

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21634

研究課題名(和文)ミトコンドリアDNAを可視化・操作する新規ツール開発と生理機能解析

研究課題名(英文)Development of a new probe for visualization and manipulation of mtDNA

研究代表者

稲生 大輔 (Ino, Daisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・特別研究員

研究者番号：40721981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、エネルギー産生に重要な役割を果たす細胞内器官であるが、核内のゲノムDNAとは異なる独自のゲノム(ミトコンドリアDNA: mtDNA)を持つ。mtDNAの生理機能や病気への関連については未だ不明な点が多いが、その原因の一端として生きた細胞の中でmtDNAを解析するための手法が限られている点を挙げることができる。そこで、本研究では、mtDNAを生きた細胞の中で可視化・操作するための新規技術を開発することを目的とした。我々は、生きた細胞の中でDNAの構造を鮮明に可視化するための新規ツールChrocodiLEの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria, organelles which play a central role in cellular energy production, have their own genome named mitochondrial DNA (mtDNA). The physiological and pathophysiological roles of mtDNA remain elusive partly because the techniques to analyze mtDNA function in living cells are still limited. In this research, we aimed to develop a new probe that allows us to visualize mtDNA dynamics and to artificially manipulate mtDNA state in living cells. We succeeded in generating a new fluorescent probe named ChrocodiLE, which enables us to visualize fine DNA structure in living cells.

研究分野：神経科学・薬理学

キーワード：イメージング DNA ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、核内のゲノム DNA とは異なる独自の DNA(ミトコンドリア DNA; mtDNA)を持つ。mtDNA は、ミトコンドリアの電子伝達系に関わる酵素の一部やミトコンドリア内リボソーム RNA をコードしており、ミトコンドリアの正常なエネルギー代謝に必須な役割を果たしている。実際に mtDNA の塩基配列の変異が、エネルギー消費が活発な筋肉や神経系の組織に異常を生ずるミトコンドリア病の大きな一因となっているからその重要性が見て取れる。さらに mtDNA のコピー数の変動が、細胞の老化や Alzheimer 病・自閉症といった病気とも関連することも提唱されてきており、その重要性が明らかになりつつある。しかしながら、mtDNA のコピー数とその生理機能との関連を示す直接的な証拠は未だに乏しい。この原因としては、これまでの mtDNA の解析が固定した組織を用いた組織化学や単離した組織を用いた生化学の手法により主に行なわれており、生きた細胞の中で mtDNA を定量的に解析する手法と mtDNA のコピー数を制御する手法の確立し確立が期待されている。

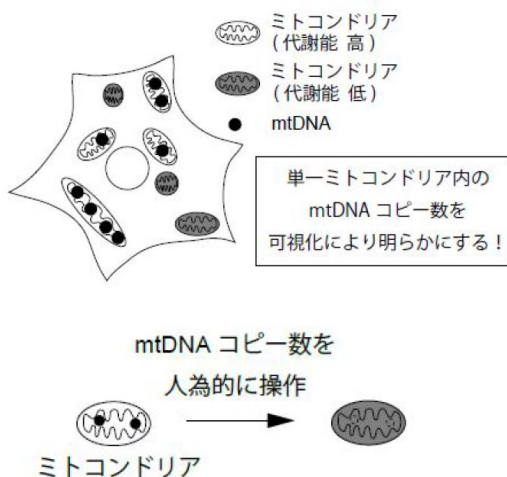


図 1

## 2. 研究の目的

mtDNA は、ミトコンドリア代謝に必須な分子をコードしており、正常な細胞機能に必須な役割を果たす。近年、mtDNA コピー数の変動が、細胞の老化や様々な病態の指標となる可能性が示唆されてきているが、その関連を直接結び付けるための証拠は未だに不十分である。その理由の一端としては、生きた細胞の中で mtDNA の機能解析を行なうための手法が未だ限定されている点を挙げる事が

できる。そこで申請者は、生きた細胞の中で mtDNA を可視化する蛍光プローブと mtDNA コピー数を操作するツールを新規に開発することを最終的に目指すことにした(図1)。特に、本研究では、DNA に高親和性に結合し、その構造を精細に可視化する新規 DNA 標識プローブの開発に注力し、研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1)高親和性 DNA 標識プローブの作成・評価

細菌由来の高親和性 DNA 結合蛋白質をベースに変異を導入し、新規 DNA 標識プローブを作成した。これらのプローブは HeLa 細胞に発現させ、蛍光イメージング法により性能を評価した。

### (2)DNA 構造変化の高分解能ライブイメージング

上記プローブを発現した HeLa 細胞を薬物により刺激し、刺激に応答した DNA の構造変化を観察した。所属研究室が所有する超解像イメージングシステムを用いることで、高分解能での測定を達成した。

### (3)トランスジェニック動物の作成

上記プローブを発現する個体(マウス、線虫)の作成を行なった。

### (4)ミトコンドリア内腔への局在化

上記プローブにミトコンドリア内腔局在化シグナル配列を付加し、mtDNA の標識を試みた。

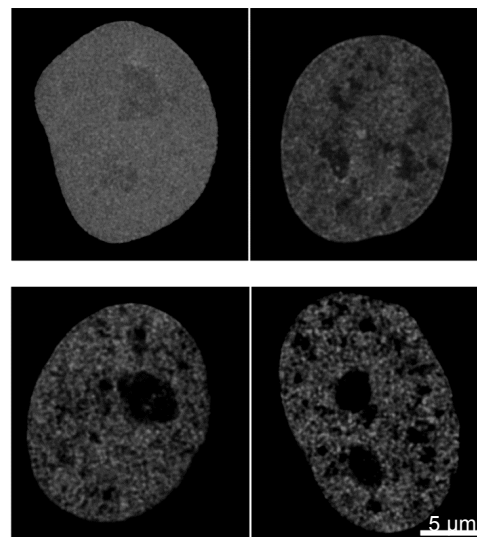


図 2

## 4. 研究成果

### (1)高親和性 DNA 標識プローブの作成・評価

細菌由来の高親和性 DNA 結合蛋白質をベースに様々な変異を導入し、蛍光蛋白質を融合させたプローブを作成した (図 2)。これらの結合解離特性を評価するために、プローブを HeLa 細胞に発現させ、光褪色後蛍光回復法による解析を行なったところ、DNA に対する結合解離特性を持つプローブを作成できていることが判明した。特に、本プローブの中で DNA に対する親和性が高く、細胞内に導入した際にゲノム構造を最も鮮明に可視化できる変異体を、我々は ChrocodiLE と命名した (図 3)。マーカー染色による評価などから、ChrocodiLE は、ほどけた領域に選択的に結合する性質を持っていることが分かった。

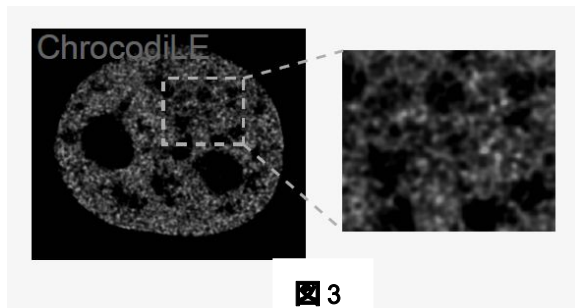


図 3

### (2) DNA 構造変化の高分解能ライブイメージング

ChrocodiLE を安定発現する HeLa 細胞株を作成した。本細胞を薬物により刺激した時の DNA の構造変化を高分解能で捉えることを試みた。まず、ヒスタミン H1 受容体のアゴニストであるヒスタミンによる刺激を行なった。すると、数十分程度の時間スケールで局所的な構造変化が観察された。また、プロテインキナーゼ C の活性化薬である PMA による刺激を行なったところ、数時間に渡る時間スケールで DNA の全体的な構造変化が観察された。上記のように、ChrocodiLE は刺激にตอบสนองした様々な DNA の微細な構造変化を追従できる性能を持つことが分かった。

### (3)トランスジェニック動物の作成

上記の実験で ChrocodiLE を安定発現させた細胞株が取得可能なことから、細胞毒性が低く、ChrocodiLE を発現するトランスジェニック動物を作成することが可能ではないかと考えられた。そこで、トランスジェニック

マウスと線虫の作成を試みた。マウス、線虫ともに ChrocodiLE を発現する個体の取得に成功した。これらの個体は正常に生育し、繁殖も可能であることが判明している。

### (4)ミトコンドリア内腔への局在化

ChrocodiLE にミトコンドリア内腔局在化シグナルを付加し、mtDNA の標識を試みた。しかしながら、ミトコンドリア局在化 ChrocodiLE はミトコンドリア内腔全体に渡って局在し、ミトコンドリア核様体への点状の局在は見られなかった。ChrocodiLE がゲノム DNA に強く結合するのに対し、mtDNA への結合が見られないのは予想に反する驚くべき結果である。今後は ChrocodiLE にさらなる変異を導入し、mtDNA への局在化機構の解明を目指す。特に、ChrocodiLE の mtDNA への局在化の On/Off を制御できるようになれば、mtDNA を生きた細胞の中で操作するツールとして活用できると考えられ、ChrocodiLE の使用用途のさらなる可能性が期待できる。

## 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)Daisuke Ino\* and Masamitsu Iino, Efficient Gene Transfer to Myelinating Schwann Cells in the Rodent Sciatic Nerve using in vivo Electroporation, Methods Mol Biol: Myelin, 2018, in press, \*責任著者

(2)Daisuke Ino and Masamitsu Iino, Schwann cell mitochondria as key regulators in the development and maintenance of peripheral nerve axons, Cell Mol Life Sci, 2017, 827-835, 査読有

(3)Daisuke Ino\* and Masamitsu Iino, In Vivo Gene Transfer to Schwann Cells in the Rodent Sciatic Nerve by Electroporation, J Vis Exp 2016, 54567, 査読有, \*責任著者

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 高尾 恭輔, 稲生 大輔, 岡田 康志,  
脳の加齢に伴うエピゲノム変化の可視化解析,  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会,  
2018 年 3 月 30 日, 東京都武蔵野市, 日本医  
科大学武蔵境校舎

(2) 稲生 大輔, 池田 一穂, 岡田 康志,  
間期核内染色体構造動態の超解像ライブイ  
メージングのためのプローブ開発,  
第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会,  
2017 年 3 月 29 日, 長崎県長崎市, 長崎大学

(3) 稲生 大輔, 池田 一穂, 岡田 康志,  
Development of a new probe for the  
super-resolution live imaging of the  
chromatin structures in interphase  
nucleus,  
第 90 回日本薬理学会年会,  
2017 年 3 月 17 日,  
長崎県長崎市, 長崎ブリックホール

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲生 大輔 (INO, Daisuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命シス  
テム研究センター・特別研究員

研究者番号: 40721981

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし