

論文要約

Development of genome editing technology of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母ミトコンドリア DNA 編集技術の開発)

生体高分子化学研究室 天井 貴光

ミトコンドリアは植物、動物および酵母など真核生物において存在する細胞小器官であり、ATP 合成やアポトーシスなどの重要な役割を担っている。ミトコンドリアの特徴的な性質は、核ゲノムとは異なる独自のミトコンドリア DNA (mtDNA) を保有することである。

ミトコンドリアの機能不全はヒトでは重篤な病気、例えばミトコンドリア病に関わることが知られている。ミトコンドリア病の病因は mtDNA の塩基変異にあり、疾患治療ではこれらの変異を元に戻す必要があり、mtDNA を編集する技術が必要である。

本研究では、出芽酵母において mtDNA を標的とすることが可能な「mito-CRISPR」システムを開発し、mtDNA の特異的切断を試みた。次に、mtDNA の狙ったところを標的とした「mito-base editor」システムを新規に構築し、二本鎖切断を行うことなく標的の mtDNA の塩基を編集することに成功した。さらに、「mito-base editor」システムを利用することで新規 mtDNA 機能変異の獲得に成功した。

1. mito-CRISPR システムを用いた出芽酵母 mtDNA 欠失株 (ρ^0 株) 作製方法の確立

まず、ゲノム編集用 Cas9 タンパク質の N 末端側に出芽酵母 COX4 (Cytochrome c oxidase subunit 4) タンパク質由来の Mitochondrial targeting sequence (MTS) を付加させることで、本タンパク質 MTS-Cas9 をミトコンドリアへ局在させることができた。さらに、MTS-Cas9 複合タンパク質と gRNA を導入し、標的の mtDNA (*ATP8*) を切断、分解することで mtDNA 欠失を行い、その表現型として ρ^0 株の作製が可能になった。

2. mito-base editor システムを用いた出芽酵母 mtDNA 塩基編集技術の開発

Cas9 タンパク質に MTS、Cytidine base editor (CBE) である *PmCDA1* (cytidine deaminase) を発現するプラスミドを構築し、ミトコンドリアに局在させると、標的 mtDNA の塩基編集を行うことができた。

さらに、「mito-base editor」システムと gRNA ライブラリーを用いることで、mtDNA の新規機能変異の獲得を試みた。その結果、エリスロマイシンに対して耐性を持つ mtDNA 変異を、新規に獲得することに成功した。このことから、「mito-base editor」システムの mtDNA エンジニアリングツールとしての駆動を示唆した。

まとめ

1. Cas9 タンパク質に MTS を付加させることで標的とした mtDNA を切断する「mito-CRISPR」システムを開発し、出芽酵母の mtDNA 欠失株 (ρ^0 株) の作製に成功した。
2. 既存の核ゲノム塩基編集システムに MTS を付加させ、さらに gRNA を導入することで、目的の塩基編集を行うことができる新規の「mito-base editor」システムを構築した。