

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650068

研究課題名(和文) マイクロデバイスで実現するホモプラズミックなミトコンドリアゲノム改変技術

研究課題名(英文) Development of homoplasmic mitochondrial genome editing method by using microdevice

## 研究代表者

和田 健一 (Wada, Ken-Ichi)

国立研究開発法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号：20525919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア(mt)ゲノムの機能解析を実施するためにはホモプラズミックなmtゲノム改変が必要であるが、これを実現する実用的な改変技術は開発されていない。本研究ではマイクロデバイスによる独自の細胞質移植技術を用いたホモプラズミックなmtゲノム改変技術の創出を目指した。この技術では変異mtゲノムをクローニングすることによりホモプラズミックなmtゲノム変異を構築することを想定している。これを実現するためには生きた細胞間における単一ミトコンドリアの移植が不可欠であるが、マイクロデバイスを用いた独自の細胞質移植技術に改良を加えることで、これを実現した。

研究成果の概要(英文)：To carry out functional analysis of mitochondrial (mt) genome, it is necessary to achieve homoplasmic mutation(s) on mt genome, however, feasible mt genome editing method has not been developed. The purpose of this study was to develop a novel mt genome editing method by using a specially-developed microfluidic device which can perform direct cytoplasmic transfer between live single cells via formation of cell fusion through a micro aperture. In the proposed method, homoplasmic mt genome mutation is achieved by transferring of single mitochondrion with mutated mt genome into the mt genome-less cell. In this study, single mitochondrion transfer between single live cells, the most critical matter for achieving homoplasmy of mt genome mutation, was realized by developing a new cell fusion method, in particular, modulating geometry of the microfluidic device.

研究分野：細胞/分子生物学

キーワード：ミトコンドリアゲノム マイクロデバイス 細胞融合

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアゲノム (mt ゲノム) は動物細胞においては唯一の核外ゲノムである。mt ゲノムの生命システムにおける役割を明らかにするためには mt ゲノム改変に基づく機能解析が必要であるが、その実施は極めて困難である。mt ゲノム改変が困難であるのは主に以下の二つの理由による。第一に、ミトコンドリアへの外来遺伝子送達そのものが困難であること、第二に、1 細胞あたり数千コピーにもおよぶ mt ゲノムが存在することである。つまり、たとえ任意の変異を導入することできたとしても、それが多数存在するコピーの大多数に導入されない限り表現型に反映されない。すなわち、mt ゲノムの機能解析を行うためには“ホモプラズミックな mt ゲノムの変異導入”という困難な課題を克服しなくてはならない。

これまでにミトコンドリア移行シグナルを付与した制限酵素等によってその標的配列を有した mt ゲノムを切断・除去することでその領域に変異を有した mt ゲノムをホモプラズミックな状態にできることが報告されている。しかしこの方法では mt ゲノム改変の対象となる変異は制限酵素の標的部位に限られるため、実用的な mt ゲノム改変法とは言い難い。現在のところ、mt ゲノム全域にわたって配列非特異的にホモプラズミックな mt ゲノム変異の導入する実用的な方法は開発されていない。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでにマイクロデバイスを用いた独自の細胞融合技術を開発し、その技術を用いることで生きた細胞間における直接的なミトコンドリア移植に成功している。本研究の目的は、申請者の独自技術であるマイクロデバイスを用いた細胞質融合技術を用いることで、これまで実現してこなかった mt ゲノムの全領域を対象としたホモプラズミックな mt ゲノム変異導入を可能にする、新規 mt ゲノム改変技術を開発することである。

## 3. 研究の方法

本研究の実施に先立ち、単一ミトコンドリア移植による mt ゲノムクローニングを実施することで実現する mt ゲノム全域を対象としたホモプラズミックな変異導入技術を開発した。この技術の概略は以下の通りである。mt ゲノム変異を蓄積させた細胞をドナー細胞とし、 $\rho 0$  細胞 (mt ゲノムを欠失させた細胞) をレシピエント細胞として準備する。これらの細胞間において、単一のミトコンドリアを  $\rho 0$  細胞に移植することで mt ゲノムの

クローニングを実現する。ミトコンドリア、および mt ゲノムは細胞/核ゲノムとは独立して増殖/複製することから、ミトコンドリアが移植された  $\rho 0$  細胞の mt ゲノムはその後同一の型のみを含む状態、すなわちホモプラズミックに mt ゲノムを有する細胞となる。

この mt ゲノム改変を実現するためには、単一ミトコンドリアの移植が必須である。本研究計画では、申請者の独自技術であるマイクロデバイスを用いた細胞融合法を用いた細胞質移植を基に、単一ミトコンドリアの移植を実現するマイクロデバイスを開発し、ホモプラズミックな mt ゲノムの改変を実現することを目指す。

## 4. 研究成果

本研究では、申請者の独自技術であるマイクロデバイスを用いた細胞融合技術を用いることで実現する単一ミトコンドリア移植に基づいたホモプラズミックな mt ゲノム改変技術 (研究の方法を参照) を発想し、その実現を目指した。具体的には、以下の4課題に取り組んだ。(1) 単一ミトコンドリアの移植、(2) mt ゲノムに変異が蓄積した細胞の樹立、(3)  $\rho 0$  細胞 (mt ゲノム欠失細胞) の樹立、(4) ミトコンドリアが移植細胞の選別法の樹立、である。それぞれの課題に関する研究成果を以下に記す。

### (1) 単一ミトコンドリアの移植

本研究に先立って申請者が開発したマイクロデバイスは、幅約  $2\mu\text{m}$  の微小な間隙 (マイクロスリット) を介して細胞融合を成立させることで、核の混合を伴わない直接的な細胞質移植を実現する。このデバイスは、細胞融合の際に生じる細胞質の相互交換に伴い生きた細胞間のミトコンドリアの移植も実現するが、その際にはミトコンドリアは細胞融合が成立した後に数時間かけて徐々に融合パートナーに移植されるという特徴があった。この研究課題では、単一ミトコンドリアの移植を実現するために、このゆっくりとしたミトコンドリア移植に着目した。すなわち、ミトコンドリアの移植量をさらに減じることができれば、単一ミトコンドリアの移植が実現すると考えた。そこで、マイクロデバイスのジオメトリを変更することでミトコンドリアの移植量を減じ、単一ミトコンドリアの移植を実現することを目指した。

ミトコンドリアの移植量を制限するために、微小な間隙構造をマイクロスリットからマイクロトンネルに変更した。幅  $2\mu\text{m}$ 、長さ 4、6、 $10\mu\text{m}$  のマイクロトンネルを有するマイクロデバイスをデバイスを作製し、NIH3T3 線維芽細胞を用いた細胞融合実験にてそれらにおけるミトコンドリアの移植量を比較したところ、トンネル長が長いほどミトコンドリアの移植量が減ることが明らかとな

った。特に、トンネル長が  $10\ \mu\text{m}$  のマイクロデバイスは、移植されるミトコンドリア量が非常に少なく、いくつかの例では融合パートナーへ移動したミトコンドリアを一つにすることに成功した (図 1)。また、マイクロトンネルは、融合試薬 (センダイウィルスエンベロープ) を除去した後すみやかに細胞の解離を誘発することもできた。これらの結果から、マイクロトンネルを有したマイクロデバイスを用いることで直接的な単一ミトコンドリア移植が実現できると考えられた。

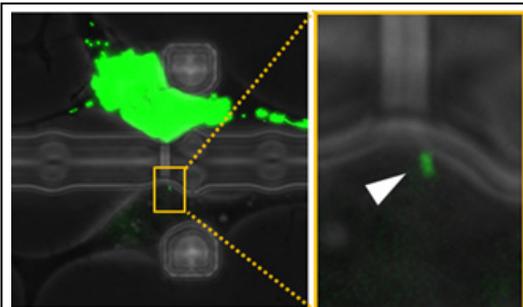


図 1. マイクロデバイスによる単一ミトコンドリア (矢じり) の移植。ドナー細胞側のミトコンドリアを COX8a-EGFP で標識した。

#### (2) mt ゲノムに変異が蓄積した細胞の樹立

本研究で提案する mt ゲノム改変技術では、ランダムに mt ゲノム変異を蓄積した細胞から  $\rho 0$  細胞に単一のミトコンドリアを移植することで mt ゲノムをクローニングし、その結果としてホモプラズミックな mt ゲノムの改変を実現する。この研究課題では、まず、このような mt ゲノムのクローニングの可否を検討するために、遺伝子型が明らかな mt ゲノムをヘテロプラズミック有するドナー細胞を構築した。具体的には、Hela と 143B 細胞の融合させ、両者の mt ゲノムをヘテロプラズミックに有する細胞株を樹立した。さらに両細胞種の mt ゲノムの全塩基配列の比較から、双方の mt ゲノムがヘテロプラズミックに混在する状態の細胞からそれぞれを PCR を用いて簡便に検出できる mt ゲノム領域も同定した。

本研究計画における mt ゲノム改変において、最終的には mt ゲノムに変異が蓄積した細胞が必要であるため、これを不正確な mt ゲノム複製を誘発する変異型 pol  $\gamma$  発現細胞を樹立することで作製を試みた。しかしながら、変異型 pol  $\gamma$  発現ベクターを作製するための pol  $\gamma$  のクローニングは終了したが、予定された研究期間内に変異型 pol  $\gamma$  発現細胞株の樹立には至らなかった。

#### (3) $\rho 0$ 細胞 (mt ゲノム欠失細胞) の樹立

本研究で提案するホモプラズミックな mt ゲノム改変技術において、レシピエント細胞として用いる  $\rho 0$  細胞が不可欠であるため、その樹立を行った。臭化エチジウムの長期曝露によって mt ゲノムを完全に除去すること

で 143B 細胞を  $\rho 0$  化することに成功した。さらに作製した  $\rho 0$  細胞に H2B-mCherry 発現ベクターを安定導入して核を赤い蛍光で標識し、ミトコンドリア移植後に  $\rho 0$  細胞由来の細胞を追跡できるようにし、これをレシピエント細胞とした。

#### (4) ミトコンドリアが移植された $\rho 0$ 細胞の選別法の樹立

本研究で用いるマイクロデバイス内では目的とするミトコンドリアが移植される  $\rho 0$  細胞は稀であるため (<1%と見積られる)、この細胞を選別する方法が必要である。そこで、TK (virus thymidine kinase) と GCV (Ganciclovir) を用いた選別システムを考案した。具体的には、TK 発現細胞をドナー細胞とし、そこからレシピエント細胞 ( $\rho 0$  細胞) にミトコンドリア移植を実施する。融合細胞の解離を誘発した後に、融合に伴ってレシピエント細胞に移動した TK が消失するまで培養を継続する。その後、GCV へ暴露することでドナー細胞由来の核を含む細胞を除去する。さらに、 $\rho 0$  細胞の生存に必要なウリジンとピルビン酸を含まない通常培地で培養を継続することでミトコンドリアが移植されなかった  $\rho 0$  細胞を除去する。

この研究課題では、このような GCV を用いた選別を実施できる TK 発現細胞の樹立に取り組んだ。具体的には、143B 細胞に TK 発現ベクターを導入することで TK 発現細胞 (TK-143B 細胞) を樹立した。また、樹立した TK-143B 細胞は、 $20\ \mu\text{M}$  の GCV への暴露で完全に死滅するが、143B 細胞はこの条件で増殖に影響を受けないことを確認した。また、TK-143B 細胞と  $\rho 0$  細胞を用いてマイクロデバイスを用いた細胞融合を行ったところ、マイクロトンネルを介した細胞融合とその後の解離を誘発することができた。

本研究では、研究期間内に最終目標としたホモプラズミックな mt ゲノム改変には至らなかったが、上記 4 つの課題の実施を通じて、この mt ゲノム改変に関する新規技術を実現する上で必要な基本要素を構築することができた。特に、最も重要な単一ミトコンドリアの移植に成功したことは、ホモプラズミックな mt ゲノム改変技術の実現に向けて大きな進展があったといえる。今後は、本研究にて構築できた基本要素を基に、ホモプラズミックな mt ゲノム改変が実現することが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① E. Kondo, K.-I. Wada, K. Hosokawa, M. Maeda. "Cryopreservation of adhered mammalian cells on a microfluidic

device: toward ready-to-use cell assay platforms”, Biotechnol Bioeng 113: 237-240, 2016, 査読有  
DOI:

② K.-I. Wada, K. Hosokawa, Y. Ito, M. Maeda. “Effects of ROCK inhibitor Y-27632 on cell fusion through a microslit”, Biotechnol Bioeng 112: 2334-2342, 2015, 査読有  
DOI:

③ E. Kondo, K.-I. Wada, K. Hosokawa, M. Maeda. “Microfluidic perfusion cell culture system confined in 35 mm culture dish for standard biological laboratories”, J Biosci Bioeng 118: 356-358, 2014, 査読有  
DOI:

[学会発表] (計 12 件)

① 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫.  
“マイクロ流体デバイスで実現する直接的な細胞質移植技術”. 第 25 回インテリジェント材料シンポジウム. 2016 年 1 月 8 日. TWIns (東京都・新宿区).

② K.-I. Wada, K. Hosokawa, Y. Ito, M. Maeda. “A novel cytoplasm transplantation method by microdevice”. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PacifiChem2015). 2015 Dec.18. Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii, USA).

③ 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫.  
“マイクロチップによる高効率な生きた単一細胞間における直接的な細胞質移植”. 第 38 回日本分子生物学会年会 (第 88 回日本生化学会大会・合同大会). 2015 年 12 月 2 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市).

④ K.-I. Wada. “On-chip direct cytoplasmic transfer between live single cells”. 28th International Microprocess and Nanotechnology Conference (NMC 2015)". 2015 Nov.12. Toyama International Conference Center (Toyama, Japan).

⑤ K.-I. Wada, K. Hosokawa, Y. Ito, M. Maeda. “Prevention of nuclear mixing of fused cells interconnected through a microslit using ROCK inhibitor Y-27632 for direct cytoplasmic transfer between live single cells”. The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS

2015). 2015 Oct.26. Hwabaek International Convention Center (Gyeongju, Korea).

⑥ 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫.  
“Selective Organelle Transfer Between Live Single Cells”. 第 1 回 COINS 国際シンポジウム. 2015 年 2 月 27 日. 東京大学 (東京都・文京区).

⑦ 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫.  
“マイクロデバイスを用いた選択的な細胞質移植の試み”. シンポジウム: 細胞アッセイの現状と将来. 2015 年 1 月 13 日. 東京大学 (東京都・目黒区).

⑧ 和田健一, “マイクロデバイスを用いた単一細胞の操作に基づいた細胞生物学の展開”. 第 11 回医歯工融合セミナー. 2015 年 10 月 8 日. NIMS (茨城県・つくば市).

⑨ 和田健一, “マイクロデバイスを用いた細胞操作—ゲノム操作への応用—”. 第 44 回染色体工学研究センターセミナー. 2015 年 1 月 26 日. 鳥取大学 (鳥取県・米子市).

⑩ 和田健一, “マイクロデバイスで迫る細胞のインテリジェンス”. 第 24 回インテリジェント材料/システムシンポジウム特別セッション「インテリジェント材料の将来を展望する」. 2015 年 1 月 19 日. TWIns (東京都・新宿区).

⑪ 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫.  
“マイクロデバイスによる直接的かつ選択的な細胞質移植/Direct and selective cytoplasm transplantation by microdevice”. 第 24 回日本 MRS 年次大会. 2014 年 12 月 10 日. 開港記念会館 (神奈川県・横浜市).

⑫ 和田健一, 細川和生, 前田瑞夫, 伊藤嘉浩.  
“マイクロデバイスを用いた選択的なオルガネラ移植”. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 26 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 凍結細胞の製造方法

発明者: 細川和生, 近藤栄太郎, 和田健一, 前田瑞夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2014-202940 号

出願年月日:

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 健一 (Wada, Ken-Ichi)

国立研究開発法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号：20525919

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし