

ゲノム編集技術を用いたミトコンドリア遺伝子疾患モデルマウスの作製

梅原 萌 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 石川 香 (筑波大学 生命環境系)

ミトコンドリアは酸化的リン酸化により生体エネルギーである ATP を合成する細胞小器官である。その内部には独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) が数百から数千コピー存在しており、呼吸酵素複合体のサブユニットおよびそれらの翻訳に必要な tRNA と rRNA がコードされている。mtDNA に病原性突然変異が蓄積すると、ミトコンドリア病と総称される多様な疾患が引き起こされることが知られている。ミトコンドリア病は現在のところ有効な治療法はほとんどなく、病態の発症メカニズムすらよく理解されていない難治性疾患である。ミトコンドリア病の病態を理解し、治療法を探るために最も有効なアプローチは、mtDNA に突然変異を有し、それが原因で病態を発症するミトコンドリア病モデル動物の樹立であるが、mtDNA に突然変異を有するモデル動物の樹立は、それ自体が技術的に困難であり、ミトコンドリア病を理解する上で大きな障壁となっている。それは、核膜腔があり、また細胞分裂に伴って核膜が消失するなど、DNA に直接アクセスできる核 DNA の場合とは異なり、mtDNA は細胞周期を通じてミトコンドリアの外膜と内膜という二重の生体膜で細胞質から隔離されていることから、核 DNA で一般的に行われているような変異挿入や遺伝子のノックアウトなどの遺伝子操作が非常に困難とされてきたためである。

そこで本研究では、ランダムな mtDNA 突然変異の中から目的の変異を濃縮するという手法によってミトコンドリア病モデルマウスを樹立するための出発材料となるマウス培養細胞を得ようと考えた。mtDNA 突然変異を有するマウス培養細胞が得られれば、その変異を ES 細胞に導入し、キメラマウス作製を経て当該変異を有するモデルマウスを樹立することが可能である。まず、ミトコンドリア病の病因変異として最も頻度が高いことで知られるヒト mtDNA の A3243G 点突然変異と相同部位にあたる、マウス A2689G 変異を探索の対象として設定した。次に、ランダムな突然変異を有するマウス培養細胞として、mutator mice の mtDNA を有する培養細胞を用いることとした。Mutator mice は、mtDNA の唯一のポリメラーゼである DNA polymerase γ の校正機能を破壊して作製されたマウスで、加齢に伴って mtDNA にランダムな突然変異を蓄積していくことで知られている。このランダムな突然変異の中から、目的とする A2689G 変異を検出・濃縮したいと考えた。濃縮の方法として、mito-TALEN を用いようと考えた。mitoTALEN は、制限酵素の Fok I タンパク質と細菌由来の DNA 結合ドメインを組み合わせた合成ヌクレアーゼである TALEN に、ミトコンドリア移行シグナル(MLS)を組み込んだものである。MLS の存在によって、mitoTALEN は翻訳後、ミトコンドリア内に侵入する。この後、DNA 結合ドメインによって mtDNA の任意の配列が認識され、Fol I タンパク質によって切断されると考えられている。

ランダムな mtDNA 突然変異を有する細胞に野生型 (WT) mtDNA を切断するように設計した mito-TALEN を作用させ、高率で存在する WT の mtDNA は切断することができれば、もともと少量含有している A2689G の割合を増加させることがで

きると想定される。そこで本研究では、まずランダムな mtDNA 突然変異を有する培養細胞を樹立し、その mtDNA 中に目的の A2689G 変異が存在するか否かを検討した上で、mito-TALEN による WT mtDNA の切断を介して当該変異を濃縮することが可能かどうか検討することを目的とした。

【材料と方法】

まず、ランダムな mtDNA 突然変異を有するマウス培養細胞を樹立するために、10 カ月齢の mutator mice から麻酔下で血液を採取し、遠心分離によって血小板を調整した。血小板は無核であるため、mtDNA をもたないマウス ρ^0 細胞と融合することによって mutator mice の mtDNA のみをマウス培養細胞に導入することができる。そこで、調整した血小板を所属研究室が有するマウス ρ^0 細胞である ρ^0 B82 細胞と融合し、B82mtPolG^{mut/mut} を樹立した。同時に、対照として野生型マウス (C57BL/6; B6) の血小板を用いて B82mtB6 も樹立した。

次に、この樹立された細胞の mtDNA 中に目的の A2689G 変異が含まれているかどうかを確認するために、次世代シーケンサーを用いた mtDNA の配列解析を実施した。

これと並行して、WT mtDNA の切断ができるよう、mito-TALEN の設計を試みた。

【結果と考察】

樹立した細胞の mtDNA 配列解析により、B82mtPolG^{mut/mut} には B82mtB6 よりも有意に高い割合で突然変異が蓄積していることが明らかとなった。詳細は発表会にて報告する。