

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07148

研究課題名（和文）マウス発生過程における異質性mtDNA分離モデル構築と操作技術への応用

研究課題名（英文）The segregation of heteroplasmic mtDNA during mouse development and its application to manipulation techniques

研究代表者

設楽 浩志（SHITARA, Hiroshi）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・室長

研究者番号：90321885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：異質性状態にあるミトコンドリアDNA（mtDNA）の遺伝様式を解明するため、塩基配列の違いが比較的少ない2種のmtDNAを有する新規異質性mtDNAマウスモデルを樹立した。本システムを用いた解析の結果、異質性mtDNAが子孫に伝達する際には個体間でその割合に違いが生じることが示された。また卵母細胞間においても異質性mtDNA割合に一定の差が生じていることが認められた。ミトコンドリア機能に関わる核遺伝子が異質性mtDNA分離・遺伝に与える効果を解析するため核遺伝子機能改変マウス系統を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類においてmtDNA上に変異が生じた場合には、野生型と変異型の少なくとも2種類のmtDNA分子種が生体に存在する状態（異質性）となる。本研究はこうした異質性状態にあるmtDNAがどのように子孫に伝えられていくのかとした問題に取り組むもので、基礎遺伝学分野に貢献すると考えられる。また変異型mtDNAが関与すると考えられており治療法の確立が困難とされているミトコンドリア病に対する治療方法への応用の可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the segregation of heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA), a new heteroplasmic mouse strain containing two types of mtDNA with few differences in DNA sequences was established. Analysis using this strain revealed that there is a difference in the proportion of heteroplasmic mtDNA between individuals when the heteroplasmic mtDNA is transmitted to the next generation. A difference was also observed in the proportion of the heteroplasmic mtDNA among single germline cells. To analyze the effect of nuclear genes on the segregation of heteroplasmic mtDNA, a knock-in mouse strain was established.

研究分野：実験動物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 異質性 マウス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類 mtDNA は、エネルギー産生の機能を主に担うミトコンドリアに存在する約 16kb の環状二本鎖の DNA であるが、この mtDNA の特徴の一つとして変異率が核 DNA と比較すると十数倍高いことが挙げられる。また、変異型 mtDNA が生じた場合には、細胞・個体中に 2 種類あるいは 2 種類以上の mtDNA 分子種が存在し、いわゆる異質性の状態が維持される可能性がある。こうした変異がいわゆる病的変異の場合にはミトコンドリア機能障害を引き起こすようなミトコンドリア病の原因になるとされている。しかし mtDNA 上に病的変異が生じた場合でもミトコンドリア機能障害が直ちに引き起こされるわけではなく、変異型 mtDNA の割合が一定の高い割合を占めるようになると病態を発症する事例が示されている。このため生じた変異型 mtDNA の割合はミトコンドリア病の発症の重要な要素になりうる。異質性 mtDNA 割合は生殖系列を通して次世代へ伝達される際に変動し、この遺伝現象は mtDNA 急調分離として知られている。この分離の遺伝現象を、ミトコンドリア病発症予防を目的とした方法の一つである着床前診断法 (Preimplantation genetic diagnosis) へ応用することが考えられているが、その遺伝様式や機構については未だ解決されていない問題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では mtDNA に特徴的な遺伝様式である急調分離について、個体あるいは卵母細胞、初期胚の発生過程において、異質性の状態にある mtDNA がその割合としてどのような動態・変動を示すのか、マウスを用いた解析を行う。特に mtDNA 分子種の違いによる異質性割合への影響を考慮し、塩基配列としての違いが非常に少ない 2 種類の mtDNA 分子種を有する異質性 mtDNA モデルを新たに構築し解析を行う。さらに mtDNA 異質性の遺伝機構に関与の可能性がある遺伝的要因を解析するための遺伝子改変マウスの樹立を行う。

3. 研究の方法

(1) 異質性 mtDNA 割合の測定系の構築

これまでに構築してきた PCR-RFLP 法の原理に基づいた測定方法を本系統の測定系として採用した。データベース上にて公開されているマウス mtDNA 塩基配列の情報から、PCR 増幅単位、プライマー、制限酵素反応時の切断部位の設計、およびコントロールとして用いるための人工遺伝子の設計を行った。反応後に電気泳動・染色を行い、泳動像の画像解析によって定量解析を実施した。

(2) 新規異質性 mtDNA マウス系統の開発

新規の異質性マウス系統の開発を行うため、マウスの受容系統と供与系統として塩基配列の相同性が高い 2 系統の近交系マウスを用いた。各系統からの前核期受精卵を準備し、供与系統の細胞質を受容系統の細胞質中に導入した。その後、仮親への移植を行い、産仔を得て受容系統として用いた近交系との交雑によって系統樹立・維持した。

(3) 異質性 mtDNA 割合測定のための単一細胞からの試料調製

単一細胞における異質性 mtDNA 割合測定のため卵母細胞については、異質性 mtDNA マウスの卵巣から、コラゲナーゼやトリプシン処理などによって卵母細胞を単離した。また、初期胚の割球を単離するために、発生工学的に準備した初期胚からトリプシン処理などによって単一の細胞を調製した。DNA 量としての損失を抑えつつ DNA 溶液を調製するために、非イオン性界面活性剤を含むプロテイナーゼ K バッファーを用いて DNA 溶液を調製した。

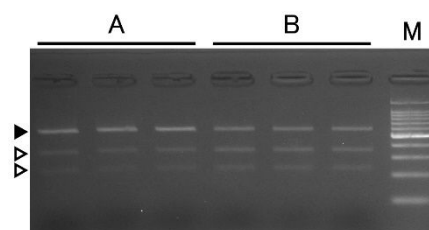
(4) 遺伝子改変マウス系統の開発

ゲノム編集 (CRISPR/Cas9) の手法を用いて遺伝子改変マウスの作製を実施し、シーケンス解析や定量 PCR 法などによって標的遺伝子機能の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 異質性 mtDNA 割合の測定系の構築

PCR-RFLP によって受容系統と供与系統の mtDNA 分子種を制限酵素切断によって区別可能となるように mtDNA 上の領域を選定した。PCR-RFLP によって異質性 mtDNA 割合の測定を行う際には PCR サイクル数増加に伴うアーティファクトの影響を受ける可能性があることが知られている。本異質性系統のための 2 種類の mtDNA 分子種は、その塩基配列の類似性が非常に高く、このためアーティファクトの検証を可能とした実験系を構築するためには同増幅領域内において上記制限酵素とは異なる制限酵素にて区別が可能となるように人為的に変異を導入し

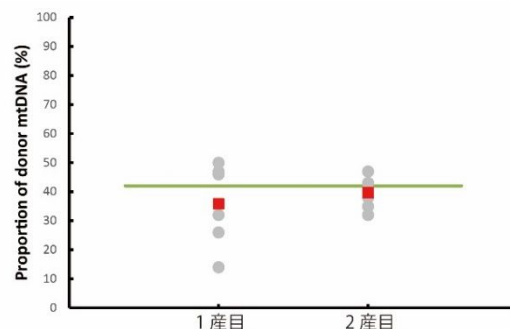


(図1) 異質性 mtDNA 解析例 (ゲル電気泳動像)
制限酵素反応後のゲル電気泳動像。A, B は各個体を (3 反応にて測定)、M はサイズマーカーを示す。黒塗または白塗三角の位置にあるバンドは、それぞれ供与系統または受容系統由来のシグナルを示している。

たコントロールが必要であり、このため目的の変異を導入した人工遺伝子コントロールを作製した。このコントロールを用いてアーティファクトが検出限界以下となるような PCR サイクル数の条件をリアルタイム PCR によって決定し、さらに PCR-RFLP の手法を組み合わせることによって測定系を構築した。この測定系の性能については、各割合で混合したコントロールとなる DNA 試料を調製し検討を行った結果、より正確な測定が可能であることが確認された。これまでに、2 種の mtDNA 分子種を有する他の異質性系統を対象として同原理を用いた測定法でもより正確な測定が可能であることを見出しており、異質性 mtDNA 割合を測定する本方法の有用性が示されたと考えている (図 1)。

(2) 新規異質性 mtDNA マウス系統の樹立

上記 3 (2) によって複数の産仔を得た。これらの産仔において尾から DNA 試料を調製し、異質性割合の測定を行った。その結果、検出限界以下から最大で十数%の供与系統由来 (外来性) mtDNA が検出された。この検出結果はこれまでに作製してきた別の異質性系統とほぼ同じであり、同様の外来性 mtDNA 導入効率であることが示された。これらのファウンダー個体と受容系統個体とを交雑することによって系統の維持を行った。得られた子孫の個体について、尾から DNA 試料を調製し異質性 mtDNA 割合を測定したところ、導入した供与系統由来 mtDNA が次世代へ伝達する様子が確認され、新規の異質性 mtDNA マウス系統が樹立されたことが示された。さらに同じ親から同時期に出生した個体間において異質性 mtDNA 割合を検討したところ、最大で数十%程度の差となる場合があることが観察された (図 2)。さらに個体の各組織 (肝臓、骨格筋等) から DNA 試料を調製し異質性 mtDNA 割合を測定した。その結果、調べた限りの各組織間の差は最大で十数%程度であり、また得られた結果から性別や加齢の影響については非常に小さいと現時点では考察している。これまでの知見、すなわち mtDNA 塩基配列が異なる別の異質性系統を用いた解析結果において、幾つかの組織間によっては数十%の差として検出されることもあり、これと比較して本異質性系統における組織間における異質性 mtDNA 割合の差は小さい結果として観察された。

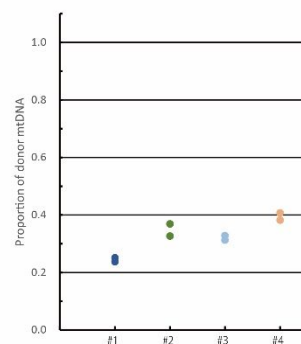


(図 2) 出生個体における異質性 mtDNA の割合

3-4 週齢時尾における異質性 mtDNA 割合を測定。縦軸は供与系統由来 mtDNA 割合、丸 (灰色) は各個体の割合、四角 (赤色) は同時期に出生した個体の平均の割合、横線 (緑) は親個体の割合を示す。

(3) 卵母細胞、初期胚における異質性 mtDNA の測定

本異質性マウス系統を用いて、卵母細胞間における異質性 mtDNA 分離様式を検討した。卵巣内の単一卵母細胞を調製し異質性 mtDNA 割合の測定を実施した。その結果、卵母細胞間では、異質性 mtDNA 割合が数十%程度の差となって示される場合があることが観察された。一方で、着床前の初期発生過程における割球において検討するため、単一の割球を調製し解析を行ったが、2 細胞期から 8 細胞期において現在までに割球間の異質性 mtDNA 割合として大きな差は観察されていない (図 3)。以上の結果は、本研究で樹立した新規 mtDNA 異質性 mtDNA マウス系統において、卵母細胞の時期に異質性 mtDNA 割合が細胞間で大きく異なる状況が生じ、着床前の初期発生過程ではこの割合が変動する効果は比較的小さいことを示唆している。



(図 3) 2 細胞期胚の割球における異質性 mtDNA 割合
横軸は 2 細胞期胚の試料番号、縦軸は供与系統由来 mtDNA 割合、丸は各割球の割合を示す。

(4) ミトコンドリア遺伝子機能に關与する核遺伝子の改変マウス作製と解析

異質性 mtDNA 分離機構を解明するために、ミトコンドリア、mtDNA 機能に関わることが知られている核遺伝子を対象とした、複数系統のノックアウト (KO) マウスとノックイン (KI) マウスの樹立、機能解析を行った。

作製したうちの 1 系統の KO マウスの子孫について、ヘテロ接合体同士との交配によって得られた子孫の遺伝子型を解析したところ、ホモ接合体個体は得られなかった。ヘテロ接合体および野生型マウスの組織から RNA 試料を調製し、qRT-PCR によって対象遺伝子の発現量を解析したところ、複数の組織において対象遺伝子の発現量が減少していることが示された。さらに mtDNA 量について検討するため、組織から DNA 試料を調製し、定量 PCR によって相対定量解析を行った結果、組織によって程度の差は認められるが、KO (ヘテロ接合体) マウスの組織では野生型と比較した場合に mtDNA 量が低下している傾向が観察された。

また、別の遺伝子を対象とした KI マウスの作製を実施した。標的配列に対応した sgRNA を作製し、Cas9 とドナー DNA とともにマイクロインジェクション法によって前核期受精卵に導入し

た。ファウンダー個体においてシーケンス解析を行い、複数の個体において標的とした領域の塩基配列が設計した配列となっていることが確認された。さらに、オフターゲットの候補領域において変異導入は検出されず、オフターゲット効果については認められなかった。選定したラインについては野生型マウスとの交雑により系統を樹立した。

これら複数遺伝子の遺伝子機能の解析と同時に、異質性 mtDNA 遺伝への影響やその機構の解析について進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tani Haruna, Ohnishi Sakiko, Shitara Hiroshi, Mito Takayuki, Yamaguchi Midori, Yonekawa Hiromichi, Hashizume Osamu, Ishikawa Kaori, Nakada Kazuto, Hayashi Jun-Ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-017-18828-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 http://www.igakuken.or.jp/center/basic/idenshi.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	米川 博通 (YONEKAWA Hiromichi) (30142110)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員 (82609)	