

・ 研究助成題目

「新規細胞制御・治療法の開拓に向けたミトコンドリア DNA 編集技術の確立」

・ 助成期間

2020 年 4 月～2021 年 3 月

・ 研究の目的

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産だけでなく、代謝においても重要な役割を果たし、ミトコンドリア病などの様々な疾病がその機能異常に起因している。また、核とは異なる独自の DNA (mtDNA) が存在し、その突然変異によって機能異常、ひいては疾病が引き起こされる。したがって、mtDNA 編集が可能になればその治療や代謝改変に向けて非常に有用であるとともに、いまだ不明な点が多いミトコンドリアを研究する上での基礎研究ツールとしても意義深い。そこで、本研究では mtDNA を自在に編集する新たな技術の確立を目的とする。

・ 研究成果

mtDNA 編集技術を確立するうえで、(1) Cas9 ヌクレアーゼのミトコンドリア局在、(2) mtDNA の切断、(3) ドナー DNA のミトコンドリア局在、(4) 相同組み換えによるドナー DNA の mtDNA への挿入、といった 4 つの過程が必要である。本研究では、まず過程(1)と(2)に着目して、ミ

トコンドリア内での CRISPR-Cas9 の機能的発現を行い、以下のように出芽酵母 mtDNA を欠失させた ρ^0 細胞を作製する新たな方法を確立した (図 1)。

CRISPR/Cas9 システムを出芽酵母のミトコンドリア内で機能させるため、Cas9 ヌクレアーゼ

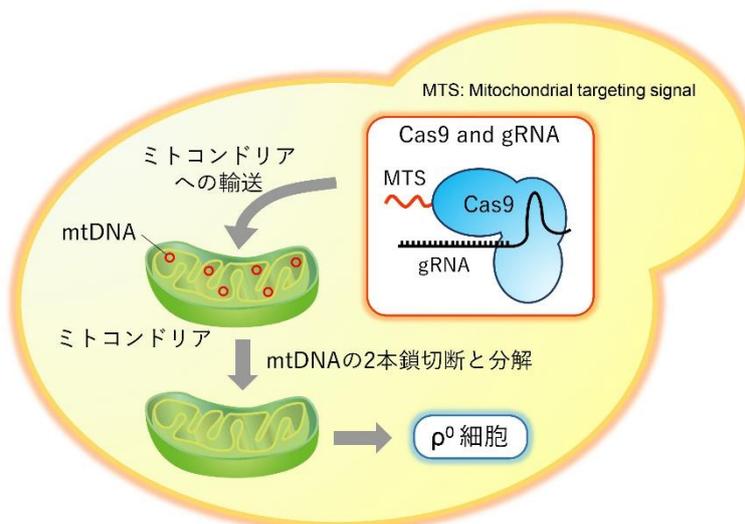


図 1 研究の概要

の N 末端にミトコンドリア輸送シグナル配列 (MTS) を付加した (MTS-Cas9)。また、発現後に細胞内局在を観察できるようにするため、Cas9ヌクレアーゼの C 末端には蛍光タンパク質 EGFP を付加した形で発現させた。酵母形質転換体を液体培養し、蛍光顕微鏡にて観察したところ、MTS を付加した Cas9ヌクレアーゼは、MTS を付加していないものとは異なり、ミトコンドリアに局在化することが分かった。mtDNA は二本鎖切断を受けた後、修復が行われないと速やかに分解することが知られている。そこで、mtDNA 上に存在する *ATP8* 遺伝子の塩基配列を認識する guide RNA (gRNA) とともに MTS-Cas9 を発現させることで、二本鎖切断を介した mtDNA の欠失を試みた。呼吸鎖の欠陥により、 ρ^0 酵母細胞は非発酵性炭素源 (グリセロールやエタノールなど) のみを含む培地では増殖できず、発酵性炭素源 (グルコース) を含む培地では mtDNA を持つ細胞と比較して非常に小さいコロニー (プチコロニー) を形成する。MTS-Cas9 と gRNA を共に発現させた酵母では、両者を発現していない酵母と比べてプチコロニー形成率が大きく向上した (図 2)。さらに、MTS-Cas9 と gRNA の発現により得られたプチコロニーの細胞から mtDNA を抽出し、定量 PCR (qPCR) によって mtDNA 量を測定したところ、mtDNA 量が著しく減少した (図 3)。したがって、ミトコンドリアに局在化させた Cas9ヌクレアーゼが gRNA と共にミトコンドリア内で機能し、mtDNA の二本鎖切断を誘起して ρ^0 細胞の形成を促すことが示された。

以上のように本研究では、ミトコンドリア内において CRISPR/Cas9 システムを機能させることに成功した。Cas9ヌクレアーゼの DNA 二本鎖切断活性を利用することで mtDNA を欠失させた ρ^0 細胞を作製することができ、エチジウムブロマイドを用いた従来法に代わる方法として有用である。今後、本成果を基盤として、mtDNA 配列を自在に編集する技術へと発展させることで医療分野への応用も期待できる。

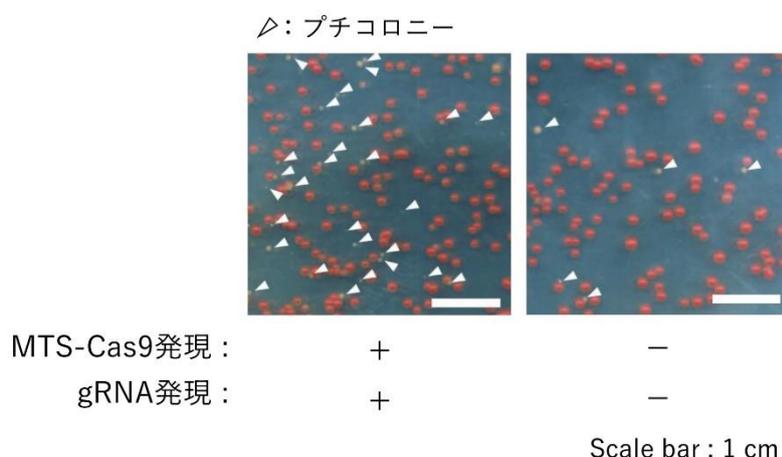


図 2 MTS-Cas9 と gRNA の発現によるプチコロニー形成率の向上

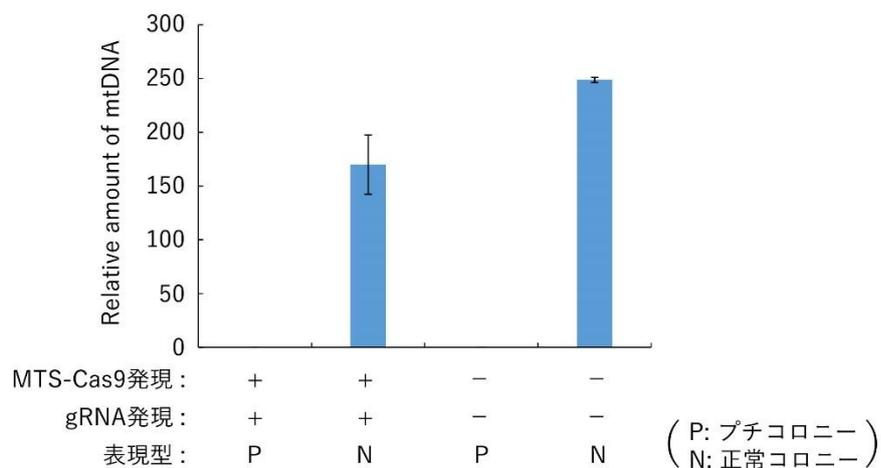


図3 MTS-Cas9 と gRNA の発現による mtDNA 量の減少
(酵母から mtDNA を抽出し、qPCR によって mtDNA を定量した。)

・学会発表

天井貴光、辻知佳、植田充美、黒田浩一
ミトコンドリアゲノム編集 (mito-CRISPR) システムの開発とその応用
日本農芸化学会 2021 年度大会 (オンライン) 2021 年 3 月 20 日

・論文発表

Takamitsu Amai, Tomoka Tsuji, Mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda
Development of mito-CRISPR system for generating mitochondrial DNA-deleted strain in
Saccharomyces cerevisiae
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 85(4): 895-901 (2021)

※2022 年 3 月 16 日、本論文に対して「日本農芸化学会 2021 年 B.B.B.論文賞」が授与された。