

令和元年5月30日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07207

研究課題名(和文)ホモプラズミックなミトコンドリアゲノム改変細胞ライブラリーの創出

研究課題名(英文)Generation of homoplasmic mtDNA modified cell library

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・開拓研究本部・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：単一ミトコンドリア移植が実施できれば、ホモプラズミックなmtDNA改変技術の開発が期待できる。本研究では、この技術に必要なマイクロデバイスを用いた独自のミトコンドリア移植技術によって、単一ミトコンドリア移植を実現するマイクロトンネルを介した細胞融合、融合細胞の解離、および、ミトコンドリアが移植されたレシピエント細胞の選択的回収に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実用的なmtゲノム改変技術は開発されていないため、mtゲノムの機能解析の実施には大きな制約がある。ホモプラズミックなmtゲノム改変の実現と、それに引きつづいてmtゲノム改変細胞ライブラリーを構築することによって、これまで制約の多かったmtゲノム解析を強力に推進する研究プラットフォームの創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Single mitochondrion transfer is a possible approach for homoplasmic mtDNA modification. This study aimed to develop a novel method for single mitochondrion transfer and following mtDNA cloning to achieve homoplasmic mtDNA modification. In this study, I succeeded in performing single mitochondrion transfer between live single cells by achieving cell fusion through a 10 μ m-length microtunnel using a microfluidic device, and in harvest of mitochondria transferred mtDNA-less cell from the microfluidic device. This provides an important basis for development of homoplasmic mtDNA modification method.

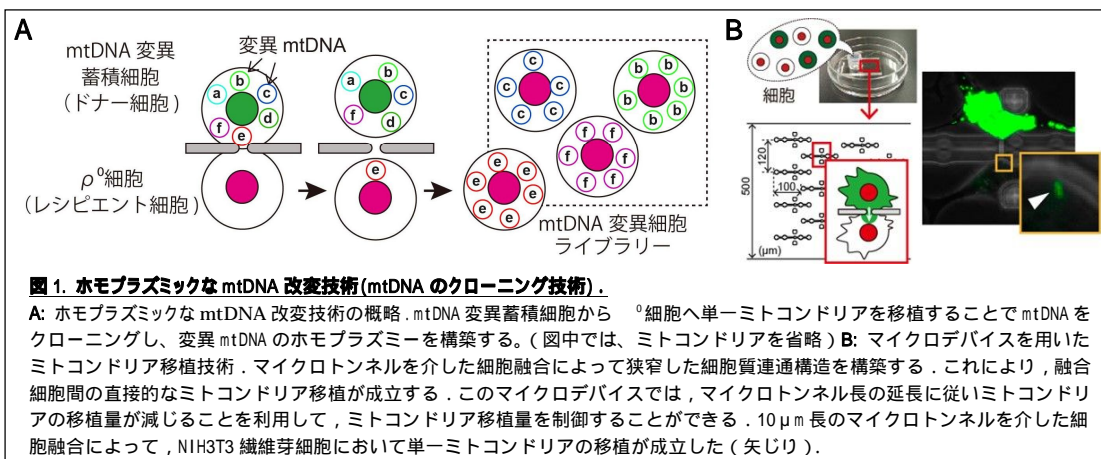
研究分野：細胞生物学

キーワード：mtDNA マイクロデバイス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアゲノム(以下, mtDNA)は有酸素的エネルギー産生に關与する遺伝子群をコードするミトコンドリアに含まれる約 16.5kb の環状 DNA であるが, 現在のところ, その実用的な改変技術が開発されていない。これは, mtDNA が閉鎖した二重の膜(外膜, 内膜)の内側に存在しているために, mtDNA が機能する場合(すなわち, ミトコンドリアのマトリクス)へ外来遺伝子の送達を行うことができないことに加え, 1 細胞あたり数千コピーにも及ぶ極端な多コピー性を呈するため, mtDNA 改変(変異導入)に基づいた機能解析を行うためには全ての mtDNA コピーに同一の変異導入を実現しなければならないが, これを実現する技術が開発されていない為である。このような状況を背景に, 申請者は, 本研究課題に先行して行われた挑戦的萌芽研究(平成 26-27 年度)において, mtDNA クローニングに基づいたホモプラズミックな mtDNA 改変技術の開発に取り組んだ。その概略を図 1 に示した。まず, mtDNA 変異を蓄積した細胞(ドナー細胞)から mtDNA 欠失(ρ^0)細胞(レシピエント細胞)に対して, マイクロデバイスを用いた申請者の独自技術によって単一のミトコンドリアを移植することで mtDNA のクローニングを実現する。移植されたミトコンドリアは細胞内で増殖するとともに, そこに含まれる mtDNA も核ゲノムとは独立して複製されるため, 移植された mtDNA は ρ^0 細胞内で通常的量まで回復することができる。その結果, ホモプラズミックな mtDNA 変異を有した細胞株が樹立される。申請者は, 先の挑戦的萌芽研究にて, ホモプラズミックな mtDNA 改変技術の極めて重要な鍵技術となる融合細胞間の単一ミトコンドリア移植には成功したが, 予定されていた研究期間内に mtDNA 改変を実現することはできなかった。



2. 研究の目的

実用的な mtDNA 改変技術が開発されていないために, mtDNA の機能解析の実施は大きく制限されている。そこで本研究では, 先行して行われた研究課題に引き続いて, ホモプラズミックな mtDNA 改変技術を引き続きの開発を行い, さらに, それを用いたホモプラズミックな変異 mtDNA 細胞ライブラリーを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題に先行して行われた挑戦的萌芽研究(平成 26-27 年度)において, mtDNA クローニングの実施において極めて重要な要素技術となる単一ミトコンドリア移植に成功したものの, mtDNA のクローニング, および, それに伴うホモプラズミックな mtDNA 改変の実現には至らなかった。本研究では, この技術開発において残された課題を解決することで, 申請者の提案するホモプラズミックな mtDNA 改変技術の創出を目指した。具体的には, mtDNA 変異を蓄積した細胞(ドナー細胞)の作製, ミトコンドリア移植の終結(融合細胞の解離), および, ミトコンドリア移植が成立したレシピエント細胞の選択的回収, である。また, 申請者の提案する mtDNA 改変技術は, ランダムに生じた mtDNA 上の変異をクローニングするという原理上の制約より配列を任意に改変することは出来ない反面, 多様な変異 mtDNA 株の樹立が期待される。この特性に基づいて, mtDNA クローニングのスループットを向上させることで多数の mtDNA 変異株を樹立し, 変異 mtDNA 細胞ライブラリーを創出することを計画した。

4. 研究成果

(1) mtDNA 変異を蓄積した細胞(ドナー細胞)の作製

申請者が提案するホモプラズミックな mtDNA 改変技術の実施には, ランダムな mtDNA 変異が蓄積した細胞(ドナー細胞)を作製する必要がある。このようなドナー細胞を, 変異型 DNA polymerase (DNA 複製の正確性が失われている mtDNA polymerase 変異体)[J Biol Chem 275:24818-24828(2000)]の高発現株を樹立することで作製することを試みた。変異型 DNA polymerase 発現ベクターを作製するため, HeLa 細胞から調整した cDNA より DNA polymerase 遺伝子のコード領域を PCR 法によって増幅し, この遺伝子をコードする DNA 断片を得た。これをテンプレートにして, 目的の変異を導入したプライマーを用いた fusion PCR によって変異

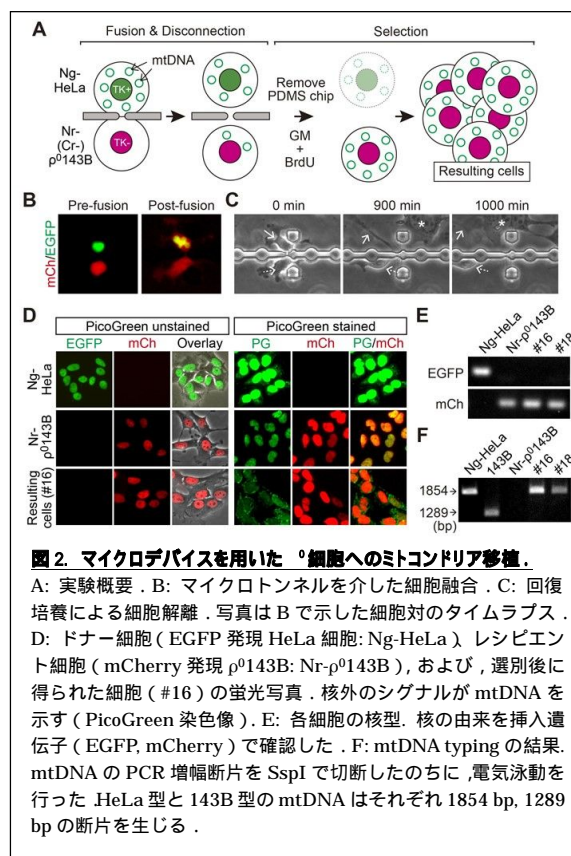
型 DNA polymerase の発現ベクターの作製，および，その安定発現株の樹立に取り組んだが，研究期間内にこの作業を終了することができなかった．ランダムな mtDNA 変異が蓄積した細胞の作製に並行して，ドナー細胞として利用できる病原性 mtDNA 変異をヘテロプラズミックに有する細胞の作製を試みた．具体的には，mtDNA に A3243G 変異を有する MELAS 患者由来の iPS 細胞から得た繊維芽細胞様細胞と ρ^0 143B を融合させたハイブリッド細胞の作製を行った．現在までに，いくつかのクローンが得られており，現在，ドナー細胞として利用できる形質を有しているかを検討中である．

(2) ミトコンドリア移植の終結（融合細胞の解離）

本研究課題に先行して行われた挑戦的萌芽研究（平成 26-27 年度）において，マイクロトンネルを介して融合した細胞対が融合後に生じる細胞移動に伴ってお互いが解離し，単一細胞に復帰することが観察されていたが，その成立条件は不明であった．そこで，マイクロトンネルを介して融合が成立した細胞対のタイムラプス撮影を行い，その後の細胞の挙動を観察した．いくつかの培養条件を検討した結果，HVJ-E によって細胞融合を誘発した後に，通常の増殖地で回復培養を行うことで，16 時間以内に 80%以上の確率で融合細胞が単一細胞に復帰することが明らかとなった．

(3) ミトコンドリア移植が成立したレシピエント細胞の選択的回収

上記の通り，マイクロトンネルを介して融合した細胞対は，その後の回復培養によって高確率で解離する．この知見に基づいて，マイクロデバイスを用いた ρ^0 細胞に対するミトコンドリアの移植，およびミトコンドリア移植が成立した ρ^0 細胞の回収方法を検討した．具体的には，ドナー細胞として HeLa 細胞を，レシピエント細胞としてチミンキナーゼ欠損株（BrdU 耐性株）である 143B 細胞から樹立した ρ^0 細胞を用い，マイクロトンネルを介した細胞融合とそれに引き続く細胞解離を行った．その後，レシピエント細胞の BrdU 耐性，および ρ^0 細胞としての栄養要求性を組み合わせた選別を行った．具体的には，BrdU(+)/ウリジン(-)/ピルビン酸(-)の条件下で選別培養を行った．その結果，ドナー細胞由来の mtDNA，および，レシピエント細胞由来の核のみを持つ細胞が得られた（図 2）．この結果は，マイクロトンネルを介したミトコンドリア移植とそれに引き続く mtDNA のレシピエント細胞での定着，および，mtDNA が定着したレシピエント細胞の選択的回収が成立したことを示している．



(4) 変異 mtDNA 細胞ライブラリーの創出

本研究では，先行して行われた挑戦的萌芽研究（平成 26-27 年度）に引き続いてホモプラズミックな mtDNA 改変技術の開発を行った．これらの研究の成果として，単一ミトコンドリアの移植，融合細胞の解離，および，ミトコンドリアが移植されたレシピエント細胞の選択的回収，という重要な要素技術は構築できたものの，ホモプラズミックな mtDNA 改変技術の開発には至らなかった．そのため，変異 mtDNA 細胞ライブラリーの創出には着手できなかった．ホモプラズミックな mtDNA 改変技術の開発，および，変異 mtDNA 細胞ライブラリーの創出という本研究における最終目標は，残念ながら研究期間内には達成できなかった．しかしながら，ホモプラズミックな mtDNA 改変を実現する上で鍵となるいくつかの重要な要素技術 単一ミトコンドリアの移植，融合細胞の解離，および，ミトコンドリアが移植されたレシピエント細胞の選択的回収 の構築に至った．このような本研究成果の進捗状況より，申請者が提案するホモプラズミックな mtDNA 改変技術の創出に向けた試みは，十分に現実的な目標としてその実現が視野に入ってきたと考えている．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Quantitative control of mitochondria transfer between live single cells using a microfluidic device", *Biology Open* 6: 1960-1965, 2017. (査読有)

[学会発表](計 13件)

(国際学会)

1. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "A novel method for quantitative organelles transfer using a microfluidic device". 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology. Tsukuba, Japan. 2019.Mar.8 (Poster)
2. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Cytoplasmic transfer between live single cells by achieving transient cytoplasmic connection". The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017). Georgia, USA. 2017 Oct.24. (Poster).
3. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Quantitative Control of Mitochondria Transfer Using a Microfluidic Device". The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017). Kyoto, Japan. 2017 Aug.30. (Oral).
4. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Quantitative control of direct cytoplasmic transfer by using a microfluidic device". 3rd COINS International Symposium 2016. Kanagawa, Japan. 2016 Dec.15. (Poster).
5. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Quantitative control of mitochondria transfer between live single-cells by microfluidic device". International Conference on Single Cell Research 2016 Joint Conference of the 10th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & IIRC Conference 2016. Tokyo, Japan. 2016 Nov.16. (Poster).
6. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda. "Controlled organelle transfer between live single cells by using microfluidic device". The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016). Dublin, Ireland. 2016 Oct.10. (Poster).

(国内学会)

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オルガネラ移植の量的制御 (Quantitative Control of Organelles Transfer Using a Microfluidic Device)". 第28回日本MRS年次大会. 福岡県北九州市(北九州国際会議場・西日本総合展示場). 2018年12月19日(口頭).
8. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫. "シングルセル解析を目指したマイクロ流体デバイスを用いたオルガネラ組成の操作 (Manipulation of organelles heterogeneity using a microfluidic device toward single cell analysis)". 第41回日本分子生物学会年会. 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜). 2018年11月29日(口頭(ワークショップ)ポスター).
9. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫. "Quantitative control of mitochondria transfer between live single cells using a microfluidic device toward mtDNA editing". 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会 (Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, Tokyo 2018 Cell and Developmental Biology Meeting). 東京都江戸川区(タワーホール船堀). 2018年6月7日(口頭(ワークショップ)), 6月8日(ポスター).
10. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫. "ホモプラズミックなミトコンドリアゲノム変異導入を目指したミトコンドリアクロニング技術の開発". 理研シンポジウム 理研/iCONM/物材機構 医工学ネットワーク. 神奈川県川崎市(川崎市キングスカイフロント). 2017年12月12日(ポスター).
11. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫. "Cytoplasmic transfer between live single cells using a microfluidic device". 第4回COINSシンポジウム ナノテク 体内病院 スマートライフ ~未来医療はナノマシンが創る~. 神奈川県川崎市(川崎市産業振興会館). 2017年12月8日(ポスター).

12. 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て直接的なミトコンドリア移植の量的制御を実現する ”. 第 26 回インテリジェント材料シンポジウム . 東京都新宿区 (TWIns 会議室 2F). 2017 年 1 月 11 日 (口頭).
13. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫. “ 直接的な細胞質移植を実現するマイクロ流体デバイスを用いた新規単一細胞操作技術 ”. 第 39 回日本分子生物学会年会 . 神奈川県横浜市 (パシフィコ横浜). 2016 年 12 月 1 日 (ポスター).

〔 図書 〕 (計 1 件)

1. K.-I. Wada, K. Hosokawa, Y. Ito, M. Maeda. “ A novel cell fusion method for direct cytoplasmic transfer using a microfluidic device ” ACS Symposium Series Volume 1253, Advances in Bioinspired and Biomedical Materials Volume 2 Chapter 11, pp227-236 (2017)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。