

## マウス培養細胞を用いた病原性突然変異型ミトコンドリア DNA の濃縮の試み

日比 保乃郁 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 中田 和人 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

ミトコンドリアは脂質二重膜構造を有する細胞小器官であり、内膜に存在する呼吸酵素複合体によって ATP を産生する。哺乳類のミトコンドリアには核 DNA とは異なる独自の環状二本鎖構造の DNA (mtDNA) が、細胞あたり数百から数千コピー含有されている。この mtDNA に病原性突然変異が生じ、そのような変異型 mtDNA が細胞や組織に高い割合で蓄積すると、ミトコンドリア呼吸機能 (ミトコンドリアにおける ATP 産生) が低下し、ミトコンドリア病と呼ばれる全身性の代謝疾患が発症する。

ミトコンドリア病の症例の中でも MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) は最も罹患率が高い病型である。MELAS の症例では mtDNA にコードされた *tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>* 遺伝子領域に点突然変異が高頻度に生じていることが知られており、特に同遺伝子領域の A3243G 変異が MELAS の症例の約 80% で見出されている。近年、この A3243G 変異が糖尿病や難聴の症例でも見出されたことを受け、A3243G 変異による多様な発症機構の存在が注目されている。しかし、A3243G 変異を含有する病態モデルマウスが樹立されていないことから、有効な治療法の探索はもとより、A3243G 変異による多様な発症機構の理解は遅れている。

そこで本研究では、ヒト A3243G 変異と相同なマウス A2689G 変異を有する、病態モデルマウスの作製を最終目的とした。核 DNA と異なり、mtDNA にコードされた遺伝子の改変は極めて困難であり、CRISPR-Cas9 をはじめとした各種遺伝子改変手法をもってしても、未だに病態モデルマウスの作出には活用できていない。そこで本研究では、体細胞突然変異によって生じたわずかな変異型 mtDNA を濃縮し、その細胞質体をマウス ES 細胞に導入する細胞生物学的な手法を活用することにした。

## 【材料・方法】

A2689G 変異を有する病態モデルマウスの作製計画は以下の通りである。まず、A2689G 変異を高い割合で含有する培養細胞を脱核して得た細胞質体と、mtDNA を欠損させたマウス ES 細胞を融合させる。A2689G 変異を有する mtDNA をミトコンドリアごと導入したマウス ES 細胞を、マウス初期胚に移植してキメラマウスを作製する。雌のキメラマウスを野生型の雄と交配させ、全身に A2689G 変異を有する病態モデルマウスを誕生させる。

本研究では、この作製計画の出発材料である A2689G 変異を高い割合で含有する細胞の樹立を目指して、所属研究室の先行研究において作製された mutator mice の血小板と mtDNA 欠損培養細胞を融合させた細胞質雑種 (Cytoplasmic hybrid; Cybrid) を用いることにした。mutator mice とは mtDNA 複製酵素である DNA Polymerase  $\gamma$  (PolG) の校正機能を欠損させたマウスであり、加齢に伴って mtDNA にランダムに突然変異が生じることが知られている。先行研究で樹立された Cybrid には A2689G 変異を有する mtDNA が 0.0104% の割合で含有されていたため、本研

究ではこの Cybrid を出発材料として A2689G 変異を有する mtDNA を濃縮しようと考えた。

A2689G 変異を有する mtDNA を濃縮するために、mtDNA 複製阻害剤であるエチジウムブロマイド (EtBr) を用いた。Cybrid を 2.5  $\mu$ M の EtBr を添加した培地で 5 日間培養すると、mtDNA コピー数が減少し、その後、通常培地で 5 日間培養すると、mtDNA コピー数が回復する。このような mtDNA コピー数の減少と回復によるボトルネック効果を利用して、A2689G 変異を有する mtDNA の割合が増加したクローンを単離しようと考えた。mtDNA コピー数を回復させた後、シングルセルクローニングを行い、単離したクローンに含まれる A2689G 変異を有する mtDNA の割合を PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) によって解析した。

さらに本研究では、よりわずかな A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮状態を検出するために dPCR の活用を検討した。dPCR の条件検討では、野生型と A2689G 変異のオリゴ DNA を用いて検出感度を検証した。

## 【結果】

これまでに (2024 年 1 月現在)、計 1,293 クローンを単離し、PCR-RFLP (検出感度 1.0% 程度) を行ったが、A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮は確認できていない。

dPCR における A2689G 変異を有する mtDNA の検出のための実験では、少なくとも 0.3% 程度まで検出感度を向上させることに成功した。

## 【考察・展望】

所属研究室における別の変異型 mtDNA の濃縮研究において、1,728 クローンの単離を介して変異型 mtDNA の含有率を 0.4% から 95% 以上に濃縮することに成功している。本研究のように、極めて低含有率の変異型 mtDNA (A2689G 変異を有する mtDNA の含有率は 0.0104%) を濃縮させるためには、より多くのクローンの単離が必要であると考えられる。そこで今後は、クローン数を増やし、かつ、各クローンに含まれる A2689G 変異の含有率の解析に dPCR を用いることで、今までは検出できなかったよりわずかな A2689G 変異を有する mtDNA の濃縮状態を検出し、A2689G 変異を有する mtDNA を多含する Cybrid の樹立を成功させたいと考えている。