

令和元年6月25日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07369

研究課題名(和文) 神経細胞におけるmtDNAの動態と役割の解明

研究課題名(英文) Dynamics of mtDNA in neuron

研究代表者

小松原 晃 (Komatsubara, Akira)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：70802792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアゲノムを生細胞内で標識する技術を発展させるため、核ゲノムの特定領域を標識するのに頻用されているCRISPR/Cas9システムを用いてテロメア領域がどの程度染まるかを検証した。テロメア領域を標的とするsgRNAにMS2配列を16個接続したものと、MS2配列を認識するMCPにGFPを接続したMCP-GFP、そしてdCas9を1つの細胞に発現させたところ、核内にGFPが凝集しているのが確認できた。検証のために細胞を固定して、テロメア領域を免疫染色したところMCP-GFPとの共局在が認められた。以上よりdCas9とMS2を用いた手法で核酸の特定領域を生細胞内で染色できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは核ゲノムより転写翻訳されたタンパク質だけでなく、ミトコンドリアゲノム(mtDNA)から発現するタンパク質にも依存して機能を維持しているため、本研究ではmtDNAの挙動を調べるためにCRISPR/Cas9の技術を用いてゲノム特定部位を標識する実験を行った。生細胞内におけるゲノム特定領域の可視化技術は今後ミトコンドリアの機能維持の機構を知る上で重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a technique for labeling mitochondrial genomes in living cells, we examined the extent to which telomeric regions stain using the CRISPR / Cas9 system, which is frequently used to label specific regions of the nuclear genome. When 16 cells of MS2 sequence were connected to sgRNA targeting telomeric region, MCP-GFP in which GFP was connected to MCP which recognizes MS2 sequence, and dCas9 were expressed in one cell, GFP was in the nucleus. It was confirmed that it was aggregated. The cells were fixed for verification and immunostaining of telomeric regions showed co-localization with MCP-GFP. From the above, it is thought that specific regions of nucleic acid can be stained in living cells by the method using dCas9 and MS2.

研究分野：クロマチン構造

キーワード：dCas9 MS2

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

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物において多くのエネルギーを産生する一方で、機能や膜電位が低下すると活性酸素種の発生源となる諸刃の剣である。このため、ミトコンドリアの品質を高く保つことは生物が生きていく上で必須である。

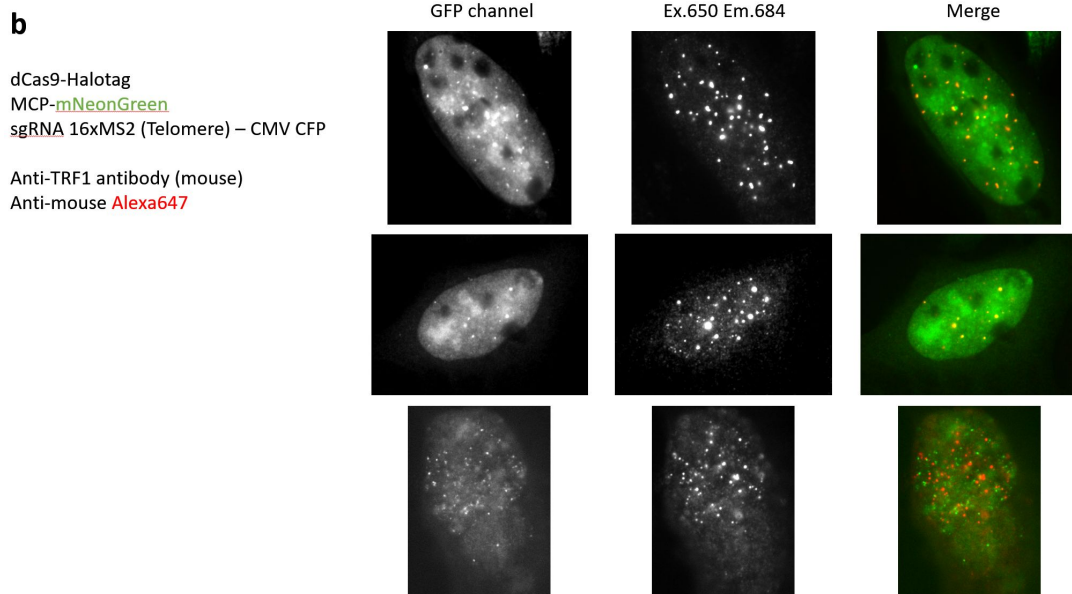
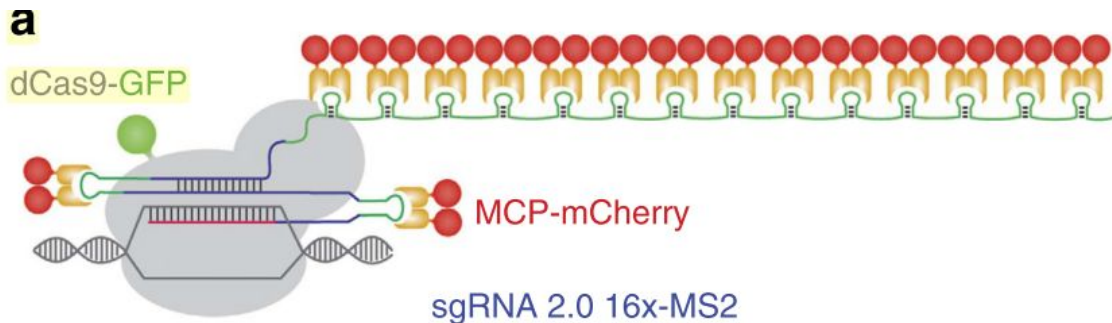
ミトコンドリアが機能するために必要なタンパク質は、核ゲノムだけでなくミトコンドリア自身も持つミトコンドリアゲノムからも転写・翻訳されている。ミトコンドリアゲノムは核ゲノムと異なり、1つの細胞に数千とも言われる数が存在しており、ミトコンドリア毎に含有するミトコンドリアゲノムの数は異なるため発現する呼吸鎖複合体の量も一定ではないはずだが、ミトコンドリアゲノムの動態とミトコンドリアの機能との関係については未だ未知な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では本研究では、ゲノム可視化プローブをミトコンドリアに局在させた上で、所属研究室で開発された ATP バイオセンサーを使用し、生細胞中のミトコンドリアにおける mtDNA の局在と機能のダイレクトな因果関係を調べることで、複雑な動態をもつミトコンドリアがどのようにして機能を維持しているか解明することを目的とする。

3. 研究の方法

mtDNA の染色には TALE を用いる予定であったが、難航したため近年核ゲノムを染色するのに頻用されている Cas9/CRISPR システムを使用した (図 a)。本研究中では dCas9 には Halotag を、ループ構造を形成する MS2 配列を認識する MCP には緑色蛍光タンパク質である mNeonGreen を接続した MCP-mNeonGreen を用いている。sgRNA の標的配列をテロメアになるよう設計した上で、dCas9-Halotag、MCP-mNeonGreen、sgRNA(telomere)-16xMS2 を1つの細胞に発現させたところ、核内で mNeonGreen がいくつもの凝集体を形成している様子を確認できた (図 b)。また、この凝集体は、MCP-mNeonGreen だけではなく、dCas9 も発現している細胞中でより多く観察された。比較検討した結果、Cas9-GFP を用いて染色した場合よりも、MCP-GFP と結合する MS2 配列を繰り返し付与した sgRNA を用いた方がより S/N 比の高い染色画像が得られた。また、過去の報告から、sgRNA のゲノム認識配列以降に変異を加えることで Cas9 と sgRNA の結合率が高くなることが知られていたため、これを試した所より多くのテロメア領域を可視化することができた。



4. 研究成果

ミトコンドリアゲノムを生細胞内で標識する技術を発展させるため、核ゲノムの特定領域を標識するのに頻用されている CRISPR/Cas9 システムを用いてテロメア領域がどの程度染まるかを検証した。テロメア領域を標的とする sgRNA に MS2 配列を 16 個接続したものと、MS2 配列を認識する MCP に mNeonGreen を接続した MCP-mNeonGreen、そして dCas9-HaloTag を 1 つの細胞に発現させたところ、核内に mNeonGreen が凝集しているのが確認できた。検証のために細胞を固定して、テロメア領域に結合する抗 TRF1 抗体を用いて免疫染色したところ MCP-mNeonGreen との共局在が認められた。以上より dCas9 と MS2 を用いた手法で核酸の特定領域を生細胞内で染色できると考えられる。しかしながら、MCP-mNeonGreen 単独で発現させた際にもわずかながら核内に凝集体が認められたことや、MCP-mNeonGreen、dCas9-HaloTag、sgTelomere-16xMS2 がいずれも発現しているにもかかわらず核内の凝集体が非常に少ない細胞や認められない細胞が存在した。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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。