

2010 年度

学位論文 (博士)

MELAS A3243G 変異型ミトコンドリア DNA と
ミトコンドリア転写終結因子 mTERF の機能メカニズム

東京大学大学院 新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻 分子医科学分野

学籍番号 17528

矢野 隆光

目次

| | |
|--|-----------|
| 略語一覧..... | 5 |
| 序章..... | 6 |
| 第一章 細胞融合による細胞核バックグラウンドの改変..... | 7 |
| 1-1 序論 A3243G 変異と MELAS の分子病理..... | 7 |
| 1-2 実験目的..... | 11 |
| 1-3 実験方法..... | 12 |
| 1-3-1 細胞培養..... | 12 |
| 1-3-2 2SD サイブリッド細胞のミトコンドリア膜電位の解析..... | 14 |
| 1-3-3 Hygromycin 耐性 2SD サイブリッド細胞の作出..... | 14 |
| 1-3-4 細胞融合..... | 15 |
| 1-3-5 細胞融合の確認..... | 17 |
| 1-3-6 PCR-RFLP による A3243G 変異型 mtDNA の解析..... | 17 |
| 1-4 実験結果..... | 20 |
| 1-4-1 A3243G 変異によるミトコンドリア膜電位の低下..... | 20 |
| 1-4-2 2SD-MiTen ハイブリッド細胞による予備実験の結果..... | 21 |
| 1-4-3 2SD ^{hygro} -TIG ハイブリッド細胞の樹立..... | 22 |
| 1-4-4 2SD ^{hygro} -TIG ハイブリッド細胞の mtDNA の解析..... | 23 |
| 1-4-5 ハイブリッド細胞クローンの変異型 mtDNA の減少率..... | 24 |
| 1-5 考察..... | 26 |
| 第二章 mTERF の mtDNA 複製における機能の検証..... | 30 |
| 2-1 序論..... | 30 |
| 2-1-1 mTERF の想定されている機能..... | 30 |
| 2-1-2 mTERF タンパク質と DNA との分子相互作用..... | 32 |

| | | |
|--|--------------------------------------|-----------|
| 2-1-3 | mtDNA の複製..... | 34 |
| 2-2 | 実験目的..... | 36 |
| 2-3 | 実験方法..... | 37 |
| 2-3-1 | ミトコンドリア・タンパク質の抽出..... | 37 |
| 2-3-2 | 総タンパク質濃度の測定..... | 37 |
| 2-3-3 | Western blot..... | 38 |
| 2-3-4 | mTERF 遺伝子発現ベクターの作製と変異率の解析..... | 41 |
| 2-3-5 | siRNA による mTERF 遺伝子発現のノックダウン..... | 47 |
| 2-3-6 | mTERF 発現のノックダウンの確認・定量..... | 48 |
| 2-3-7 | 細胞あたりの mtDNA 量の定量..... | 49 |
| 2-4 | 実験結果..... | 52 |
| 2-4-1 | RNAi による mTERF 発現量の減少..... | 52 |
| 2-4-2 | mTERF のノックダウンに伴う mtDNA 量の増加..... | 53 |
| 2-4-3 | mTERF の western blot による過剰発現の確認..... | 54 |
| 2-4-4 | サイブリッド細胞クローンごとの変異率..... | 54 |
| 2-5 | 考察..... | 56 |
| 第三章 変異型 mtDNA の量的置換システムの構築..... | | 57 |
| 3-1 | 序論..... | 57 |
| 3-1-1 | MELAS の新治療ストラテジーの提案..... | 57 |
| 3-1-2 | 制限酵素導入法による変異型 mtDNA の切断・破壊..... | 58 |
| 3-1-3 | PNA による変異型 mtDNA の複製阻害ストラテジー..... | 60 |
| 3-1-4 | PI ポリアミドによる MELAS の分子治療ストラテジー..... | 62 |
| 3-2 | 実験目的..... | 66 |
| 3-3 | 実験方法..... | 67 |
| 3-3-1 | ML1 ポリアミドの分子デザイン..... | 67 |
| 3-3-2 | PI ポリアミドの合成..... | 70 |
| 3-3-3 | 合成後の PI ポリアミドの HPLC での精製..... | 73 |
| 3-3-4 | 真空凍結乾燥..... | 74 |

| | | |
|-------|--------------------------------------|-----------|
| 3-3-5 | PI ポリアミドの濃度測定..... | 74 |
| 3-3-6 | EMSA による ML1 ポリアミドとの結合解析..... | 75 |
| 3-3-7 | mIP アッセイ..... | 77 |
| 3-3-8 | サイブリッド細胞での ML1 ポリアミドの効果の解析..... | 82 |
| 3-3-9 | ML1 ポリアミドの生細胞に対する毒性・副作用の有無..... | 83 |
| 3-4 | 実験結果..... | 84 |
| 3-4-1 | ターゲット配列への塩基配列特異的結合..... | 84 |
| 3-4-2 | 免疫沈降させた mtDNA 断片の PCR 増幅..... | 85 |
| 3-4-3 | 免疫沈降した mtDNA 断片の q-PCR による定量..... | 86 |
| 3-4-4 | ML1 ポリアミドによる野生型 mtDNA の増加..... | 87 |
| 3-4-5 | ML1 ポリアミドの mTERF 結合阻害が生細胞に与える影響..... | 90 |
| 3-5 | 考察..... | 95 |
| | 終章..... | 99 |
| | 引用文献..... | 102 |
| | 発表論文..... | 110 |
| | 謝辞..... | 111 |

略語一覽

CPEO chronic progressive external ophthalmoplegia

dsDNA double-stranded DNA

EMSA electrophoretic mobility shift assay

FACS fluorescence-activated cell sorting

HSP heavy strand promoter

LSP light strand promoter

MELAS mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes

MERRF myoclonus epilepsy with red-ragged fibers

mIP mitochondrial DNA immunoprecipitation

mtDNA mitochondrial DNA

mTERF mitochondrial transcription termination factor

MTS mitochondria targeting signal

mtSSBP mitochondrial single-stranded binding protein

NARP neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa

OXPPOS oxidative phosphorylation

PNA peptide nucleic acids

RNAi RNA interfering

siRNA short interfering RNA

TFAM mitochondrial transcription factor A

TPP triphenyl phosphonium

VNTR variable number of tandem repeat

序章

ミトコンドリアは真核細胞のエネルギー産生を担っている細胞小器官であり、酸化リン酸化(oxidative phosphorylation; OXPHOS)により、化学的エネルギー(ATP)を細胞に供給している。成熟赤血球を除く、ヒト細胞のミトコンドリアの内部には核DNAとは異なる、マルチコピー性の16,568 bpの環状二重鎖DNAであるミトコンドリアDNA(mtDNA)が存在しており、OXPHOSに必須な4つの呼吸鎖複合体のサブユニットタンパク質である13種類のポリペプチドの遺伝情報をコードし(Anderson et al.,1981)、それに加えてmtDNAは、ミトコンドリア・タンパク質合成に必要な2種類のリボソームRNA(12S, 16S rRNA)、22種類のトランスファーRNA(tRNA)をコードしている。

近年、このmtDNA上の遺伝子変異が様々な疾患を引き起こすことが次々と報告されている。これらのmtDNA変異疾患の頻度は高く、少なくとも1/5000と見積もられており、これは筋ジストロフィーよりも頻度が高い遺伝子疾患である(Chinnery et al.,2007)。

今日まで、mtDNA上における多数の点変異から大規模欠失や重複までの病原性変異が報告されている。これらの変異は主に筋疾患、神経変成疾患の多彩な症状を示すだけでなく、多臓器疾患や糖尿病とも関係している。これらの疾患は進行性であり、患者の症状は増悪して行くが、有効な薬物治療は存在しない。

本論文は、第一章では、細胞融合により、変異型mtDNAの細胞内量をシフトさせ、その現象で重要な役割を果たす因子を考察し、第二章では第一章の考察から導き出された因子の機能を実験的に検証し、因子の分子メカニズムを提唱した。第三章では第二章の分子メカニズムに基づき、DNA結合化合物を使用した、ミトコンドリア遺伝子疾患の新しい治療ストラテジーの検証を行なった。

第一章 細胞融合による細胞核バックグラウンドの改変

1-1 序論 A3243G変異とMELASの分子病理

ミトコンドリアは個体が活動する為に必要なエネルギーの約 90%を供給している為、ミトコンドリア機能異常はエネルギー需要の高い中枢神経や骨格筋、心筋に見られ、中枢神経や筋に症状が現れるミトコンドリア病を特にミトコンドリア脳筋症と呼ぶ。ミトコンドリア病は症状が多彩なので、DiMauro らによって臨床症状に応じて 3 つの病型 (3 大病型) に分類されている(DiMauro et al.,1985): MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), MERRF (myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibers), CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia、慢性進行性外眼筋麻痺)。

これらの病型には、いずれもミトコンドリア tRNA の異常が関与している。ミトコンドリア遺伝子疾患で認める変異の半数以上がミトコンドリア tRNA 上に集中しており、ミトコンドリア・ゲノムの 22 個の全てのミトコンドリア tRNA 遺伝子上で点突然変異を持つ症例が報告されて、その数は 120 箇所以上に及んでいる (MITOMAP, human mitochondrial genome database 2010, <http://www.mitomap.org/>)。その中で変異頻度が高いミトコンドリア tRNA としてはロイシン tRNA (UUR) (tRNA^{Leu(UUR)}) とイソロイシン tRNA (tRNA^{Ile})、そしてリジン tRNA (tRNA^{Lys})が挙げられる。

MELAS は、脳卒中様発作、高乳酸血症などを特徴とするミトコンドリア病の中でも頻度の高い、致死的ミトコンドリア遺伝子疾患である。MELAS を惹起す

る病原性点変異は、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子に集中して存在するが(図 1)、MELAS の遺伝的病因の 80%は、mtDNA のミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子上のミトコンドリア塩基番号 3243 番におけるアデニン (A) からグアニン (G) への一塩基置換 (A3243G) である。A3243G 変異は MELAS をはじめとするミトコンドリア糖尿病や難聴、心筋症、CPEO などの多彩な臨床症状を引き起こすことが知られており、分子病理の研究が最も進んでいる点変異である。

King らは低濃度のエチジウムブロマイド (mtDNA の複製を阻害する) で細胞を長期に渡って処理することにより、内在性 mtDNA を全く欠く細胞 (ρ^0 細胞) 株を樹立した (King et al., 1989)。そしてこの ρ^0 細胞株に MELAS 患者由来のミトコンドリアを導入することにより、人工融合細胞である MELAS サイブリッド細胞を作製し、A3243G 変異が核遺伝子の影響無しに単独で、mtDNA にコードされる呼吸鎖タンパク質のサブユニットの合成を阻害することを示した (King et al., 1992)。

A3243G 変異はミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}の高次構造の不安定化を招き、定常量を減少させること (Park et al., 2003)、ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}のウオブル部位のアンチコドン (U34) のタウリン修飾欠損を招来させ、ミトコンドリア・タンパク質 (特に複合体 I の ND6) の合成障害を引き起こすこと (Yasukawa et al., 2000)、また A3243G 変異型 tRNA^{Leu(UUR)}分子は互いに結合して 2 量体を形成し、ミトコンドリア mRNA の翻訳過程において正常に機能出来なくなること (Wittenhagen et al., 2002)、そしてアンチコドンに対応した、適切なアミノ酸を付加するアミノアシル化の効率を低下させる可能性などが報告されている (Borner et al., 2000)。

MELAS において、A3243G 変異型 mtDNA は同一の細胞に野生型 mtDNA と共存して存在しており、この状態をヘテロプラスミー(heteroplasmy)という。ミ

トコンドリア機能障害すなわち OXPHOS 機能障害は、細胞内で A3243G 変異型 mtDNA が一定の割合(60-95%)を超えた時に出現する(Martinuzzi et al.,1992)。これを閾値効果 (threshold effect) という。変異型 mtDNA のヘテロプラスミーの割合は細胞の種類、または組織のレベルでさえも異なり、時として変動する(Shanske et al., 2004)。

MELAS A3243G 変異 mtDNA を持つサイブリッド細胞を使った研究により、A3243G 変異型 mtDNA の細胞内の割合、すなわちヘテロプラスミーの割合は、細胞の核バックグラウンドに依存していることが示されている (Dunbar et al.,1995) 。様々な核バックグラウンドでの mtDNA のヘテロプラスミーの挙動を解析することは、このミトコンドリア遺伝子疾患の病理や予後を理解する為に重要である。しかしながら、これまでのところ、細胞内における A3243G 変異型 mtDNA のコピー数の制御機構は殆ど判っていない。

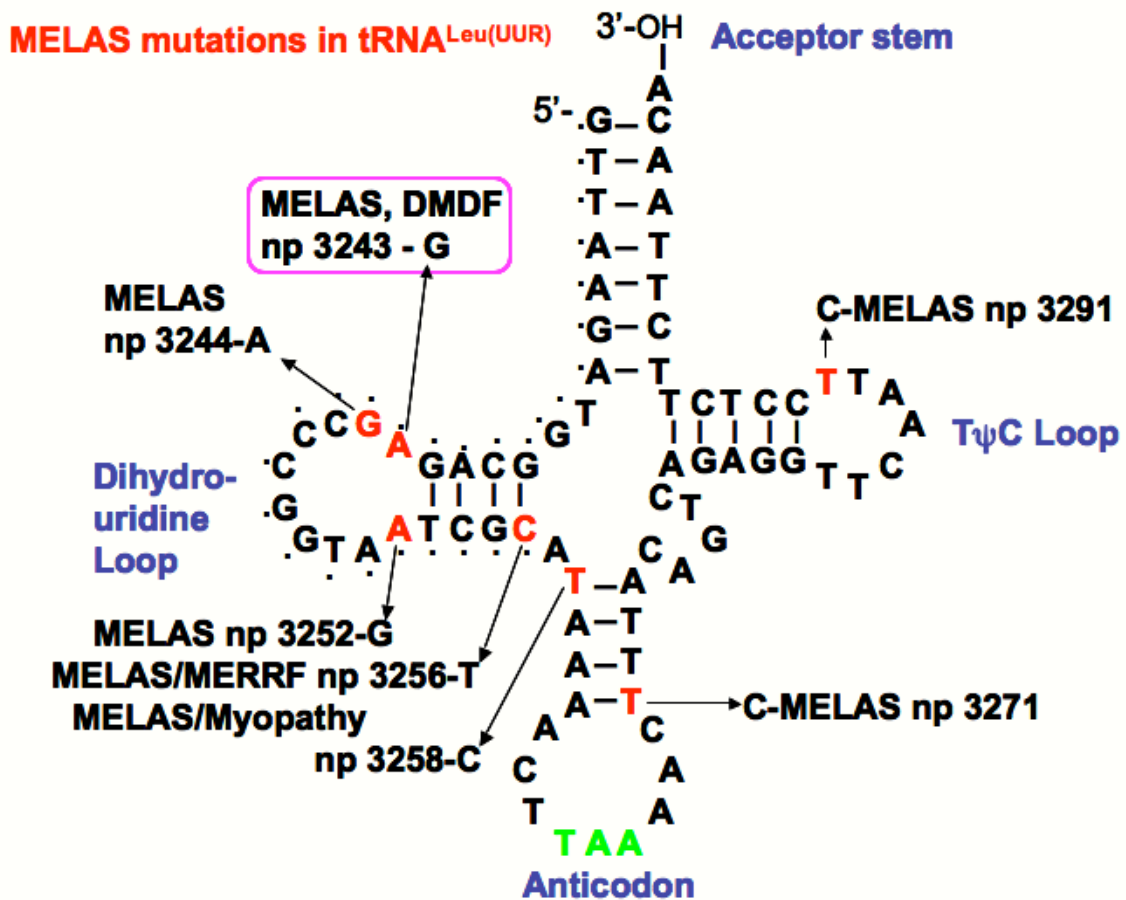


図 1. ミトコンドリア tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子上の MELAS 点変異。ドットの付いた塩基はミトコンドリア転写終結因子 mTERF の結合配列内に存在していることを表している。DMDF: 糖尿病+難聴

1-2 実験目的

これまで **A3243G** 変異の研究は人工融合細胞、サイブリッド細胞を用いて、長年詳細に解析が行なわれて来た。しかし、サイブリッド細胞は腫瘍細胞株由来である為、腫瘍細胞核バックグラウンド以外の正常細胞の核バックグラウンドの影響が、**A3243G** 変異 mtDNA のヘテロプラスミーの挙動にどのような影響を与えるのか、殆ど判っていない。

本研究は、正常核細胞である胎児肺由来繊維芽細胞と **MELAS** サイブリッド細胞との細胞融合を行ない、非腫瘍性正常核を含む細胞質を、腫瘍細胞核を有する **MELAS** サイブリッド細胞に導入することで腫瘍核バックグラウンドを改変し、この導入の影響により、ヘテロプラスミーの状態がどのように変化するのかを解析し、**A3243G** 変異型 mtDNA 量の制御機構を考察することを目的とした。

1-3 実験方法

1-3-1 細胞培養

細胞融合実験を行なう為の親細胞は以下のように入手した。

Lesch-Nyhan 症候群患者の皮膚組織由来繊維芽細胞 MiTen (JCRB0072)、胎児肺組織由来繊維芽細胞 TIG-3-20 (JCRB0506)は JCRB Cell Bank から入手した。括弧内は JCRB 番号を示す。ヒト骨肉腫細胞株である 143B 細胞と mtDNA に A3243G 変異を持つ 143B 細胞由来細胞である 2SD サイブリッド細胞は、岐阜国際バイオ研究所の伊藤雅史博士から頂いた。

MiTEn 細胞は hypoxanthine phosphoribosyl transferase 欠損 (HPRT⁻)であり、143B、2SD サイブリッド細胞と hygromycin 耐性 2SD サイブリッド細胞 (2SD^{hygro} サイブリッド細胞) は thymidine kinase 欠損 (TK⁻) で、HAT 感受性である。2SD サイブリッド細胞、2SD^{hygro} サイブリッド細胞と繊維芽細胞 TIG-3-20、MiTen との融合細胞であるハイブリッド細胞の維持には、高グルコース DMEM (COSMO BIO) に FBS (10%)、ピルビン酸ナトリウム (0.1 mg/ml)、ウリジン (50 µg/ml) そして Antibiotic-Antimycotic liquid (Invitrogen) を添加した完全培地 (complete DMEM) を使用した。この complete DMEM では変異率 100% の細胞でも維持が可能である。Table I に今回実験に使用した細胞の名称、薬剤耐性の遺伝的特性と A3243G の変異率 (%) を示す。

Table 1.

Genetic characteristics and mutation percentages of parental cells and nuclear hybrids

| Cell lines | Drug resistance | Cross | Selection | % A3243G |
|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|----------------|----------|
| Tumor cell line | | | | |
| 143B | HAT ^s , Hygro ^s | | | 0 |
| Parent cell lines | | | | |
| Cybrid cell line | | | | |
| 2SD | HAT ^s , Hygro ^s | | | 94.0 |
| 2SD ^{hygro} | HAT ^s , Hygro ^r | | | 86.6 |
| Fibroblast cell line | | | | |
| MiTen ^a | HAT ^s , Hygro ^s | | | 0 |
| TIG-3-20 | HAT ^r , Hygro ^s | | | 0 |
| Hybrid cell clones | HAT ^r , Hygro ^r | 2SD ^{hygro} × TIG-3-20 | HAT + Hygro | |
| Hy-1 | | | | 21.3 |
| Hy-2 | | | | 17.5 |
| Hy-3 | | | | 15.2 |
| Hy-4 | | | | 82.6 |
| Hy-5 | | | | 32.7 |
| Hy-6 | | | | 15.5 |

^a human skin fibroblast cell line from Lesch-Nyhan syndrome patient^s drug sensitive, ^r drug resistance

1-3-2 2SD サイブリッド細胞のミトコンドリア膜電位の解析

2SD サイブリッド細胞のミトコンドリア膜電位の評価は、fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法で、MitoTracker Orange dye CMTMRos (Invitrogen) を使用し、行なった。2SD サイブリッド細胞を 100 nM の濃度で脂溶性カチオンである MitoTracker Orange を含有する培地で 37°C、30 min 暗所にて培養し、PBS で 2 回洗浄後、トリプシン処理で細胞をはがし、FACS buffer で洗浄した。細胞は最終的に 200 μ l の FACS buffer に懸濁した。10⁵ 個の細胞を FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System) に注入した後、ミトコンドリア膜電位に依存した蛍光強度によって細胞をソーティングし解析した。

FACS buffer:

日水ハンクス液 フェノールレッド不含 (日水製薬) 05905

0.035% NaHCO₃

0.1% NaN₃

0.2% BSA

1-3-3 Hygromycin 耐性 2SD サイブリッド細胞の作出

繊維芽細胞と MELAS サイブリッド細胞との融合細胞、すなわちハイブリッド細胞を作出する為には、細胞融合後の細胞選択の為の何らかの薬剤耐性をサイブリッド細胞に付与させる必要がある。その為、hygromycin 耐性遺伝子が組み込まれている哺乳類細胞遺伝子発現ベクターの pcDNA3.1/Hygro(+)ベクター (Invitrogen) を Lipofectamine PLUS (Invitrogen) を、2SD サイブリッド細胞に

リポフェクション法にて導入した。なお pcDNA3.1/Hygromycin ベクターは細胞核 DNA へのインテグレーションの効率を高める為、制限酵素で non-coding 領域を一カ所切断し線状化したものを使用した。3 週間、0.5 mg/ml の濃度で hygromycin (Invitrogen) にて処理し、hygromycin 耐性遺伝子が安定に発現している 2SD サイブリッド細胞だけを選択した後、細胞をバルクで回収し hygromycin 耐性 2SD サイブリッド細胞 (2SD^{hygro} サイブリッド細胞) として細胞融合の実験に供した。

1-3-4 細胞融合

2SD サイブリッド細胞、2SD^{hygro} サイブリッド細胞と、繊維芽細胞である MiTen, TIG-3-20 とのそれぞれの細胞融合は、分子量 1450 の 50% (w/v) ポリエチレングリコール (Hybrimax, Sigma-Aldrich) を使用して行った。それぞれの親細胞 10⁶ 個を用意して混合し、1200 rpm 5 min で遠心してペレットにした後、FBS (-) DMEM で一回洗浄し、50%(w/v)ポリエチレングリコール溶液を 0.4 ml 加え 4-5 回サスペンドした。恒温槽で 40℃、1.5 - 3.5 min インキュベートした後、FBS (-) DMEM で 1-2 min かけてゆっくり希釈し (10 ml まで)、1200 rpm で遠心する。その後細胞ペレットに注意しながら上清をサクションし、ポリエチレングリコールを FBS (-) DMEM で洗浄して除去した。細胞ペレットを 10 ml の complete DMEM で懸濁させたのち、一部を採取、検鏡して楕円型の融合細胞があることを確認し、10 cm ディッシュ 2 枚に播いた。播種 48 時間後、2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の薬剤選択の場合、complete DMEM に HAT (GibcoBRL) と hygromycin (0.3 mg/ml、Invitrogen) を添加し、ハイブリッド細胞を 2 週間、薬剤選択した。一方 2SD-MiTen ハイブリッド細胞の細胞選択には HAT のみを用いた。なお、2SD サイブリッド細胞 (HPRT⁺/TK⁻) と MiTen 細胞 (HPRT⁻/TK⁺)

とのハイブリッド細胞は、HAT に耐性であり、2SD^{hygro} サイブリッド細胞 (Hygro^r / TK⁻) と TIG-3-20 細胞 (Hygro^s / TK⁺) とのハイブリッド細胞は HAT、hygromycin の両方に耐性である (図 2)。

融合後から 14-17 日経過してからディッシュの底に、2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞のコロニーが多数観察されたので、シリンダー法にてシングルコロニーを回収し、complete DMEM で 6 つのクローンをそれぞれ経代培養した。なお 2SD-MiTen ハイブリッド細胞はトリプシン処理後、バルクで回収した。

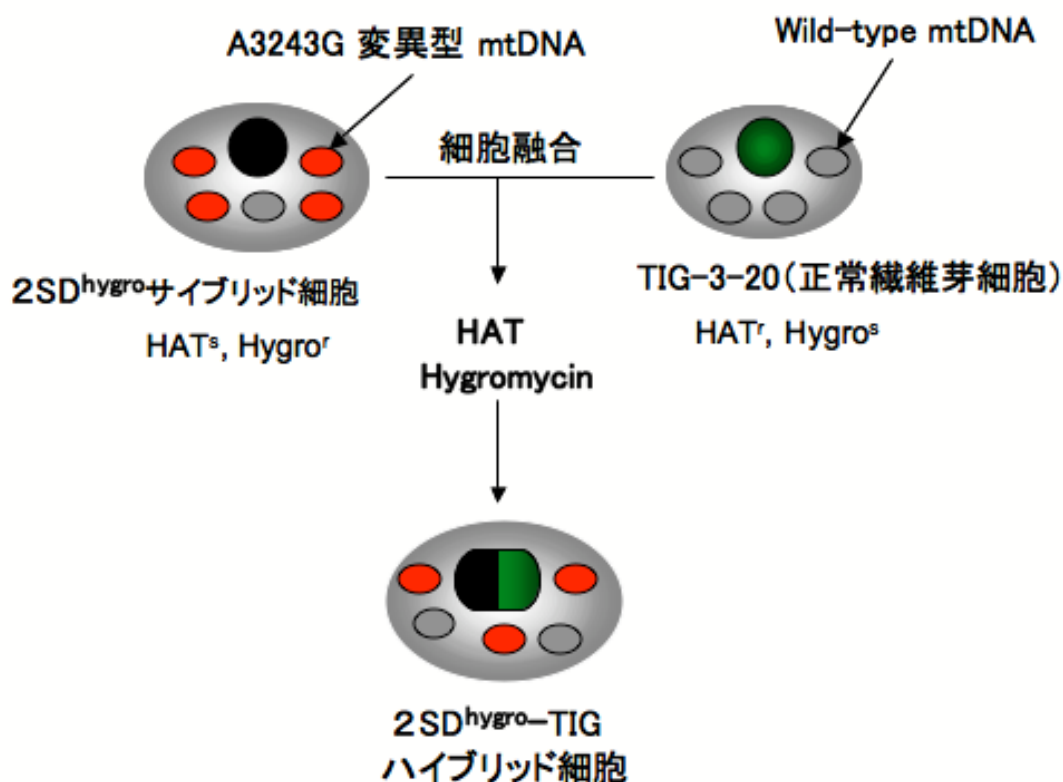


図 2. 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の作製

1-3-5 細胞融合の確認

2SD^{hygro} -TIG ハイブリッド細胞の細胞融合の成否は、核ゲノム多型の VNTR (variable number of tandem repeat)の一つである MCT118 のリピート長の差を解析することで確認した。Total DNA は DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を使用し、細胞から抽出した。多型パターン識別の為に DNA の PCR 増幅の為に primer 塩基配列と温度条件を下に示す：

Forward primer: 5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G-3'

Reverse primer: 5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC-3'

温度条件は以下のようなになる：

| Denaturing | Annealing | Extension |
|------------|-----------|-----------|
| 94°C | 66°C | 72°C |
| 60 sec | 15 sec | 120 sec |

PCR を上記の温度サイクルで 30 サイクル行なった後、2% agarose ゲル (1X TAE) で PCR 産物を泳動し分離した。

1-3-6 PCR-RFLP による A3243G 変異型 mtDNA の解析

ミトコンドリア塩基番号 3243 位を含む遺伝子領域を増幅する primer の塩基配列を下記に示す：

Forward primer: 5'-TCA CCA GTC AAA GCG AAC TA-3'

Reverse primer: 5'-AGA AGA GCG ATG GTG AGA GC-3'

温度条件は以下のようになる：

| Denaturing | Annealing | Extension |
|------------|-----------|-----------|
| 94°C | 60°C | 72°C |
| 15 sec | 15 sec | 60 sec |

上記温度cycleを24 cycle (normal PCR, 28 cycles) 行った。PCRのlast cycleの直前で、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ をPCR tubeに加え(0.3 μCi / tube)、1 cycle (このcycleのみ次の温度条件：94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) 回しPCR産物を放射能ラベルし、オーバーナイトでPCR産物をApalで切断した後、6% 非変性アクリルアミドゲル (1X TBE)で30 mA, 95 min 泳動、分離した。泳動の終わったゲルをガラスプレートごと20 min、imaging plate (Fuji Film) に押し当て露出・感光させ、BAS-5000 (Fuji Film)でバンドの放射能の強度を測定し、細胞あたりのA3243G変異量を解析した。2SD-MiTenハイブリッド細胞のmtDNAの解析は通常のPCR-RFLP(polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism)後、2% agaroseゲル(1X TAE)で泳動を行なった。

<PCR 組成液>

| | |
|------------------------------------|--------------------------|
| 10X ExTaq buffer | 2.0 μl |
| dNTP | 1.6 μl |
| Forward primer (25 μM) | 2.0 μl |
| Reverse primer (25 μM) | 2.0 μl |
| Ex taq polymerase | 0.1 μl |
| DNA (200 or 400 ng) | - |
| ddH ₂ O | up to 20.0 μl |

< 1 X TBE 泳動 buffer >

Tris 21.6 g
Boric acid 11.0 g
EDTA 1.48 g (or 0.5 M EDTA 8 ml)
ddH₂O up to 2 L

< Loading buffer >

50% glycerol
1 mM EDTA
0.25% BPB
0.25% XC

Ex Taq polymerase (TaKaRa)

装置 :

スラブ電気泳動槽 (日本エイドー) NA-1110-1

泳動プレート 16cm X 16cm X 1mm (日本エイドー) NA-1100-1,2

1-4 実験結果

1-4-1 A3243G 変異によるミトコンドリア膜電位の低下

FACS 解析により行なった、2SD サイブリッド細胞のミトコンドリア膜電位とコントロールの 143B 細胞との比較結果を示す。2SD サイブリッド細胞のミトコンドリア膜電位 (left peak)はコントロールの 143B 細胞の膜電位 (right peak) に比べて明らかに低下しており (図 3A)、A3243G 点変異は、生物学的機能の低下、すなわち OXPHOS 機能としてのミトコンドリア機能不全を 143B 細胞核バックグラウンドでも引き起こし、病原性を有することが示された。

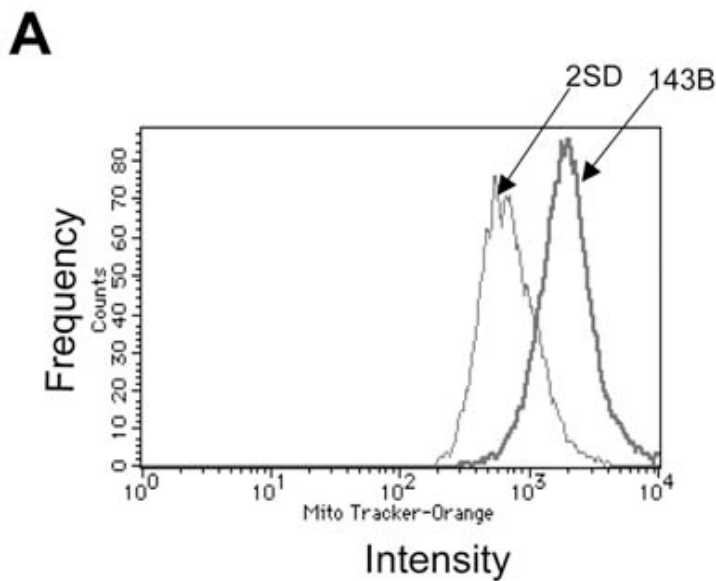


図 3A. MitoTracker Orange 染色後、FACS 法によりミトコンドリア膜電位依存性蛍光強度を 2SD サイブリッド細胞、その親細胞である 143B 骨肉腫細胞株とで比較解析した。2SD サイブリッド細胞では蛍光強度が 143B 細胞に比べ低下しており、ミトコンドリア膜電位の低下が認められる。

1-4-2 2SD-MiTen ハイブリッド細胞による予備実験の結果

2SD-MiTen ハイブリッド細胞は HAT を含有した complete DMEM で選択し、トリプシン処理後、バルクで回収した。Total DNA を 2SD-MiTen ハイブリッド細胞から抽出した後、PCR-RFLP を行ない、2% agarose ゲル(1X TAE)で泳動し、A3243G 変異型 mtDNA の相対量を調べた。その結果、バルクで培養したハイブリッド細胞内の A3243G 変異型 mtDNA の著しい減少を観察した(図 3B)。

この細胞融合実験で、Lesch-Nyhan 症候群患者由来の非腫瘍細胞である繊維芽細胞由来の核を含む細胞成分が MELAS サイブリッド細胞に導入されることにより、A3243G 変異型 mtDNA の減少が促されることが明らかになった。この予備実験で使用した Lesch-Nyhan 症候群患者由来細胞の X 連鎖変異が、実験結果に与えた影響を排除する為、この変異を持たない正常胎児肺由来繊維芽細胞である TIG-3-20 細胞と MELAS サイブリッド細胞とを融合させる実験を、次に施行することにした。

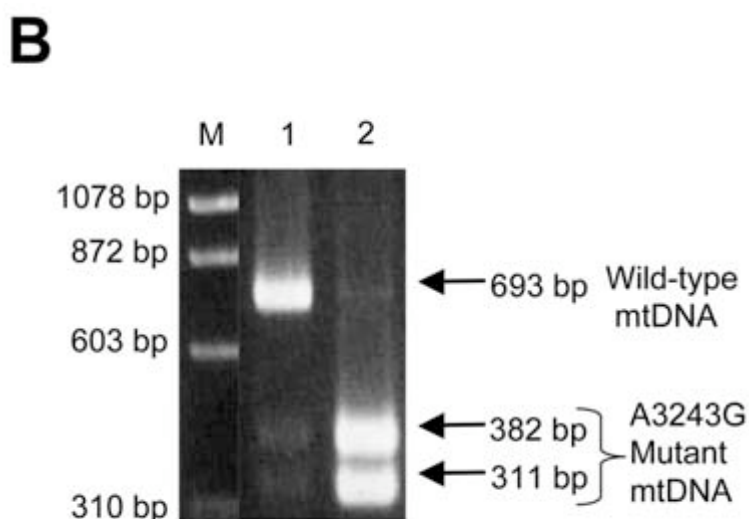


図 3B. MiTen 細胞 (Lesch-Nyhan 症候群患者由来繊維芽細胞)と 2SD サイブリッド

ド細胞とのハイブリッド細胞の mtDNA の変異量の解析。Lane M: 分子量マーカー、lane 1: 2SD-MiTen ハイブリッド細胞、lane 2: 2SD サイブリッド細胞、それぞれを示す。A3243G 変異型 mtDNA の著しい減少が lane 1 の 2SD-MiTen ハイブリッド細胞で観察された。

1-4-3 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の樹立

2SD^{hygro} サイブリッド細胞には hygromycin 耐性遺伝子が組み込まれているので、HAT 耐性の TIG-3-20 肺由来繊維芽細胞と融合させた 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞は hygromycin と HAT を含む選択培地で生存し、融合しなかった親細胞の TIG-3-20 細胞は hygromycin で、2SD^{hygro} サイブリッド細胞は TK (thymidine kinase 欠損)である為に HAT によって、それぞれ培地中で死滅した。2 週間後、選択培地中に 2 重薬剤耐性の 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞が出現し、コロニーを形成した。

2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞は complete DMEM の中で良く増殖したが、多くの非腫瘍細胞のように接触阻止能を獲得していた。細胞増殖は細胞がコンフルエント状態になると抑制された。図 4 は VNTR (variable number of tandem repeat) の一つである MCT118 のリピート長の増幅パターンによって細胞融合の成否を分析した結果を示している。6 つの全ての 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞クローンが上方の 2 本のバンドの存在を示すことから、2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の核成分は 2SD^{hygro} サイブリッド細胞と TIG-3-20 細胞株のそれぞれの親細胞由来であることを表し、このことは細胞融合が成功したことを示している。

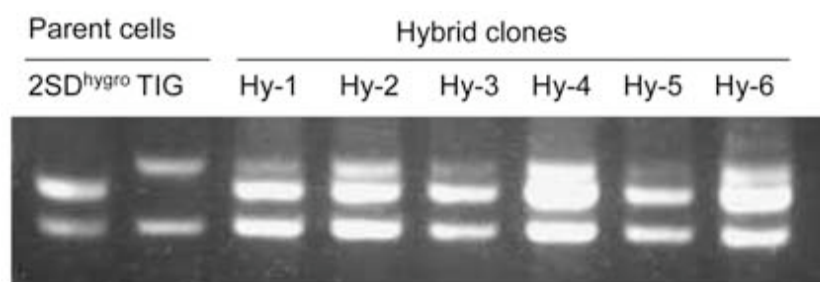


図 4. 核遺伝子マーカーMCT118 を用いたハイブリッド細胞の核型の解析。

MCT118 は VNTR の一つであり、親細胞株の核遺伝子多型の識別に使用した。

親細胞である 2SD^{hygro} サイブリッド細胞株と TIG-3-20 細胞株はそれぞれ 1 つの特異的な多型バンドを持ち、1 つのバンドを共有している。ハイブリッド細胞は 2SD^{hygro} サイブリッド細胞と TIG-3-20 細胞由来の多型バンドの 1 つずつ持つ。6 つのハイブリッド細胞クローン(Hy-1 to -6)の全てが、一番下の共通のバンドと親細胞由来の固有の 2 つのバンドを持ち、細胞融合したことが確認された。

1-4-4 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の mtDNA の解析

細胞内の A3243G 変異率の測定は、通常の PCR で形成されるヘテロデュプレックス (heteroduplex) による誤差を排除し、正確な変異率の定量を行う為、放射性ラベル PCR (last-hot cycle PCR) で解析を行なった。この PCR により 693 bp の領域が増幅される。mtDNA 塩基番号 3243 位の A から G への一塩基置換は変異型 mtDNA 上に新たな *Apal* サイトを作り出す。PCR 産物の *Apal* 処理により 382 bp と 311 bp の断片が生じる。経代初期 (Day 29) ではハイブリッド細胞クローンの Hy-4 (変異率 82.6%) 以外の全ての細胞クローンで野生型 mtDNA が優位に存在した(図 5A)。経代後期 (Day 115) では、全てのハイブリッド細胞クローンには A3243G 変異型 mtDNA が殆ど存在していないことが明らかになった(図 5B)。一方、コントロールとして長期経代培養していた 2SD^{hygro} サイブリッド細胞では A3243G 変異率に顕著な増減は無かった。

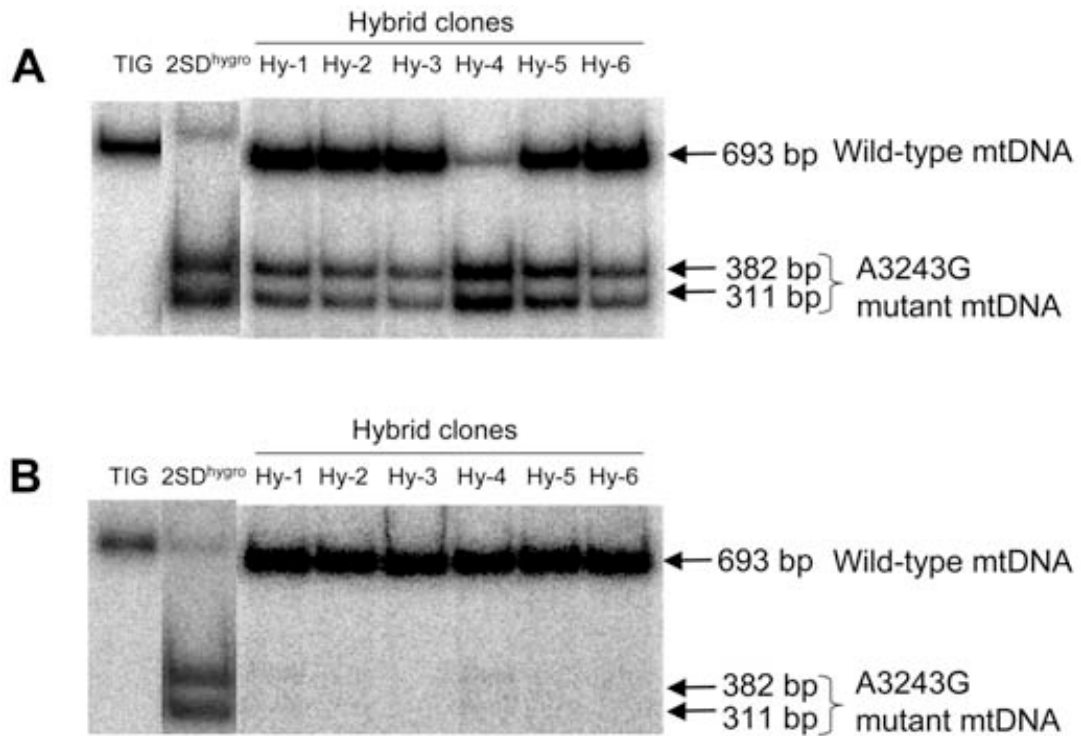


図 5. 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の last-hot cycle PCR による A3243G 変異型 mtDNA 量の解析。ハイブリッド細胞クローンの経代初期 (A) (3 passages) と経代後期 (B) (15 passages) での A3243G 変異型 mtDNA 量のレベルを示す。6 つのハイブリッド細胞クローン (Hy-1 to -6) はそれぞれ単一コロニーから分離された。経代初期と経代後期における *Apal* 切断バンドの強度の相違は、2 つの親細胞とハイブリッド細胞クローンでの A3243G 変異量の差異を反映している。

1-4-5 ハイブリッド細胞クローンの変異型 mtDNA の減少率

図 6 は、それぞれのクローンにおける A3243G 変異型 mtDNA の量的変化を計時的にモニターしたものである。115 日間、total DNA を 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞クローンから抽出し、last-hot cycle PCR で解析した。A3243G 変異

型 mtDNA の単位時間あたりの減少率(Δt)は各クローンで一定ではなく、変異率の高いクローン程 Δt は大きく、変異率の低いクローンで Δt は小さいこと示され、変異率は指数関数的に減少することが明らかになった。

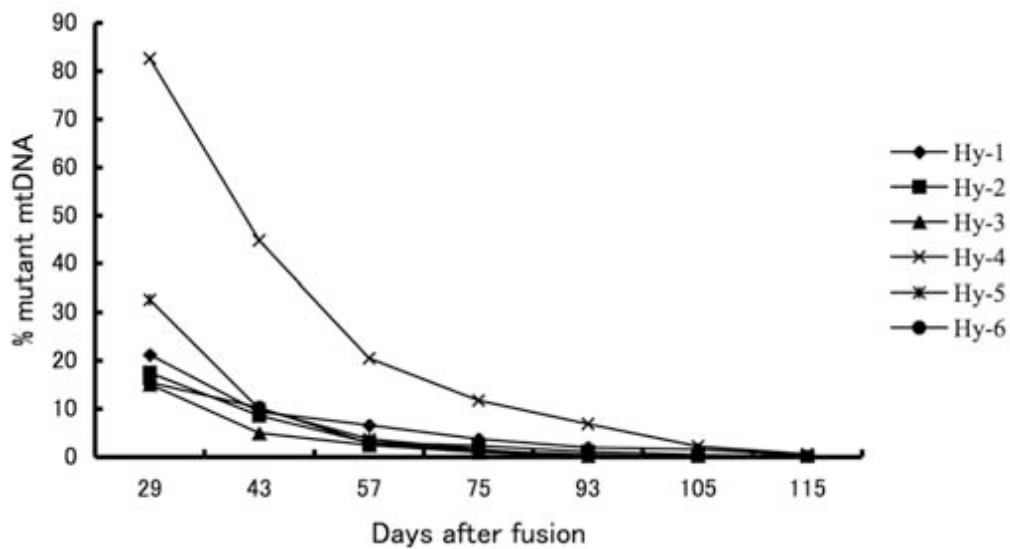


図 6. 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞クローンの A3243G 変異型 mtDNA を定量モニターしたもの。A3243G 変異型 mtDNA 量の百分率は last-hot cycle PCR にて 7 つの定量点 (Day 29, 43, 57, 75, 93, 105 and 115) 取り、測定した。

1-5 考察

今回の実験により、正常肺由来繊維芽細胞とミトコンドリア遺伝子 A3243G 病原性点突然変異を持つ骨肉腫由来サイブリッド細胞との細胞融合が A3243G 変異型 mtDNA の選択的な消失を引き起こすことが示された。15 経代後 (Day 115) では、2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞 6 クローン⁶の全てにおいて A3243G 変異型 mtDNA の殆ど完全な消失が起こった。今回の実験で使用した同じ A3243G 変異型 mtDNA を保持する、骨肉腫細胞由来 MELAS サイブリッド細胞の長期培養は、A3243G 変異型 mtDNA 量の細胞内レベルの増加 (Yonada et al., 1992)、または野生型 mtDNA と変異型 mtDNA が細胞集団で 2 つに分離する stochastic segregation が起こることが報告されている (Shoubridge, 1995)。しかしながら、100 日以上¹⁰⁰のハイブリッド細胞の長期細胞培養で全く異なる現象、すなわちヘテロプラスミーの野生型 mtDNA への漸次的なシフトを本研究で観察した。これはヒト非腫瘍性繊維芽細胞の核を含む細胞成分の導入による骨肉腫細胞由来サイブリッド細胞の核バックグラウンドの改変により、A3243G 変異型 mtDNA が維持されなくなることを示唆している。

哺乳類の受精時において、ユビキチン化された父性ミトコンドリアの破壊に伴う、父性 mtDNA の選択的消失が報告されている (Sutovsky et al., 1999)。しかしながら、この mtDNA の消失は受精後、数十時間という短時間で起こるのに対し、本研究で見られた A3243G 変異型 mtDNA の消失はそれに比べゆっくりと進行し、少なくとも週単位の時間で起きる現象であった。このことから、サイブリッド細胞の核バックグラウンドの改変に伴う A3243G 変異型 mtDNA の消失現象では、受精時に観察されるものとは異なる消失メカニズムが作動していることが考えられる。

更にミトコンドリア同士はハイブリッド細胞では 2 週間で融合し、内容物を交換することが報告されている (Ono et al., 2001)。本実験の 2SD^{hygro}-TIG ハイブリッド細胞の変異率の計測では、このミトコンドリア融合が起こる 2 週間後以降も、A3243G 変異型 mtDNA の選択的且つ継続的な減少が続いた。もしミトコンドリアの破壊に伴う変異型 mtDNA の消失であれば、ミトコンドリア融合後に殆ど起こらなくなる筈である。それ故、導入された繊維芽細胞の細胞成分が MELAS サイブリッド細胞の A3243G 変異型 mtDNA を含むミトコンドリアを破壊し、消失に寄与しているという可能性は排除された。

私はハイブリッド細胞の A3243G 変異型 mtDNA の減少の一つの原因は、野生型 mtDNA と A3243G 変異型 mtDNA との複製機構または維持機構のメカニズムの差異にあるという仮説を立てた。ヒト mtDNA は ape mtDNA よりも優先して維持されることがヒトのサイブリッド細胞やハイブリッド細胞で報告されている (Morales et al., 1999)。この報告は、譬え病原性変異がヒト mtDNA に存在しても正常 ape mtDNA より、ヒト細胞核はヒト mtDNA に対して優先的に維持に働くことを示している。それ故、mtDNA の細胞内選択は機能的な mtDNA のハプロタイプに必ずしも依存していないことを意味している。恐らくヒト mtDNA 複製因子(群)は ape mtDNA よりも優先してヒト mtDNA に結合する為、その複製が進行するのに対し、ape mtDNA では複製プロセスがスムーズに進行しない為、維持されず徐々に分解し、消失するのであろう。

A3243G 変異によって mtDNA への親和性が大きく影響を受けるような、A3243G 変異型 mtDNA の選択におけるデターミナントとしての mtDNA 複製に関与する因子が存在する可能性がある。

ミトコンドリア転写終結因子 (mitochondrial transcription termination factor; mTERF) は、A3243G 変異がまさに存在する、ミトコンドリア転写終結に必須

な 13 塩基対の配列 (tridecamer sequence) に結合することが知られている (Christianson et al., 1988)。A3243G 変異は *in vitro* で結合配列に対する mTERF の親和性の障害、そして転写終結不全を引き起こし、2つのミトコンドリア rRNA (12S, 16S rRNA)の適切な合成の障害を結果的に惹起することで、MELAS の発症原因となっている可能性が挙げられた (Hess et al., 1992)。一方、MELAS サイブリッド細胞や死亡した MELAS 患者の剖検組織で、ミトコンドリア転写物を解析した研究では、ミトコンドリア rRNA の合成は適切に行なわれていることが判明し、以前考えられていたような重大な mTERF の親和性の障害は起こっていないことが判った(Chomyn et al., 1992; Kaufmann et al., 1996)。この為、mTERF の結合配列に対する親和性または転写終結不全は *in vivo* では何らかのメカニズムによって代償されていると考えられる。しかしながら、mTERF の結合配列への親和性の障害による完全な転写終結が行なわれていないことに起因すると考えられた、RNA19 と呼ばれるプロセッシングが途中で停止したような RNA 転写物(16S rRNA+ tRNA^{Leu(UUR)}+ND1 遺伝子)が、A3243G 変異型 mtDNA を持つサイブリッド細胞で同定されている(King et al., 1992)。

mTERF の主要な機能は、ミトコンドリア転写制御システムにおける、ミトコンドリア rRNA の合成の為の転写終結であると信じられている。しかしながら、mTERF は転写調節に参加しているだけでなく mtDNA 複製における制御機能を有し、ヒト mtDNA において複製停止現象を引き起こすことが示唆されている (Hyvarinen et al., 2007)。

本研究では、非腫瘍性の正常組織由来の繊維芽細胞の核を含む細胞成分を 143B 骨肉腫由来サイブリッド細胞に導入することにより、A3243G 変異型 mtDNA が消失することを報告した。私は、正常繊維芽細胞 TIG-3-20 との細胞融合後、野生型 mtDNA の mTERF 結合配列への何らかの細胞内因子による

mTERF の結合阻害などにより、複製関連因子の適合性が変化し、A3243G 変異型 mtDNA とは異なって野生型 mtDNA が優先的に複製、維持されているのではないかと仮説を立てている。この mTERF が A3243G 変異型 mtDNA の変異率の変化に寄与している複製調節因子である、という仮説は MELAS サイブリッド細胞のみならず A3243G 変異型 mtDNA を持つ MELAS 患者の細胞内でのヘテロプラスミーの増減を説明するものであるとして、現在、その可能性を考えている。

第二章では、mTERF が A3243G 変異型 mtDNA の細胞内選択に影響しているデターミナントであるか検証し、また mtDNA 複製機構に与える mTERF の影響を解析する。

第二章 mTERF の mtDNA 複製における機能の検証

2-1 序論

2-1-1 mTERF の想定されている機能

ミトコンドリア内には独自の転写システムが存在し機能している。この中で重要なのは転写開始と転写終結であるが、16S rRNA と tRNA^{Leu(UUR)}との境界付近に存在する DNA 配列に対する親和性に依存する、HeLa 細胞のライセートから抽出した分画が精製された (Kruse et al., 1989)。この分画に存在するタンパク質である mitochondrial transcription termination factor (mTERF)は、mtDNA の H 鎖転写開始プロモーター (HSP1; H1 サイト) と前述の 16S rRNA と tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子との境界付近に存在する 28 bp の配列に結合することが知られ、迅速で効率的な 2 種類のミトコンドリア rRNA (12S rRNA、16S rRNA) の合成に重要な役割を果たしていると考えられている。DNA 配列に変異を導入する実験により、mTERF 結合配列内の 13 bp の配列 (tridecamer sequence) が転写終結に必須であることが判明した (Christianson et al., 1988)。

一分子の mTERF が H1 サイトと転写終結配列に同時に結合することにより、DNA のループを形成し、RNA ポリメラーゼや他の転写因子がこの挟まれた領域に結合・解離して再利用されながら、シャトルし転写することにより、積極的なミトコンドリア rRNA の合成が行なわれるとされ(図 7)、この DNA ループは電子顕微鏡で観察されている(Martin et al., 2005)。しかし、HaLa 細胞ライセートから精製された mTERF は H1 サイトに結合出来たが、リコンビナント mTERF

は出来ないことから、翻訳後修飾または他の補欠分子存在が mTERF の H1 サイトへの結合に必要なのではないかと考えられる。

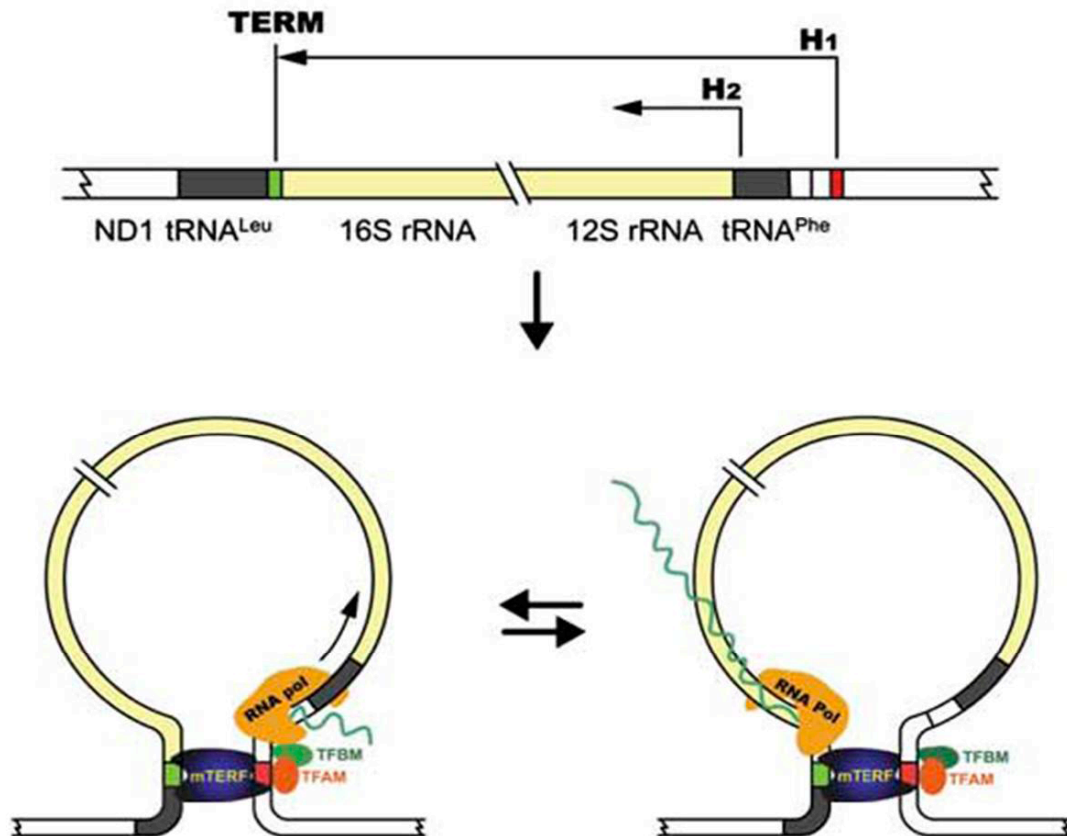


図 7. 提唱されている mTERF が形成する rDNA ルーピングのモデル図。mTERF は HSP1 (H1 サイト) と転写終結サイト (TERM) に同時に結合して DNA ループを形成する。なお、H1 サイトからの転写はミトコンドリア rRNA 合成に使用され、HSP2 (H2 サイト) は mtDNA 全周に渡るポリシストロニックな転写物の合成に用いられる。mtDNA の転写には RNA ポリメラーゼ (オレンジ) と TFAM (mitochondrial transcription factor A) が必要である。mTERF は転写因子群の再利用を促進する rDNA ループの形成に寄与している (Martin et al., 2005 より)。

また、MELAS の主要な病因となっている、 $\text{tRNA}^{\text{Leu(UUR)}}$ 遺伝子に存在する A3243G 変異は *in vitro* で、mTERF の転写終結配列に対する結合を弱めることが報告されている (Chomyn et al., 1992)。また、*in vitro* 転写系で A3243G 変異の転写終結への影響を調べたところ、転写終結障害が認められている (Yakubovskaya et al., 2010)。しかしながら、この A3243G 変異は生細胞における mRNA に対するミトコンドリア rRNA の割合には影響を与えなかった (Chomyn et al., 1992)。この為、この mTERF の結合配列への親和性障害、また転写終結不全は何らかのメカニズムで *in vivo*、すなわち生細胞では代償されていると考えられている。

近年になって、mTERF は考えられていた従来の転写調節機能のほかに複製調節機能を持つことが示唆されている。 $\text{tRNA}^{\text{Leu(UUR)}}$ 遺伝子内に存在する canonical な mTERF 結合配列への mTERF の結合は、その付近における strand-coupled 型複製反応の停止現象を引き起こす、とされている (Hyvarinen et al., 2007)。更に新たな mTERF 結合サイトは non-coding 領域と ND1 遺伝子内に見つかり、従来考えられていた結合配列への結合よりも弱い、mTERF が過剰発現させた系において複製停止を起こすことが示されている。

mTERF は、複製システムと転写システムの両方のマシーナリーの衝突を回避することで、ミトコンドリア・ゲノムの不安定性を最小限に抑える為の複製停止システム内で機能している因子の一つと考えられている (Hyvarinen et al., 2007)。

2-1-2 mTERF タンパク質と DNA との分子相互作用

最近になり、mTERF タンパク質と二重鎖 DNA との結合状態が、結晶構造解析により、詳細が明らかになった (図 8)。

その結果、従来考えられていたように mTERF は、分子内に存在するロイシンジッパーを介して DNA と結合するのではないことが分かった。結合の際、二重鎖 DNA は mTERF タンパク質表面の正に荷電した溝に沿って結合し、mTERF タンパク質は DNA のメジャーグループ（主溝）に結合する。

また mTERF は僅かに DNA を湾曲させ（ 25° ）、二重螺旋を巻き戻し、3つのヌクレオチド（L 鎖の A3243、H 鎖の T3243 と C3242）をめくり返す作用があることが報告された。この塩基のめくり返し（*eversion*）は DNA 配列への安定した結合に必要なものであると考えられており、mTERF の結合が塩基配列特異的であることを強く支持している。

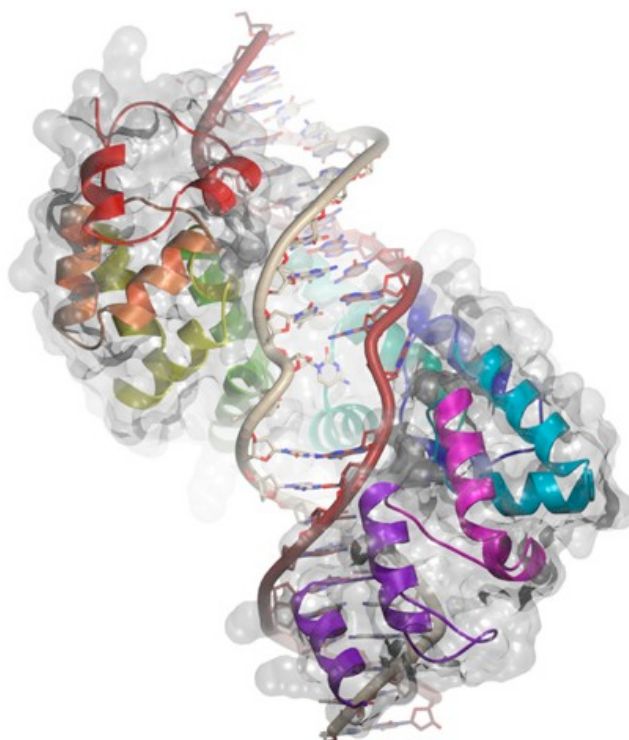


図 8. mTERF タンパク質と mtDNA との分子相互作用の全体像。L 鎖は茶色で、H 鎖は灰色で表している。分子の表面は透明にしてある（Yakubovskaya et al.,2010 より）。

2-1-3 mtDNA の複製

現在、哺乳類の mtDNA 複製では 2 つの提唱されているモデルが存在する (図 9)。mtDNA の複製は、1982 年に strand-asynchronous 型複製モデルが提唱され、H 鎖、L 鎖の 2 つの複製開始点 (O_H , O_L) から時間差をもって複製が開始されると考えられて来た (Clayton, 1982)。Strand-asynchronous 型複製モデルでは、 O_H から開始される新生 H 鎖の合成が一定方向から始まる。軽鎖プロモーター (LSP) からの転写イベントは O_H からの複製反応に必要な primer を生成する。H 鎖の複製がゲノムの 3 分の 2 に達すると O_L からの新生 L 鎖の複製反応が逆方向から開始される (Hixson et al., 1986)。H 鎖、L 鎖の両方の鎖の合成は異なる場所から開始され、複製反応が進行するもので、mtDNA の複製は約 2 時間で完了し (Clayton, 1982)、一般的な DNA 複製反応と異なりラッキング鎖 (lagging 鎖) を形成しない。

2000年にHoltらは、二次元電気泳動法を用いたmtDNAの複製中間体の研究成果から、核DNAと同様な複製バブルを伴うstrand-coupled型のmtDNA複製機構を提唱した(Holt et al., 2000)。このstrand-coupled型複製モデルでは古典的なリーディング鎖(leading鎖)とラッキング鎖を伴う複製フォークの形成が起こる。この複製モデルがこのように行なわれているとすると、ラッキング鎖の形成に使用されたprimerを除去する為のprimaseが必要であるが、現時点では同定されていない。

恐らく、この2つの複製モデルが存在するのだと現在考えられている。すなわち定常状態ではstrand-asynchronous型複製が主体であり、一方、mtDNAを急速に合成しなくてはならない場合 (mtDNA欠乏時など) はstrand-coupled型複製が主体になるのであろうというのが、一般的な考え方である。

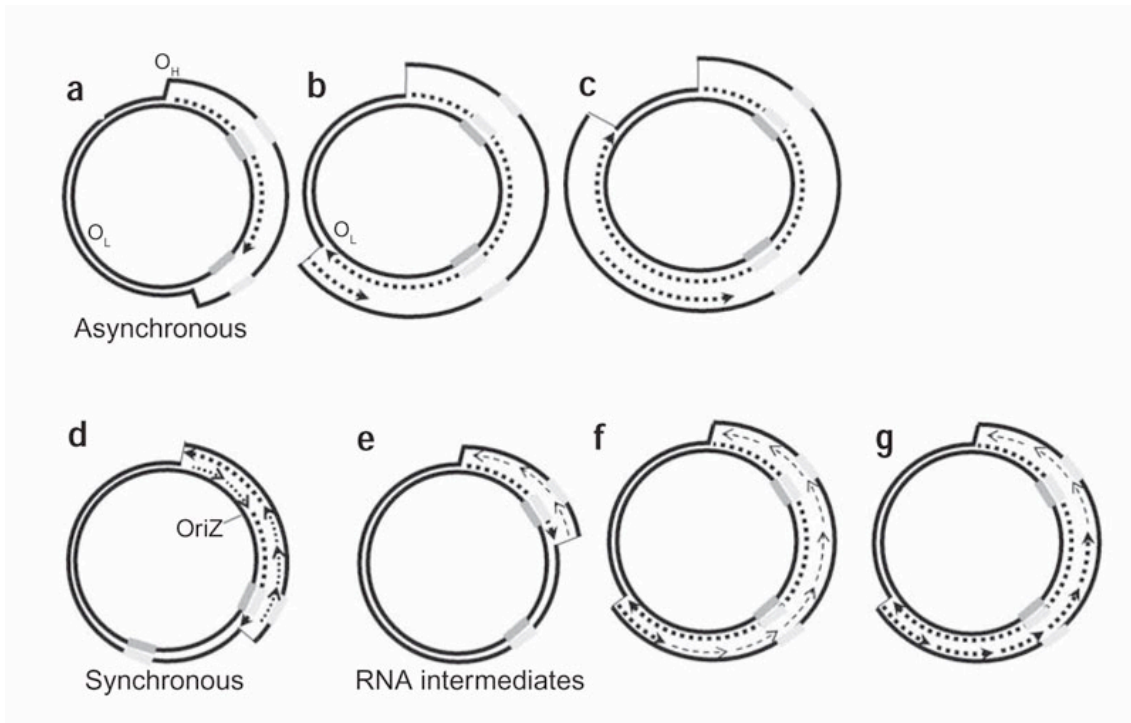


図 9. 2 種類の mtDNA 複製モデル。mtDNA 上には H 鎖と L 鎖の 2 つの複製点 (O_H , O_L) が存在する。a,b,c は strand-asynchronous 型複製を示している。 O_H から H 鎖の複製が始まり、全体の 3 分の 2 ほど進んだ後で、初めて O_L からの L 鎖の複製が反対向きに始まる複製モデルである。d,e,f,g は strand-coupled 型複製を示す。この複製モデルでは O_H , O_L に限定せずに、mtDNA のあらゆる場所で複製反応が始まる ($OriZ$)。一方の DNA 鎖はリーディング鎖として合成され、もう一方は短い RNA 中間体 (RNA intermediates) が合成された後、DNA 合成が行なわれる複製モデルである (Holt et al., 2000 より)。

2-2 実験目的

本研究では、**A3243G** 変異型 **mtDNA** の細胞内の量的変動に関わる因子の同定、その分子機構メカニズムの解明を行なう為、第一章で可能性が考えられた **mTERF** に焦点を当てた。

哺乳類細胞発現ベクターに組み込んだ **mTERF** 遺伝子を **MELAS** サイブリッド細胞に導入し、**mTERF** を発現亢進させ、**A3243G** 変異率の変動に関与している因子であるかを解析し、また、正常細胞の内在性 **mTERF** 遺伝子発現を **siRNA** にてノックダウンし、細胞内の **mtDNA** 複製機構における **mTERF** の機能の解明することを本研究の旨とした。

2-3 実験方法

2-3-1 ミトコンドリア・タンパク質の抽出

PBS(-)に最終濃度 1%となるように Triton X-100 を加え、ミトコンドリア・タンパク質抽出用 lysis buffer (遮光保存) とし、protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) を加え、実験に使用した。培地の除去後、PBS(-)で洗浄し、約 10^6 個の細胞が生育している 10 cm ディッシュに、この氷冷した lysis buffer を 100 μ l 加え、セルスクレイパーで掻き取り、良くサスペンドしマイクロチューブに回収、氷上に 30 min インキュベートした後、14,000 g で 20 min 遠心し、上清を回収、ミトコンドリア・タンパク質を含むタンパク質抽出液として用いた。タンパク質抽出液は、総タンパク質の濃度定量後、20 μ l ずつ分注し、液体窒素でスナップフリーズした後、-80°Cで保存し、適宜解凍し western blot に使用した。

2-3-2 総タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度の測定は、protein assay solution (Bio-Rad) により Bradford 法で既知の濃度の BSA 溶液で検量線を作成し、行なった。

Protein assay solution (Bio-Rad)

装置：分光光度計 (島津製作所)

2-3-3 Western blot

タンパク質 20 μ g に 2X Laemmli サンプル buffer を加えた後、全容量の 1/10 の量の β -mercaptoethanol を加え、95°C、10 min ボイルし、タンパク質を変成させた。その後、10% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行ない、サンプルバンドを含むゲルを適当な大きさに切り出し、切り取ったゲルを semi-dry blotting buffer に浸して、室温で 5 min 振盪し洗浄した。その後、semi-dry 式 blotter を使用し、ゲル内のタンパク質のメンブレンへのトランスファー [ゲルの面積 (cm^2) X 2 mA、60 min]を行なった。メンブレンはニトロセルロース・メンブレンを使用した。タンパク質がトランスファーされたメンブレンを TBS-T で 15 min、室温で振盪し洗浄し、その後 TBS-T with 5% skim milk に浸し、60 min 室温でシェイカーにて振盪しながらブロッキングを行なった。ブロッキング後のメンブレンを一次抗体（抗 mTERF rabbit 抗体 4000 倍希釈、抗 β -actin mouse 抗体 5000 倍希釈）を加えた TBS-T with 5% skim milk に浸し、4°Cの低温室にてオーバーナイトで振盪した。抗原抗体反応後、メンブレンを TBS-T with 5% skim milk で洗浄（0 min X2, 20 min X2）後、HRP-conjugated 2 次抗体（抗 mouse、抗 rabbit 抗体、4000 倍希釈）を TBS-T with 5% skim milk に加え、室温で一時間、2 次抗体を反応させた。その後 TBS-T で洗浄し（20 min X2）、メンブレンを ECL solution に 5 min 浸し、LAS-1000 plus (Fuji Film)で化学発光を検出した。

<2X Laemmli サンプル buffer>

| | |
|------------------------|------|
| 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) | 2 ml |
| 10% SDS | 4 ml |
| Glycerol | 2 ml |
| 1% BPB | 数滴 |

ddH₂O up to 10.0 ml

< 10 ml stacking ゲル >

| | |
|-------------------------|---------------|
| 0.5 M Tris-HCl (pH 6.5) | 2.5 ml |
| 30%アクリルアミド溶液 | 1.5 ml |
| 10% SDS | 0.1 ml |
| 10% APS | 0.1 ml |
| TEMED | 5.0 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>5.8 ml</u> |
| | 10.0 ml |

< 20ml 分離ゲル >

| | |
|-------------------------|---------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8.8) | 5 ml |
| 30%アクリルアミド溶液 | 6.7 ml |
| 10% SDS | 0.2 ml |
| 10% APS | 0.2 ml |
| TEMED | 10 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>7.9 ml</u> |
| | 20.0 ml |

< 10X Semi-dry blotting buffer >

| | |
|--------------------|----------|
| Tris | 29.1 g |
| Glycine | 14.6 g |
| 10% SDS | 18.8 ml |
| ddH ₂ O | 481.2 ml |

< 1X Semi-dry blotting buffer >

| | |
|------------------------------|-----------|
| 10X Semi-dry blotting buffer | 100 ml |
| MeOH | 200 ml |
| ddH ₂ O | up to 1 L |

< 10X TBS >

| | |
|-----------------------|--------|
| NaCl | 80.0 g |
| Tris (200 mM, pH 8.0) | 24.2 g |
| ddH ₂ O | 1 L |

< 1X TBS-T >

| | |
|--------------------|--------------|
| 10X TBS | 50.0 ml |
| 20% Tween-20 | 5.0 ml |
| ddH ₂ O | up to 500 ml |

ニトロセルロース・メンブレン[Hybond-ECL(pore size 0.22 μm),GE healthcare]

抗β-actin mouse monoclonal 抗体 (Sigma)

抗 mTERF rabbit monoclonal 抗体 (Invitrogen 社によるカスタムメイド、Finland, University of Tampere, Howard T. Jacobs 博士より供与。認識アミノ酸配列 : CSNDYARRSYANIKE、濃度 1 mg/mg)

抗 mouse, rabbit HRP-conjugated 2 次抗体 (GE healthcare)

ECL solution (Immobilon、Millipore)

装置 : Blotter (Trans-Blot SD、Bio-Rad)

2-3-4 mTERF 遺伝子発現ベクターの作製と変異率の解析

2SD サイブリッド細胞がコンフルエンス 90%で生育している 15 cm ディッシュ 1 枚分に ISOGEN (Nippon gene) 溶液を加えて、total RNA を抽出し、RNA 1 µg から 1 step RT-PCR kit (Invitrogen) にて mTERF 遺伝子 coding sequence (CDS)の double-stranded DNA (dsDNA)を合成した。Forward primer には Kozak 配列を組み込み、導入した外来性 mTERF 遺伝子の発現効率を高めるようにした[Kozak 配列での開始コドン atg の次の塩基は通常プリン(A/G)となっており、この場合はシトシン(C)であるが、発現効率は大きく変わらない]。使用した 5'上流配列 forward primer 配列を示す :

5'-GC**GGATCC**GCCACC**atg**cagagccttccttaggacaaacaag-3'

*Bam*HI Kozak 配列

また以下に reverse primer complimentary 配列を示す :

5'-ctaaattgaaaaagttaagcagatttgcc**taa**CTCGAGCGC-3'

*Xho*I

小文字で書かれた配列は本来の mTERF 遺伝子の CDS を示し、大文字で書かれた配列は primer に組み込まれた人工配列を示す。Forward primer 配列 5'末の 5'-GC-3'、reverse primer complimentary 配列 3'末の 5'-CGC-3'は、これら 2 種

類の primer 同士の結合を防ぎ、また制限酵素の切断効率を高める為のものである。赤字の **atg** は開始コドン、**taa** は終止コドンを示す。RT-PCR により増幅された dsDNA の 5'末には **Bam**HI、3'末には **Xho**I 制限酵素認識配列がそれぞれ存在することになる。1 step RT-PCR の条件は以下のようなになる：

< 1 step RT-PCR >

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| 2X Reaction Mix | 25.0 μ l |
| Template RNA (1 μ g) | - |
| Forward primer (10 μ M) | 1.0 μ l |
| Reverse primer (10 μ M) | 1.0 μ l |
| Super Script III RT | 1.0 μ l |
| ddH ₂ O | up to 50.0 μ l |

RT (Reverse Transcription)

55°C 30 min → 95°C 2 min (reverse transcriptase inactivation)

↓

PCR

94°C 15 sec → 55°C 30 sec → 68°C 90 sec (40 cycles)

↓

Final extension

68°C 5 min

この RT-PCR により、開始コドンから終止コドンまでの mTERF 遺伝子 CDS 領域 (1200 bp) が増幅される。この PCR 産物を制限酵素 **Bam**HI、**Xho**I で切断

し、両端が 5'末突出の blunt end を持つようにする。次に詳細な手順を示す。

RT- PCR 産物を 0.8% agarose ゲルで泳動し、サイズ長と単一のバンドであることを確認した後、カラム精製 (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) し、mTERF dsDNA 以外の不純物を除去した。以下、カラムからの溶出には 32 μ l の ddH₂O を使用した(カラムからの溶出量は約 30 μ l である)。その後 mTERF dsDNA をインサートとして *Xho*I 制限酵素処理する。

<インサート DNA の *Xho*I による切断>

| | |
|------------------------------|--------------------|
| <i>Xho</i> I (10 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| 10X High buffer | 2.0 μ l |
| RT-PCR 産物(1 μ g) | - |
| ddH ₂ O | up to 20.0 μ l |

オーバーナイト (約 12 hours) で酵素切断反応を行なった。同様に、サイブリード細胞に導入する哺乳類細胞発現ベクターである pcDNA3.1/neo (Invitrogen)の *Xho*I による切断反応を 37°C、オーバーナイトで行なう。

<pcDNA3.1/neo の *Xho*I 切断反応>

| | |
|------------------------------|--------------------|
| <i>Xho</i> I (10 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| 10X High buffer | 2.0 μ l |
| pcDNA 3.1/neo (1 μ g) | - |
| ddH ₂ O | up to 20.0 μ l |

*Xho*I 処理サンプルを 65°C、10 min で熱処理し、*Xho*I を失活させ、カラム精製した。また pcDNA 3.1 ベクターの *Xho*I の切断後、1% agarose (1X TAE)ゲルでサンプルを 1 μl 泳動しベクターの完全切断を確認した。泳動サンプルの組成は以下のようなになる：

<*Xho*I 切断ベクター泳動サンプル組成>

| | |
|------------------------------|---------------|
| 10X High buffer | 0.8 μl |
| <i>Xho</i> I 処理 pcDNA3.1/neo | 1.0 μl |
| 10X loading buffer | 2.0 μl |
| <u>ddH₂O</u> | <u>8.2 μl</u> |
| | 12.0 μl |

<コントロール・ベクター泳動サンプル組成>

| | |
|-------------------------|---------------|
| 10X High buffer | 1.0 μl |
| Uncut pcDNA3.1/neo | 1.0 μl |
| 10X loading buffer | 2.0 μl |
| <u>ddH₂O</u> | <u>8.0 μl</u> |
| | 12.0 μl |

次に *Bam*HI による *Xho*I 処理済み pcDNA3.1/neo の切断反応を 50 μl の反応系を使用し行なった。

<pcDNA3.1/neo の *Bam*HI 切断反応>

| | |
|----------------------------|---------|
| <i>Xho</i> I 処理済み pcDNA3.1 | 30.0 μl |
|----------------------------|---------|

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 10X K buffer | 5.0 μ l |
| <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>14.0 μl</u> |
| | 50.0 μ l |

切断反応は 37°C、オーバーナイトで行なった。

*Bam*HI 切断処理サンプルを 65°C、10 min で熱処理後、カラムで精製し、*Bam*HI、*Xho*I で切断され線状化した pcDNA3.1 の両端の blunt end を、熱失活性アルカリフォスファターゼで脱リン酸化処理した。

<pcDNA3.1/neo ベクターの脱リン酸化>

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| 切断済み pcDNA3.1/neo | 30.0 μ l |
| TSAP (1U / μ l) | 1.0 μ l |
| MULTI-CORE 10X buffer | 5.0 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>14.0 μl</u> |
| | 50.0 μ l |

上記の反応液を 37°C、10 min でインキュベートした。pcDNA3.1/neo の 5'突出 blunt end の脱リン酸化処理後、反応液全量 (50 μ l) に 74°C、15 min の熱処理を加え TSAP を失活させた。その後カラム精製し、- 20°Cで保存した。

次に *Xho*I で処理したインサート DNA を *Bam*HI にて 37°C、オーバーナイトで切断した。

<インサート DNA の *Bam*HI 切断反応>

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| インサート DNA | 30.0 μ l |
| 10X K buffer | 5.0 μ l |
| <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l) | 1.0 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>14.0 μl</u> |
| | 50.0 μ l |

*Bam*HI 切断反応後、酵素を熱失活させ、カラムで精製した。 *Bam*HI、 *Xho*I でそれぞれ切断し、脱リン酸化した pcDNA3.1/neo とインサート DNA とのライゲーション反応を Mighty Mix (TaKaRa) を使用し行なった。

<ライゲーション反応>

| | |
|-----------------------|-------------------------------|
| 脱リン酸化 pcDNA3.1(50 ng) | 6.0 μ l |
| インサート DNA (90 ng) | 4.0 μ l |
| <u>Ligation Mix</u> | <u>10.0 μl</u> |
| | 20.0 μ l |

4°Cの低温室にヒートブロックを持ち込み、ライゲーション反応液に 16°C、30 min の処理を行なった。

ライゲーション反応液をカラム精製した後、インサートが組み込まれた pcDNA3.1/neo コンストラクト(10 ng)を大腸菌(DH5 α 株)コンピテントセルに導入し、トランスフォーメーションを行なった。多数のコロニーが生育しているデイッシュからコロニーを 2 つピックし、それぞれ大量培養し、コンストラク

トを Plasmid midi kit (Qiagen)で精製した。この2種類のコンストラクト(pTER1、pTER2)をシーケンシングにて Kozak 配列、mTERF 遺伝子の open reading frame (ORF)の配列を確認し、Kozak 配列、ORF が精確にベクターに組み込まれているコンストラクト (pTER2)を遺伝子導入実験に用いた。pTER2 のサイブリッド細胞への導入は Lipofectamine PLUS (Invitrogen)を用いてリポフェクション法で行なった。2週間、G418 (0.8 mg/ml)で細胞選択を行ない、コントロールとして pcDNA3.1/neo、そして pTER2 を導入した細胞が生息しているディッシュから出現した G418 耐性細胞のそれぞれ 10 クローンを、マイクロピペットに装着した滅菌済みのイエローチップの先端で掻き取って採取し、98-well plate へ播いて、最終的に 10 cm ディッシュで経代培養した。Day 42 に薬剤耐性サイブリッド細胞クローンから total DNA を採取し、細胞クローンごとに PCR-RFLP を行なった後、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent technologies)でバンドの定量・解析をし、クローンごとの変異率を算出した。

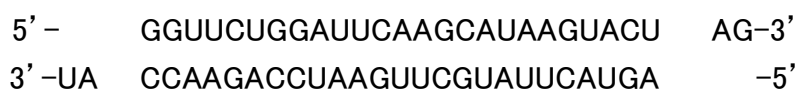
2-3-5 siRNA による mTERF 遺伝子発現のノックダウン

mTERF に対する siRNA(short interfering RNA)を Lipofect AMINE 2000 (Invitrogen)を使用し、正常2倍体繊維芽細胞株 TIG-3-20 に導入、内在性 mTERF 遺伝子の発現をノックダウンし、その後5日間のうち Day 0、Day 2、Day 3、Day 4 そして Day 5 での mtDNA の細胞あたりのコピー数を定量 PCR(q-PCR)で定量した。

mTERF に対する siRNA の作成は iGENE 社 (つくば市) に依頼し、mTERF mRNA のシーケンス (GenBank accession No: NM__006980) への高活性 dsRNA を活性予測アルゴリズムにて設計・合成した。siRNA の効果が高いと予測されたターゲット配列 (センス鎖) は次のようになった。

| ポジション(ORF 内の位置) | ターゲット配列(センス鎖) | 活性予測値順位 |
|-----------------|---------------------------|---------|
| 1050 | GGUUCUGGAUUCAAGCAUAAGUACU | 1 |
| 213 | AAAUGAGGACCUACUGAAAAACUUA | 2 |
| 913 | UGUACUGAAGAAGAGGUACAGAAGU | 3 |
| 338 | CCAAAGGAGCUAGCAAAGAAGUGAU | 4 |
| 908 | UUGGAUGUACUGAAGAAGAGGUACA | 5 |

この中から、ポジション 1050 をターゲットとする、以下のオーバーハング末端を持つ dsRNA を合成した。



TIG-3-20 を 6-well plate に 10^5 個/well の密度で播き、この細胞を siRNA (最終濃度 40 nM) で 5 日間処理、total RNA 及び DNA を抽出した。

2-3-6 mTERF 発現のノックダウンの確認・定量

Total RNA を用いて、RNAi による mTERF の発現量の減少を確認、定量を行った。mTERF と内在性コントロール遺伝子の 18S rRNA の発現定量は TaqMan® Gene Expression Assays(Applied Biosystems)を用いて TaqMan probe 法で定量 PCR(q-PCR)を行なった。

<q-PCR 反応液 (TaqMan probe 法) >

2X Master Mix 12.5 μ l

20X primer probe 1.25 μ l

Template cDNA -
ddH₂O up to 25.0 μl

※Template cDNA は total volume の 1/10 以下が好ましい。

温度条件は以下のようなになる：

| | | | |
|------|--------|--------------------|---|
| 50°C | 2 min | step 1 | |
| 95°C | 10 min | step 2 | |
| 95°C | 15 sec | step 3 (40 cycles) | } |
| 60°C | 1 min | | |

2-3-7 細胞あたりの mtDNA 量の定量

siRNA でノックダウンした TIG-3-20 から抽出した total DNA を用いて、mtDNA の細胞あたりのコピー数に与える影響を解析した。定量にあたり、そのままの DNA 濃度は高いので、10 倍希釈する。希釈した Day0 (siRNA 導入開始) の total DNA を使用し検量線を作製し、18S rRNA 遺伝子に対する mtDNA の相対量を q-PCR で解析した。

使用した mtDNA (np.3212-3319)、18S rRNA を増幅する 2 組の primer 配列は次のようになる：

<mtDNA>

Forward primer: 5'-CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT-3'

Reverse primer: 5'-TGG CCA TGG GTA TGT TGT TAA-3'

< 18S rRNA >

Forward primer: 5'-TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC-3'

Reverse primer: 5'-CGC TGA GCC AGT CAG TGT-3'

< 検量線 >

| | | | | |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 10 倍希釈 TIG3-20 DNA (Day 0) | 1.0 μ l | 2.0 μ l | 4.0 μ l | 8.0 μ l |
| Forward primer (5 μ M) | 1.0 μ l | 1.0 μ l | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| Reverse primer (5 μ M) | 1.0 μ l | 1.0 μ l | 1.0 μ l | 1.0 μ l |
| 2X SYBR Premix Ex Taq | 12.5 μ l | 12.5 μ l | 12.5 μ l | 12.5 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>9.5 μl</u> | <u>8.5 μl</u> | <u>6.5 μl</u> | <u>2.5 μl</u> |
| | 25.0 μ l | 25.0 μ l | 25.0 μ l | 25.0 μ l |


< q-PCR 反応液 >

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| Template DNA(10 倍希釈) | 2.0 μ l |
| Forward primer (5 μ M) | 1.0 μ l |
| Reverse primer (5 μ M) | 1.0 μ l |
| 2X SYBR Premix Ex Taq II | 12.5 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>8.5 μl</u> |
| | 25.0 μ l |

温度条件は以下のようなになる：

| | | |
|------|--------|----------------------|
| 95°C | 10 sec | Step 1 |
| 95°C | 5 sec | } Step 2 (50 cycles) |
| 60°C | 34 sec | |

95°C 15 sec
60°C 1 min
95°C 15 sec



Step 3

q-PCR を実行する装置は Smart cycler II system (Cepheid 社)を使用した。

2-4 実験結果

2-4-1 RNAi による mTERF 発現量の減少

TIG-3-20 正常 2 倍体細胞の内在性 mTERF 発現を、siRNA の導入でノックダウンし、mTERF の発現量に与える影響を定量した(mean±S.E.M. n=3)。RNAi により mTERF 発現量は q-PCR により、siRNA 未処理のコントロールに比べて、約 30%まで低下していることが判明した (図 10)。

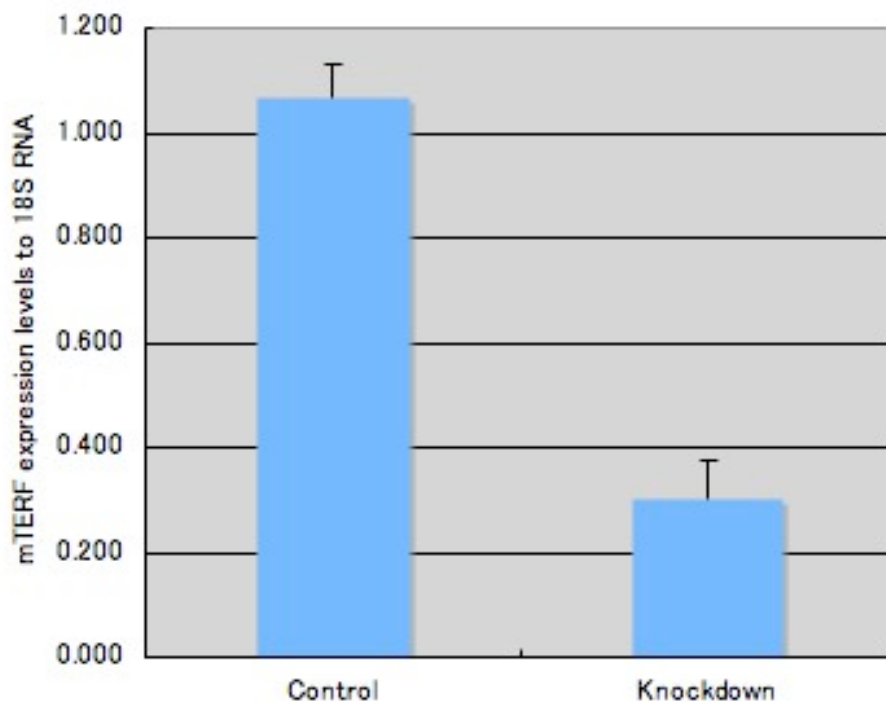


図 10. TIG-3-20 における RNAi による内在性 mTERF 発現の抑制。

2-4-2 mTERF のノックダウンに伴う mtDNA 量の増加

Day0 に siRNA を TIG-3-20 細胞に導入し、mTERF のノックダウンを施行した。Day2 から mtDNA は増加し続け、Day5 には Day0 の約 3.5 倍に達していることが判明し（図 11）、mTERF の発現阻害、機能減弱が mtDNA 量の増加に繋がることが正常細胞で明らかになった。すなわち、mTERF は mtDNA の複製機構の抑制因子としての機能を有していることが、裏付けられた。これは、ほぼ同時期に報告された、mTERF は転写終結を通じて mtDNA の転写の調節因子として働くだけでなく、strand-coupled 型 mtDNA 複製の停止に働く作用があるという報告と合致する。

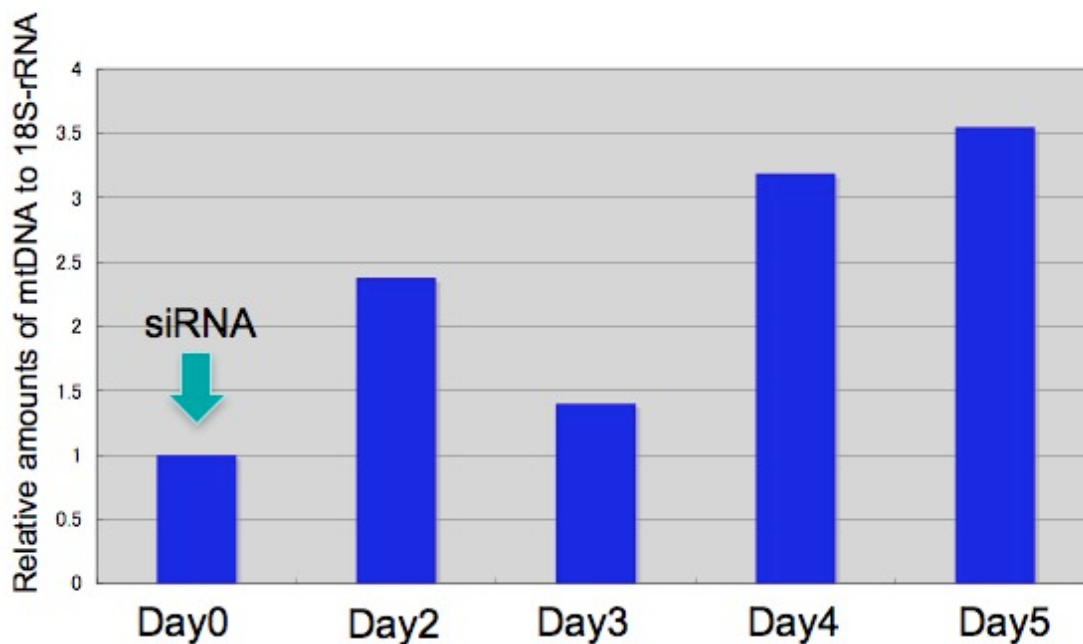


図 11. mTERF 発現のノックダウンに伴う、細胞あたりの mtDNA 量の増加。

2-4-3 mTERF の western blot による過剰発現の確認

また、mTERF が MELAS サイブリッド細胞の A3243G 変異型 mtDNA のヘテロプラスミー比にどのような影響を与えるか、mTERF タンパク質強制発現ベクター (pTER2) を MELAS サイブリッド細胞に導入した。コントロールには空ベクター (pcDNA) を導入したものを用い、それぞれのクローンを採取して、western blot で強制発現が pTER2 クローンで起こっているかを調べた。その結果、pTER2 クローンでは内在性 mTERF と pTER2 ベクターから発現した両方の mTERF によって、mTERF の翻訳レベルでの増加が観察された (図 12)。

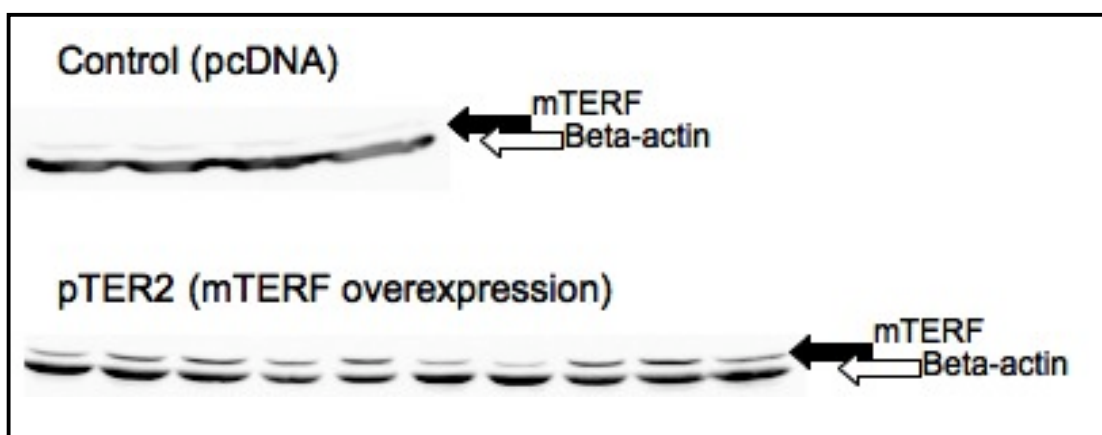


図 12. Western blot による pTER2 ベクターの mTERF の細胞内過剰発現の確認。

2-4-4 サイブリッド細胞クローンごとの変異率

コントロール細胞 10 クローンと pTER2 細胞 10 クローンでは、A3243G 変異率の分布に明らかな相違が認められ、mTERF が過剰に発現している pTER2 細胞クローンでは、A3243G 変異型 mtDNA の増加が見られた細胞クローンが統計学的にも有意に多く採取された (t-test, $p < 0.0001$) (図 13)。

コントロール細胞では比較的、変異率のばらつきが大きかったが、pTER2 細胞クローンでは高い変異率の方に収束する傾向があることが解る。すなわち mTERF の発現量が上昇すると、A3243G 変異率が増加することから、A3243G 変異型 mtDNA の細胞内における量の増加を促すような作用を有することが示唆された。

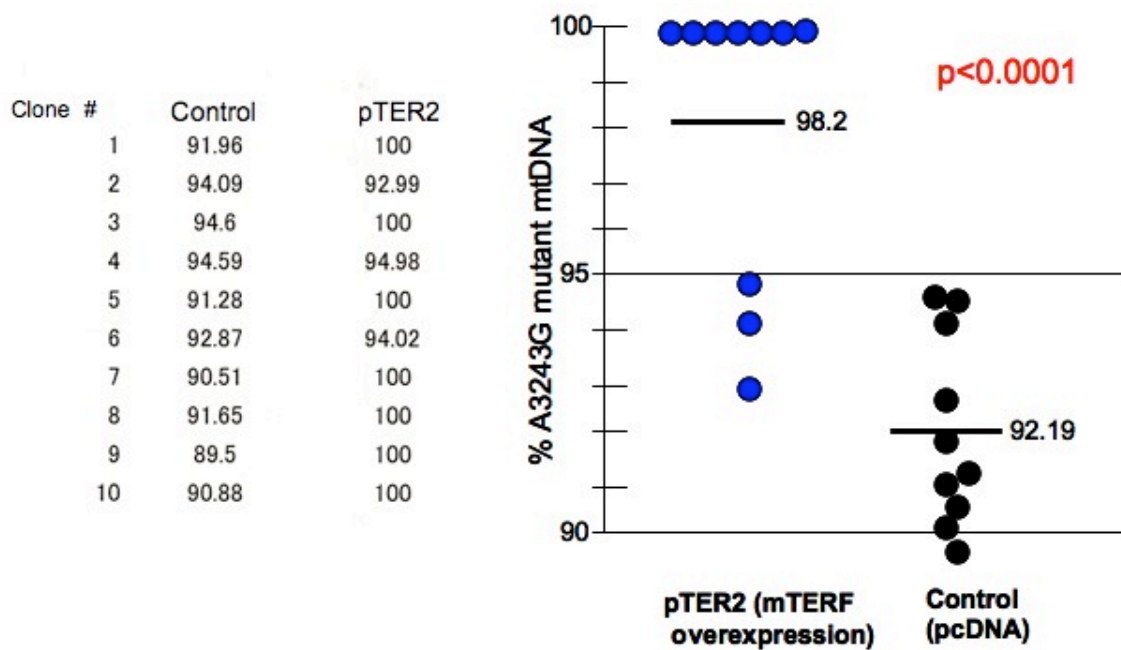


図 13. コントロール細胞クローンと mTERF を強制発現させた pTER2 細胞クローンの A3243G 変異率の分布。

2-5 考察

本論文において、以上の実験結果を充足する分子機構モデルを、私は提唱する (図 14)。それは、mTERF が strand-coupled 型 mtDNA 複製の抑制因子として機能し、16S rRNA 遺伝子と tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子の境界付近に存在する 28 bp の結合配列、特に tridecamer sequence に結合し、その付近で複製停止を引き起こすことが中核となっている。A3243G 病原性変異はこの tridecamer sequence 内に存在する為、mTERF タンパク質と mtDNA との親和性の障害を引き起こし、mtDNA の不完全な複製停止が起こると考えられ、この為、A3243G 変異型 mtDNA が野生型に比べ、多くの run-off 鎖を生じ、優先的に複製が進行して、細胞内で増加する可能性が考えられる。このモデルは単に MELAS サイブリード細胞にだけ適用されるだけでなく、一般の MELAS 患者の細胞内でも起こり得ることで、原因が今まで不明だった A3243G 変異型 mtDNA の細胞内での増加メカニズムを説明する分子機構モデルとして、一つの可能性を提示している。

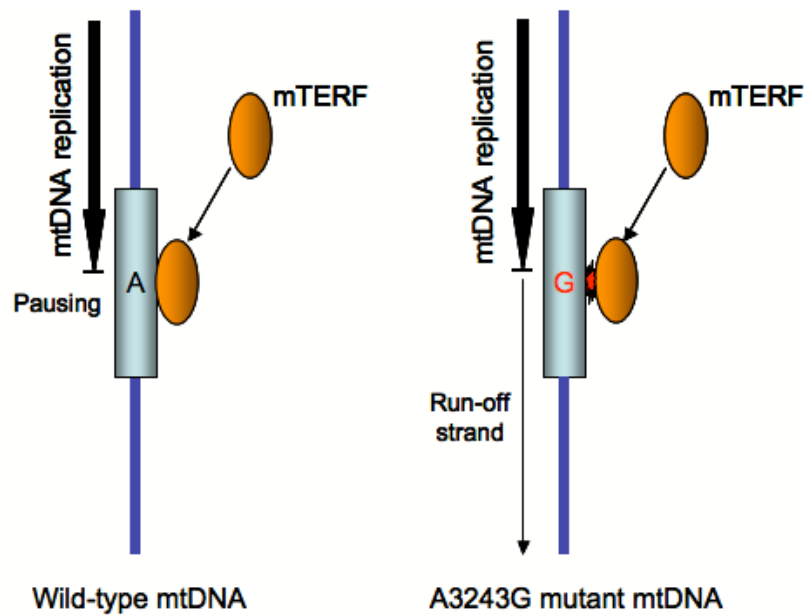


図 14. A3243G 変異型 mtDNA が優先的に増加する分子機構モデル。

第三章 変異型 mtDNA の量的置換システムの構築

3-1 序論

3-1-1 MELAS の新治療ストラテジーの提案

第二章では、mTERF の mtDNA の転写、複製における機能を解説し、mTERF は mtDNA の複製反応の抑制因子として機能していること、A3243G 変異型 mtDNA の細胞内での増加のデターミナントになっていることを実験的に示した。また、その結論から導かれた細胞内での A3243G 変異型 mtDNA が増加してくる分子機構モデルを提唱した。この分子機構モデルに基づき、今回、A3243G 変異によって引き起こされる MELAS を始めとする、ミトコンドリア遺伝子疾患の分子治療法の可能性を、MELAS サイブリッド細胞を用いて模索した。

ミトコンドリア遺伝子疾患の遺伝子治療は様々な試みがなされているが、その中で最も大きな障害となっていることは、安全且つ効率的にミトコンドリア内に、治療効果を有する物質を導入する技術が確立していないことに由来している。

この章ではまず、ある程度の成功を収めている制限酵素と peptide nucleic acids (PNA) のミトコンドリア内へ導入による治療ストラテジーを解説する。そして、これらに比べ治療効果のより大きな潜在的可能性を持った DNA 結合化合物である pyrrole-imidazole polyamide (PI ポリアミド)を使用した、A3243G 変異によって引き起こされるミトコンドリア遺伝子疾患に対する新しい治療ストラテジーを提案したい。

3-1-2 制限酵素導入法による変異型 mtDNA の切断・破壊

点突然変異は時に、独自の制限酵素認識配列を mtDNA 内に生じさせることがある。例えば、本論文で扱っている A3243G 変異も一塩基置換により野生型 mtDNA には存在しない *Apal* 切断部位を、mtDNA 上の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子内に作り出す。これが PCR で増幅した産物を *Apal* で消化処理することにより、簡便で迅速な A3243G 変異の有無を調べる遺伝子診断を可能にしている。同様に NARP T8993G 変異の一塩基置換変異は、*SmaI* 認識サイトを一カ所、変異型 mtDNA 内に作り出す。ミトコンドリア内に機能的な *SmaI* タンパク質を輸送させれば、*SmaI* サイトを保持する NARP 変異型 mtDNA のみを切断し破壊することが出来る筈である。

Tanaka らはミトコンドリア内に *SmaI* のポリペプチドを輸送させる為、MTS (mitochondrial targeting signal) を N 末端に融合させた制限酵素 *SmaI* タンパク質を発現する遺伝子ベクターを作製し、それを NARP 患者由来のミトコンドリアを有するサイブリッド細胞に導入した。遺伝子ベクターは NARP サイブリッド細胞内で発現し、MTS が融合している *SmaI* のポリペプチド鎖はミトコンドリア内に輸送され、プロセッシングを受けた後、制限酵素として正常に機能し、T8993G 変異を持つ NARP 変異型 mtDNA を選択的に細胞内で切断・破壊した。細胞内から NARP 変異型 mtDNA が除去され、野生型 mtDNA が増加したことにより、低下していた OXPHOS 機能は徐々に回復し、ATP 産生能もほぼ正常になった(Tanaka et al., 2002)。

このように塩基配列特異的に DNA を切断する機能を有する制限酵素をミトコンドリアに輸送し、変異型 mtDNA のみを切断・破壊するという、ミトコンドリア遺伝子疾患の治療戦略は魅力的であるが、同然ながら制限酵素切断サイトが mtDNA 上に新たに生じるような変異である場合に限られ、また野生型

mtDNA 上に導入に使用する切断サイトが存在しないことが前提条件である。

本研究の A3243G 変異は、*Apal* サイトを前述のように変異型 mtDNA の tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子内に生じさせるが、野生型 mtDNA に 3 カ所の *Apal* サイトが存在する為、*Apal* タンパク質をミトコンドリア内に導入する治療戦略は使用出来ない。NARP T8993G 変異の場合、*SmaI* サイトは変異型 mtDNA にだけにしか存在しないので、この治療戦略の適用が可能なのである。

しかし危惧される潜在的な問題点が幾つか存在する。制限酵素のような DNA を切断するタンパク質が細胞内で長期間に渡って発現していることの安全性の問題である。制限酵素には MTS が付加されており、ミトコンドリアに選択的に輸送されるが、ミトコンドリアの細胞内メタボリズムなどで破壊されたミトコンドリアから漏出した機能的な制限酵素の核 DNA へ及ぼす危険性である。

第二に、これが一番危惧される問題点であるが、制限酵素を導入後の細胞内の mtDNA 全体量の欠乏現象である。細胞内の変異型 DNA の割合が高い場合程、これは顕著になる。単純に考えると、細胞内の変異率が 90% である場合、制限酵素によって細胞内の mtDNA 量が短時間で 10% までに急激に減少してしまうことになる。細胞のエネルギー供給を十分賄うまでに、野生型 mtDNA 量が増加するまでの間、細胞は深刻なエネルギー飢餓を経験することになる。細胞内の mtDNA 量の減少するミトコンドリア病である遺伝性 mtDNA 欠乏症候群の存在が報告されているが、この症状は重篤で患者は 1 歳以内に死亡している。このように細胞内の mtDNA 量の激減は一時的ではあれ、細胞、組織のエネルギー産生、細胞機能に重大な悪影響を及ぼすことは想像に難くない。それは変異型 mtDNA によるミトコンドリア機能不全よりも、細胞の状態を増悪させる可能性が高い。これが制限酵素などの変異型 mtDNA の切断を触媒するような治療物質を、治療戦略を生体で実際に適用するにあたり、困難な点である。

3-1-3 PNAによる変異型 mtDNA の複製阻害ストラテジー

一方、制限酵素導入法よりも緩やかに変異型 mtDNA の量を減らし、ヘテロプラスミーを野生型 mtDNA の方にシフトさせようとする試みもある。Lightowers らは、複製中の MERRF A8344G 変異型 mtDNA に出現する、一本鎖 H 鎖の配列に結合する peptide nucleic acids (PNA ; ペプチド核酸) (Egholm et al., 1993) を用いて、strand-asynchronous 型複製における新生 L 鎖の合成伸長を阻害し、MERRF 変異型 mtDNA の複製を選択的に阻害する実験を行なった(図 15)。

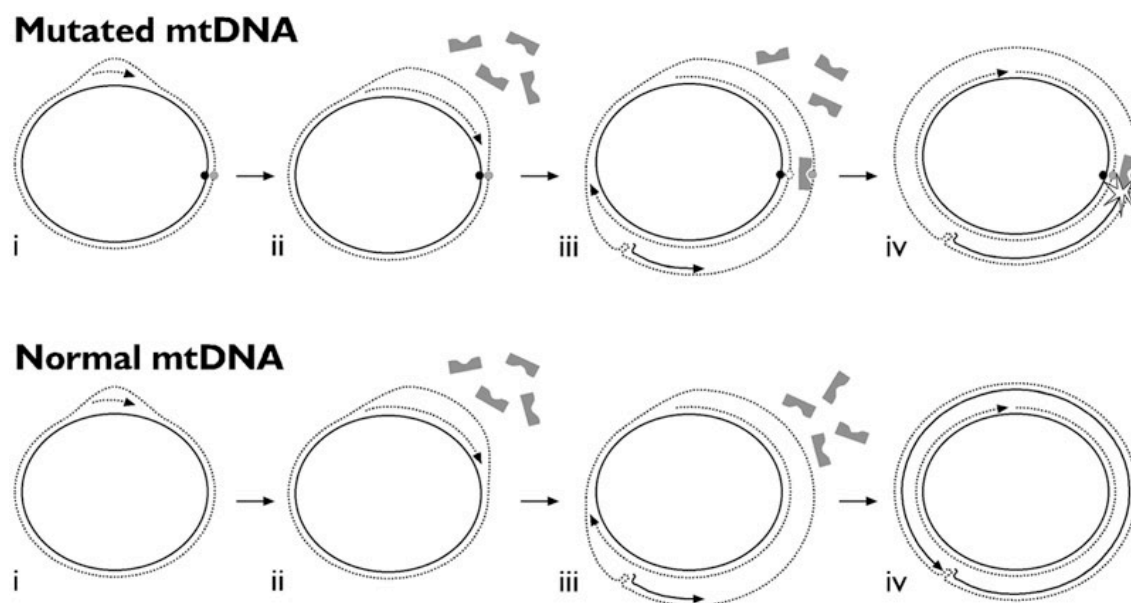


図 15. L 鎖を太線で、H 鎖を破線で示す。PNA は、strand-asynchronous 型複製に伴って出現する A8344G 変異型 mtDNA の一本鎖 H 鎖内のターゲット配列 (A8344G 変異を含んでいる) に選択的に結合し、 O_L から開始される新生 L 鎖の合成伸長を阻害することにより、複製の結果生じる 2 分子の MERRF A8344G 変異型 mtDNA 分子のうち、1 分子の生成を阻害する (Smith et al., 2003 より)。

彼らは mtDNA 複製 run-off アッセイ系を使用し、PNA による *in vitro* での MERRF A8344G 変異 mtDNA の複製阻害効果を解析した (Taylor et al., 1997)。この実験では合成伸長を阻害された truncated mtDNA が検出され、PNA による変異型 mtDNA の複製阻害効果を認めた。しかしながら *in vivo* での治療効果を評価する為、この PNA を添加した培地で MERRF サイブリッド細胞を培養したが、ヘテロプラスミーの野生型 mtDNA へのシフトは認められず、生細胞での PNA による A8344G 変異型 mtDNA の複製阻害効果は証明されなかった (Taylor et al., 2001)。

彼らはこの結果から、変異型 mtDNA の複製中、一本鎖になっている H 鎖に結合している mtSSBP (mitochondrial single-stranded binding protein) に阻まれ、PNA がターゲット配列に結合出来ないか、H 鎖が一本鎖になっている時間が限られており (約 90 min)、PNA が不十分にしか結合出来ない、または結合していた PNA が転写・複製マシーナリーによって DNA から排除されてしまうのではないかと推論している。

また、この PNA を用いた治療戦略は strand-asynchronous 型複製モデルに基づいている。近年 strand-coupled 型複製モデルが提唱され検証されて来ているが、その複製過程で一本鎖 DNA を生じないという点で先の strand-asynchronous 型複製モデルと大きく異なっている。この strand-coupled 型複製が実際の生細胞内では、高い比率で恒常的に行なわれている可能性も否定出来ない。この場合、PNA は結合するべきターゲットサイトの大部分を失うことになる。

PNA の欠点としては、分子自体が荷電していないことから、水溶性に乏しく、細胞への導入効率が悪いことである。効率的な導入には、トランスフェクション試薬等が必要になる。また、ミトコンドリア内部に効率良く導入するのにも

MTS や強い極性物質である triphenyl phosphonium (TPP) (Murphy, 1997) 誘導体などを PNA に付加させる (Muratovska et al., 2001) などの何らかの修飾が必須である。このことを考えると、個体レベル、すなわち人体への投与は PNA に何らかの改良を加えない限り、そのままでは実際困難である。また、先に述べた strand-coupled 型複製モデルに基づいた PNA 治療ストラテジーの検証も必要である。

3-1-4 PI ポリアミドによる MELAS の分子治療ストラテジー

もし塩基配列特異的に結合する低分子化合物があり、mtDNA の 3243 位の一塩基の相違を識別出来るなら、それを選択的に野生型 mtDNA だけに結合させ、mTERF の転写終結配列への結合を阻害することが出来、その野生型 mtDNA の複製停止を解除し、細胞内で積極的にその複製プロセスを進行させることが可能であるかも知れない。

私は pyrrole-imidazole polyamide (PI ポリアミド)に、この可能性を見出した。これはディスタマイシン A (distamycin A) の低分子アナログであり、高い親和性で二重鎖 DNA のマイナーグループ (副溝) に結合する化合物で、任意の塩基配列に特異的に結合するような比較的自由度の高い分子設計が可能である (Tauger et al., 1996; White et al., 1997; Dervan, 2001)。

本実験で、ミトコンドリア rRNA 合成の為の H1 サイトからの転写終結に必須な結合配列である tridecamer sequence 内に結合する PI ポリアミド (ML1 ポリアミド) を分子設計、合成を行った。ML1 ポリアミドはイミダゾール基、ピロール基からなる 2 つのサブユニットを γ -アミノ酪酸で繋いだ PI ポリアミド基本構造を有する (図 16)。イミダゾール基またはピロール基で構成されたサブユニットが長くなると、PI ポリアミドの剛直性が増加する為、ターゲット dsDNA

のマイナーグループの湾曲にフィットせず、結合しない。このPI ポリアミドの剛直性を和らげ、分子に柔軟性を持たせる為、ML1 ポリアミドは、 β -アラニン をサブユニット内に入れる構造を採用している。

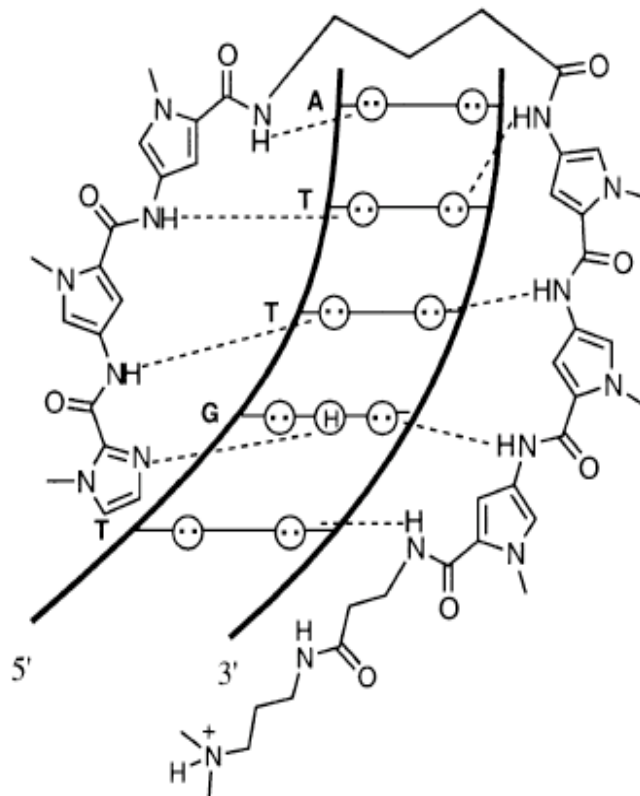


図 16. PI ポリアミドの基本構造 (Pilch et al.,1996 より)。イミダゾール基、ピロール基で構成された 2 つのサブユニットを、 γ -アミノ酪酸で繋いだ構造を有する。サブユニット分子が長くなると剛直性が増加する為、ここには示されていないが、ML1 ポリアミドのサブユニットは、 β -アラニンが挿入された構造になっている。Dimethylaminopropylamide(Dp)末端が正に荷電していることに注意。

ML1 ポリアミドは、mTERF と mTERF 結合配列との結合を競合的に阻害することにより、この塩基配列周辺で、strand-coupled 型の野生型 mtDNA 複製の停止を解除し、その複製を優先的に促進する。このことにより細胞内での野生型と A3243G 変異型 mtDNA のヘテロプラスミー比を野生型 mtDNA の方に傾かせ、OXPHOS 機能不全を脱する閾値以上まで、野生型 mtDNA の量を選択的に増加させることで、細胞の障害されている OXPHOS 機能を回復させる (図 17)。

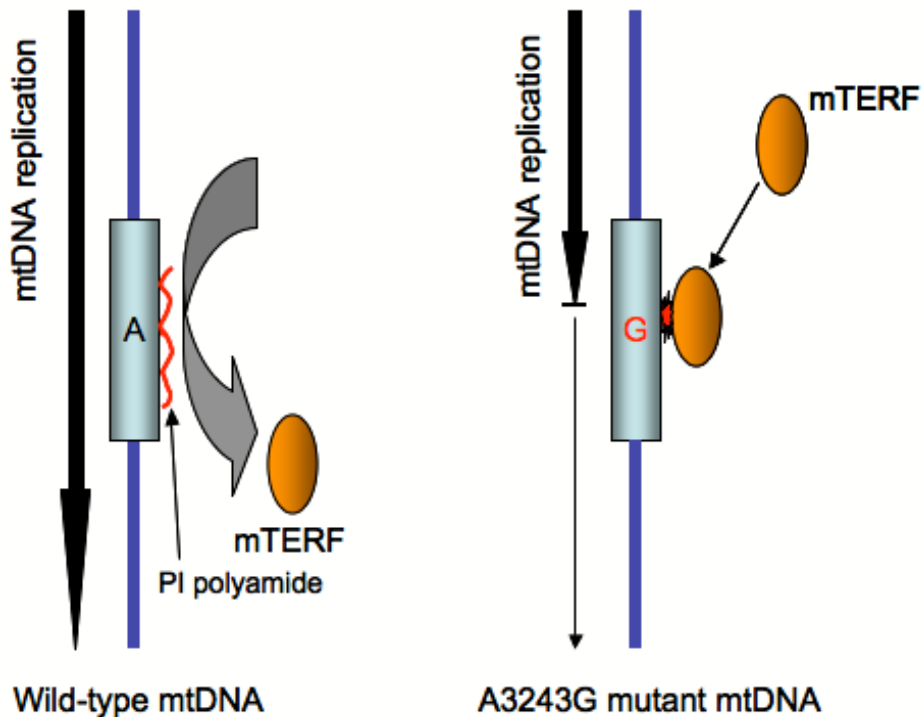


図 17. 提唱した mTERF の分子機構モデルに基づく、ML1 ポリアミドによる野生型 mtDNA の選択的複製促進戦略。ML1 ポリアミドは高い親和性で野生型 mtDNA と選択的に結合し、mTERF が転写終結配列に結合するのを競合的に阻害する。その為、結合配列の近傍における野生型 mtDNA の複製停止を解除し、A3243G 変異による mTERF の結合配列への親和性の障害の為に、変異型 mtDNA から生じる run-off 鎖よりも、多量の野生型 mtDNA 新生鎖を生成させ、

細胞内の野生型 mtDNA の相対量を増加させる。

A3243G 変異型 mtDNA と野生型 mtDNA との差異は僅か一塩基だけであるが、ML1 ポリアミドはこれを認識する。他の PI ポリアミド種の研究では DNA 配列の一塩基の差異で、Kd 値は 10-100 倍に変化することが、表面プラズモン共鳴を利用した分子結合アッセイ (BIAcore) で知られている。

ML1 ポリアミドは、生体膜をトランスフェクション試薬など無しに、そのまま通過することが出来ることが実験的に知られている。また ML1 ポリアミドは正に荷電している Dp 末端を有している為、荷電していない PNA とは異なり、MTS や TPP のようなミトコンドリア指向性を高める修飾など無しに、負のミトコンドリア膜電位 (-150 to -180 mV) のよって、ミトコンドリア・マトリックスに積極的に取り込まれる。これはミトコンドリア内に治療物質を効率的に導入するといった、ミトコンドリア遺伝子疾患の治療における最大の障壁を乗り越えられることを意味する。

また、ML1 ポリアミドは、ヘテロプラスミーを野生型 mtDNA の方に徐々にシフトさせて行くので、制限酵素導入法で観察されるような変異型 mtDNA を切断・破壊による細胞内の mtDNA 量の急激な減少を引き起こさない為、治療の過程で細胞のミトコンドリア機能にも悪影響を及ぼすことが無い、といった利点があり、前述の制限酵素導入法を使った mtDNA 治療戦略に比べ優れている、と考えられる。

3-2 実験目的

第二章で提唱した、A3243G 変異型 mtDNA の細胞内増加現象における mTERF の分子機構メカニズムのモデルに基づき、実際に A3243G 変異型 mtDNA を高率で保持する、MELAS サイブリッド細胞の野生型 mtDNA の tridecamer sequence に対する mTERF の結合を、ML1 ポリアミドで阻害することにより、野生型 mtDNA 複製を選択的に促進し、細胞内の A3243G 変異型 mtDNA と野生型 mtDNA の量比のシフトを試みることにより、ML1 ポリアミドの有効性を解析し、MELAS の分子治療法の基盤を細胞レベルで確立することを旨とした。

3-3 実験方法

3-3-1 ML1 ポリアミドの分子デザイン

今回、16S rRNA 遺伝子と tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子の境界付近に存在し、転写終結に必須で且つ A3243G 変異が存在する 13 塩基対の tridecamer sequence への mTERF の結合を阻害する PI ポリアミド(ML1 ポリアミド)の設計を行なった。標的 DNA 塩基配列に対する ML1 ポリアミドの imidazole 基(Im)、pyrrole 基(Py)の配列は、以下に示す塩基認識則に従い設計した。

| | 5'- G | C | T | A -3' | |
|-------------------|-------|---|---|-------|------|
| | 3'- C | G | A | T -5' | 塩基認識 |
| Im / Im | - | - | - | - | None |
| Py / Py | - | - | + | + | W |
| β / β | - | - | + | + | W |
| Im / β | + | - | - | - | G/C |
| β / Im | - | + | - | - | C/G |
| Py / β | - | - | + | + | W |
| β / Py | - | - | + | + | W |
| Im / Py | + | - | - | - | G/C |
| Py / Im | - | + | - | - | C/G |

なお、2つのサブユニットを繋いでいる γ -アミノ酪酸 (γ -turn) の認識する塩基は W (A or T) である。また Dp (dimethylaminopropylamide) 末端と Ac (acetyl

residue) 末端には塩基の認識能が無いことが解っている。

ヒト・ミトコンドリア 16S rRNA と tRNA^{Leu(UUR)} 遺伝子上の mTERF 結合配列及び転写終結配列とその配列内の ML1 ポリアミドの配列位置を示す(図 18、19)。

Human mTERF-binding site sequence in tRNA^{Leu(UUR)} gene



図 18. 28 塩基の mTERF 結合配列 (オレンジ) と転写終結に必要な 13 bp の配列 (エメラルド) を示す。mTERF タンパク質は、この 13 bp の転写終結配列 (tridecamer sequence) に結合することにより、H1 サイトからのミトコンドリア rRNA 合成に寄与する転写反応を終結させると考えられている。

ML1 polyamide designed against transcription termination sequence in mtDNA

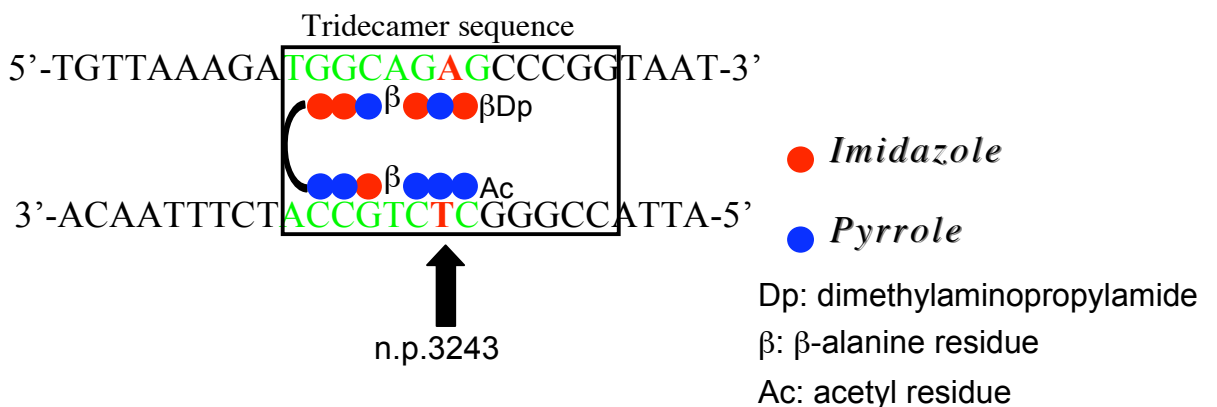


図 19. Tridecamer sequence に結合する PI ポリアミド (ML1 ポリアミド) の

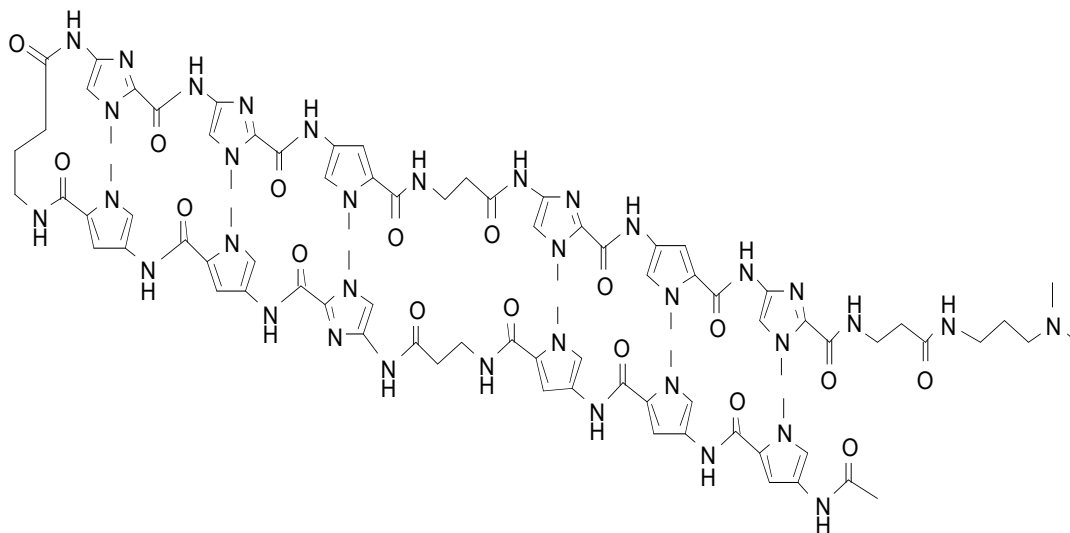
構造と結合塩基配列との対応を示した模式図。ML1 ポリアミド：
Ac-Py-Py-Py-β-Im-Py-Py-γ-Im-Im-Py-β-Im-Py-Im-β-Dp

以下に ML1 ポリアミドの分子構造を示す(図 20)。

(

Im Im Py β Im Py Im β Dp

Py Py Im β Py Py Py Ac



Chemical Formula: $C_{87}H_{105}N_{35}O_{17}$
Molecular Weight: 1912.99

図 20. ML1 ポリアミドの構造式

ML1 ポリアミドの認識する塩基配列は以下ようになる：

5'-W-G-G-C-W-G-W-G-3' (W= A or T)

ML1 ポリアミドが認識する配列は 8 塩基対であるが、W の認識箇所が 3 カ所あることから、 2^3 通りの認識配列の組み合わせが存在する。その全ての認識配列において、野生型 mtDNA 全周での認識配列は tRNA^{Leu(UUR)} 上流の 28 塩基の mTERF 結合配列以外に存在せず、ML1 ポリアミドは、その結合配列内のターゲット配列のみだけに特異的に結合すると考えられた。

3-3-2 PI ポリアミドの合成

PI ポリアミドの合成の作業の流れは大まかに以下ようになる：

1. Fmoc 法による固相合成、質量分析装置による分子量の確認
2. HPLC での精製
3. 精製後の分子量の確認
4. 凍結乾燥による溶媒の除去

自動合成は PSSM8 (島津製作所) を使用して行った。Fmoc 法による PI ポリアミドの固相合成の工程を次に示す (図 21)。

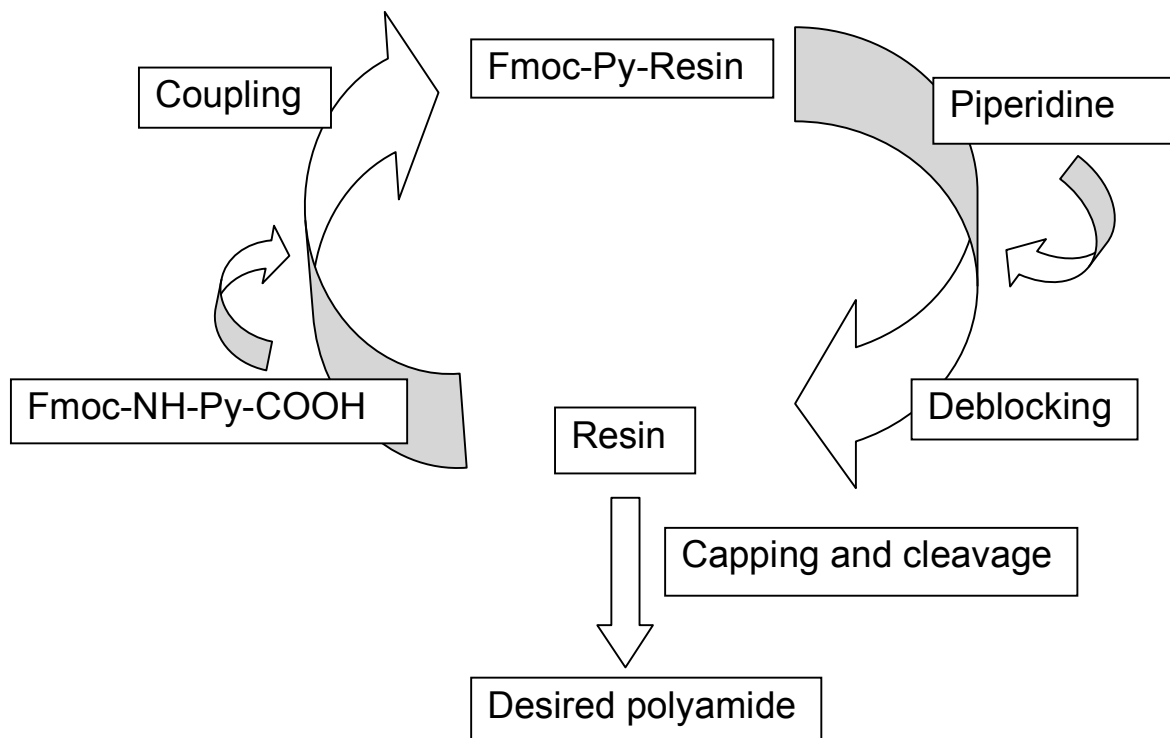


図 21. Fmoc 法による PI ポリアミドの合成

目的の DNA 配列に結合する PI ポリアミドの合成の手順は次のようになる。

NovaPEG Wang Resin を固相として用い、脱水縮合(アミド結合)によって Py (pyrrole) や Im (imidazole)を付加し、順次伸長させていく。まず、resin と Py または Im とを反応させ、反応が終了したら、NMP(N-メチル-2-ピロリドン)で洗浄し、未反応の Py または Im を除去する。次に固相に結合している Py や Im の保護基(Fmoc)を 30% piperidine で除去(脱保護)する。次の反応点となるアミノ基が現れたら、piperidine を NMP で洗い流し、次に結合させる Py や Im と反応させ、これらを繰り返すことにより固相に結合している反応物を順次伸長させていく。目的とする PI ポリアミドの合成が終わったら、N,N-ジメチル-1,3-プロパンジアミンを加え、60℃前後の条件下で固相表面から切り出して PI ポリアミドを回収した。目的とする合成された ML1 ポリアミドの分子量は質量分析装置(島津製作所)で確認した(図 22)。

Data: <Untitled>.A15 9 Jul 2008 14:59 Cal: Munekata 25 Jun 2008 18:05
 Kratos PC Axima QIT V2.4.4: Mode positive, Mid 750+, Power: 30
 %Int. 67 mV Profile 100

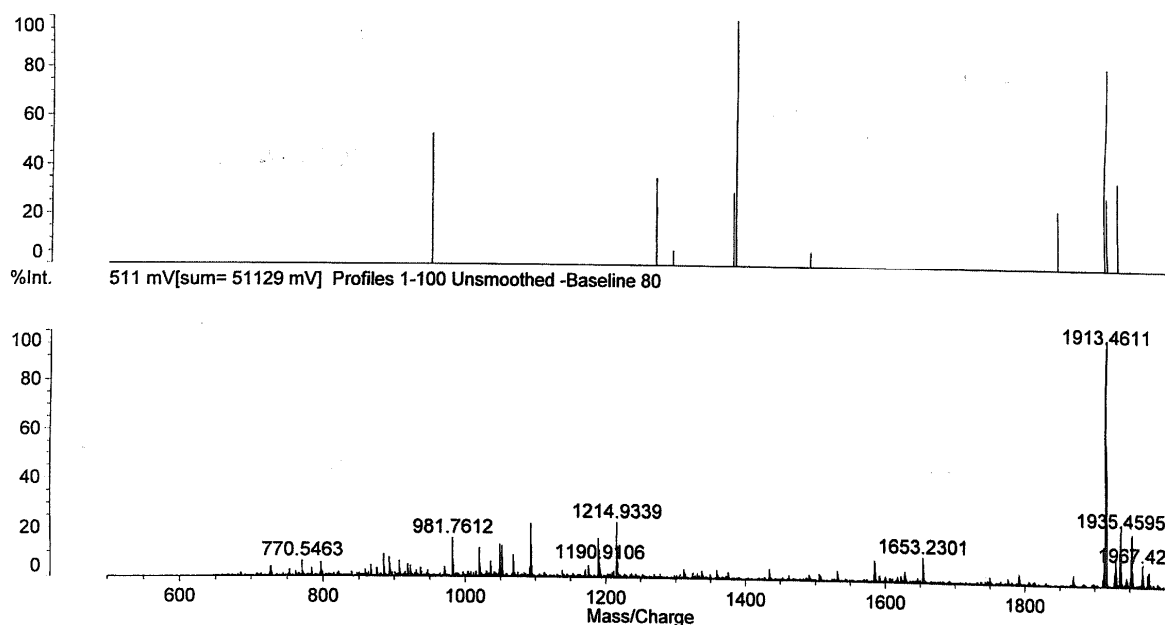


図 22. 合成した ML1 ポリアミドの分子量を示したマスペクトル。

3-3-3 合成後のPIポリアミドのHPLCでの精製

合成後、未反応の原料物質 (Py や Im) や合成が不完全な状態のPIポリアミドが残存している為、これらの物質を除去する必要がある。PIポリアミドの精製では分子極性を利用して、分離・精製を行った。逆相クロマトグラフィー (Prominence/LC solution、島津製作所) で0.1%酢酸/アセトニトリル勾配を使用する場合は、まずアセトニトリルの少ない条件 (0.1% 酢酸の量が優位) で極性の高い物質が溶出し、徐々にアセトニトリルの割合を増加させていくことにより、極性の低い物質が順次溶出させるようにする。溶出時間は30分でアセトニトリルが100%になるように設定し、実際に反応物が溶出してくる時間は10-20分以内とした。ML1ポリアミドのHPLCクロマトグラムを以下に示す (図23)。

<クロマトグラム>

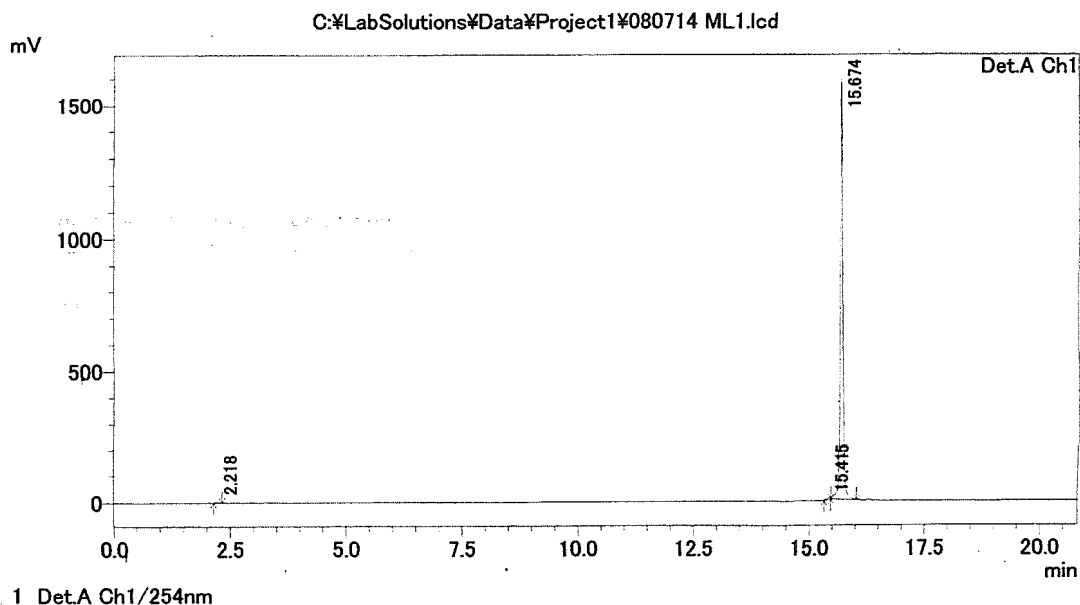


図23. ML1ポリアミドのHPLCによる精製結果のクロマトグラムを示す。

3-3-4 真空凍結乾燥

HPLC で精製した PI ポリアミドは溶媒に溶解している状態なので、溶媒を除去する必要がある。PI ポリアミドの真空凍結乾燥は FDU-1200（東京理化学器械 EYELA）で行なった。これにより PI ポリアミドは淡黄色または白色の粉末状の固体になる。

3-3-5 PI ポリアミドの濃度測定

PI ポリアミドは ddH₂O または 50% DMSO 溶液に溶解させる。PI ポリアミドはイミダゾール基(Im)が多くなると水溶性に乏しくなる傾向があるので、その場合は 0.1%酢酸溶液か 50% DMSO 溶液に溶解させる。通常は重量から換算した目安として数 mM のオーダーになるように溶解させる。濃度決定は以下の手順で行なう：

1. ddH₂O または 50%DMSO 水溶液に粉末状のポリアミドを溶解させる。同じ溶媒で 1000 倍希釈する。
2. 分光光度計（光路長 1 cm）で PI ポリアミド溶液の最大吸収波長における吸光度を測定する（最大吸収波長は PI ポリアミドの構造により異なるが、300 nm 付近にある）。
3. 吸光度が信頼区間である 0.2 - 1.0 の間に入るよう、希釈率を微調整する。

吸光度より PI ポリアミドの濃度（M）を求める計算式は一般的に次のようになる。

<溶媒が ddH₂O の場合>

濃度 (M) = 吸光度 / [8600 x Py (pyrrole)、Im (imidazole)環の個数]

<溶媒が DMSO、DMF の場合>

濃度 (M) = 吸光度 / [9800 x Py (pyrrole)、Im (imidazole)環の個数]

ただし、個数をカウントして良いのは Py 環, Im 環のみで、β-アラニン、γ-アミノ酪酸は含めない。

例えば、Ac-Py-Py-Py-β-Py-Py-Im-γ-Py-Py-Im-β-Im-Im-Py-β-Dp の ddH₂O 中で
の吸光度が 0.516 だったとすると、

濃度 (M) = 0.516 / (8600 x 12) = 5 x 10⁻⁶ (M) = 5 μM となる。

なお、PI ポリアミドの溶媒に 50% DMSO を使用して、生細胞に添加し各種の解析を行なう場合は、DMSO が細胞毒性を持っていることから、培地中での DMSO の最終濃度は 0.1%以下にすることに留意した。

3-3-6 EMSA による ML1 ポリアミドとの結合解析

ML1 ポリアミドとターゲット配列との *in vitro* での塩基配列特異的結合を確認する為、EMSA (electrophoretic mobility shift assay)を行ない解析した。5'末に FITC を結合させた、mTERF タンパク質結合配列の tRNA^{Leu(UUR)}遺伝子配列のオリゴ DNA をサーマルサイクラーにて熱変成させた後、徐冷、アニーリングを行ない、dsDNA を作成した。

<野生型 mtDNA template>

5'-FITC-TGTTAAAGATGGCAGAGCCCG-3'

3'-ACAATTTCTACCGTCTCGGGC-5'

<A3243G 変異型 mtDNA template>

5'-FITC-TGTTAAAGATGGCAGGGCCCG-3'

3'-ACAATTTCTACCGTCCCGGGC-5'

青色の配列は ML1 ポリアミドの認識領域を示す。赤字は np.3243 位の塩基を示している。

センス鎖 5 μ l とアンチセンス鎖 5 μ l (それぞれ 10 pmol / μ l) を混合し、サーマルサイクラーで 95°C、3 min で熱変性条件下に置いた後、オリゴ DNA 溶液を入ったマイクロチューブを熱湯に浸し、室温まで水温が下がるまで放置した。こうして作製した dsDNA (50 pmol/10 μ l) に ddH₂O を 40 μ l を加え、1 pmol / μ l まで希釈する。この dsDNA template 4 pmol を 10⁻⁴ M、10⁻⁵ M、10⁻⁶ M、10⁻⁷ M の濃度になるように ML1 ポリアミド溶液と混合し、37°C、1 hour インキュベートした。その後サンプルを loading buffer と混合し、350V、10 min プレランした 20% 非変性アクリルアミドゲル (0.5X TBE) にアプライした。

4°C、100V で BPB がゲルの下端 3/4 に来るまで泳動し、バンドのシフトを LAS-3000 (FujiFilm) で検出した。EMSA に使用した非変成アクリルアミドの組成を次に示す。

<EMSA 用ゲルの組成>

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| 30% アクリルアミド | 16.5 ml |
| 10X TBE | 2.5 ml |
| 10% APS | 188 μ l |
| グリセロール | 878 μ l |
| ddH ₂ O | 14.0 ml |
| <u>TEMED</u> | <u>11.3 μl</u> |
| | 25.0 ml |

3-3-7 mIP アッセイ

生細胞での ML1 ポリアミドによる、転写終結配列である tridecamer sequence への mTERF タンパク質の結合阻害を確認するため mIP (mitochondrial DNA immunoprecipitation; mtDNA 免疫沈降) アッセイを行なった。

HeLa 細胞 10^6 個を 10 cm ディッシュに播き、10%FBS を加えた通常の DMEM で培養した。ML1 ポリアミドの構造類似体(3- β -3 構造)で、ターゲット配列を認識しない PI ポリアミドである LOX1 ポリアミドを培地に添加し、細胞にそれぞれ薬剤処理を施した。そして薬剤未処理群、ML1 ポリアミド処理群、LOX1 ポリアミド処理群、negative control 群の 4 群に分けた。ML1 ポリアミドの濃度は 5 μ M とし (LOX1 ポリアミド濃度は 100 μ M) 、24 時間処理した。培地をサククションし、除去した後、新鮮な培地 6 ml を加え、最終濃度 1%になるようホルムアルデヒドを添加し、37°C、10 min インキュベート、DNA 結合タンパク質を DNA に cross-link させた。10 min 後、cross-link 反応を停止させる為に 2.5 M の glycine 水溶液 300 μ l を培地に加え、4°C、10 min 保った後、培地をサククション

で可能な限り除去した。次に PMSF (最終濃度 200 μ M) を含有する冷 PBS で 2 回細胞を洗い、SDS lysis buffer 150 μ l をディッシュに加え、セルスクレイパーで細胞を掻き取り、良くサスペンドした後 1.5 ml のマイクロチューブにセルライセートを回収した。次にセルライセートを氷冷しながら、water bath 型超音波破碎機にかけ、核 DNA と mtDNA の両方を 200-600 bp の長さに断片化した。ソニケーションは 5 sec X 5 回のストロークで行なった。その後 4°C、15,300 g で遠心し、上清を採取、そのうち 5 μ l を 1% agarose ゲルで泳動、断片化した DNA のサイズをチェックした。その後、50 μ l の salmon sperm/protein A agarose-50% slurry を加え dilution buffer で 10 倍希釈 (1400 μ l 添加) し、1600 μ l とする。4°C、30 min ローテーションし、1000 g、1 min 遠心しプレクリアーを行ない、上清を採取した。このうち 400 μ l に一次抗体を 5 μ g 加え、4°C、オーバーナイトでローテーションし抗原抗体反応させた。薬剤未処理細胞サンプル、ML1 ポリアミド処理細胞サンプルそして LOX1 ポリアミド処理細胞サンプルには 5 μ g の抗 mTERF 抗体を加え、negative control は薬剤未処理細胞サンプルに rabbit-IgG 抗体を 4 μ g 加えた。オーバーナイトでの抗原抗体反応の後、60 μ l の salmon sperm DNA/protein A agarose-50% slurry を加え、4°C、60 min ローテーションをかけ、1000 g、1 min で遠心し、agarose beads をペレットにした。その後上清を除去し、agarose beads ペレットを各種の wash buffer で次のように洗浄した : a) Low Salt Immune Complex buffer (1X 400 μ l)、 b) High Salt Immune Complex Buffer (1X 400 μ l) 、 c) LiCl Immune Complex Buffer (1X 400 μ l) 、 d) 1X TE buffer (2X 400 μ l)。次に protein A agarose/一次抗体/DNA-タンパク質複合体に 150 μ l の elution buffer を加え、dsDNA-タンパク質複合体を agarose beads から解離させた。室温で 10 min ローテーションした後、1000 g、1 min (室温) で遠心し、溶出液を回収した。これをもう一度繰り返し、計 2 回分の溶出液を

合わせた（合計約 300 μ l）。これに 12 μ l の 5 M NaCl を加え、65°C、オーバーナイトでインキュベートし reverse cross-link した。その後 0.5 M EDTA 6 μ l, 1 M Tris-HCl (pH 6.5) 12 μ l, 10 mg/ml の protease K 1.2 μ l をそれぞれ添加し、45°C、60 min インキュベートした後、フェノール/クロロホルム抽出を行ない、グリコーゲンを加えて DNA 断片をエタノール沈殿させ、免疫沈降した DNA 断片を精製し、30 μ l の ddH₂O に溶解させた。コントロールとなる input は、薬剤未処理細胞のセルライゼートを他のサンプルと同時に超音波破碎処理したものから total DNA を他のサンプルと同様に精製し、100 倍希釈したもの（1% input）を使用した。その後、通常の PCR、そして q-PCR を行ない、各サンプルにおける抗 mTERF 抗体で免疫沈降したターゲット mtDNA 配列を含む DNA 断片の確認・定量を行なった。

mTERF が結合し、転写終結に必須な tridecamer sequence を含む領域を増幅する primer を、Primer 3 version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) で設計した。デザインされた primer の配列は以下のようになる：

Forward primer: 5'-CAC CCA AGA ACA GGG TTT GT-3'

Reverse primer: 5'-TGG CCA TGG GTA TGT TGT TA-3'

1% input DNA、そして薬剤未処理群、ML1 ポリアミド処理群、LOX1 ポリアミド処理群、negative control 群から抽出した DNA をそれぞれ template DNA として PCR を施行後、2% agarose(1X TAE)ゲルで泳動し、LAS plus (FujiFilm) にて免疫沈降した mtDNA 断片由来のバンドの存在を確認した。

<PCR 組成液>

| | |
|-----------------------------|--------------|
| 10X Ex Taq buffer | 2.0 μ l |
| dNTP | 1.6 μ l |
| Forward primer (25 μ M) | 2.0 μ l |
| Reverse primer (25 μ M) | 2.0 μ l |
| Ex Taq polymerase | 0.1 μ l |
| DNA solution | 1.0 μ l |
| ddH ₂ O | 11.3 μ l |

温度条件 : 95°C 15sec → 57°C 15sec → 72°C 25 sec (30 cycles)

また、免疫沈降した mtDNA 断片の定量は、検量線を 1% input DNA を 1、10⁻¹ ~ 10⁻⁷ 倍まで希釈した定量点を 8 点取り、q-PCR 施行し行なった。

q-PCR 反応液の組成を次に示す :

<q-PCR 反応液>

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| Template DNA | 2.0 μ l |
| Forward primer (10 μ M) | 1.0 μ l |
| Reverse primer (10 μ M) | 1.0 μ l |
| 2X SYBR Premix Ex Taq II | 12.5 μ l |
| <u>ddH₂O</u> | <u>8.5 μl</u> |
| | 25.0 μ l |

温度条件は以下のようなになる：

| | | |
|------|---------|-------------|
| 95°C | 10 sec | |
| 95°C | 5 sec | } 40 cycles |
| 55°C | 30 sec | |
| 72°C | 30 sec | |
| 20°C | forever | |

装置は Smart cycler II system (Cepheid 社)を使用した。各群の測定値データは、1% input DNA の測定値を 1.0 とし相対値として算出した。

mIP アッセイに使用した試薬類：

SDS lysis buffer [4°C保存、使用時に PMSF (最終濃度 200 μM) を添加し使用、1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH8.1)]

Salmon sperm DNA/ProteinA agarose-50% slurry (4°Cで保存、使用にあたり良くボルテックスし、先端を切断したイエローチップを使用する、Millipore)

Dilution buffer [4°C保存、使用時に PMSF を添加する (最終濃度 200 μM) 、0.01% SDS, 1.1% Triton-X, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1), 167 mM NaCl]

Low Salt Immune Complex Wash buffer [4°C保存、0.1% SDS, 1% Triton-X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl]

High Salt Immune Complex Wash buffer [4 °C保存、0.1% SDS, 1% Triton-X, 2

mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 500 mM NaCl]

LiCl Salt Immune Complex Wash buffer [4°C保存、0.25 M LiCl, 1% IGEPAL-CA 630, 1% deoxycholic acid (Na), 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)]

Elution buffer (使用時に適宜作製し使い切る、1% SDS, 0.1 M NaHCO₃)

LOX1 ポリアミド : Ac-Im-Py-Im-β-Py-Im-Py-γ-Py-Py-Py-β-Py-Py-Py-β-Dp

塩基配列認識 : 5'-W-C-W-W-W-C-W-C-3'

3-3-8 サイブリッド細胞での ML1 ポリアミドの効果の解析

ML1 ポリアミドの効果を知る為、培養 MELAS サイブリッド細胞に投与し、意図した野生型 mtDNA の積極的な複製が、実際の生細胞内で起こるかを確認した。

10 cm ディッシュに 2SD サイブリッド細胞を播き、complete DMEM の培地中に 50% DMSO に溶解させた ML1 ポリアミドを、最終濃度 1 μM, 5 μM そして 10 μM となるように添加した。ML1 ポリアミドを添加した培地の交換は 3 日ごとに行なった。コントロールには同じ希釈率の DMSO を培地に加えた。なお DMSO の培地中の濃度は 0.1%以下 (最大 0.05%) になるように、50%DMSO 溶液に溶解させたポリアミド溶液を ddH₂O で希釈した。

ML1 ポリアミドで処理したサイブリッド細胞から Day 7、Day 14 に total DNA を抽出し、PCR-RFLP を行なった後、マイクロチップ泳動装置 (島津製作所) でバンドの定量を行ない、サイブリッド細胞の変異率を解析した。

1 μM 以下の濃度で、ML1 ポリアミドの効果がより高いことが有り得ることも

考えられたことから、1 μM 以下に濃度を振り、サイブリッド細胞を処理して、その効果を解析することにした。培地中の ML1 ポリアミドの濃度を 1 μM 、500 nM そして 100 nM とし、より長期の効果の解析を行なった。Day 7、Day 15 そして Day 35 に total DNA をそれぞれの濃度で ML1 ポリアミド処理したサイブリッド細胞から抽出し PCR-RFLP を行ない、2%の agarose ゲル (1X TAE) で泳動し、野生型 mtDNA の増加を調べた。

装置：マイクロチップ泳動装置 MCE-202 MultiNA (島津製作所)

3-3-9 ML1 ポリアミドの生細胞に対する毒性・副作用の有無

mTERF の主要な機能はミトコンドリア rRNA の効率的な、積極的な合成だと考えられている。ML1 ポリアミドは、この mTERF タンパク質が mtDNA に結合するのを阻害することで効果を発揮すると考えられるが、このことによりミトコンドリア rRNA の正常な合成が阻害され、ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質合成に悪影響を及ぼし、細胞を死に至らしめる可能性はないのか、今回、この副作用の有無を調べた。呼吸鎖欠損細胞が生存出来ない通常の 10%FBS を加えた DMEM 培地 (ピルビン酸ナトリウム不含、ウリジン不含) で、効果を有する濃度内での ML1 ポリアミドの処理を行なった。ミトコンドリア呼吸鎖タンパク質合成は細胞の生命維持に必須な為、僅かな機能不全でも細胞は死に至ることになる。

143B 細胞、HeLa 細胞を DMEM、complete DMEM (ピルビン酸ナトリウム 0.1 mg/ml、ウリジン 50 $\mu\text{g/ml}$)、complete DMEM with ML1 ポリアミド ($\sim 1 \mu\text{M}$)、DMEM with ML1 ポリアミド ($\sim 1 \mu\text{M}$) で一週間培養し、細胞の生死を観察した。

3-4 実験結果

3-4-1 ターゲット配列への塩基配列特異的結合

ターゲット配列dsDNAと一塩基置換変異 (A3243G変異) を持つ変異型dsDNAとML1ポリアミドとの*in vitro*における結合を、37°C、1 hourの条件でインキュベーションした後、EMSAで解析した。ML1ポリアミド 10^{-7} Mから 10^{-5} Mまでの濃度でのバンドのシフトは無かったが、 10^{-4} MでML1ポリアミドとターゲットdsDNAとの結合に伴うバンドの明確なシフトが見られた。この実験結果は、ML1ポリアミドは*in vitro*においてターゲットdsDNAと、速やかに且つ強固結合することを示している。また、このアッセイで、ターゲット配列dsDNAとの結合に伴うバンドのシフトが見られる濃度 (10^{-4} M) において、変異型dsDNAとML1ポリアミドとの結合に伴う顕著なバンドのシフトは確認出来なかったことから、ML1ポリアミドは一塩基の差異を認識して、実際に*in vitro*において塩基配列特異的に結合することを示した。

ML1ポリアミドが期待される効果を持つ為には、一塩基の差異を認識し、野生型mtDNAとだけ特異的に結合し、A3243G変異型mtDNAとは結合しないか、非常に弱く結合することが要求される。この実験で少なくとも*in vitro*では、ML1ポリアミドはこの条件を満たしていることが判明した (図24)。

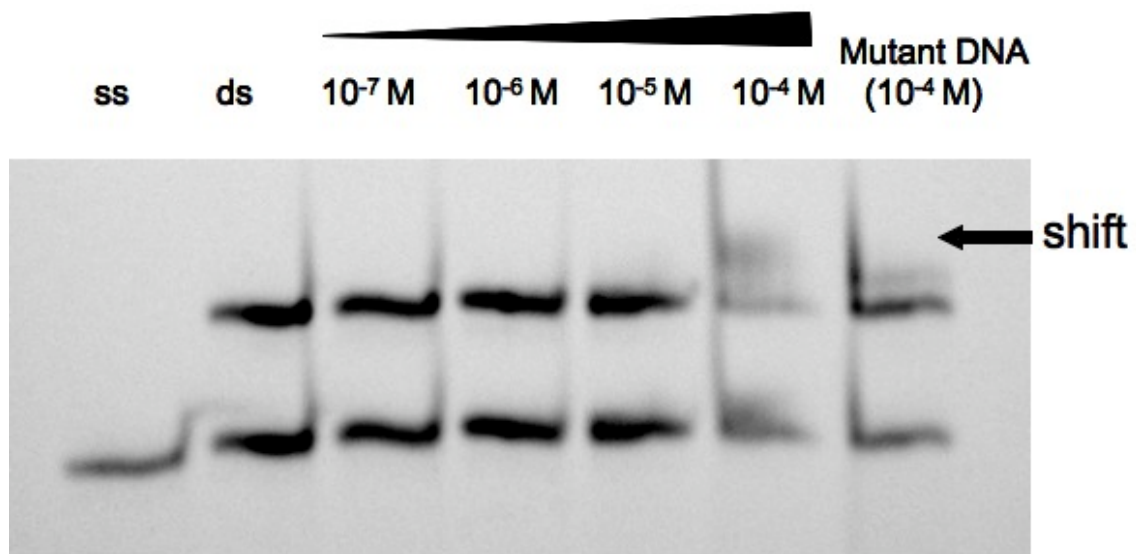


図 24. EMSA による ML1 ポリアミドとターゲット配列との塩基配列特異的結合の解析。ターゲット配列の dsDNA で顕著なバンドのシフトが見られる（濃度 10^{-4} M）。一塩基置換を持つ A3243G 変異型 dsDNA では顕著なシフトが見られない。このことは ML1 ポリアミドの塩基配列特異的結合が *in vitro* で起きていることを示している。ss: single-stranded DNA, ds: double-stranded DNA

3-4-2 免疫沈降させた mtDNA 断片の PCR 増幅

mTERF タンパク質と cross-link した mtDNA はソニケーションにより、約 200 bp まで断片化され、抗 mTERF 抗体と結合させることにより、agarose beads と共沈し、DNA の精製後、PCR により増幅されてバンドが検出される。一方、ML1 ポリアミドは mTERF タンパク質と mtDNA との結合を阻害する為、抗 mTERF 抗体をセルライゼートに加えても、mTERF タンパク質と cross-link した mtDNA 断片との共沈現象は殆ど起こらず、DNA バンドが僅かしか検出されない。これと同様なことは negative control (N.C.)でも起こり、セルライゼートに添加された IgG 抗体は mTERF タンパク質と結合せず、抗体と共沈する mtDNA 断片は得られない。それ故、PCR により増幅されたバンドは検出されない。

今回、PI ポリアミドの **negative control** として LOX1 ポリアミドを使用した。LOX1 ポリアミドは ML1 ポリアミドと同じ 3- β -3 構造を有し、8 塩基配列を認識する構造類似体であるが、ML1 ポリアミドとは異なる塩基認識能を持つ。この為、mTERF タンパク質は mtDNA と cross-link し、抗 mTERF 抗体で共沈する筈であるが、実際にポリアミド未処理細胞及び LOX1 ポリアミド処理細胞では DNA バンドが検出され、mtDNA 断片の免疫沈降が確認された。一方、ML1 ポリアミド処理細胞やセルライゼートに IgG 抗体を加えた **negative control** からの DNA を PCR で検出を試みたところ、沈降・回収された DNA 断片の微量にしか得られず、PCR 増幅バンドも明瞭ではなかった(図 25)。



図 25. 免疫沈降した mTERF 結合配列を含む mtDNA 断片の PCR 増幅。

3-4-3 免疫沈降した mtDNA 断片の q-PCR による定量

5 μ M の濃度の ML1 ポリアミドで処理した HeLa 細胞から得られ免疫沈降した DNA 量は、q-PCR により定量した。ML1 ポリアミドで処理した細胞からの免疫沈降した DNA 量は、ポリアミド未処理細胞の約 20 分の 1 で、生細胞における ML1 ポリアミドによる明らかな mTERF の結合阻害効果が認められた。なお、免疫沈降に IgG 抗体を加えた **negative control** (N.C.) では得られた DNA 断片は非常に微量であった (図 26)。

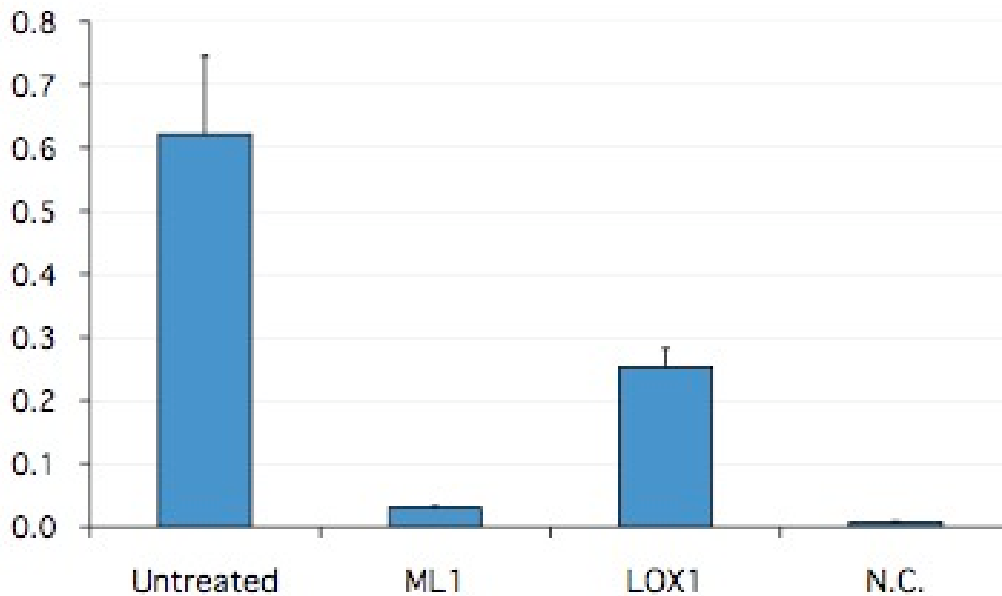


図26. ML1ポリアミドによるmTERF結合阻害。mIPによるDNA量を、q-PCRにて定量した (mean±S.E.M. n=3)。生細胞におけるML1ポリアミドのmtDNAへの結合とそれに伴うmTERFの結合阻害効果が認められる。

3-4-4 ML1ポリアミドによる野生型mtDNAの増加

A3243G変異型mtDNAを有する2SDサイブリッド細胞を7-14日間、ML1ポリアミドで処理した。濃度は1 μ M、5 μ M、10 μ Mとした。その後、サイブリッド細胞からtotal DNAを抽出し、PCR-RFLPを行なった後、DNAサンプルをマイクロチップ泳動定量装置にて、野生型mtDNAの比率を定量した。

その結果、7日間ポリアミド処理した2SDサイブリッド細胞では顕著な野生型mtDNAの増加は認められなかったが、14日間のML1ポリアミド処理したサイブリッド細胞で濃度依存的な野生型mtDNAの明らかな増加を認めた（図27）。

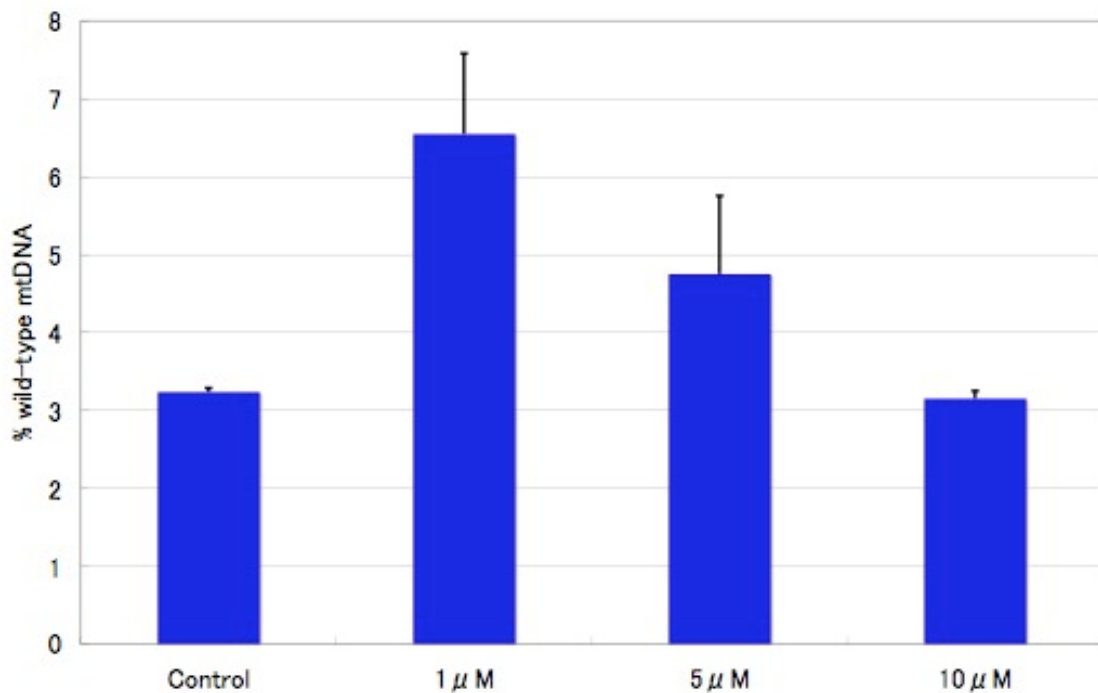


図27. PCR-RFLPで分離したDay14のサイブリッド細胞の野生型DNA量を泳動定量装置で解析した（mean±S.E.M. n=3）。生細胞におけるML1ポリアミドによる野生型mtDNAの増加が1 μM, 5 μMの培地濃度で観察された。培養液中のML1ポリアミドの濃度が高くなる程、効果が失われることが解る。

ML1ポリアミドの培地中の濃度10 μMで効果は殆ど認められなかったのに対し、より低い濃度(1 μM, 5 μM)では野生型mtDNAの優先的な複製に伴う、変異率の低下が観察された。この定量実験により、ML1ポリアミドの効果は1 μM > 5 μM > 10 μMのようになることから、1 μM以下の濃度で、より高い効果が期待され

たので、サイブリッド細胞を1 μ M、500 nM、100 nMの濃度でのML1ポリアミド処理を15日間行なった。

その結果、1 μ M、500 nM、100 nMの濃度で処理した全ての細胞で、PCR-RFLP後のagaroseゲル電気泳動で、コントロールに対し、肉眼で確認出来る程の野生型mtDNAの増加が認められた（図28）。

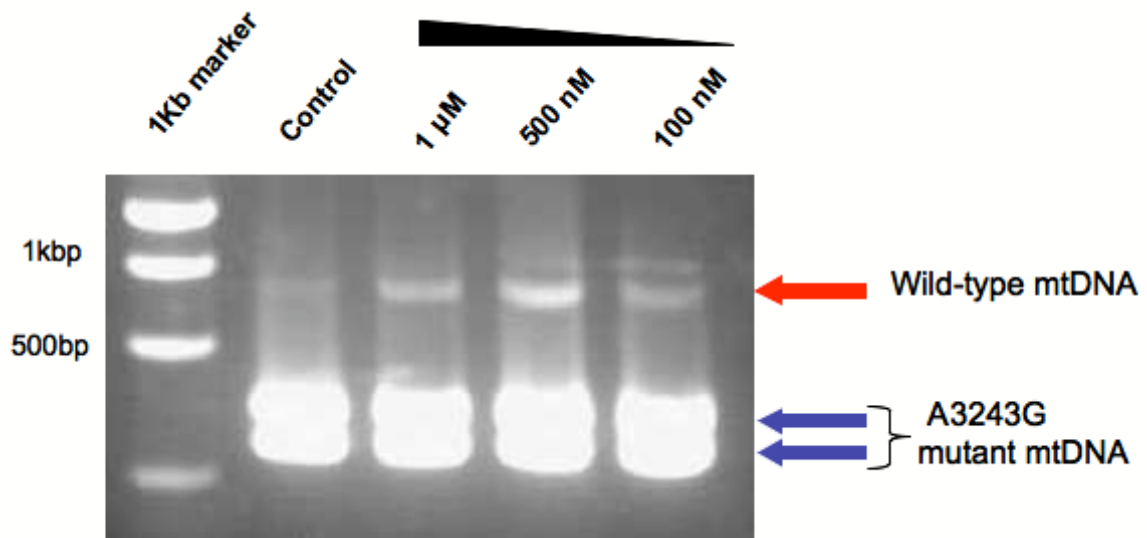


図28. ML1ポリアミド処理15日後のサイブリッド細胞での野生型mtDNAの増加。500 nMの濃度のML1ポリアミドで処理した細胞で、野生型mtDNAの増加が顕著である。

この培養実験から2SDサイブリッド細胞におけるML1ポリアミドの最大活性は、培地濃度500 nM付近に有ることが示唆された。更にML1ポリアミド濃度500 nMでの2SDサイブリッド細胞の培養を35日間続けたが、継続的な野生型mtDNAの増加を認めた（図29）。

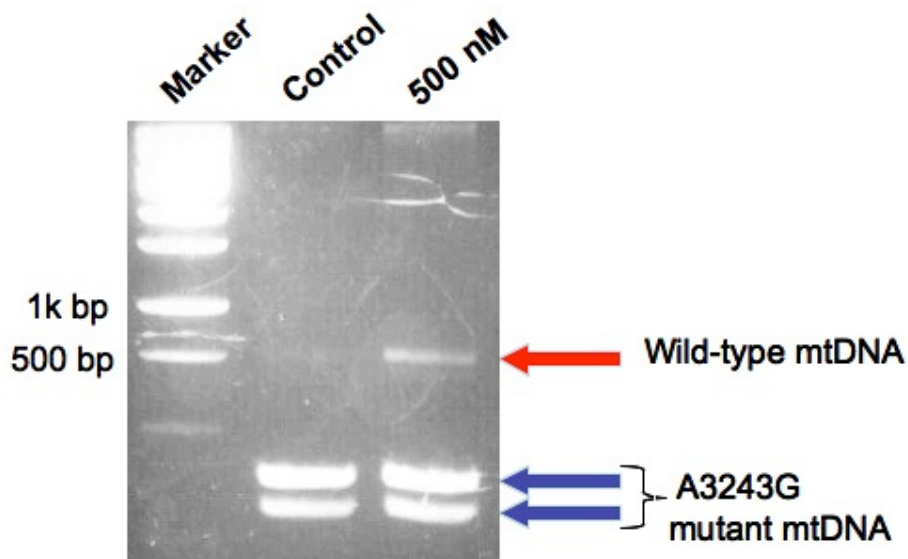


図29. ML1ポリアミド処理35日間後の2SDサイブリッド細胞内のmtDNA構成。野生型mtDNAが殆ど存在しないコントロールに対し、細胞内での継続的な野生型mtDNAの増加に伴う増幅バンドが確認出来る。

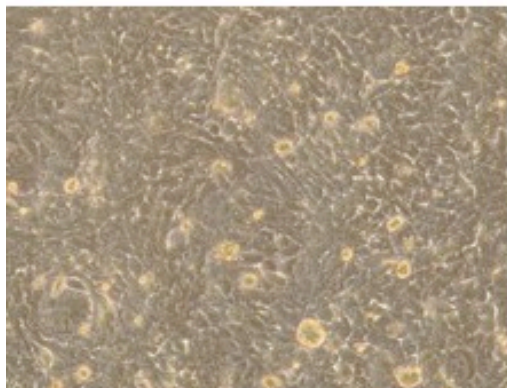
3-4-5 ML1ポリアミドのmTERF結合阻害が生細胞に与える影響

mTERFの主たる機能が、ミトコンドリアrRNAの合成に密接に関わっているとすれば、ML1ポリアミドの考えられ得る重大な副作用は、mTERFの結合阻害によるミトコンドリアrRNAの合成障害、それに伴う細胞死に至るレベルのミトコンドリア内翻訳系の停止である。これを吟味する為、2SDサイブリッド細胞の親細胞である143B細胞とHeLa細胞にML1ポリアミドの投与し、影響を観察した。

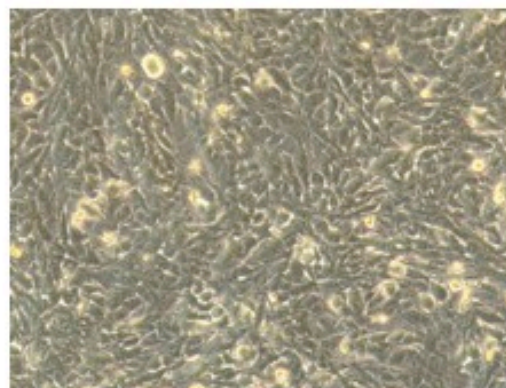
ML1ポリアミドの細胞への曝露は143B細胞では100 nM, 500 nM, 1 μ Mの濃度で、またHeLa細胞では1 μ Mとし、ML1ポリアミドの有効性が見られた範囲内の濃度で行なわれた。

この結果、一週間、ウリジン、ピルビン酸ナトリウムが含まれていない通常のDMEMで培養した143B細胞、HeLa細胞へのML1ポリアミド処理で、これらの細胞には何ら形態学的な影響が無く、生存し続けた。次にML1ポリアミド処理30時間後の細胞像を示す（図30, 31, 32）。

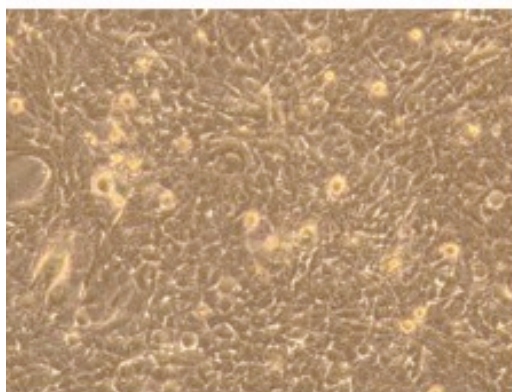
30 hrs under ML1 polyamide treatment



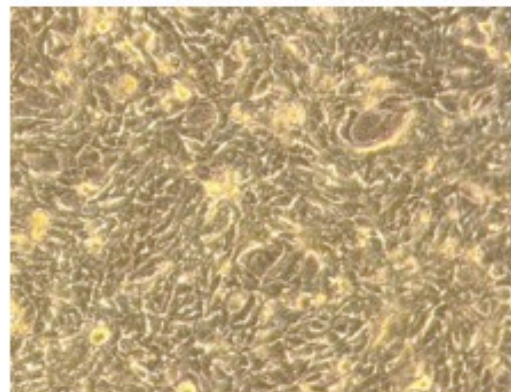
143B Complete DMEM



143B DMEM



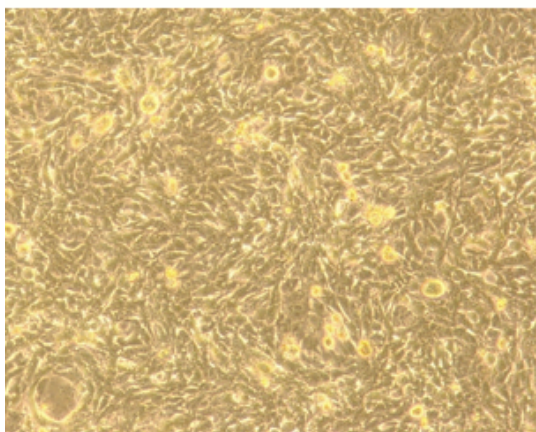
143B Complete DMEM
with 1 μ M ML1



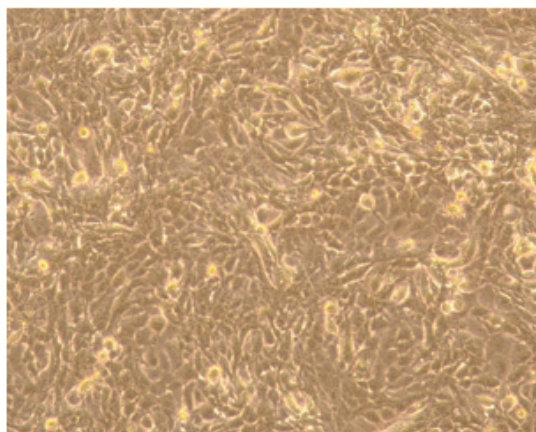
143B DMEM
with 1 μ M ML1

図30. 1 μ MのML1ポリアミドで処理した143B細胞と未処理のコントロール細胞。

30 hrs under ML1 polyamide treatment



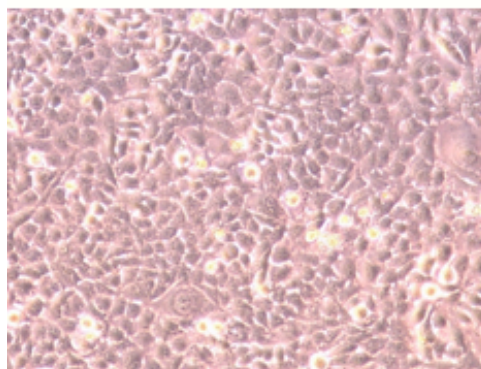
143B DMEM with 500 nM ML1



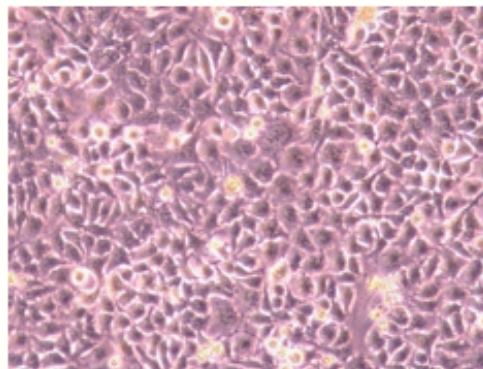
143B DMEM with 100 nM ML1

図31. 500 nM, 100 nMのML1ポリアミドで処理した143B細胞。

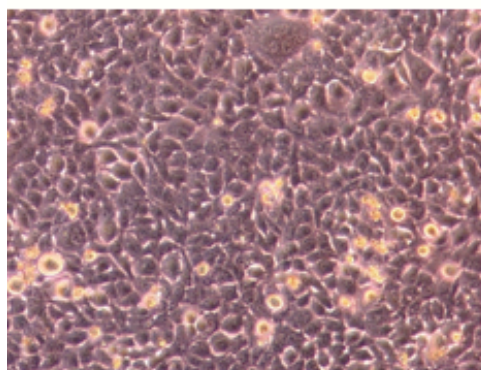
30 hrs under ML1 polyamide treatment



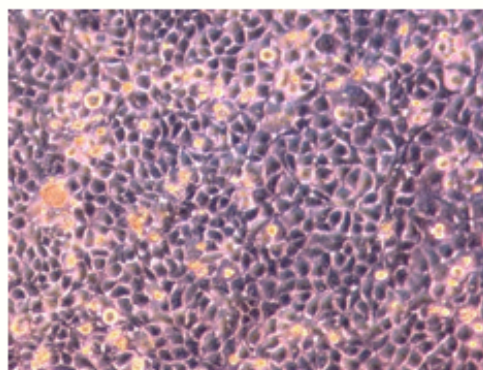
HeLa Complete DMEM



HeLa DMEM



HeLa Complete DMEM with 1 μ M ML1



HeLa DMEM with 1 μ M ML1

図32. 1 μ MのML1ポリアミドで処理したHeLa細胞と未処理のコントロール細胞。

3-5 考察

本研究では、第二章で述べた実験結果である mTERF の mtDNA 複製における抑制機能の知見、また提唱した A3243G 変異型 mtDNA と mTERF との相互作用を示した分子機構モデルに従って、野生型 mtDNA の転写終結配列への mTERF の結合を競合的に阻害することにより、野生型 mtDNA の複製を選択的に促進する効果を持つと考えられた ML1 ポリアミドを分子デザインし、開発した。

そして、この ML1 ポリアミドが *in vitro* での mTERF 結合配列への結合を示し、また実際に ML1 ポリアミドが生細胞を使用した実験で、mTERF の mTERF 結合配列への結合を *in vivo* で阻害することを mIP アッセイで確認した。これは同時に ML1 ポリアミドのミトコンドリア・マトリックスへの取り込みを証明するものでもあった。これまで、PI ポリアミドが核に移行することは知られていたが、ミトコンドリア内に取り込まれ、mtDNA と結合する、という報告は無かったからである。

現在の知見で mtDNA は、むき出しの状態ではミトコンドリア・マトリックスに存在しているのではなく、転写開始因子の一つである mitochondrial transcription factor A (TFAM) によって mtDNA 全周が覆われ、電子伝達系から漏出する電子により生成される活性酸素などの攻撃から保護されていると考えられており、実験的にそのことを示すデータも蓄積して来ている(Alam TI et al., 2003; Kanki T et al., 2004a; Kanki T et al., 2004b)。この為、ML1 ポリアミドとターゲット mtDNA 配列との結合が、TFAM によって阻害される可能性も充分考えられ、今回、*in vivo* おける ML1 ポリアミドと mtDNA との結合を確認する必要があった。

実験から、ML1 ポリアミドは、*in vivo* で TFAM などの mtDNA 結合タンパク質の影響を受けることなく、mTERF の転写終結配列へ結合していることが確かめら

れた。また、ML1ポリアミドをMELASサイブリッド細胞が生育している培地中の添加し、実際に野生型mtDNAの増加を観察した。この実験により、培地濃度500 nM付近で最も野生型mtDNAを増加させる効果が高いことが解った。特筆すべきは低濃度でも他の薬剤のように効果が失われるが、高濃度（10 μ M）でも効果が失われることである（図27）。これは高濃度において、ML1ポリアミドの塩基配列特異性、すなわち野生型と変異型mtDNAの一塩基の相違に対する選択性が失われ、A3243G変異型mtDNAのmTERF転写終結配列にも結合してしまうことによるものと考えられる。高濃度におけるこの特性は、想定していた分子作用機序に従ってML1ポリアミドがmtDNA分子に作用していることを間接的に裏付けるものである。

ML1ポリアミドを使用した治療で考慮すべき点は、このPIポリアミドを常に最適な濃度の範囲内で細胞に作用させることである。細胞レベルの実験において培養液中のML1ポリアミド濃度が一定でも、細胞内すなわちミトコンドリア内のポリアミドの濃度は変化し得る。前述のように、Dp末端が正に荷電している為、ミトコンドリア膜電位に依ってミトコンドリア・マトリックスにML1ポリアミドは集積すると考えられる。ML1ポリアミドの効果により、野生型mtDNAの相対量がMELAS細胞内で増加し閾値を超えると、OXPHOS機能が回復し、低下していたミトコンドリア膜電位が正常域まで回復する。そうなれば内膜の内外の電位差が大きくなり、より多くのML1ポリアミドがミトコンドリア・マトリックスに集積し、ミトコンドリア内部のML1ポリアミド濃度が高くなることで、その効果が減少する可能性がある。その為、最大の効果を維持する為には、MELAS細胞と正常細胞とのミトコンドリア内のML1ポリアミドの濃度の比較解析する実験が必要であろう。そして、そのデータに基づき、実際の治療では患

者へのML1ポリアミドの投与量を、細胞のOXPHOS機能の回復に応じて段階的に変えることが必要になるだろう。

ML1ポリアミドは、野生型mtDNAのmTERFの転写終結配列へのmTERFの結合を阻害することで効果を示す。この転写終結はミトコンドリアrRNAの効率的な合成に必要なだと信じられて来たので、ML1ポリアミド処理によって、ミトコンドリアrRNAの合成に悪影響を及ぼすことが少なからず懸念された。

これまでのサイブリッド細胞での研究で、A3243G病原性点変異は、*in vitro*で明らかな、mTERFの親和性の障害 (Hess et al.,1991; Chomyn et al.,1992)、転写終結障害(Hess et al.,1991; Yakubovskaya et al., 2010) を引き起こすことが報告されている。しかしながら、MELASサイブリッド細胞、MELAS患者由来組織、すなわち*in vivo*ではミトコンドリアrRNA合成障害は無いことが解った(Chomyn et al.,1992; Kaufmann et al., 1996)。最近になり、mTERFの発現をRNAiでノックダウンし、ミトコンドリア転写物の解析を行なった報告がなされたが、これによれば、mTERFの発現のノックダウンにより、sense-strand 12S rRNA量の上昇が見られ、16S rRNAとND1の転写物の量には影響を与えないことが示されている (Hyvarinen et al., 2010)。

ML1ポリアミドが、通常の培地で生息している野生型mtDNAのみ保持している培養細胞に細胞死を誘導しなかった事実は、前述の報告のように、A3243G病原性点変異は*in vitro*ではmTERFの結合障害やミトコンドリア転写終結障害を引き起こすが、ミトコンドリアrRNA合成に影響を与えないようにする、何らかのメカニズムが生細胞には存在する可能性が有ることと無関係ではない。*In vitro*においてmTERFの転写終結障害が認められても、*in vivo*ではミトコンドリアrRNAの合成に何ら影響を及ぼさないことから、ミトコンドリアrRNA合成は他のメカニズムによって代償されているか、現在信じられているmTERFの転写終結

機能はミトコンドリアrRNA合成とは別の処にあるのかも知れない。未だ、mTERFの実質的な機能は不明のままであり、mTERF遺伝子のノックアウト・マウスの作出などの個体レベルの研究を通じ、ML1ポリアミドの実用化に向けて、今後のmTERFのより詳細な機能解明が待たれる。

終章

本論文では、MELASの主たる分子遺伝学的病因となっているA3243G変異を持つ変異型mtDNAの細胞内の増減に関わっている因子と想定された、ミトコンドリア転写終結因子mTERFのmtDNA複製機構における機能、また細胞内のA3243G変異型mtDNA量の挙動との関連性を説明する分子機構モデルを提唱した。また、その分子機構モデルに従った分子治療ストラテジーがMELAS A3243G変異を持つサイブリッド細胞で有効であることを示した。

第一章では、A3243G変異型mtDNAを高率に持つサイブリッド細胞と正常組織由来繊維芽細胞を融合させることで、A3243G変異型mtDNAが選択的に消失することを実験的に示し、この実験結果から以下のことを考察した。

ミトコンドリア融合が完了した以降も、A3243G変異型mtDNAの選択的減少は進行した。またmtDNAの消失は漸次的であり、受精時に見られるようなミトコンドリアの破壊に伴うmtDNAの急激な消失ではない。以上のことから変異型mtDNAの消失はミトコンドリアの破壊に伴う変異型mtDNAの破壊というより、野生型と変異型mtDNAとの複製機構または維持機構の何らかの差異と考えられた。またA3243G変異はミトコンドリア転写終結因子mTERFの転写終結に必須な結合配列内に存在しているが、この変異はmTERF結合配列への親和性の障害を引き起こすことが*in vitro*の実験で既に示されており、またmtDNA複製においてmTERFが複製反応に影響を与える因子であるとする報告もあることから、野生型mtDNAと変異型mtDNAの細胞内選択のデターミナントである可能性が強く示唆された。

第二章では、このmTERFが、mtDNAの細胞内選択のデターミナントとしてA3243G変異型mtDNAの量的挙動にどのような影響を与えるかどうかを調べる為、哺乳類細胞発現ベクターに組み込んだmTERF遺伝子をサイブリッド細胞に導入し、mTERF遺伝子の発現を亢進させ、A3243G変異率の変動に関与している因子であるか否かを解析した。また正常細胞の内在性mTERF遺伝子の発現をsiRNAにてノックダウンし、細胞内のmtDNAの複製機構における以下のことを明らかにした。

mTERF遺伝子の発現亢進はA3243G変異型mtDNAの増加に関わっていること、またmTERFの機能低下により、細胞内のmtDNAのコピー数が増加することから、mTERFはmtDNA複製に対して抑制的機能を有すること、これらのことを実験で示した。そして、以上の実験結果を充足する、細胞内でA3243G変異型mtDNAが増加してくる分子機構メカニズムを提唱した。

第三章では、第二章で提唱したA3243G変異型mtDNAとmTERFの相互作用を説明した分子機構モデルに従って、野生型mtDNAへのmTERFの結合をPIポリアミド（ML1ポリアミド）で選択的に阻害することにより、野生型mtDNAの優先的な複製促進を試みた。その結果、以下の結果が得られた。

野生型mtDNAの転写終結配列へのmTERFの結合を阻害するよう分子デザインされたML1ポリアミドは、実際にMELASサイブリッド細胞において、野生型mtDNA量を選択的に細胞内で増加させる効果を実際に示した。また、この効果を持つ濃度範囲内のML1ポリアミド処理を通常の培地で生育している培養細胞に対して行なっても、何ら変化は認められず生存し続けた。この結果からミト

コンドリアrRNA合成は細胞内の他のメカニズムによって代償されているか、ミトコンドリアrRNAの効率的な合成の為の転写終結が主要な機能とされている、mTERFの本質的な役割が別の処に有る、とも言うことが出来、このことは、細胞内でML1ポリアミドによりmTERFの転写終結配列への結合が阻害されても、その考えられ得る副作用が現れなかった理由と考えられた。以上のことから、ML1ポリアミドは、現在、根本的な治療法が存在しないA3243G変異によって引き起こされるMELASをはじめとするミトコンドリア遺伝子疾患の有効な治療薬に繋がる可能性がある。

引用文献

Alam TI, Kanki T, Muta T, Uraji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N and Kang D: Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nuc Acids Res* 31(6) :1640-1645, 2003.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijin MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R and Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*: 290,457-465,1981.

Borner GV, Zeviani M, Tiranti V, Carrara F, Hoffmann S, Gerbitz KD, Lochmuller H, Pongratz D, Klopstock T, Melberg A, Holme E and Paabo S: Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum Mol Genet* 9: 467-475, 2000.

Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Tayler RW, Bindoff LA, Turnbull DM: The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 48: 188-193, 2000.

Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C and Attardi G: MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in

respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4221-4225, 1992.

Christianson TW and Clayton DA: A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. Mol Cell Biol 8: 4502-4509, 1988.

Derban PB: Molecular recognition of DNA by small molecules. Bioorg Med Chem 9: 2215-2235, 2001.

DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M and DeVivo DC: Mitochondrial myopathies. Ann Neurol 17(6):521-38, 1985.

Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT and Holt IJ: Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. Proc Natl Acad Sci USA 92: 6562-6566, 1995.

Egholm H, Buchart O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B and Nielsen PE: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature 365: 566-568, 1993.

Goto Y, Nonaka I and Horai S: A mutation in the tRNA (Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 348: 651-653, 1990.

Hess JF, Parisi MA, Bennett JL and Clayton DA: Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 351: 236-239, 1992.

Hixson JE, Wong TW and Clayton DA: Both the conserved stem-loop and the divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand replication. *J Biol Chem* 261 (5) : 2384-2390, 1986.

Holt IJ, Lorimer HE and Jacobs HT: Coupled leading- and lagging-strand replication. *Cell* 100: 515-524, 2000.

Hyvarinen AK, Pohjoismaki JLO, Reyes A, Wanrooij S, Yasukawa T, Karhunen PJ, Spelbrink JN, Holt IJ and Jacobs HT: The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 35: 6458-6474, 2007

Kanki T, Nakayama H, Sasaki N, Taikio K, Alam TI, Hamasaki N and Kang D: Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann NY Acad Sci* 1011: 61-68, 2004a.

Kanki T, Ohgaki K, Gaspari M, Gustafsson CM, Fukuoh A, Sasaki N, Hamasaki N and Kang D: Architectural role of mitochondrial transcription factor A in

maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* 24(22): 9823-9834, 2004b.

Kaufmann P, Koga Y, Shanske S, Hirano M, DiMauro S, King MP and Schon EA: Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann Neurol* 40: 172-180, 1996.

King MP and Attardi G: Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246: 500-503, 1989.

King MP, Koga Y, Davidson M and Schon EA: Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Mol Cell Biol* 12: 480-490, 1992.

Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y and Ohta S: A point mutation in the mitochondrial tRNA (Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun* 173: 816-822, 1990.

Kruse B, Narasimhan N and Attardi G: Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell* 58: 391-397, 1989.

Martin M, Cho J, Cesare AJ, Griffith JD, and Attardi G: Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell* 123: 1227-1240, 2005.

Martinuzzi A, Bartolomei L, Carrozzo R, Mostacciuolo M, Carbonin C, Toso V, Ciafaloni E, Shanske S, DiMauro S and Angelini C: Correlation between clinical and molecular features in two MELAS families. *J Neuro Sci* 113: 222-229, 1992.

Moraes CT, Kenyon L and Hao H: Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: The determining role of primary sequence and length over function. *Mol Biol Cell* 10: 3345-3356, 1999.

Muratovska A, Lightowers RN, Taylor RW, Turnbull DM, Smith RAJ, Wilce JA, Martin SW and Murphy MP: Targeting of peptide nucleic acids (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugations to lipophilic cations: Implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease. *Nucl Acids Res* 29: 1852-1863, 2001.

Murphy M: Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends Biol* 15(8): 326-330, 1997.

Ono T, Isobe K, Nakada K and Hayashi JI: Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28: 272-275, 2001.

Park H, Davidson E and King MP: The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) decreases the efficiency of aminoacylation. *Biochemistry* 42: 958-964, 2003.

Pavlakakis SG, Phillis PC, DiMauro S, De Vivo DC and Rowland LP: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 16: 481-488, 1984.

Pilch DS, Poklar N, Gelfand CA, Law SM, Breslauer KJ, Baird EE and PB Dervan: Binding of a hairpin polyamide in the minor groove of DNA: Sequence-specific enthalpic discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8306-8311, 1996.

Shanske S, Pancrudo J, Kaufmann P, Engelstad K, Jhung S, Lu J, Naini A, DiMauro S and De Vivo DC: Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implication for diagnosis. *Am J Med Genet A* 130: 134-137, 2004.

Shoubridge EA: Segregation of mitochondrial DNAs carrying a pathogenic point mutation (tRNA^(leu3243)) in cybrid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 189-195, 1995.

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C and Schatten G: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402: 371-372, 1999.

Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM and Lightowers RN: Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication. *Nat Genet* 15: 212-215, 1997.

Taylor RW, Wardell TM, Smith PM, Muratovska A, Murphy M P, Turnbull DM and Lightowers RN: An antigenomic strategy for treating heteroplasmic mtDNA disorders. *Adv Drug Deliv Rev* 49: 121-125, 2001.

Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kikuchi A, Nakano I, Ozawa K and Yagi K: Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *J Biomed Sci* 9: 534-541, 2002.

Tauger JW, Baird EE and Derban PB: Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature (Lond)* 382:559-561, 1996.

Yakubovskaya E, Mejia E, Byrnes J, Hambardjjeva E and Garcia-Diaz M: Helix unwinding and base flipping enable human MTERF1 to terminate mitochondrial transcription. *Cell* 141(6):982-93, 2010.

Yasukawa T, Suzuki T, Ueda T, Ohta S and Watanabe K: Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs^{Leu(UUR)} with pathogenic

mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes. *J Biol Chem* 275: 19198-19209, 2000.

Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O and Attardi G: Marked replication advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11164-11168, 1992.

White S, Baird EE and Derban PB: On the pairing rules for recognition in the minor groove of DNA by pyrrole-imidazole polyamides. *Chem Biol* 4: 569-578, 1997.

Wittenhagen LM and Kelly SO: Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat Struct Biol* 9 (8): 586-590, 2002.

発表論文

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

Yano T, Tanaka M, Fukuda N, Ueda T and Nagase H: Loss of mutant mitochondrial DNA harboring the MELAS A3243G mutation in human cybrid cells after cell-cell fusion with normal tissue-derived fibroblast cells. *International Journal of Molecular Medicine* 25: 153-158, 2010

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤なるご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 分子医科学分野 教授 上田卓也先生に深く感謝申し上げます。

本研究の実験の全般に渡り、ご指導を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 分子医科学分野 准教授 富田（竹内）野乃先生、東京都健康長寿医療センター研究所 田中雅嗣博士に心より感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 医用機能分子工学分野 准教授 和田猛先生に厚くお礼申し上げます。

研究における実験に使用した抗mTERF抗体の提供をして頂きましたフィンランド、University of Tampere 教授 Howard T. Jacobs博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実験にご協力を頂きました、日本大学医学部先端医学講座細胞再生移植医学分野、癌遺伝学分野の皆様にも厚くお礼申し上げます。

研究生生活を共に過ごし、公私にわたり終始励まして下さった多くの友人に心よりお礼申し上げます。

最後に、終始温かく見守り励ましてくれた家族に心から感謝致します。

平成 22 年 10 月