

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22391

研究課題名（和文）内在性DNA損傷修復活性を利用した新規ミトコンドリアゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel mitochondrial genome editing technology using endogenous DNA repair machinery

研究代表者

鈴木 啓一郎（Suzuki, Keiichiro）

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：70433654

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：エネルギー産生のある場であり細胞の生存や恒常性の維持にとって必要不可欠な細胞小器官「ミトコンドリア」内には独自のゲノムDNAが存在し、「ミトコンドリアDNA (mtDNA)」と呼ばれる。mtDNA内に生じた突然変異はミトコンドリアの機能障害を誘発し、老化・がん・疾患など生命活動の維持にとって多大な悪影響をもたらす事が知られているが、mtDNA配列を自由自在に改変する遺伝子操作技術は未だ開発されていない。本研究課題では、核ゲノム編集の責任因子であるDNA修復活性を利用した遺伝子組み込み法を複数検討し、ヒト神経由来細胞でmtDNAの標的遺伝子を置換することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、mtDNAを自由に改変できる全く新しい『ミトコンドリアゲノム編集技術』の創出に成功した。今後、更なる改良を重ねることで、疾患や老化に関連する事が推測される変異mtDNAを持つ細胞株やマウスを作製し、既存の技術では解析不可能であったミトコンドリア疾患機序の解明や新規治療法の開発を視野に入れた研究への展開を期待している。

研究成果の概要（英文）：Unique mitochondrial DNA (mtDNA) exists in the organelle "mitochondria" which is a place for energy production. Specific mutation in mtDNA is known to induce mitochondrial dysfunction such as aging, cancer and mitochondrial diseases. However, a universal genome editing technology for mtDNA has not been developed yet. In this study, we have developed novel mitochondrial genome-editing method which is applicable for neuronal cells.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：ゲノム編集 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

エネルギー産生のある場であるミトコンドリアは細胞の生存や恒常性の維持にとって必要不可欠な細胞小器官であり、ミトコンドリア機能の破綻は様々な疾患の発症へと繋がる。ミトコンドリア内には、ミトコンドリア DNA (mtDNA) と呼ばれる独立した DNA が多コピー存在し、そのすべての遺伝子が細胞のエネルギー源である ATP の合成に関わっている。また、全身性のミトコンドリア機能異常に伴うミトコンドリア病、神経変性疾患、糖尿病、ガン患者や老化した細胞には、突然変異をおこした mtDNA が高頻度で観察されている。このため、ミトコンドリアの関わる生命現象の理解や疾患メカニズム解明・治療には、mtDNA 上への変異導入や正常な配列への置換が非常に有効であると考えられている。しかしながら、mtDNA の遺伝子改変に関する研究はほとんど進んでおらず、最近の著しい分子操作技術の進歩により可能となった核ゲノムに対するゲノム編集技術のような mtDNA 配列を自由に改変できる遺伝子操作技術の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの様々な核ゲノム改変技術の開発から得られた研究代表者の知見を生かし、mtDNA を容易に改変できる全く新しい『ミトコンドリアゲノム編集技術』の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) mtDNA を切断する活性を持つことが報告されている人工ヌクレアーゼである mitoTALEN で部位特異的に mtDNA を切断し、ゲノム編集の責任因子である DNA 修復活性を利用した遺伝子組み込み効率の高い方法を検討した。

(2) ミトコンドリア内に外来ドナー DNA を高効率で導入するため、既報の mitoAAV (Yu et al, PNAS 2012) や DQAsome (Weissig et al, Pharm Res1998) を用いた外来 DNA 導入効率を検討した。

(3) ミトコンドリアのエネルギー産生活性の異なる細胞種を複数比較・検討した。

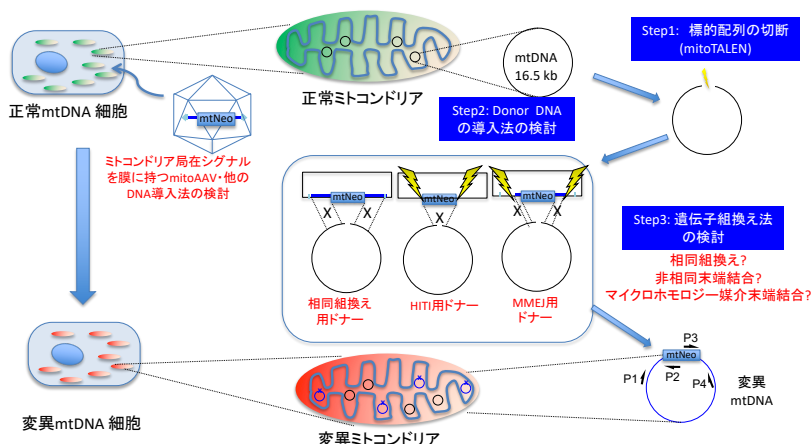


図1 ミトコンドリアゲノム編集技術の開発

ミトコンドリア DNA (mtDNA) ゲノム編集法の確立。Step1: mtDNA の標的配列に DSB を導入するため、ミトコンドリア局在シグナルを付加した TALEN を作製し、細胞内で発現させる。Step2: 標的部位を改変するため、ミトコンドリアの使用コンドンに最適化したネオマイシン耐性遺伝子 (mtNeo) と相同配列を持つ相同組換え用ドナー DNA を作製する。mtDNA の存在するミトコンドリアマトリックス内にこの外来 DNA を運搬するために、ミトコンドリア局在シグナルを人工的に付加した殻タンパク質を持つアデノ随伴ウイルスベクター (mitoAAV) や他のベクターに様々な DNA 修復経路を利用したドナー DNA を乗せる。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集の責任因子である DNA 修復活性 (相同組換え・非相同末端結合・マイクロホモロジー媒介末端結合) を利用した遺伝子組み込み効率の高い方法を比較するため、さまざまな構造を有する複数のターゲティングベクターを作製した (図 1)。

(2) 複数の遺伝子導入方法を検討したが、大きな差異は見られなかった。

(3) 相同組換え方法を用いることで、ヒト培養神経細胞で mtDNA の遺伝子改変に成功した (図 2)。

このように本研究では新規ミトコンドリアゲノム編集技術の開発に成功した。現状では、応用可能な細胞種が限定的であり、ゲノム編集効率も低いことが明らかになってきた。今後は、原理的観点から、ミトコンドリアゲノム編集技術の改良を目指し、汎用性の高い技術とする。

さらに、開発したミトコンドリアゲノム改変技術を用いて、疾患や老化に関わる事が予想される変異をmtDNAに挿入する事で、ミトコンドリア病・老化のモデル細胞の作製を試み、mtDNAの変異が及ぼす細胞の恒常性破綻機構の解明を目指す。

<引用文献>

Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, Ozdemir SS, Chiodo V, Boye SL, Boye SE, Hauswirth WW, Lewin AS, Guy J. Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 May 15;109(20):E1238-47.

Weissig V, Lasch J, Erdos G, Meyer HW, Rowe TC, Hughes J. DQAsomes: a novel potential drug and gene delivery system made from Dequalinium. Pharm Res. 1998 Feb;15(2):334-7.

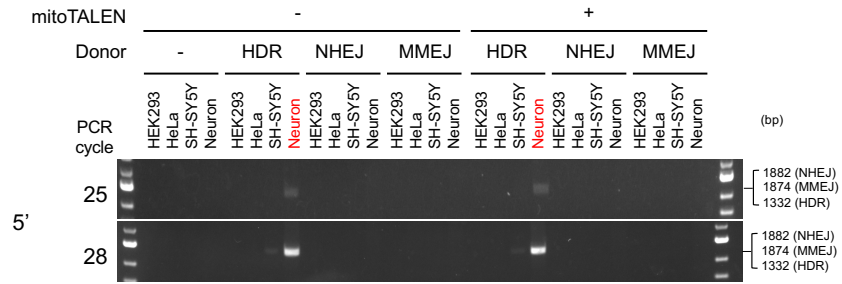


図2 PCR法によるmtDNAへの遺伝子ノックイン

PCR法によるmtDNAへのノックインの測定。神経細胞に対して相同組換え法を用いた場合でのみミトコンドリア相同組換えに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------