

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430101

研究課題名(和文) マウス異質性ミトコンドリアゲノムの遺伝原理モデル構築と制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of mouse models for heteroplasmic mitochondrial DNA transmission

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・主任基盤技術研究職員

研究者番号：90321885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類において2種類以上のミトコンドリアDNA(mtDNA)分子種が細胞内に存在する異質性の状態が、子孫へ伝達するときの遺伝様式を解明するために、マウスを用いた遺伝モデル構築を行った。また異質性mtDNAについて、その割合を測定するための方法を詳細に検討することによって、従来の問題点を克服した条件下での測定が可能となるように測定方法の改善を実施した。さらに異質性mtDNA遺伝に影響を及ぼす可能性のある因子として、mtDNAに結合しその機能維持に必要な遺伝子について、ゲノム編集の技術を用いてノックアウトマウスの作製を実施した。

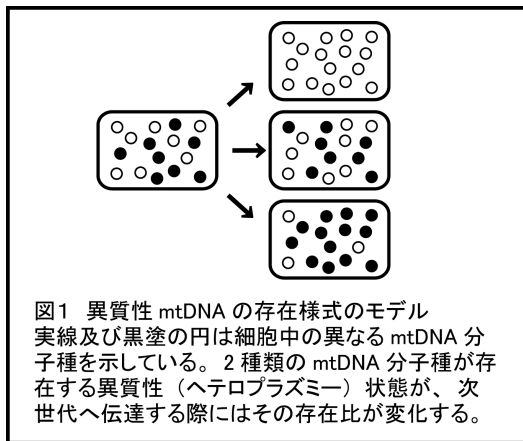
研究成果の概要(英文)：Mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy is the presence of two or more types of mtDNA molecules within single cells and individuals. To investigate the mode of heteroplasmic mtDNA transmission in mammals, heteroplasmic mtDNA mouse strains were established using cytoplasmic transfer methods by microinjection. The proportion of heteroplasmic mtDNA was measured by PCR-RFLP methods, which were improved to eliminate the influence of artifacts. Moreover, a knockout mouse strain was established using CRISPR/Cas9 system to investigate the target gene function associated with the inheritance of heteroplasmic mtDNA.

研究分野：実験動物学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリアDNA ヘテロプラズミー

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは主な機能としてエネルギーである ATP 産生を行う細胞小器官で、独自のゲノムであるミトコンドリア DNA (mtDNA) を有している。哺乳類 mtDNA は、ヒトでは約 16.5 kbp、マウスでは約 16.3 kbp の環状二本鎖の構造で、ミトコンドリア機能に関わる 2 種類の rRNA、22 種類の tRNA および 13 種類の構造タンパクをコードしている。通常、一つの細胞内に mtDNA は複数コピーとして存在し、その数は細胞種によって異なるものの 1000-10000 分子と見積もられている。また、核 DNA と比較すると変異率が高いことが知られており、mtDNA 上に変異が生じた場合、細胞内には野生型と変異型の少なくとも 2 種類の mtDNA 分子種が存在する状態となる。このような状態は、mtDNA の異質性状態 (ヘテロプラズミー) と呼ばれている (図 1)。



ヒトにおいて、mtDNA 上の変異が病的変異であった場合には、いわゆるミトコンドリア疾患の原因となりうるということが知られている。例えば、mtDNA 上の 8344 番目の塩基の点変異では MERRF (Myoclonus epilepsy associated with ragged red fibers) と呼ばれる疾患の原因とされ、その遺伝様式として変異型 mtDNA が様々な割合で子孫へと伝達することが報告されている。この他にも mtDNA 上の 3243 番目の点変異が原因とされる MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) や大規模欠失変異が原因とされる CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia) 等、複数のミトコンドリア疾患が知られており、“異質性の状態にある mtDNA” の次世代への伝達様式や組織種における存在様式が、変異種によって異なることが報告されている。

異質性 mtDNA がどのようにして子孫へと伝達していくのか、こうした疾患に対するアプローチを中心として様々な検討が進められてきている。しかし、特にミトコンドリア機能に大きな影響を与える病的変異型 mtDNA の場合には、ミトコンドリアそのものが異常な状態なことも考えられ、これらの生理的要因の影響を大きく受ける可能性が容易に想定され、これらの要因を排した条件下での異質

性 mtDNA 遺伝についての検討は困難である。これまでに病的変異型 mtDNA を持たない異質性 mtDNA モデルとしてマウス系統間の mtDNA 多型を用いて、すなわち 2 系統由来 mtDNA を有する異質性 mtDNA モデルマウス系統の例が報告されており、このモデル系統を用いて個体として様々な割合で異質性 mtDNA が次世代へと伝達していく様子が解析されている。また、各種組織における異質性 mtDNA の存在様式についても解析され、その組織特異性についても検討がなされてきている。しかしながら、詳細な遺伝様式については不明な点がおおく残されており、特に細胞、オルガネラのレベルでの解析や、その制御メカニズムを含めると未解明の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、異質性状態にある mtDNA がどのようにして子孫へと伝達するのか、異質性 mtDNA モデルマウス系統を樹立し、その遺伝原理の理解を進めることにある。そのために、マウス系統間の mtDNA 多型を用いた異質性状態のモデルマウスを作製し、子孫へどのように伝達をしていくのか継代的な遺伝学的解析を実施し、また分化した組織・細胞における分配様式について解析を実施する。また、異質性 mtDNA 割合を測定する方法についても、より正確な定量が可能となるように検討を行うこととした。さらにこれらの遺伝モデルを基礎として、mtDNA の異質性状態に影響を及ぼす可能性のある遺伝的要因についても、遺伝子改変マウスの樹立を行い、異質性 mtDNA 状態を制御することも含めて検討することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 異質性 mtDNA マウス系統の樹立

肝臓由来ミトコンドリア画分の初期胚への導入

mtDNA 上に多型の存在する 2 系統のマウスを、それぞれ受容系統および供与系統として用いた。mtDNA 供与系統の肝臓から粗精製することで、導入に使用するミトコンドリア画分を調製した。受容系統の初期胚に、供与系統のミトコンドリア画分をマイクロインジェクション法によって導入した。マイクロインジェクション後に正常な形態を維持した胚を偽妊娠の仮親マウスに移植し、出生個体を得た。

初期胚間における細胞質移植

上記(1)と同様に受容系統および供与系統として 2 系統のマウスを用いた。両系統の卵と 1 系統の精子を用いて体外受精を行うことで、初期胚を準備した。供与系統の初期胚から、マイクロインジェクション用ピペットを用いて少量の細胞質を吸引し、これを受容系統の初期胚へと導入した。マイクロインジェクション後に 2 細胞期にまで発生した胚を偽妊娠の仮親マウスに移植し、出生個体を得た。

(2) 異質性 mtDNA 検出・測定法としての PCR, PCR-RFLP

マウス mtDNA 配列情報について、すでにデータベース上に公開されている配列情報とそれ以外の配列についてはシーケンス解析を行うことにより決定し、PCR プライマーの設計や制限酵素反応の実験系構築時の参考とした。

導入した供与系統由来 mtDNA を検出するためには、供与系統 mtDNA 配列に特異的なプライマーを作製し、PCR を行った。

供与系統および受容系統由来 mtDNA の割合 (異質性 mtDNA の割合) を測定するために、PCR-RFLP 法の原理に基づいた測定を行った。両系統の配列を認識するプライマーを用いて PCR を実施した後に、一部の PCR 反応液を片方の系統由来配列のみを認識する制限酵素を用いて処理し、ゲル電気泳動・染色の後に、画像解析装置にて検出された断片の定量解析を行った。

(3) mtDNA 機能に関わる遺伝子のノックアウト (KO) マウス作製

mtDNA 機能と関係のあるタンパクをコードする遺伝子を対象とし、CRISPR/Cas9 による KO マウスの作製を行った。Cas9 mRNA および標的遺伝子の配列情報から sgRNA を合成した。これらの RNA 溶液をマイクロインジェクション法によってマウス初期胚に導入し、偽妊娠の仮親マウスに移植し、出生個体を得た。得られた個体について、試料 DNA を調製し、シーケンス解析によって、変異が導入されているか否かを検討した。

4. 研究成果

(1) 異質性 mtDNA マウス系統の樹立

受容系統の初期胚に、供与系統由来肝臓ミトコンドリア画分をマイクロインジェクション法によって導入したところ、得られた出生個体のうち、複数の個体から供与系統由来 mtDNA を PCR 法にて検出した。

さらに PCR-RFLP 法で検出を試みたが、供与系統由来 mtDNA の断片は認められなかった。先の PCR 法の検出感度の方が、PCR-RFLP 法よりも高感度であることが考えられ、このことから導入された供与系統由来 mtDNA 量が PCR-RFLP 法にて検出されない程度の少量であったことが想定された。また、次世代以降についても検討を行ったが、PCR-RFLP 法において検出されなかった。以上の結果から、肝臓由来ミトコンドリア画分を用いた場合には少量の供与系統由来 mtDNA を導入することは可能であるが、系統の樹立は困難であると判断した。

受容系統の初期胚に供与系統の初期胚細胞質を移植することによって、異質性 mtDNA マウス系統の作出を試みた。体外受精によって初期胚を準備し、供与系統由来初期胚の細胞質を受容系統へと導入した。2 細胞期へと

発生した胚において PCR-RFLP 法にて検討したところ、供与系統由来 mtDNA が導入されていることが確認された。さらに、マイクロインジェクション後の初期胚を仮親へ移植し、得られた出生個体の尾からの試料について、導入の有無を PCR-RFLP 法にて検討したところ、複数の個体において供与系統由来 mtDNA が導入されていることを確認した。受容系統と供与系統のマウス系統を複数系統として用いることを含め、複数の組合せによる細胞質移植を実施したが、実施した組合せにおいて、供与系統由来 mtDNA の導入が確認された。

(2) 異質性 mtDNA 割合の測定法の技術開発

PCR-RFLP 法による異質性 mtDNA 割合の測定は従来から実施をされてきているが、その定量性には PCR サイクル数の増加によって測定値に影響を与える可能性のあるアーティファクトが想定されている。このアーティファクトを抑えるために、対象となる DNA 試料濃度に対応した PCR サイクル数を設定し、異質性 mtDNA 割合が測定可能となるか検討を行った。その結果、少なくとも用いた検出系においてアーティファクトが検出限界以下となるような条件下で、測定が可能となることが確認された。また、その定量性を検証するために、受容系統と供与系統由来のコントロール DNA を様々な割合で有する希釈系列を作製し反応を実施したところ、正確性の高い測定が可能であることが示された。

(3) 細胞・組織・次世代における異質性 mtDNA の測定

尾試料より供与系統由来 mtDNA の導入が確認された個体について、各種組織における異質性 mtDNA 割合について測定を行った。その結果、調べた限りの全ての組織において異質性 mtDNA が検出された。現時点でこれらの組織間において異質性 mtDNA の割合に差がある様子が観察されている。また、単一細胞における異質性割合の測定を行うために、初代培養細胞を調製し測定を行った結果、様々な割合で異質性 mtDNA が存在している様子が認められた。これらの現象についてはさらに詳細な解析を進めることとしている。

異質性 mtDNA の次世代への伝達を検証するために、得られたファウンダーと野生型個体との交配により F1 世代の個体を得て、測定を行った。その結果、様々な割合で異質性 mtDNA が伝達しており、親個体の異質性 mtDNA 割合とは異なる個体も確認された。以上の結果から、本研究において異質性 mtDNA 遺伝モデルマウス系統が樹立されたと考えている。

(4) mtDNA 機能に関わる遺伝子のノックアウト (KO) マウス作製

mtDNA 機能に関わる遺伝子が異質性 mtDNA 遺伝に与える影響を検証するために、CRISPR/Cas9 システムにより KO マウスの作製を行った。シーケンス解析の結果、複数の

個体に変異が導入されていることが確認され、そのうち1ラインについて野生型との交雑により系統を樹立した。このラインについて、オフターゲット効果は現在のところ認められていない。異質性 mtDNA マウスと併せて解析することで、異質性 mtDNA 遺伝に関わる機能についてさらなる検証を進めている。

山口 碧 (YAMAGUCHI, Midori)
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・基盤技術研究職員
研究者番号：20593643

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

設楽浩志、曹麗琴、山口碧、米川博通、多屋長治：C57BL/6J および *Mus spretus* 由来ミトコンドリアゲノムを有する異質性マウス系統の開発．第63回日本実験動物学会総会，2016.5.18. ミューザ川崎シンフォニーホール(神奈川県川崎市)
設楽浩志：哺乳類における異質性ミトコンドリア DNA の遺伝．第16回 REG 部会，2014.11.8. 順天堂大学医学部(東京都文京区)

Midori Shimanuki, Junya Yamaguchi, Choji Taya, Hikomichi Yonekawa, Jun-ichi Hayashi, Hiroshi Shitara: Proportion of large deleted mitochondrial DNA in single primary adherent cells from mouse tail. International Symposium on Mitochondria 2013: The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-Mit), 2013.11.6-7, Tokyo, Japan

島貫碧、米川博通、設楽浩志：1日の時間変化による組織ミトコンドリア DNA 量の解析．第60回日本実験動物学会総会，2013.5.15. つくば国際会議場(茨城県つくば市)

山口潤也、島貫碧、米川博通、設楽浩志：マウス初代接着性細胞におけるミトコンドリア核様体の挙動解析．第60回日本実験動物学会総会，2013.5.15. つくば国際会議場(茨城県つくば市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/center/basic/identshi.html>

6. 研究組織

(1)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・主任基盤技術研究職員
研究者番号：90321885

(2)研究分担者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

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・特任研究員
研究者番号：30142110