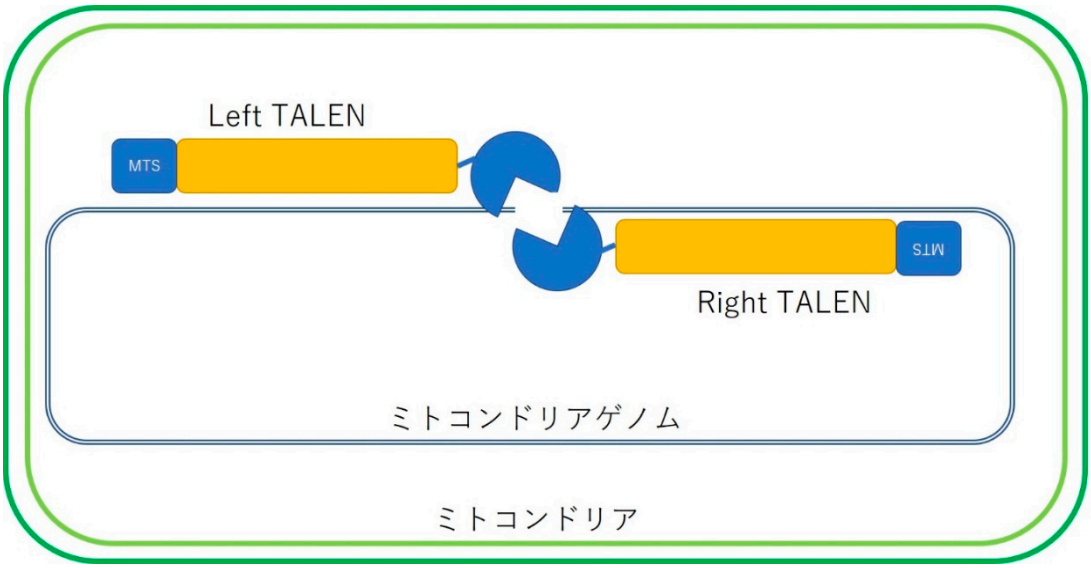
144　mitoTALENを用いたミトコンドリアゲノム改変への挑戦	木下　善仁

【目的】ミトコンドリア病は最も頻度の高い先天代謝疾患として知られ、厚労省の定める指定難病となっている。本研究では、ミトコンドリア病のゲノム解析から同定されたミトコンドリア遺伝子変異の有害性検証するため、ミトコンドリアゲノムを対象としたゲノム編集ツール mitoTALEN の技術構築を目的とする。

【方法】従来の TALEN（Transcription activator-like effector nuclease）にミトコンドリア局在シグナルを付加したベクターを構築し、ミトコンドリア局在型の mitoTALEN を作製した。さらに Left TALEN と Right TALEN の細胞内導入が確認できるように、EGFP と mCherry の蛍光マーカーをそれぞれに導入した。先行研究で同定したミトコンドリア遺伝子変異をターゲットとする mitoTALEN を構築した。株化細胞 HEK293 あるいはミトコンドリア遺伝子変異を有する患者線維芽細胞に対して、リポフェクションにより mitoTALEN を導入した。

【結果】まず mitoTALEN を処理した HEK293 細胞で、ミトコンドリアを分画し、mitoTALEN の細胞内局在を確認した。TALEN の十分なミトコンドリア局在を確認することができた。また、免疫染色でも mitoTALEN のミトコンドリア局在を確認することができた。mitoTALEN を処理した HEK293 細胞では十分な蛍光タンパク質の発現を確認することができたが、患者線維芽細胞での導入効率は高くなかった。そこで、セルソーターを用いて、EGFP と mCherry のダブルポジティブ細胞を選択した。この細胞でのミトコンドリア変異率の変動を定量し、7％程度の変異減少を観察した。

mitoTALEN によるミトコンドリアゲノム編集



144. mitoTALEN を用いたミトコンドリアゲノム改変への挑戦

木下　善仁

順天堂大学 大学院医学研究科 難治性疾患診断・治療学 難病の診断と治療研究センター

Key words：ミトコンドリア，ミトコンドリア病，ゲノム編集

緒　言

ミトコンドリア病はミトコンドリアの機能異常によって引き起こされる難治性疾患であるが、ミトコンドリア遺伝子および核遺伝子のいずれの異常によっても引き起こされる。これまで、我々の研究グループでは日本で最大となるミトコンドリア病のコホート研究を行ってきており、ミトコンドリア病患者のゲノム解析から多岐に渡る病型およびその原因遺伝子を明らかにしてきた［1，2］。我々は現在までにミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の両方を対象とする遺伝子パネルおよび全エクソーム解析を行ってきた。146 例におよぶミトコンドリア病患者のゲノム解析を報告し［2］、続いて神経症状を主症候とする Leigh 脳症についても 106 例の生化学診断とゲノム解析を報告してきた［3］。核遺伝子については、様々な遺伝子解析技術を用いることができることから検証実験が進み、多くの新規原因遺伝子を報告することができた［2，4〜7］。一方で、ミトコンドリア遺伝子は核遺伝子に比べて遺伝学的解析技術が限られており、検証が難しいものとなっている。ミトコンドリアの遺伝子変異は MITOMAP（https://www.mitomap.org/MITOMAP）というデータベースにまとめられている。有害性が検証されている変異や議論の余地のある変異、SNP 等が登録されている。我々の過去の報告により、確定的な原因変異となったミトコンドリア遺伝子変異も存在する［8］。我々のゲノム解析では MITOMAP に登録のない未知のバリアントなども多数同定しているが、解析技術の不足から検証が進まずに有害性を確認できていないバリアントが多数残っている。そこで本研究では、これらの未知の変異の問題を解決するために、ミトコンドリア局在型の TALEN（ranscription activator-like effector nuclease）を用いた、ゲノム編集技術の技術確立を目標とした。

方法および結果

1.　mitoTALEN ベクターの作製

従来の TALEN の N 末端側にミトコンドリア局在シグナルを付加したベクターを作製し、TALEN がミトコンドリアに局在するように改変した。さらに Left TALEN と Right TALEN の細胞内導入が確認できるように、EGFP と mCherry の蛍光マーカーをそれぞれに導入した。これまでのミトコンドリア病のゲノム解析により同定したミトコンドリア遺伝子変異を認識しうる DNA 結合配列を導入した mitoTALEN を作製した。ミトコンドリア遺伝子変異は未報告変異であるため、現時点での公表を控える。

2.　mitoTALEN の細胞内局在の確認と蛍光マーカーの発現の確認

まずヒト胎児腎細胞である HEK293 細胞に対して作製した mitoTALEN をリポフェクションにより導入した。この導入細胞からミトコンドリアを分画し、mitoTALEN の細胞内局在を確認した（図 1A）。TALEN は細胞質を多く含む画分にはほとんど見られず、ミトコンドリア画分に多く存在することが確認できた。免疫染色によっても mitoTALEN とミトコンドリアの共局在を確認することができた。また、mitoTALEN を処理した HEK293 細胞では十分な EGFP と mCherry の発現を確認することができた（図 1B）。

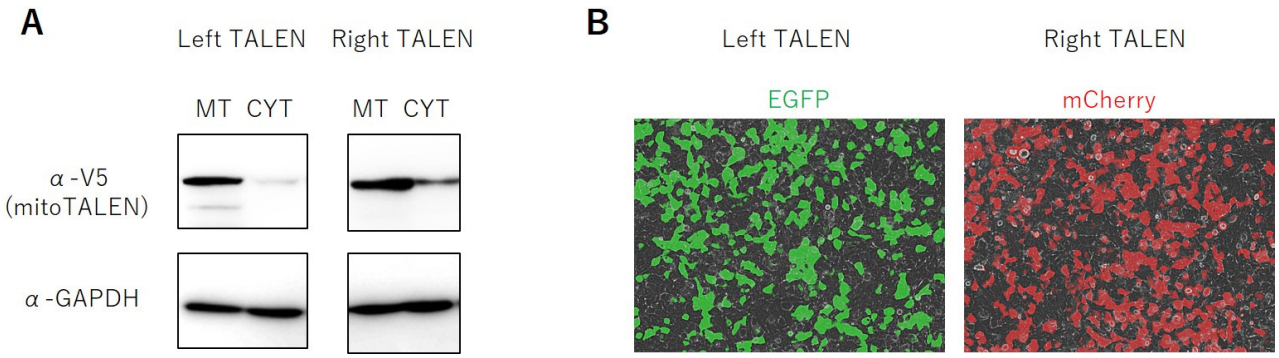


図 1. mitoTALEN の局在確認と蛍光マーカーの確認

A) HEK293 細胞に mitoTALEN（Left および Right）を導入した 2 日後に、ミトコンドリアを分画した（MT）。分画の際には、細胞質の多く含まれる画分（CYT）も回収した。TALEN には V5 タグを C 末端側に付加したため、V5 抗体を用いて SDS-PAGE/ウエスタンブロットにより検出を行った。

B) HEK293 細胞に mitoTALEN（Left および Right）を導入した 2 日後に、EGFP と mCherry の蛍光を撮影した。

3. 患者線維芽細胞への mitoTALEN の導入とミトコンドリア遺伝子変異率の測定

患者線維芽細胞でも mitoTALEN の導入を行ったが蛍光タンパク質のポジティブ細胞の数は多くなかったため、セルソーターを用いて EGFP と mCherry のダブルポジティブ細胞を選択した（図 2A）。この細胞でのミトコンドリア変異率の変動を定量し、約 7%程度の変異減少を観察した（図 2B）。

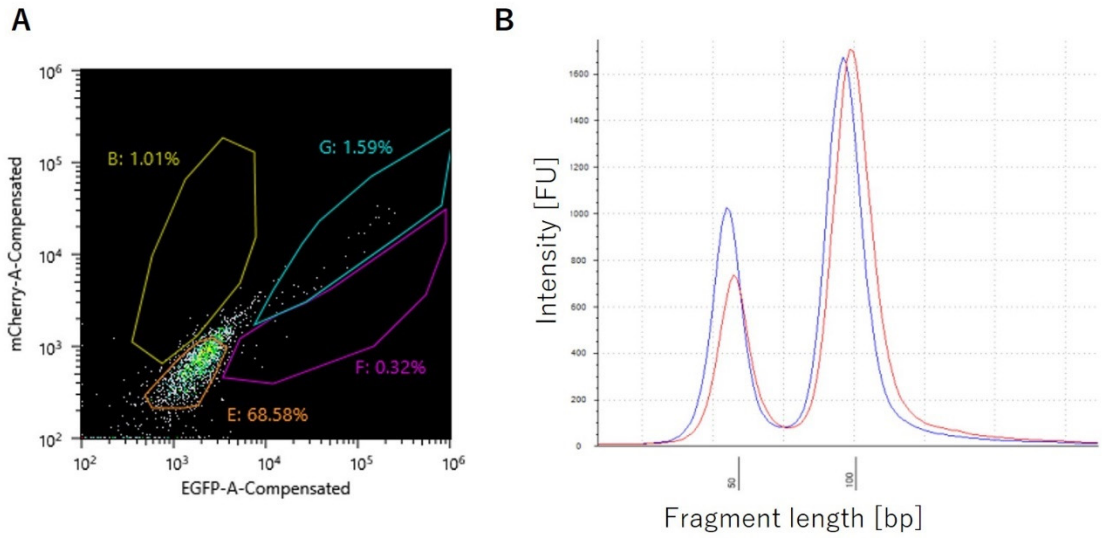


図 2. mitoTALEN の導入細胞のセレクションとミトコンドリア変異比率変動の検証

A) 患者線維芽細胞に mitoTALEN（Left および Right）を導入した 3 日後に、EGFP と mCherry のダブルポジティブ細胞をセルソーターで分取した。G の領域をダブルポジティブ、E の領域をダブルネガティブの領域としてソーティングした。

B) 患者線維芽細胞に mitoTALEN（Left および Right）を導入しソーティングした細胞で、PCR-RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）法にてミトコンドリア遺伝子変異率を調べた。ダブルポジティブ細胞（青）ではダブルネガティブ細胞（赤）と比べて、約 7%の変異率の減少がみられた。この PCR-RFLP では、変異が存在する場合には制限酵素で PCR 産物が切断されないため、野生型が増えるほど 50 bp あたりの産物が減少することになる。

考　察

mitoTALEN を用いてミトコンドリア遺伝子変異のゲノム編集の実験系の構築を行った。変異の変動率は高くなかったが、一定数の変異を消去することには成功した。今後、この効率を高めるとともに変異導入についても実験系の構築を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、順天堂大学大学院難治性疾患診断・治療学の岡﨑康司、神田将和、八塚由紀子、埼玉医科大学小児科の大竹明、千葉県こども病院の村山圭である。

文　献

1) Ohtake A, Murayama K, Mori M, Harashima H, Yamazaki T, Tamaru S, Yamashita Y, Kishita Y, Nakachi Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Mizuno Y, Moriyama Y, Kato H, Okazaki Y. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. Biochim Biophys Acta. 2014 Apr;1840(4):1355-9. Epub 2014 Jan 24. Review. PMID: 24462578 DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.01.025.

2) Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Borna NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. PLoS Genet. 2016 Jan 7;12(1):e1005679. PMID: 26741492 DOI: 10.1371/journal.pgen.1005679. eCollection 2016 Jan.

3) Ogawa E, Shimura M, Fushimi T, Tajika M, Ichimoto K, Matsunaga A, Tsuruoka T, Ishige M, Fuchigami T, Yamazaki T, Mori M, Kohda M, Kishita Y, Okazaki Y, Takahashi S, Ohtake A, Murayama K. Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. J Inherit Metab Dis. 2017 Sep;40(5):685-693. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28429146 DOI: 10.1007/s10545-017-0042-6.

4) Kishita Y, Pajak A, Bolar NA, Marobbio CM, Maffezzini C, Miniero DV, Monné M, Kohda M, Stranneheim H, Murayama K, Naess K, Lesko N, Bruhn H, Mourier A, Wibom R, Nennesmo I, Jespers A, Govaert P, Ohtake A, Van Laer L, Loeys BL, Freyer C, Palmieri F, Wredenberg A, Okazaki Y, Wedell A. Intra-mitochondrial Methylation Deficiency Due to Mutations in SLC25A26. Am J Hum Genet. 2015 Nov 5;97(5):761-8. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26522469 DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.09.013.

5) Feichtinger RG, Oláhová M, Kishita Y, Garone C, Kremer LS, Yagi M, Uchiumi T, Jourdain AA, Thompson K, D'Souza AR, Kopajtich R, Alston CL, Koch J, Sperl W, Mastantuono E, Strom TM, Wortmann SB, Meitinger T, Pierre G, Chinnery PF, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, DiMauro S, Calvo SE, Mootha VK, Moggio M, Sciacco M, Comi GP, Ronchi D, Murayama K, Ohtake A, Rebelo-Guiomar P, Kohda M, Kang D, Mayr JA, Taylor RW, Okazaki Y, Minczuk M, Prokisch H. Biallelic C1QBP Mutations Cause Severe Neonatal-, Childhood-, or Later-Onset Cardiomyopathy Associated with Combined Respiratory-Chain Deficiencies. Am J Hum Genet. 2017 Oct 5;101(4):525-538. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28942965 DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.08.015.

6) Martin CA, Sarlós K, Logan CV, Thakur RS, Parry DA, Bizard AH, Leitch A, Cleal L, Ali NS, Al-Owain MA, Allen W, Altmüller J, Aza-Carmona M, Barakat BAY, Barraza-García J, Begtrup A, Bogliolo M, Cho MT, Cruz-Rojo J, Dhahrabi HAM, Elcioglu NH; GOSgene, Gorman GS, Jobling R, Kesterton I, Kishita Y, Kohda M, Le Quesne Stabej P, Malallah AJ, Nürnberg P, Ohtake A, Okazaki Y, Pujol R, Ramirez MJ, Revah-Politi A, Shimura M, Stevens P, Taylor RW, Turner L, Williams H, Wilson C, Yigit G, Zahavich L, Alkuraya FS, Surralles J, Iglesias A, Murayama K, Wollnik B, Dattani M, Heath KE, Hickson ID, Jackson AP. Mutations in TOP3A Cause a Bloom Syndrome-like Disorder. Am J Hum Genet. 2018 Aug 2;103(2):221-231. Epub 2018 Jul 26. PMID: 30057030 DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.07.001.

7) Borna NN, Kishita Y, Kohda M, Lim SC, Shimura M, Wu Y, Mogushi K, Yatsuka Y, Harashima H, Hisatomi Y, Fushimi T, Ichimoto K, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Mitochondrial ribosomal protein PTCD3 mutations cause oxidative phosphorylation defects with Leigh syndrome. Neurogenetics. 2019 Mar;20(1):9-25. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30607703 DOI: 10.1007/s10048-018-0561-9.

8) Imai A, Fujita S, Kishita Y, Kohda M, Tokuzawa Y, Hirata T, Mizuno Y, Harashima H, Nakaya A, Sakata Y, Takeda A, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. Rapidly progressive infantile cardiomyopathy with mitochondrial respiratory chain complex V deficiency due to loss of ATPase 6 and 8 protein. Int J Cardiol. 2016 Mar 15;207:203-5. Epub 2016 Jan 7. PMID: 26803244 DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.01.026.