコンドリアへ局在するように、ミトコンドリア移行シグナルとタグタンパク質 (HA tag, S tag) および TALEN の cDNA との融合遺伝子を設計し、哺乳類細胞で発現可能なプロモーターを有するベクターに挿入し、主に分子生物学的手法を用いてミトコンドリア局在型 TALEN の発現ベクターを構築した。また、導入された細胞を選別することが可能となるように、薬剤マーカーを含んだ別ベクターを用いても構築した。

(2) 培養細胞への導入

構築したベクターの発現を確認するために、リポフェクション法を用いて培養細胞に導入した。培養細胞としては NIH3T3 細胞株を用いて、37℃、5%CO₂ 条件にて培養を行った。リポフェクションの前日までにグラスベスのディッシュに播種し、リポフェクションによる DNA 溶液添加後の 24 時間後以降に観察、リアルタイム PCR 法、免疫染色等を行った。また、導入操作上の技術的な問題の有無を確認、およびミトコンドリアを蛍光蛋白にて可視化するために、ミトコンドリア局在化蛍光タンパク (EGFP, DsRed2) の発現ベクターを使用した。

(3) リアルタイム RT-PCR 法による RNA の相対定量

ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターをリポフェクションにより導入した後の細胞から RNA 試料を調製し、リアルタイム RT-PCR 法によって発現量の解析を行った。基準となる内在性遺伝子としては β -アクチンを用いた。

(4) 免疫染色

ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターのリポフェクション後の発現を確認するために、免疫染色法を実施した。構築したベクターにはタグタンパク質 (HA tag, S tag) の配列が含まれており、このタグタンパク質に対する抗体を用いた。リポフェクション後のグラスベスのディッシュ上の細胞を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液にて固定し、PBS で洗浄した後、1 次抗体および蛍光標識 2 次抗体にて反応させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) マウス初期胚へのマイクロインジェク

ションと切断効率の検証

マイクロインジェクション法によってマウス前核期受精卵に RNA を導入し、切断効率や変異導入について検討を実施した。構築したミトコンドリア局在型 TALEN の発現ベクターには T7 プロモーター配列が含まれており、これを利用した *in vitro* transcription および RNA 精製を行うことでマイクロインジェクション用の RNA 溶液を調製した。

各 TALEN の RNA 溶液を 2.5-5 ng/ μ L の濃度に調製し、マイクロインジェクションによって C57BL/6J 由来の前核期受精卵に導入した。導入後の受精卵を体外にて桑実胚～胚盤胞期までに発生させた後に、プロテイナーゼ K (PK) を含んだ溶液に導入し、55℃ で反応させた後に、95℃ で PK を失活させ、DNA 試料の溶液を調製した (図 2)。

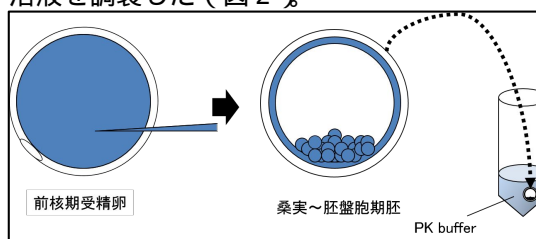


図 2 マイクロインジェクション後のマウス初期胚からの DNA 調製

また、マイクロインジェクションと同日に前核期受精卵を仮親マウスの卵管に移植し、11.5 dpc 胚を採取し、DNA 試料を調製した。

得られた DNA 試料を用いて、標的配列を含む領域を PCR 法にて増幅し、切断および変異の有無の検証を行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターの構築

汎用近交系マウス C57BL/6J の mtDNA 配列情報をもとに mtDNA 配列上の領域から、ATP6 遺伝子内の配列を標的配列として選定した。選定した配列をシーケンス法にて確認し、TALEN 発現ベクターを構築した。次に、TALEN の N 末端側にミトコンドリア移行シグナル (MLS) とタグタンパク質 (HA tag, S tag) が融合するように MLS/タグタンパク質の DNA 配列を設計・合成した。TALEN 発現ベクターに MLS/タグタンパク質の DNA 配列を組込むために、MLS/タグタンパク質を含んだベクターと TALEN 発現ベクターを制限酵素で処理し、ゲル電気泳動で目的の断片を分離し、DNA を精製し、ライゲーション・大腸菌へのトランスフォーメーション等のステップを経てプラスミド調製を行うことで、ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターを構築した。なお、構築された発現ベクターについてはシーケンス法などで配列を確認した (図 3: 次ページ)。

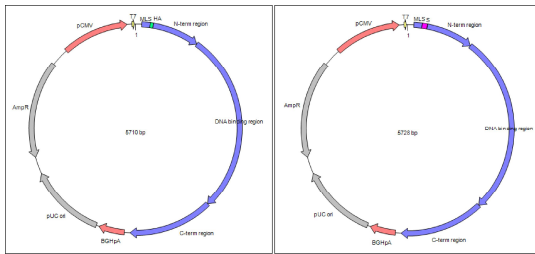


図3 ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターの構築例

(2) 培養細胞における発現の検証

作製したミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターが哺乳類細胞内において発現するかを検証するために、培養細胞に本ベクターをトランスフェクション法によって導入して検討を行った。培養細胞としては、NIH3T3 を用いた。トランスフェクション後に、発現解析を行うために、細胞より RNA 試料を調製し、リアルタイム RT-PCR 法によりその発現を確認した。また、目的タンパクのミトコンドリアへの局在を検証可能とするために、本ベクターとミトコンドリア局在型蛍光タンパクの発現ベクターを混合してトランスフェクションを行った。HA tag、S tag に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、またこれらとは波長特性の異なるミトコンドリア局在蛍光タンパク質を、同時に蛍光観察した。その結果、強制発現のプロモーター制御下にも関わらず、目的タンパク質のシグナルが不安定であることが認められたものの、目的タンパク質のシグナルと蛍光タンパク質のシグナルが一致して観察され、目的タンパク質がミトコンドリアに局在していることが強く示唆された。

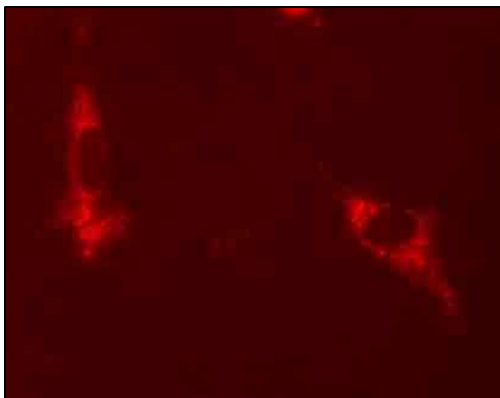


図4 ミトコンドリア局在型 TALEN 発現ベクターを導入した細胞の免疫染色例

(3) マウス初期胚への導入と切断効率の検証

作製した発現ベクターの標的配列に対する切断機能を検証するために、本ベクターを鋳型として *in vitro* transcription による RNA 合成を行い、この合成 RNA をマイクロインジェクション法によってマウス前核期受精卵へ導入した。その前核期受精卵を体外培

養にて桑実期～胚盤胞期まで発生させて、その胚から、DNA 試料を調製した後、PCR 法によって目的配列近傍を増幅し、変異導入を検証したが、現在までに変異が導入された結果は得られていない。PCR 産物の検出量についてインジェクションを実施していないコントロール群と比較すると、切断された可能性が想定される結果が得られたが、これについてはさらなる検証を行っている。

また、インジェクション後に仮親に移植を行い、11.5 dpc の初期胚についても検討を行ったが、現時点では目的配列への変異導入は検出されていない。これらの実験については、さらなる検討が必要と考えられる。

<引用文献>

米川博通： 生と死を握るミトコンドリアの謎 ~健康と長寿を支配するミクロな器官~ (知りたい! サイエンス) 技術評論社 2013

Inoue, K., Nakada, K., Ogura, A., Isobe, K., Goto, Y., Nonaka, I., Hayashi, J.-I.: Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Na.t Genet.* 26:176–181, 2000

Xu H., DeLuca, S. Z., O'Farrell, P. H.: Manipulating the Metazoan Mitochondrial Genome with Targeted Restriction Enzymes. *Science* 321: 575-577, 2008.

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 3件)

Akinori Shimizu, Takayuki Mito, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kaori Ishikawa, Kazuto Nakada, Jun-Ichi Hayashi. G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA^{Lys} regulates late-onset disorders in transmitochondrial mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有 459: 66-70, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.070

Haruka Yamanashi, Osamu Hashizume, Hiromichi Yonekawa, Kazuto Nakada, Jun-Ichi Hayashi. Administration of an Antioxidant Prevents Lymphoma Development in Transmitochondrial Mice Overproducing Reactive Oxygen Species. *Exp. Anim.* 査読有 63(4): 459–466, 2014. doi: 10.1538/expanim.63.459

Osamu Udagawa, Takaya Ishihara, Maki Maeda, Yui Matsunaga, Satoshi,

Tsukamoto, Natsuko Kawano, Kenji Miyado, Hiroshi Shitara, Sadaki Yokota, Masatoshi Nomura, Katsuyoshi Mihara, Noboru Mizushima, Naotada Ishihara: Mitochondrial Fission Factor Drp1 Maintains Oocyte Quality via Dynamic Rearrangement of Multiple Organelles. Current Biology 24(20):2451-2458, 2014 doi: 10.1016/j.cub.2014.08.060.

〔学会発表〕(計4件)

設楽 浩志：哺乳類における異質性ミトコンドリア DNA の遺伝．第16 REG 部会
2014.11.8. 順天堂大学医学部 10号館 1Fカンファレンスルーム1 (東京・文京区・御茶ノ水)(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://igakuken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員
研究者番号：30142110

(2) 研究分担者

設楽 浩志 (SHITARA, Hiroshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主任基盤技術研究職員
研究者番号：90321885