

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-55729

(P2017-55729A)

(43) 公開日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B024
AO1K	67/027	(2006.01)	AO1K	67/027	ZNA	4B065
C12N	1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C087
C12N	1/19	(2006.01)	C12N	1/19		
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 未請求 請求項の数 19 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-185058 (P2015-185058)
 (22) 出願日 平成27年9月18日 (2015.9.18)

(71) 出願人 503360115
 国立研究開発法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74) 代理人 230104019
 弁護士 大野 聖二
 (74) 代理人 100105991
 弁理士 田中 玲子
 (74) 代理人 100119183
 弁理士 松任谷 優子
 (74) 代理人 100114465
 弁理士 北野 健
 (74) 代理人 100149076
 弁理士 梅田 慎介

最終頁に続く

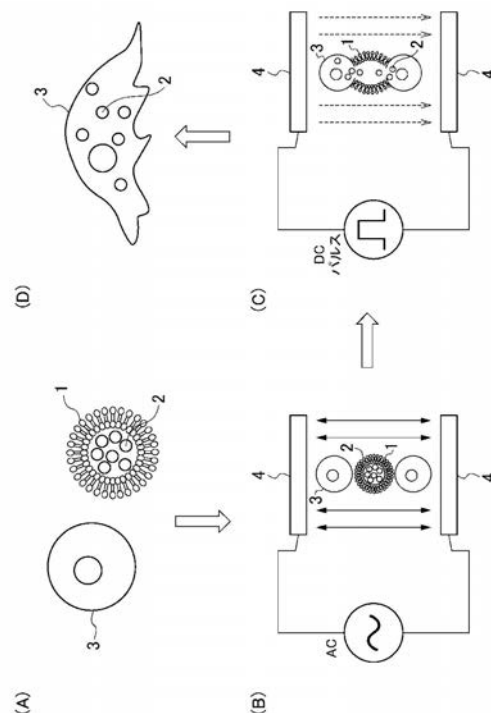
(54) 【発明の名称】細胞内へのミトコンドリア導入方法、外因性ミトコンドリアが導入された細胞及び動物の製造方法

(57) 【要約】

【課題】細胞に内在するミトコンドリア(内因性ミトコンドリア)とは遺伝的に異なる外来のミトコンドリア(外因性ミトコンドリア)を細胞内に導入するための新たな技術の提供。

【解決手段】ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付されたGUVと、細胞と、の混合液に交流電場を印加して、前記GUVと前記細胞とを配列させる交流電場印加手順と、前記混合液に直流パルス電場を印加して、前記GUVの膜と前記細胞の膜とを少なくとも一部融合させる直流電場印加手順と、含む、細胞内へのミトコンドリア導入方法を提供する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付された G U V と、細胞と、の混合液に交流電場を印加して、前記 G U V と前記細胞とを配列させる交流電場印加手順と、前記混合液に直流パルス電場を印加して、前記 G U V の膜と前記細胞の膜とを少なくとも一部融合させる直流電場印加手順と、含む、細胞内へのミトコンドリア導入方法。

【請求項 2】

前記細胞が由来する種と、前記 G U V に封入されるミトコンドリアが由来する種が異なる、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記交流電場印加手順の前に、前記細胞内に発現させた制限酵素により前記細胞内の内因性ミトコンドリア D N A を切断するミトコンドリア除去手順をさらに含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記制限酵素は、前記細胞内の内因性ミトコンドリア D N A を切断するが、前記 G U V に封入される外因性ミトコンドリア D N A を切断しない、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞が由来する種がマウスであり、前記 G U V に封入されるミトコンドリアが由来する種がヒトであり、前記制限酵素は A g e I、B g l I I I、B s a B I、B s r G I、D r d I、P s h A I 及び S e x A I からなる群から選択されるいずれか一以上の制限酵素である、請求項 4 記載の方法。

20

【請求項 6】

前記ミトコンドリア除去手順において、前記制限酵素をコードする配列とミトコンドリア移行配列とを含む発現コンストラクトを前記細胞にトランスフェクションする、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記内因性ミトコンドリア除去手順後の前記細胞をウリジンとピルビン酸の存在下で培養する手順と、前記直流電場印加手順後の前記細胞をウリジンとピルビン酸の非存在下で培養する手順とをさらに含む、請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記 G U V に封入されるミトコンドリアが遺伝子変異を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 2 ~ 8 に記載のいずれか一項に記載の方法により、細胞内に、該細胞が由来する種と異なる種のミトコンドリアを導入する工程を含む、他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された細胞の製造方法。

【請求項 10】

他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された細胞。

40

【請求項 11】

前記細胞内の内因性ミトコンドリアを有さない、請求項 10 記載の細胞。

【請求項 12】

前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記外因性ミトコンドリアが遺伝子変異を有する、ミトコンドリア病モデル細胞である、請求項 10 又 11 記載の細胞。

【請求項 13】

請求項 2 ~ 8 に記載のいずれか一項に記載の方法により、胚性幹細胞内に、該細胞が由来する種と異なる種のミトコンドリアを導入する工程と、前記胚性幹細胞から個体を発生させる工程と、を含む、

50

他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された非ヒト動物の製造方法。

【請求項 14】

他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された非ヒト動物。

【請求項 15】

前記動物由来の内因性ミトコンドリアを有さない、請求項 14 記載の非ヒト動物。

【請求項 16】

前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記外因性ミトコンドリアが遺伝子変異を有する、ミトコンドリア病モデル動物である、請求項 14 又は 15 記載の動物。

【請求項 17】

前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝子変異を有し、前記 G U V に封入されるミトコンドリアが遺伝的に正常である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 17 記載の方法により、遺伝子変異を有する内因性ミトコンドリアを含む細胞内に、遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入する工程を含む、正常ミトコンドリアが導入された細胞の製造方法。

【請求項 19】

請求項 17 記載の方法により、ミトコンドリア病患者由来の、遺伝子変異を有する内因性ミトコンドリアを含む細胞内に、遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入する工程を含む、正常ミトコンドリアが導入された細胞を含有するミトコンドリア病治療用細胞組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞内へのミトコンドリア導入方法、外因性ミトコンドリアが導入された細胞及び動物の製造方法等に関する。より詳しくは、巨大単層膜リポソーム (Giant Unilamellar Liposome) を用いて、細胞に内在するミトコンドリア (内因性ミトコンドリア) とは遺伝的に異なる外来のミトコンドリア (外因性ミトコンドリア) を導入する方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

生物の生命活動に必要不可欠な A T P を作り出すミトコンドリアには核 D N A とは全く異なる独自のミトコンドリア D N A (mtDNA) が存在する。一細胞内に多コピー存在する m t D N A は 2 つの r R N A、22 種類の t R N A、呼吸鎖酵素複合体の 13 種類のサブユニットをコードしている。

【0003】

細胞内における病原性突然変異型 m t D N A の蓄積が呼吸機能欠損を引き起こす。個体レベルにおいての影響としてはミトコンドリア病と呼ばれる複合症を引き起こすことが知られ、さらに神経変性疾患、糖尿病、難聴などの病気と関与している可能性が示唆されている。しかし、同一の病原性突然変異型 m t D N A が蓄積しても病状が多様であるなど詳しい発症メカニズムは解明されていない。

【0004】

ミトコンドリアの構造は微小であり二重膜を持つ。そのため、外因性の m t D N A を人為的にミトコンドリア内に導入することは非常に困難であり、核ゲノムで行われているような D N A 組換えの技術はミトコンドリアにおいては確立されていない。ミトコンドリア病の発症機構の解明、治療法の探索のために、外因性のミトコンドリアそのものを細胞内へ導入する手法の開発が求められる。

【0005】

非特許文献 1 には、異種間又は同種間の 2 種類の細胞を用い、一方の細胞から内因性のミトコンドリアを除去し、他方の細胞から核を除去した上で両細胞を融合し、内因性ミト

10

20

30

40

50

コンドリアが外因性ミトコンドリアで置換された細胞（サイブリッド細胞）を作成することが記載されている（図1参照）。

【0006】

巨大単層膜リポソーム（Giant Unilamellar LiposomeあるいはGiant Unilamellar Vesicle、以下「GUV」と称する）は、脂質二重膜（lipid bilayer）が水溶液中で自然に閉じてできる人工膜小胞（liposome又はvesicle）であって、直径がマイクロメートルオーダー以上のものをいう（非特許文献2, 3参照）。GUVは、細胞と同程度の大きさであり、位相差、蛍光、微分干渉、暗視野などの種々の光学顕微鏡法で直接観察ができる利点を持つ。GUVは、生体膜の形態形成や動態制御の機構をインビトロの系で研究する際、膜のモデルとして用いられてきている。

10

【0007】

非特許文献4には、細胞の長期凍結・乾燥保存を目的として、膜非透過性の凍結・乾燥保護物質（トレハロースなどの糖類）を含むGUVを細胞と電気融合させることで凍結・乾燥保護物質を細胞内に導入することが記載されている。当該文献は、トレハロース等の糖類に比してサイズが大きいミトコンドリア等の細胞内小器官（オルガネラ）を細胞内に導入すること及びそのためのGUVの調製方法や電気融合条件等については記載していない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Animal Biotechnology, 2014, 25, 139-149

【非特許文献2】Nature, 1991, 349, 475-481

【非特許文献3】Biosystems, 2003, 71, 93-100

【非特許文献4】Cryobiology, 2006, 53(3), 397

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、細胞に内在するミトコンドリア（内因性ミトコンドリア）とは遺伝的に異なる外来のミトコンドリア（外因性ミトコンドリア）を細胞内に導入するための新たな技術を提供することを主な目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題解決のため、本発明は、以下の[1]～[25]を提供する。

[1] ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付されたGUVと、細胞と、の混合液に交流電場を印加して、前記GUVと前記細胞とを配列させる交流電場印加手順と、前記混合液に直流パルス電場を印加して、前記GUVの膜と前記細胞の膜とを少なくとも一部融合させる直流電場印加手順と、含む、細胞内へのミトコンドリア導入方法。

[2] 前記細胞が由来する種と、前記GUVに封入されるミトコンドリアが由来する種が異なる、[1]の方法。

40

[3] 前記交流電場印加手順の前に、前記細胞内に発現させた制限酵素により前記細胞内の内因性ミトコンドリアDNAを切断するミトコンドリア除去手順をさらに含む、[2]の方法。

[4] 前記制限酵素は、前記細胞内の内因性ミトコンドリアDNAを切断するが、前記GUVに封入される外因性ミトコンドリアDNAを切断しない、[3]の方法。

[5] 前記細胞が由来する種がマウスであり、前記GUVに封入されるミトコンドリアが由来する種がヒトであり、前記制限酵素はAge I、Bgl II、BsaBI、BsrGI、DrdI、PshAI及びSexAIからなる群から選択されるいずれが一以上の制限酵素である、[4]の方法。

[6] 前記ミトコンドリア除去手順において、前記制限酵素をコードする配列とミトコ

50

ンドリア移行配列とを含む発現コンストラクトを前記細胞にトランスフェクションする、
[3] ~ [5] のいずれかの方法。

[7] 前記内因性ミトコンドリア除去手順後の前記細胞をウリジンとピルビン酸の存在
下で培養する手順と、

前記直流電場印加手順後の前記細胞をウリジンとピルビン酸の非存在下で培養する手順と
をさらに含む、[3] ~ [6] のいずれかの方法。

[8] 前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記 G U V に封入さ
れるミトコンドリアが遺伝子変異を有する、[1] ~ [7] のいずれかの方法。

[9] 前記 G U V が $-40\text{ mV} \sim -20\text{ mV}$ の表面電位を有する、[1] ~ [8] のい
ずれかの方法。

[10] 前記 G U V の膜を構成する脂質全体に占めるコレステロールの割合が $0 \sim 15$
モル%である、[1] ~ [9] のいずれかの方法。

[11] 前記交流電場印加手順において、前記交流電場を $5 \sim 15\text{ V/mm}$ で、 $10 \sim$
 60 秒印加し、前記直流電場印加手順において、前記直流パルス電場を $100 \sim 175\text{ V}$
 $/\text{mm}$ で、 $30 \sim 50$ マイクロ秒印加する、[1] ~ [10] のいずれかの方法。

【 0011 】

[12] [2] ~ [10] のいずれかの方法により、細胞内に、該細胞が由来する種と
異なる種のミトコンドリアを導入する工程を含む、他種由来の外因性ミトコンドリアが導
入された細胞の製造方法。

【 0012 】

[13] 他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された細胞。

[14] 前記細胞内の内因性ミトコンドリアを有さない、[13] の細胞。

[15] 前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記外因性ミトコ
ンドリアが遺伝子変異を有する、ミトコンドリア病モデル細胞である、請求項 [13] 又
[14] 記載の細胞。

【 0013 】

[16] [2] ~ [10] のいずれかの方法により、胚性幹細胞内に、該細胞が由来す
る種と異なる種のミトコンドリアを導入する工程と、

前記胚性幹細胞から個体を発生させる工程と、を含む、

他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された非ヒト動物の製造方法。

【 0014 】

[17] 他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された非ヒト動物。

[18] 前記動物由来の内因性ミトコンドリアを有さない、[17] の非ヒト動物。

[19] 前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝的に正常であり、前記外因性ミトコ
ンドリアが遺伝子変異を有する、ミトコンドリア病モデル動物である、[17] 又は [1
8] の動物。

【 0015 】

[20] 前記細胞内の内因性ミトコンドリアが遺伝子変異を有し、前記 G U V に封入さ
れるミトコンドリアが遺伝的に正常である、[1] ~ [7] のいずれかの方法。

[21] 前記 G U V が $-40\text{ mV} \sim -20\text{ mV}$ の表面電位を有する、[20] の方法。

[22] 前記 G U V の膜を構成する脂質全体に占めるコレステロールの割合が $0 \sim 15$
モル%である、[20] 又は [21] の方法。

[23] 前記交流電場印加手順において、前記交流電場を $5 \sim 15\text{ V/mm}$ で、 $10 \sim$
 60 秒印加し、前記直流電場印加手順において、前記直流パルス電場を $100 \sim 175\text{ V}$
 $/\text{mm}$ で、 $30 \sim 50$ マイクロ秒印加する、[20] ~ [22] のいずれかの方法。

【 0016 】

[24] [20] ~ [23] のいずれかの方法により、遺伝子変異を有する内因性ミト
コンドリアを含む細胞内に、遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入する工程を含む
、正常ミトコンドリアが導入された細胞の製造方法。

【 0017 】

10

20

30

40

50

[2 5] [2 0] ~ [2 3] のいずれかの方法により、ミトコンドリア病患者由来の、遺伝子変異を有する内因性ミトコンドリアを含む細胞内に、遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入する工程を含む、正常ミトコンドリアが導入された細胞を含有するミトコンドリア病治療用細胞組成物の製造方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 8 】

本発明により、細胞に内在するミトコンドリア（内因性ミトコンドリア）とは遺伝的に異なる外来のミトコンドリア（外因性ミトコンドリア）を細胞内に導入するための新たな技術が提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 1 9 】

【図 1】本発明に係るミトコンドリア導入方法における G U V と細胞の電気融合の手順を説明する模式図である。

【図 2 - 1】DNA origami の塩基配列を示す図である。

【図 2 - 2】DNA origami の塩基配列を示す図である。

【図 2 - 3】DNA origami の塩基配列を示す図である。

【図 2 - 4】DNA origami の塩基配列を示す図である。

【図 3】G U V との電気融合により蛍光ビーズ（直径 1 μ m）を導入した細胞の共焦点顕微鏡写真である。

【図 4】サイズの異なる蛍光ビーズを封入した G U V と電気融合させた細胞の共焦点顕微鏡写真である。

20

【図 5】G U V との電気融合により E G F P 発現ベクターを導入した細胞の位相差顕微鏡写真及び共焦点顕微鏡写真である。

【図 6】G U V との電気融合により DNA origami を導入した細胞の位相差顕微鏡写真及び共焦点顕微鏡写真である。

【図 7】SHSY5Y 細胞への蛍光ミトコンドリア（Mito-YFP）の導入率を計測した結果を示す図である。

【図 8】SHSY5Y 細胞への蛍光ミトコンドリア（Mito-DsRed）の導入率を計測した結果を示す図である。

【図 9】SHSY5Y 細胞への蛍光ミトコンドリア（Mito-YFP 及び Mito-DsRed）の導入率を計測した結果を示す図である。

30

【図 10】制限酵素をコードする配列とミトコンドリア移行配列とを含む発現コンストラクトの具体例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 0 】

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【 0 0 2 1 】

1. 細胞内へのミトコンドリア導入方法

40

本発明に係る細胞内へのミトコンドリア導入方法は、以下の手順 2、3 を含み、場合によって手順 1、4 を含んでもよい。

手順 1：手順 2 の前に、細胞内に発現させた制限酵素により前記細胞内の内因性ミトコンドリア DNA を切断する手順（ミトコンドリア除去手順）。

手順 2：ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付された G U V と、細胞と、の混合液に交流電場を印加して、前記 G U V と前記細胞とを配列させる手順（交流電場印加手順）。

手順 3：前記混合液に直流パルス電場を印加して、前記 G U V の膜と前記細胞の膜とを少なくとも一部融合させる手順（直流電場印加手順）。

手順 4：手順 3 の後に、前記混合液に交流電場を印加して、前記 G U V の膜と前記細胞

50

の膜との融合状態を維持する手順。

【 0 0 2 2 】

(1) 交流電場印加手順

本手順では、ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付された G U V と、細胞と、の混合液に交流電場を印加して、G U V と細胞とを配列させる。

【 0 0 2 3 】

ミトコンドリアが封入され、負の表面電位を付された G U V は以下のようにして製造することができる。

【 0 0 2 4 】

(1 - 1) G U V 及びその製造方法

【 0 0 2 5 】

G U V の製造は、文献公知の静置水和法、エレクトロフォーメーション法及び界面通過法などの手法あるいはこれらの改良手法によって行うことができる。静置水和法は、試験管内に作製したリン脂質を主成分とする脂質フィルムに水溶液を加え静置して G U V を作製する方法である (J. Mol. Biol., 1999, 287, 293-300; J. Mol. Biol., 1998, 284, 1671-1681; Curr. Biol., 2009, 19, 140-145)。エレクトロフォーメーション法は、白金や透明導電ガラス (I T O ガラスなど) の表面にリン脂質を主成分とする脂質を塗布しておき、水溶液中で交流電圧を印加して G U V を作製する方法である (Nature, 2010, 464, 864-869)。界面通過法は、油水界面にできる脂質の単層の膜 (lipid monolayer) を利用して G U V を作製する方法である (Langmuir, 2011, 27, 11528-11535; Method Enzymol., 2009, 464, 31-53)。

【 0 0 2 6 】

G U V の製造に用いられる脂質を列举すれば、リン脂質、コレステロール、合成脂質などが挙げられる。

【 0 0 2 7 】

リン脂質としてグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質等を挙げるることができる。

グリセロ糖脂質としては、例えば、スルホキシリホボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセド、ジガラクトシルジグリセド、ガラクトシルジグリセド及びジクリコシルジグリセド等を挙げるることができる。

スフィンゴ糖脂質としては、例えば、ガラクトシルセレブプロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシド等を挙げるることができる。

リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチシジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン及び水素添加リン脂質等の天然または合成のリン脂質を挙げるることができる。

【 0 0 2 8 】

上記ホスファチジルコリンとしては、大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジラウロイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、パルミトオレオイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリン等を挙げるることができる。

上記ホスファチジルエタノールアミンとしては、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、パルミトオレオイルホスファチジルエタノールアミン及びジステアロイルホスファチジルエタノールアミン等を挙げるることができる。

上記ホスファチジルセリンとしては、ジラウロイルホスファチジルセリン、ジミリストイルホスファチジルセリン、ジオレオイルホスファチジルセリン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、パルミトオレオイルホスファチジルセリン及びジステアロイルホスファ

10

20

30

40

50

チジルセリン等を挙げることができる。

上記ホスファチジルグリセロールとしては、ジラウロイルホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、パルミトオレオイルホスファチジルグリセロール及びジステアロイルホスファチジルグリセロール等を挙げることができる。

上記ホスファチジルイノシトールとしては、ジラウロイルホスファチジルイノシトール、ジミリストイルホスファチジルイノシトール、ジオレオイルホスファチジルイノシトール、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール、パルミトオレオイルホスファチジルイノシトール及びジステアロイルホスファチジルイノシトール等を挙げることができる。

【0029】

合成脂質としては、例えば、アルキル化アンモニウム塩を挙げることができる。アルキル化アンモニウム塩としては、ベンジルドデシルジメチルアンモニウムブロミド、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムクロリド、ベンジルオクタデシルジメチルアンモニウムクロリド、ステアリルトリメチルアンモニウムブロミド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ジメチルジパルミチルアンモニウムブロミド、ジオクタデシルアンモニウムブロミド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルピリジニウムクロリド1水和物等を挙げることができる。

【0030】

これらの脂質のうち、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルイノシトールは形成されるGUVに負の表面電位を付与し、アルキル化アンモニウム塩は正の表面電位を付与する。これら2群の脂質の比率を調整することで、所望の表面電位を有するGUVを製造できる。GUVの表面電位は、好ましくは0mV未満であり、より好ましくは-20mV以下であり、さらに好ましくは、-40mV~-20mVである。このような表面電位を与える脂質組成として、ジオレオイルホスファチジルコリン：ジオレオイルホスファチジルグリセロール：コレステロール=9：1：1（モル比）を例示できる。表面電位が高過ぎる場合、GUVと細胞との意図しない接着が生じ、GUVと細胞との電気融合が不能となったり、電気融合後にGUVと細胞を分離できなくなったりする。また、表面電位が上記範囲よりも低過ぎる場合、GUVが不安定となる。

【0031】

コレステロールとしては、コレステロール、ベーターコレステロール、ベーターシトステロール及びスティグマステロール等を挙げることができる。

【0032】

脂質全体に占めるコレステロールの割合を調整することで所望の膜強度を有するGUVを製造できる。脂質全体に占めるコレステロールの割合が大きい程膜強度は大きくなる。コレステロールの割合は、例えば0~20モル%、好ましくは0~15モル%、より好ましくは0~10モル%、さらに好ましくは0~5モル%、最も好ましくは0モル%である。すなわち、GUVはコレステロールを含まない脂質からなることが最も好ましい。

【0033】

GUVのサイズは、通常、直径でマイクロメートルオーダー以上とされる。GUVのサイズは、本発明においては、交流電場による細胞との配向の影響を考慮して、細胞と同程度のサイズとなる直径10μm以上50μm以下が好ましい。また、GUVのサイズは、導入される物体よりも十分に大きいことが望ましい。

【0034】

(1-2)ミトコンドリア

ミトコンドリアの調製は、従来公知の手法によって溶解した細胞を分画化し、ミトコンドリア画分を得ることによって行うことができる。

【0035】

細胞内に導入するミトコンドリアは、当該細胞とは遺伝的に異なるミトコンドリアであ

10

20

30

40

50

ってよい。具体的には、細胞内に導入するミトコンドリアは、当該細胞が由来する生物種と同種の別個体に由来するものであってよく、異種に由来するものであってもよい。また、細胞内に導入するミトコンドリアは、当該細胞と同種類の細胞から抽出されたものであってよく、異種類の細胞から抽出されたものであってもよい。

【0036】

本発明で用いるGUVには、直径100nm以上の大きさの物体を封入することが可能である。ミトコンドリアの大きさは、生物種や細胞種、細胞の状態によって変わるが、長軸長で2μm程度である。

【0037】

(1-3) GUV内へのミトコンドリアの封入

静置水和法、エレクトロフォーメーション法及び界面通過法などを用いてGUVを製造する際に、物体を含んだ溶液又は分散液を用いることで、内部に物体を取り込んだGUVを形成できる。誘電率の高い物体をGUV内に導入する場合には、エレクトロフォーメーション法以外の方法を用いることが好ましく、特に界面通過法を用いることが好ましい。

【0038】

このようにして製造される本発明に係るGUVは、好ましくは、ミトコンドリアを含み、-40mV~-20mVの表面電位を有し、膜を構成する脂質全体に占めるコレステロールの割合が0~15モル%とされたものである。

【0039】

(1-4) 交流電場印加

以上のようにして製造されたGUVと、細胞と、の混合液に交流電場を印加することで、GUVと細胞とを配列させる。図1を参照して説明する。

【0040】

ミトコンドリア2を封入したGUV1と、細胞3とを適当な緩衝液中で懸濁、混合する。緩衝液は、特に限定されないが、細胞内溶液と浸透圧が同等または近いものが望ましい。例えば、300mMマンニトール、0.1mM塩化カルシウム及び0.1mM塩化マグネシウムの溶液が挙げられる(図(A)参照)。

【0041】

次に、ミトコンドリアを封入したGUV1と細胞3との混合液に交流電場を印加する(図(B)参照)。この手順は、一对の電極4, 4間に混合液を導入して交流電場を印加することによって行うことができ、市販の細胞電気融合装置(電極及び電圧調整器等を含む)を用いて行うことができる。交流電圧としては、特に限定されないが、例えば5~15V/mm程度で10~60秒程度とされる。交流電場を印加することによって、GUV1と細胞3が電極4, 4間に一列に配列し、互いに接触して数珠状(パールチェーン状)に連なった状態となる。

【0042】

(2) 直流電場印加手順

本手順では、混合液に直流パルス電場を印加して、GUV1の膜と細胞3の膜とを少なくとも一部融合させる(図(C)参照)。直流パルス電圧の印加により、接触し合うGUV1の脂質膜と細胞3の細胞膜とが融合し、GUV1内のミトコンドリア2が細胞3内に導入される(図(D)参照)。直流パルス電圧としては、特に限定されないが、例えば100~175V/mm程度で30~50マイクロ秒程度とされる。

【0043】

本手順の後に、混合液に交流電場を印加して、GUV1の膜と細胞3の膜との融合状態を維持する手順を行ってもよい。この手順は、必要に応じて行われるものであるが、通常は省略でき、省略することが好ましい場合もある。交流電圧としては、特に限定されないが、例えば5~30V/mm程度で10秒程度以下とされる。電気融合後、細胞3を洗浄してGUV1と分離させる。

【0044】

本発明に係る細胞内へのミトコンドリア導入方法においては、以上の手順により、複雑

10

20

30

40

50

な操作を要することなく、多数の生細胞（ 10^5 個/ml程度）に同時にミトコンドリアを導入できる。

【0045】

(3)ミトコンドリア除去手順

また、本発明に係る細胞内へのミトコンドリア導入方法において、内因性ミトコンドリアを予め除去しておくことで、内因性ミトコンドリアとは遺伝的に異なる外因性ミトコンドリアによって内因性ミトコンドリアを置換することもできる。これによって、内因性ミトコンドリアが外因性ミトコンドリアで置換された細胞を作成することが可能である。

【0046】

内因性ミトコンドリアの除去は、交流電場印加手順の前に、細胞内に発現させた制限酵素により内因性ミトコンドリアDNAを切断することによって行うことができる。この際に用いる制限酵素は、内因性ミトコンドリアDNAを切断するが、外因性ミトコンドリアDNAを切断しないものとされる。

【0047】

用いる制限酵素は、内因性ミトコンドリアの塩基配列及び外因性ミトコンドリアの塩基配列に応じて選択されるものであり、内因性ミトコンドリアの塩基配列内のみを認識配列を有するものとされる。

【0048】

例えば、細胞が由来する種がマウスであり、GUVに封入される外因性ミトコンドリアが由来する種がヒトである場合、制限酵素としては、マウスミトコンドリアDNAを切断するがヒトミトコンドリアDNAを切断しない制限酵素が用いられる。具体的には、Age I、Bgl II、Bsa BI、Bsr GI、Drd I、Psh AI及びSex AIからなる群から選択されるいずれか一以上の制限酵素を使用できる。

【0049】

細胞内における制限酵素の発現は、制限酵素をコードする配列とミトコンドリア移行配列とを含む発現コンストラクト（発現ベクター）を細胞にトランスフェクションすることにより行うことができる。

【0050】

発現コンストラクトの構築とトランスフェクションは従来公知の手法によって行えばよい。また、ミトコンドリア移行配列としては、ATP5B（ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor）遺伝子の5'端領域の配列及び3'端領域の配列が公知であり、これに限られず、その他公知の配列を用いることができる。ヒトATP5Bの5'非翻訳領域の塩基配列（配列番号184）と、3'非翻訳領域の塩基配列（配列番号185）を以下に示す。

【0051】

ヒトATP5B 5'非翻訳領域

```
actgcagcgtaggcctcgccccaacggcaggagagcaggcggctgcggttgctgcagccttcagtcctccacccggactac
gccATGTTGGGGTTTGTGGGTCGGGTGGCCGCTGCTCCGGCCTCCGGGGCCTTGCGGAGACTCACCCCTTCAGCGTCGCT
GCCCCAGCTCAGCTCTTACTGCGGGCCGCTCCGA
```

ヒトATP5B 3'非翻訳領域

```
TGAAGAGCATTTCATCGTGAggggtctttgtcctctgtactgtctctctccttgcccctaaccctaaagcttcatttttc
tgttaggctgcacaagagccttgattgaagatatattctttctgaacagtatTTAAGGTTTCCAATAAAATGTACACCC
ctcagaatttctctgattctcttggttctgacaacatagtcaacact
```

（小文字は非翻訳領域、大文字はミトコンドリア局在シグナルのコード領域を表す）

【0052】

また、ミトコンドリア移行配列として、ATP5B遺伝子の5'端領域及び3'端領域の配列を用いた発現ベクターの具体例を図10に示す。Aは、プロモーター（CMVプロモーター）の下流に、ATP5B遺伝子の5'端領域の配列、制限酵素遺伝子及びATP5B遺伝子の3'端領域の配列をこの順番で挿入したベクターの構成を示す。Bは、プロモーターの下流に、ATP5B遺伝子の5'端領域の配列、制限酵素遺伝子、2A配列、e

10

20

30

40

50

GFP遺伝子及びATP5B遺伝子の3'端領域の配列をこの順番で挿入したベクターの構成を示す。このベクターは、「制限酵素 - 2A - EGFP」の融合タンパクを発現するが、該融合タンパクは2A配列で切断され、制限酵素とEGFPに分離される。

【0053】

内因性ミトコンドリアが除去されたことを確認するため、本手順の後であってかつ交流電場印加手順の前に、細胞をウリジンとピルビン酸の非存在下で培養する手順を行ってもよい。ミトコンドリアが欠失した細胞は、ウリジンとピルビン酸の存在下では生存できるが、非存在下では生存できない。このため、ウリジンとピルビン酸の非存在下での培養により、内因性ミトコンドリアが除去された細胞のみを選択することが可能となる(EMBO reports, 2007, 8, 188-193参照)。

10

【0054】

また、ミトコンドリア除去手順は、内因性ミトコンドリアの除去を完全なものとするため、交流電場印加手順の後あるいは直流電場印加手順の後にも行うことができる。

【0055】

2. 応用例

本発明に係る細胞内へのミトコンドリア導入方法によれば、上述の通り、内因性ミトコンドリアとは遺伝的に異なる外因性ミトコンドリアを細胞内に導入することができ、内因性ミトコンドリアが外因性ミトコンドリアで置換された細胞を製造できる。

【0056】

従って、例えば、遺伝的に正常な内因性ミトコンドリアを有する細胞に、GUVを用いて遺伝子変異を有する外因性ミトコンドリアを導入すれば、ミトコンドリア病モデル細胞を製造することができる。

20

【0057】

遺伝子変異を有する外因性ミトコンドリアを導入する細胞は、ミトコンドリア病モデル細胞となり得る体細胞に限られず、胚性幹細胞(ES細胞)や誘導型多能性幹細胞(iPS細胞)であってもよい。胚性幹細胞内に、該細胞が由来する種と異なる種のミトコンドリアを導入すれば、当該胚性幹細胞から個体を発生させることで、他種由来の外因性ミトコンドリアが導入された非ヒト動物を製造することができる。さらに、遺伝子変異を有する外因性ミトコンドリアを用いれば、ミトコンドリア病モデル動物を作出することができる。

30

【0058】

あるいは、遺伝子変異を有する内因性ミトコンドリアを有する細胞に、GUVを用いて遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入することもできる。ミトコンドリア病患者由来の、遺伝子変異を有する内因性ミトコンドリアを含む細胞内に、遺伝的に正常な外因性ミトコンドリアを導入すれば、正常ミトコンドリアが導入された患者由来の細胞を製造することができ、ミトコンドリア病治療用の細胞組成物として利用できる。正常ミトコンドリアが封入されたGUVと細胞とを含む細胞組成物も、ミトコンドリア病の治療用に利用できる。

【0059】

例えば、ミトコンドリア病の一種であるPearson病では、ミトコンドリアDNA異常のために貧血を主体とする汎血球減少症をきたすが、患者から分離した骨髄幹細胞、あるいは胚性幹細胞(ES細胞)や誘導性多能性細胞(iPS細胞)等の幹細胞から誘導して得た骨髄幹細胞に正常ミトコンドリアを導入し移植することで、根本的な治療が可能である。

40

【実施例】

【0060】

<実施例1：細胞内への物体導入>

1. GUVの調製

文献(PNAS, 2003, 100:10718-10721; J. Physical Chemistry B Lett., 2008, 112:14678-14681; PNAS, 2012, 109:5942-5947)記載の油中水型エマルジョン通過法に従って、

50

GUVを作製した。ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルフォスファチジルグリセロール(DOPG)及びコレステロールをモル比9:1:1(合計105mg)でクロロホルム(1050 μ l)に溶解した。溶液をガラスチューブに移し、アルゴンガス雰囲気下での乾燥と真空乾燥を行った後、液体パラフィン(500 μ l)と混合した。混合物を60 $^{\circ}$ Cで60分間超音波処理した。

【0061】

蛍光ビーズ、DNA origami又はプラスミドDNAを内部溶液(90mMスクロース、210mMマンニトール、0.1mM塩化カルシウム、0.1mM塩化マグネシウム)と混合し、この内部溶液(50 μ l)を上記脂質混合物に加えた。

【0062】

蛍光ビーズには、直径0.2、0.5、1.0、2.0 μ mのカルボン酸修飾されたFluospheres(登録商標、Invitrogen)を用いた。プラスミドDNAには、市販のキット(NucleoBond Xtra Midi plus kit, Macherey-Nagel GmbH & Co.)を用いて作製したEGFP発現ベクターを用いた。細断された矩形のDNA origami(60nm \times 90nm)を、ソフトウェア(caDNAo)を用いて設計した。図2に、DNA origamiの塩基配列(配列番号1~183)を示す。DNA origamiには、60 \times 90nm²の面に282個のFITCラベルを配置した。

【0063】

チューブを攪拌して、マイクロメーターサイズのW/Oエマルションを生成させた。エマルションを外部溶液(300mMマンニトール、0.1mM塩化カルシウム、0.1mM塩化マグネシウム)上に静かに注いだ。4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心分離(18,000g)した後、エマルションを脂質で飽和させたW/O界面を通過させて脂質二分子膜をもつGUVを形成させた。油と水との混合を避けるため、チューブの底にニードルで開けた穴からGUVを抽出した。

【0064】

得られたGUVの平均直径は、顕微鏡下での画像解析により、20 μ mと推計された。蛍光顕微鏡下での画像解析により、各GUVに封入されたビーズの数は $10^1 \sim 10^4$ オーダーと計測された。また、各GUVに封入されたプラスミド及びDNA origamiの濃度は、それぞれ220ng/ μ l、3.36nMと計算された。

【0065】

2. GUVと細胞の電気融合

HeLa細胞を融合バッファー(300mMマンニトール、0.1mM塩化カルシウム、0.1mM塩化マグネシウム)に分散させた。GUVのマンニトール溶液(400 μ l)と細胞分散液(400 μ l、 1×10^5 細胞/ml)の混合溶液を、細胞電気融合装置(ECFG21, NEPA GENE)の発電機に接続された電気融合チャンバ(NEPA GENE)に導入した。GUV数は、顕微鏡下での画像解析により、 2×10^4 /mlと計測された。チャンバは、2mm間隔で配された2枚のプラチナ平行電極(2 \times 80 \times 5mm)を含む。

【0066】

混合溶液に15V/mmの交流電場を30秒かけ、細胞とGUVを一列に配列させた(第一手順)。次に、175V/mmの直流パルス50マイクロ秒かけ、細胞とGUVを融合させた(第二手順)。細胞とGUVの融合は、細胞とGUVが接触している領域の膜が不可逆的に電気絶縁膜破壊されることによって引き起こされる。続いて、15V/mmの交流電場を10秒かけ、細胞とGUVの接触を維持した(第三手順)。その後、細胞をPBSで洗浄し、DMEMを入れた培養ディッシュに移した。

【0067】

3. 細胞内への物体導入

(1) 蛍光ビーズ

蛍光ビーズ(直径1 μ m)を封入したGUVと電気融合させた細胞を図3に示す。図左上は立体観察像、左下は垂直断面観察像、右は水平断面観察像を示す。細胞内に蛍光ビーズが導入されているのが確認できる。

10

20

30

40

50

【0068】

直径0.2、0.5、1.0、2.0 μm の蛍光ビーズを封入したGUVと細胞を電気融合させた結果を図4に示す。図は、細胞質、蛍光ビーズ及び核の蛍光観察像とこれらの合成像を示す。また、上段から対照（ビーズなし）、直径0.2、0.5、1.0、2.0 μm の蛍光ビーズの結果を示す。直径0.2、0.5、1.0 μm の蛍光ビーズが細胞内に導入されているのが確認できる。直径2 μm の蛍光ビーズは、細胞内へ導入されなかった。細胞内への蛍光ビーズの導入率をフローサイトメータで測定した結果、直径0.2、0.5、1.0、2.0 μm の蛍光ビーズでそれぞれ73、50、40、0.38%であった。

【0069】

(2) プラスミド

E G F P発現ベクターを封入したGUVと電気融合させた細胞を図5に示す。電気融合後1日及び5日の培養後、細胞のG F P発現が確認され、細胞内にE G F P発現ベクターを導入できたことが確認された。細胞へのE G F P発現ベクターの導入効率は約20%であった。

【0070】

(3) DNA origami

DNA origamiを封入したGUVと電気融合させた細胞を図6示す。FITCで標識されたDNA origamiが細胞内に導入されているのが確認できる。

【0071】

なお、蛍光ビーズ（直径1 μm ）を封入したGUVとE G F P発現ベクターを封入したGUVとを組み合わせるにより、細胞内に蛍光ビーズとE G F P発現ベクターを同時に導入できることも分かった（不図示）。

【0072】

<実施例2：GUVの表面電位の検討>

実施例1の「1. GUVの調製」において、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジオレオイルフォスファチジルグリセロール（DOPG）及びコレステロールのモル比を9：1：1のままあるいは9：0：1に変更し、実施例1で用いた蛍光ビーズ（直径0.2 μm ）が封入されたGUVを作製した。また、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）：ジオクタデシルアンモニウムブロミド（DODAB）及びコレステロールをモル比9：1.26：1で用いて同様に蛍光ビーズが封入されたGUVを作製した。

【0073】

以下の手順でGUVの表面電位（ゼータ電位）測定を行った。前記の脂質組成と手順でGUV（蛍光ビーズは封入しない）を調製し、エクストルーダー（Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids社製）を使用して直径を1 μm にそろえた（メンブレンポアサイズ1 μm 、液量1 mlに対してポア通過21回）。このリポソーム分散溶液300 μl を微粒子測定器（nano Partica SZ-100 series、堀場製作所製）に導入し、ゼータ電位の測定を行った。測定値を「表1」に示す。

【0074】

【表1】

GUV脂質組成	表面電位 (mV)
DOPC : DOPG : コレステロール = 9 : 1 : 1	-41.5
DOPC : DOPG : コレステロール = 9 : 0 : 1	-22.5
DOPC : DODAB : コレステロール = 9 : 1.26 : 1	53.3

【0075】

実施例1の「2. GUVと細胞の電気融合」と同様にしてHeLa細胞とGUVの電気

10

20

30

40

50

融合を行い、蛍光ビーズを細胞に導入した。融合操作後、以下の手順で蛍光ビーズ（直径 $0.2 \mu\text{m}$ ）の細胞への導入率を算出した。導入細胞を遠心分離（ $1000g$ ， 3min ）し、上清を取り除いた後、融合バッファを用いて再懸濁し洗浄した。再懸濁後の細胞をフローサイトメータ（Cell Lab Quanta SC MPL、ベックマンコールター社製）によって解析し、細胞への物質導入効率を求めた。直径 $7 \mu\text{m}$ 以上の物質を計測対象とした。細胞の計測数（ 1.5×10^4 cells）のうち、融合操作を行わないネガティブコントロール（検出した蛍光強度 $< 1 \times 10^1$ ）以上の蛍光強度を有するものの割合を算出した。結果を「表 2」に示す。

【0076】

【表 2】

GUV脂質組成	導入率 (%)
DOPC : DOPG : コレステロール = 9 : 1 : 1	81.9
DOPC : DOPG : コレステロール = 9 : 0 : 1	20.5
DOPC : DODAB : コレステロール = 9 : 1.26 : 1	—

10

【0077】

負の表面電位を有する GUV（DOPC : DOPG : コレステロール = 9 : 1 : 1 あるいは 9 : 0 : 1）では蛍光ビーズの導入が可能であったが、正の表面電位を有する GUV（DOPC : DODAB : コレステロール = 9 : 1.26 : 1）では、電気融合後洗浄を経た細胞にも GUV が付着し、評価が不能であった。また、より低い負の表面電位を有する GUV においてより高い蛍光ビーズの導入効率を得られた。

20

【0078】

< 実施例 3 : GUV のコレステロール含有率の検討 >

実施例 1 の「1. GUV の調製」において、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジオレオイルフォスファチジルグリセロール（DOPG）及びコレステロールのモル比を 9 : 1 : 1 から 9 : 1 : 0, 9 : 1 : 0.1, 9 : 1 : 0.4, 9 : 1 : 2 又は 9 : 1 : 5 に変更し、実施例 1 で用いた蛍光ビーズ（直径 $0.5 \mu\text{m}$ ）が封入された GUV を作製した。

【0079】

実施例 1 の「2. GUV と細胞の電気融合」と同様にして HeLa 細胞と GUV の電気融合を行い、蛍光ビーズを細胞に導入した。実施例 3 と同様にしてフローサイトメータを用いて蛍光ビーズの細胞への導入率を算出した。結果を「表 3」に示す。コレステロール比がより低い GUV において、より高い蛍光ビーズの導入率を得られる傾向があった。コレステロールの割合は、好ましくは 0 ~ 16.6 モル%、より好ましくは 0 ~ 9.1 モル%、さらに好ましくは 0 ~ 3.8 モル%、さらにより好ましくは 0 ~ 0.9 モル%、最も好ましくは 0 モル% である。

30

【0080】

【表 3】

GUV の DOPC : DOPG : コレステロール比	導入率 (%)
9 : 1 : 0	64.9
9 : 1 : 0.1	58.1
9 : 1 : 0.4	45.9
9 : 1 : 1	50.0
9 : 1 : 2	50.5
9 : 1 : 5	45.1

40

【0081】

50

< 実施例 4 : ポストフュージョン交流電場の印加時間の検討 >

実施例 1 の「2. GUV と細胞の電気融合」の第三手順での交流電場 (15 V/mm) の印加時間を 10 秒から 0, 20, 60 秒に変化させて蛍光ビーズ (0.5 μm) の細胞への導入を行った。実施例 3 と同様にしてフローサイトメータを用いて蛍光ビーズの細胞への導入率を算出した。結果を「表 4」に示す。

【0082】

【表 4】

ポストフュージョン交流電場の印加時間 (秒)	導入率 (%)
0	78.6
10	50.1
20	48.7
60	59.9

10

【0083】

< 実施例 5 : 細胞内へのミトコンドリア導入 >

1. 蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) の SHSY5Y 細胞への導入

蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) を以下のようにして調製した。

【0084】

ミトコンドリアに蛍光タンパク質 (YFP 又は DsRed) を発現させたヒト神経芽細胞腫株 (SHSY5Y) から蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP 又は Mito-DsRed) を抽出した。

20

培養した細胞を、緩衝液 (PBS) で洗浄後、トリプシンで処理して剥離した。

剥離した細胞を培地 (DMEM-F12) に分散し、遠心分離 (1000 × g, 3min) によって回収した。

回収した細胞を緩衝液 A に分散した。

【0085】

緩衝液 A (Homogenization buffer)

30mM Tris-HCl (pH7.4)

225mM マンニトール

75mM スクロース

0.5% BSA

0.1mM EGTA

30

【0086】

注射針を付けたシリンジによる、細胞分散液の吸引と排出を繰り返すことにより、細胞を破碎した。

遠心分離 (600 × g, 5min) を行って回収した上清を、さらに遠心分離 (7,000g, 10min) して沈殿物を得た。

沈殿物を緩衝液 B に分散し、遠心分離 (7,000 × g, 10min) を行った。上清を取り除き、再度、遠心分離 (10,000 × g, 10min) を行って、ミトコンドリアを含む沈殿物を得た。

40

【0087】

緩衝液 B (Fractionation buffer)

30mM Tris-HCl (pH7.4)

225mM マンニトール

75mM スクロース

【0088】

沈殿物を緩衝液 C に分散し、ミトコンドリア分散液とした。

【0089】

緩衝液 C (Mitochondria resuspending buffer)

5mM HEPES-KOH (pH7.4)

250mM マンニトール

50

0.5mM mEGTA

【0090】

調製した蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) を以下のようにしてSHSY5Y細胞に導入した。

【0091】

ジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC)、ジオレオイルフォスファチジルグリセロール (DOPG) 及びコレステロールをモル比 9 : 1 : 0.5 (合計 105 mg) でクロロホルム (2100 μ l) に溶解した。溶液をガラスチューブに移し、アルゴンガス雰囲気下での乾燥と真空乾燥を行った後、液体パラフィン (500 μ l) と混合した。混合物を 60 で 60 分間超音波処理した。

【0092】

緩衝液 D と蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) 溶液を混合し、上記脂質混合物に加えた。チューブを撈拌して、マイクロメートルサイズの W/O エマルションを生成させた。

【0093】

緩衝液 D (Inner buffer)

210mM マンニトール

90mM スクロース

0.1mM CaCl_2

0.1mM MgCl_2

【0094】

エマルションを外部溶液 (300 mM マンニトール、0.1 mM 塩化カルシウム、0.1 mM 塩化マグネシウム) 上に静かに注いだ。4 で 30 分間遠心分離 (18,000 \times g) した後、エマルションを脂質で飽和させた W/O 界面を通過させて脂質二分子膜をもつ GUV を形成させた。

【0095】

SHSY5Y細胞を融合バッファー (300 mM マンニトール、0.1 mM 塩化カルシウム、0.1 mM 塩化マグネシウム) に分散させた。蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) を封入した GUV の溶液 (400 μ l) と細胞分散液 (400 μ l、 1×10^4 細胞/ml) の混合溶液を、細胞電気融合装置 (ECFG21, NEPA GENE) の発電機に接続された電気融合チャンバ (NEPA GENE) に導入した。

【0096】

混合溶液に 15 V/mm の交流電場 (1 MHz) を 30 秒以上 4 分以内 (平均 2 分) かけ、細胞と GUV を一列に配列させた (第一手順)。次に、175 V/mm の直流パルス (パルスインターバル 0.5 秒) を 50 マイクロ秒かけ (パルス回数 5 回)、細胞と GUV を融合させた (第二手順)。細胞と GUV の融合は、細胞と GUV が接触している領域の膜が不可逆的に電気絶縁膜破壊されることによって引き起こされる。続いて、15 V/mm の交流電場 (1 MHz) を 10 秒かけ、細胞と GUV の接触を維持した (第三手順)。その後、細胞を PBS で洗浄し、D MEM を入れた培養ディッシュに移した。

【0097】

フローサイトメータ (Cell Lab Quanta SC MPL, Beckman Coulter, USA) で細胞中の蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) に由来する蛍光を検出することにより、細胞内への蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP) の導入率を測定した。導入率は、15.82% であった (図 7 参照)。

【0098】

2. 蛍光ミトコンドリア (DsRed) の SHSY5Y 細胞への導入

蛍光ミトコンドリア (Mito-DsRed) を上記の方法により調製した。調製した蛍光ミトコンドリア (Mito-DsRed) を上記の方法により SHSY5Y 細胞に導入し、導入率を測定した。導入率は、15.76% であった (図 8 参照)。

【0099】

3. 蛍光ミトコンドリア (Mito-YFP 及び DsRed) の SHSY5Y 細胞への導入

さらに、蛍光ミトコンドリア (DsRed) を導入した SHSY5Y 細胞に蛍光ミトコンドリア (M

10

20

30

40

50

ito-YFP) を導入し、導入率を測定した。導入率は、21.83%であった(図9参照)。

【0100】

<実施例6：細胞内へ導入したミトコンドリアの機能評価>

1. ミトコンドリアDNA欠失細胞 (mtDNA細胞) の作製

細胞を培養ディッシュに播種し(約1×10⁵ cell/ml)、エチジウムブロマイド(30~200ng/ml)を添加した培地(5% FBS DMEM)で培養する。

エチジウムブロマイドを含まない培地に交換し、さらにウリジン(50 μg/ml)とピルビン酸(100 μg/ml)を含まない培地に交換する。

さらに培養を行って、 mtDNA細胞を選択培養する。

【0101】

2. mtDNA細胞へのミトコンドリア導入

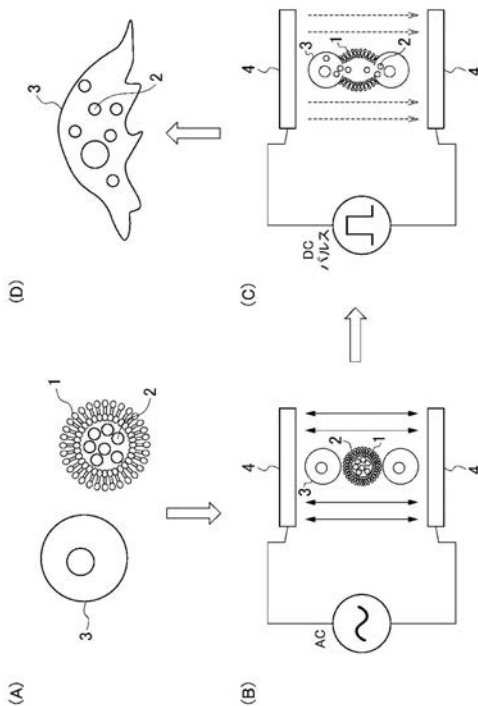
作製された mtDNA細胞内に実施例5と同様にしてミトコンドリアを導入する。

【0102】

3. ミトコンドリアの機能評価

ミトコンドリアを導入した mtDNA細胞におけるミトコンドリアの機能を評価し、導入されたミトコンドリアが細胞内で機能していることを確認する。

【図1】



【図2 - 1】

Plate 1

Well	Sequence 5' to 3'
A1	AACAGATAAAATCGGAATACCCAATGTACAAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B1	ATGACCCTGTAATACTTTGCGGGAGCAATAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C1	AAACGATTTTTGTTTAAAGTCAAGAGATAACTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D1	AAATCAACAGTTGAAAGGAATGACAGCGAAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E1	CATTTGCGTAGATTTAGTTGACCGTACGGTGTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F1	TGCCCCCTCTCAAGAGAGGATGATAAGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G1	TTTGTGCTAGCCCAATAGGAACCCACCCCTCATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H1	GAACGCGAAGTGAATGATACCCGGGTATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A2	ATGTGTAGACAGTCAATCACCATTAAATGCGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B2	CGTTTTAATGCGATCAAAAGATGGAATCGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C2	AGAGTAATGGAACGGGTACAGATTTGTATCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D2	GGTCGCTGATGATCGGTTATCGAAATCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E2	CCCTTATTAGCGTACAGCTGTAGAAATCACCATTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F2	TAGCACTGATAGTGTAGCGTAACGATTTGCTAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G2	GTAGCACCGTCAACCGACTTGAGCCATATGGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H2	GGAGGGAGGATGATGCTGAGAATCGTAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A3	AACATCGCACAAAGCGTGTAGCATGTGAGAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B3	ACAACGATGAATTTCTTAAAGCAACAAAGGAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C3	ATCTAAAATCTTTAGGACACTAAAGCCGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D3	AGACACCAACAAAGCAAAAGGGCAAGTGAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E3	ACCTGCGATCGAAGTTCGAGTAAGATATCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F3	ACCAAGTTCGAGGGCGAATTTATTCATTTGATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G3	TAAAACAGATTCGCTAGATTTTCACCTTGAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H3	ATTGAGAATAAACAACCCCAACATCCAGACGATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A4	TAAATGGTAAGAGCTGCTCATTAAAGATTCCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B4	TAGCAACAAAGTAAGCAGATAGCCATAGCAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C4	AGGGTTAAACACCGGATCAATAAGGGCTTATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D4	AAAGCGGATTCGAGTCAAGCGGTGAGCGAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E4	CTGAGACTGCGTATTTCCGAGCCTGCTAGCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F4	ACAGGAAGGCGCATAGACTACGAGTTGGGGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G4	CAAAATCATGAATCCTGAAACATATATGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H4	TAGCAAGCTAGAAGGCTTATCGGTTGCTATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A5	TCATCATATCAGATATGGCAATTTTGCAGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B5	ATTACCTTAAAGCATCAATAAATCAATAGCGATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C5	GTCCAGATGACCATATAAATACATCAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D5	CGCAATATCAGCTAAGCAGAACCAACATCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E5	ATGCGCTTATGGAAGCGCAGCTAGAACCACTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F5	ACGGAACACCTCGTTACGACGCCCAAAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G5	AATAAGCGCTTATCATTCGAGAGCGCCCAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H5	ATTGATGTAACAAAGCCGACGACCGCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A6	AAGCGAGATGATGACAGAGGTGACAGTTAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B6	GTCCACCAACGGAAATTTATCATGACAGTTCAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
C6	TTTTTCATCGGAACGAGGGTAGCACAGTTGCGCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
D6	AAATATGATGAACCATGCTGCTATATAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
E6	GAGTGAATTTACATTTAACAATTCATTTCAATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
F6	TTATTTCAAGCCAGGATAAATCCTGAGTATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
G6	ACAACCTTATAATTTTTTCCAGTACCTTGCCTTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
H6	CGGATAGACCCCTCATTTTCCAGTCTCAGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
A7	CAAGGCAAAAGATAAAGCTAAATCAAAACATTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG
B7	CTTGATATTAACGGGTCAAAACAGCATGTGTTTTTTTTTCTGTGCGCATCGAGAG

【 図 2 - 2 】

```

C7 AGCCAGCTCCGTCGGATCTCCGTAATAGTGTGTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D7 TCAGAAATAAAGAGCCGCGCCCTGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E7 GCAGAGCCGCAAGCGCTCAAGAGTTTACAGATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F7 GAAGGCGTTAAGCATGAAAGTACCTACTGATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G7 TTAACGCTTACGATTAAGAGGGAATCAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H7 AGAATTAATACCGAGCGTAAATCCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A8 GCGAGGTTGCAAAACGAGAAATCAAAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B8 CCTCAGAACCGCCGCGCATTTGACCTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C8 TACAGGCGGAAATGATTTAAGAACTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D8 ACCGATTTGCGCAACATATAAAGCAGTATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E8 GACAGCATGAGGAGTTTCCATTACTCACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F8 AAGGAATAGATTAGGAATACCATACCTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G8 GGGTAATGAGCAGAAACAATGAGAAAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H8 TGGGATTTGCTAGATGGTTTAACTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A9 CATAAAGGAGGAGGAGGATCCAGTGGTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B9 CTACTAATCGAGCTGAAAGGTTGATTTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C9 AGAAAGAAAAATAAGGAACAACCTTTGATACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D9 TTGAGGTTGCGCCGCAATAACCGATACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E9 ATCGCTGAGCGATTAATCAAGGCTAAAGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F9 AGCCTTAAGGCTTGCAGGAGTTAAACAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G9 GAGGACGCTTGAACAAGACCGGAACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H9 TCACTTTGCTGTATAGAAATTCATTTGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A10 CTGCTCCAGAAATACACTAAACAACCGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B10 CAAAATCAGTAACTAGGAGGACCGGAAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C10 TTTAAGAAATAGAAATACGATGTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D10 TTTGGCTTTAGGTTTTGGCATCTTGGCCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E10 TATTTGTCATTTTTAAACCACTTCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F10 GGGGGAGGTAAAGATTAAGAGGAAAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G10 ATATCAGTGTCAATCATATGATACATCTACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H10 CCAACTTACGTAACAGGATTTGGCAATAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A11 TGACCCCAATAATTTGTTGAGAACTTTGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B11 AAAGGCTGAAATACCGAGGTTGAAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C11 CATATTTGCGCCGCAATTTGCGACCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D11 ACCGAGCGGTGACAGGATTAATGACAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E11 CAAAATAAAGCAGTATTAATTTCCCAATCCAAACGCTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F11 TGCCAGGATCTACTGCTGCTGCTTTTTGAGGAAACAAAGTTTTCTGTG
G11 GCAATGAGTAGATCTTGGCATCTGATCGCAGG

```

Platc 2

```

Well Sequence 5' to 3'
A1 TAAGAGGACTCTATCGAGTACATCGATGATGGGGCGACGGTTCC
B1 ACCAGTGAAGCTGATTTGCCCTTCAGTGGTTCCGAAATCGGTAATAATC
C1 GAGGGGACCAAGCGCCATTCGCGCAACTGTTGGGAGGTAACCGC
D1 GCTCACAATTTGCTTGGGCTCCAGGCTGGGAAACCTGCTTTTC
E1 TTGCTGCGCATCCCTGCGAGTCCGATCCCGGATACCGAGCAGCGGAA
F1 TTGGTGTAGTGGGCGCATGTAAGCGGTTT
G1 GTAATCATCGCAGTCCGCAAGCTTGAAGCGATTAAGTTGGGGCGATCG
H1 ACGGGGAAATAATTCGCGCTTGGCAGGACGCGCATCAAAAATAATTT
A2 MAATTTGAGGAGATTGATTAAGCAGAACTGATGAACGCTGCTGGAG
B2 TTGCTGACTTTCAACTTTAAGCCTTGTAAATCAATTTGAGGATTCAC
C2 TATTCAAGTATTTAAATGCAATGTTTGAACCCCTCA
D2 CAACAAGCGTTCTAGTGTATAAACAATATA
E2 TTGACGTAATGGATTTGAGGAG
F2 GCTCATTGACTTAACCTCAATTTCCACAACAATACGCTGAAATC

```

【 図 2 - 3 】

```

G2 GTGCGGGGGTCCGGAACAGGACGACGATCGCCGAGTCAAG
H2 AAGGCTGGTCACTACAACGAGACGCGGATAGGAGCGGGGGC
A3 AGGGTTTTAGGTTGTAAGAGAGCGGTCATAGCTGTTCTGTTATCC
B3 AAAGAAATAAGGGGCAAAACCGAATGAAAATCTAAGCATCACT
C3 ATGCGACTTCCGGCAGCGCTTCTCTCTTCCGATTAAGCAAGG96A
D3 TTCCAGTTGCTACTTAAAGAGCTCAATGCAACCTCAACGAA
E3 TATCTGTAGGCTACAGACAGATGGAGGCTTTGAGGAGCAACA
F3 TGCTAACCGTGGACTCCAGGTCAGCCGAGATAGGTTAAATCT
G3 GCGATTTGAGTTGCGAGCAGCGGTTTTCCCGAGCAGCGGATTTG
H3 GCATAAGGGGGTGCCTAATGATTAATGAATCGGCCAACGGGGTTT
A4 AATACGCAAGAGAGCCGACTCCAGCGAAAGACTTCGGAACAA
B4 GTTGTATCGCCCTGGCCCTGAGGGCGGAGGTTTGGTGGCA
C4 CAGAAACAATAATAACCTTCTCTGTAA
D4 TGGGGAACAACATAGCAAAAGAGATGATG
E4 CCGGAGGTTTGAAGCCTTTCAGAGCCTAAT
F4 CTAATTTAATGGTTTGTATGATCATATG
G4 TCTTACCAGATAAAATTTTCCAGCCAGTAA
H4 TAATATCCACTTAATACCGCACTCATGAG
A5 ATTTTGGGCAACAAGATGTTTGGATATAC
B5 TAAAGTCCGCAAAAATAGATAAGTCCGA
C5 CGTTTAAATTTAAAAGTTTGAAG
D5 TGGAGGGTTAGCAACAAATACAGTAAACAGT
E5 TTAATTAATTTCCCTTAGCTCGAGAGACTA
F5 CTCGGGCTTAGTGGTATTTAGTAAATTC
G5 CGGTTTTATTTTCAATGGGTTTTAAGCAACC
H5 ATAAGTTTTCAACAACAATAAATCAGGAGG
A6 AGGCTATCTAGCTATTTTGAGAGTGAGAAATTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B6 TTGCAACTGCTATTAATCTTCGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C6 TACTATCTGACACCGCTCAACACATAAATAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D6 GGAATAGCATTTCCAGCGCGGAGGTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E6 GCGATGATAGAACCGGAGAACTTAAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F6 TCATAGGCAACTAACAAAGCTGAAATAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G6 TTACTGCGAGTTCCGCTGATTTGGTTAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H6 ACAATTTTTGATTCGATTAACCAATTCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A7 CAGAAGCGGATAGGTTGATCACTAAGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B7 CTTTGGGAACTCCAGTACGAGGAAACGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C7 AGGGGATTCATTAAGTCCGCTTCCAGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D7 AAATAGGTTGCTGCTCAGGAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E7 ATTGCTCCAGGCTTAATGCTGAGTACTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F7 TATAGCCGCGCTCAGAACCGGATGACGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G7 GTAATAAGAAAGCTCCAAACCTACCGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H7 GAGGATTTAGAGATTAAGCTTCAATGACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A8 TTAACCGGTAAGTAATTCGTTAATTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B8 GTAAGACTTCATCAACTAATTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C8 ATCATACAGCTATTACAGGTAGATACAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D8 ATAGATAGAGCGTCAATAGATAATATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E8 CTTGAGTGTGCTCAGTACCAATAAGCTTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F8 TTGACCCCTTATCGTAAATTTACCAATAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G8 CTTGCGCTTGGGAAAGAAATCTAACGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H8 ATAGGAGCTTTACAGAGATAAAGTCAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A9 ACCCAATGACCGAGTGGAGCAATCCGCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B9 CATAAATAAGTAAATGTTTGAAGCGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C9 TGCAATACAGACTTTGAGGAGTCCAGAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D9 TTAACAGCTTTGCAAAAGAGTGCACACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG

```

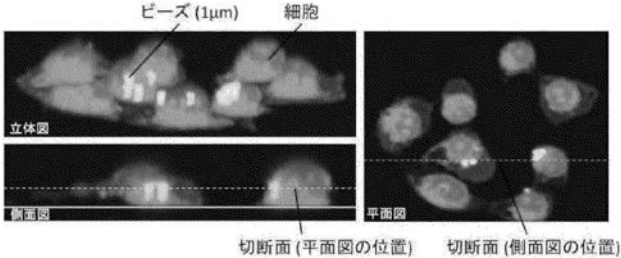
【 図 2 - 4 】

```

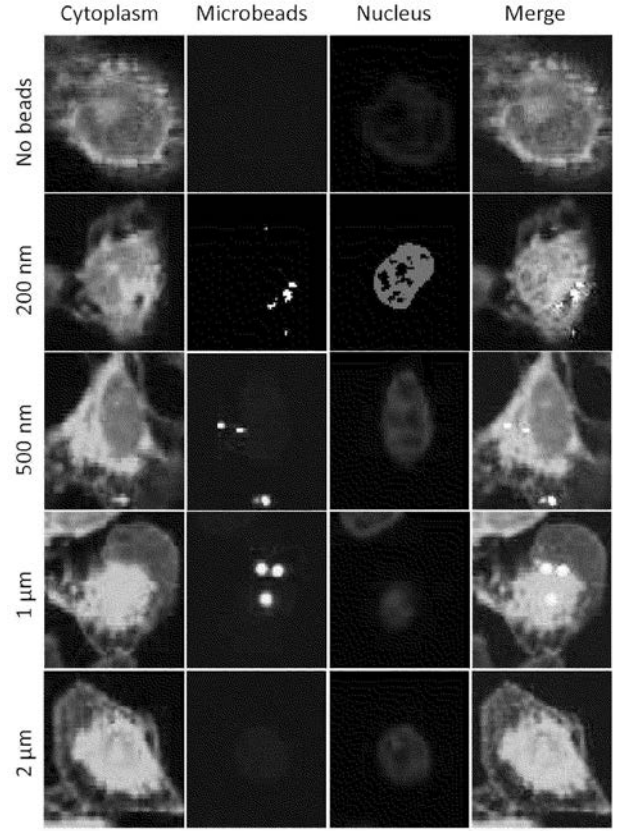
E9 GAGCCACCTGCCGTCGAGAGGTTAGGATAGTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F9 GATGATTAATCTAGTTGCGCGCAACAACAATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G9 CCAAAAAAATTTTTCTGTATGGGATTCATAAGTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H9 TTCAAAATGTTATATAACTATATGGAATTTATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A10 AGCCTCAGAGAAATAGCAAAATATCACTCAATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B10 AAATCAGCTAAATTCGCATTAACCCGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C10 AGGCTTTAATCCAACAGGTGAGTACCTTTATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D10 GATGGCTTTTTGATAAGAGGTCAAACGAGACTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E10 GGAATGGATTTTAGGTTAGTACCCAACACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F10 AGCTTAGAGAGAGAGTCAATAGTTAAATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G10 ATCAGTTGACGAGGCACTAGTAAAGTTGCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H10 AAACCAAGTTTACGAGCATGTAGAGCGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A11 TTACCAGAAAGACTCCTTATTAACGAAACGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B11 CGAACGAGAAATGGTCAATAAGCTATTTTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C11 GAGGCAATGTTACTTAGCCGGAACCGGTCAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D11 TAATCCTGAAACCCAGGAGGAGTGGCCGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E11 TCTGGAAGTAAATGCAACTAAATTTTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F11 ACGAGCGCTTAAATCAAGATTAGTATCTCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G11 TTGGGGCGAGTAGTAGATTAACACATACAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H11 CACCAGAGCCGCGCCCTCAGAGCGCTCATAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
A12 CBBGGTTTAAACAGTGGCCGCTATAAATAAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
B12 AACTAGCAAAAGCCCAAAAACAACGTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
C12 CGGAAGCAACCTGACTATTAAGCAAAATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
D12 CAGCCCTCAGTTTTGCTACCGAGTAGCCACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
E12 CAGGACGTTGACGAGAAACCCAGATATTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
F12 GCAGCACCCGGAACCGAGAGAGGATAGCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
G12 GATGCAAAAGCAAGAACGCGAGGATAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG
H12 AATAAAGAGCGGCTAATACAGAAATGAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGCATCGAGG

```

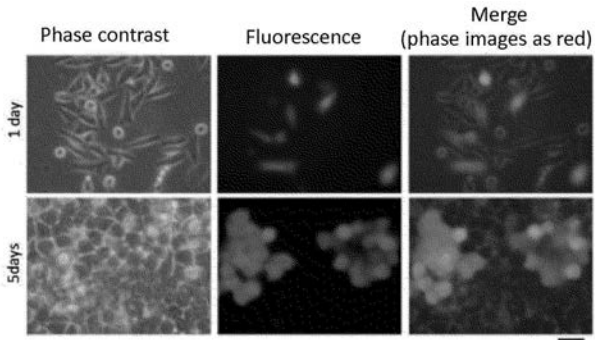
【 図 3 】



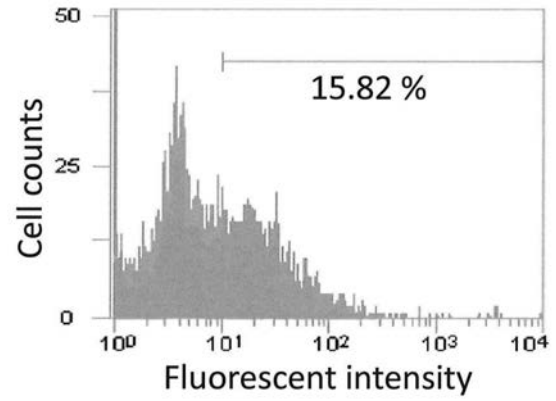
【 図 4 】



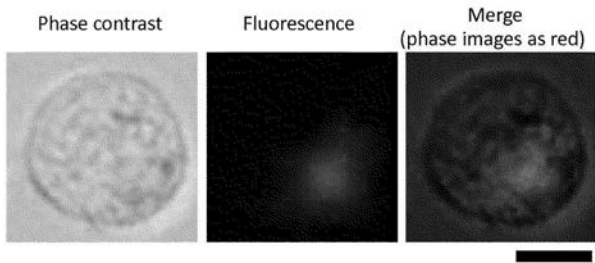
【 図 5 】



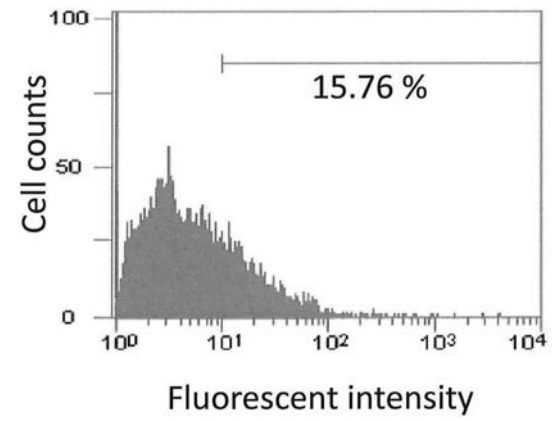
【 図 7 】



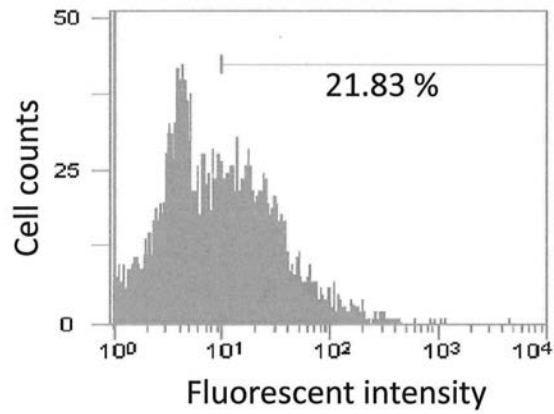
【 図 6 】



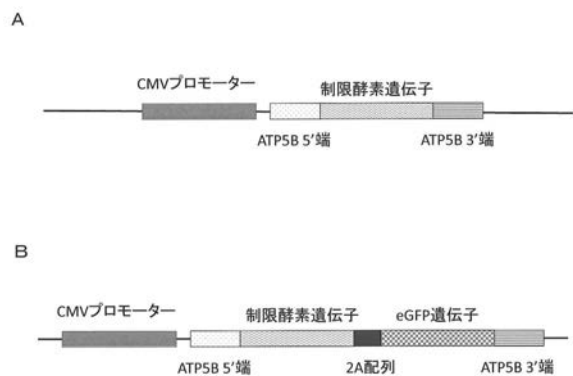
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【配列表】

2017055729000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 7

(72)発明者 小椋 利彦
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 野村 慎一郎
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

(72)発明者 齋藤 明
宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA01 DA03 EA04 FA02 GA04 GA13 GA14
GA30 HA17
4B065 AA93X AA93Y AA99Y AB01 AC20 BA02 BD21 BD50 CA44 CA60
4C087 AA01 AA03 BB65 CA12 NA14 ZB22