

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	天井 貴光
論文題目	Development of genome editing technology of mitochondrial DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母ミトコンドリアDNA編集技術の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>ミトコンドリアは植物、動物および酵母など真核生物に存在する細胞小器官であり、酸化リン酸化によるエネルギー (ATP) の合成やカルシウムイオンの保持、アポトーシスなどにおいて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ミトコンドリアDNA (mtDNA) を保有することである。mtDNA は核ゲノムのような線状ではなく、閉じた環状の構造を示し、ヒトでは塩基配列の全長は約16.5 kb、出芽酵母では約85.8 kbであることが報告されている。</p> <p>ミトコンドリアの機能不全はヒトでは重篤な病気に関わり、ミトコンドリアの機能不全により引き起こされる病状の総称である「ミトコンドリア病」を発症することが知られている。ミトコンドリア病の病因の多くは、核ゲノム及び mtDNA の塩基変異にあることが知られているが、特に、mtDNA は核ゲノムとは異なり、ヒストンなどと複合体を形成していないことや ATP 合成経路で発生する活性酸素種 (ROS : reactive oxygen species) が多く存在することにより、塩基変異が核ゲノムと比較して数倍の頻度で引き起こされる。これらの変異を修復するためには、mtDNA を編集する技術が必要となるが、CRISPR/Cas9 システムや CRISPR-base editor システムなどのゲノム編集技術は核ゲノムを標的としており、現在までに mtDNA を標的としたゲノム編集技術として確立しているものは少ない。</p> <p>本研究では、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。</p>			
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			
<p>CRISPR/Cas9 システムをミトコンドリアへ輸送し、機能させることで mtDNA を標的として切断する「mito-CRISPR」システムを構築した。本システムを用いて、mtDNA の二本鎖切断により得られる出芽酵母 mtDNA 欠失株 (ρ^0株) の作製を試みた。まず、CRISPR/Cas9 システムをミトコンドリア内で機能させるために、Cas9タンパク質のN末端側にミトコンドリア輸送配列である MTS を付加させることで、ミトコンドリアへの輸送を試みた。その結果、MTS を付加させた Cas9 (MTS-Cas9) 複合タンパク質は、付加させていない Cas9 タンパク質とは異なりミトコンドリアに局在化することを確認した。さらに、mtDNA にコードされている遺伝子 <i>ATP8</i> を標的として、gRNA と MTS-Cas9 複合タンパク質による、mtDNA の切断を試みた。一般に mtDNA は二本鎖切断後、修復機構が行われないと速やかに分解することが報告されている。そのため、MTS-Cas9 複合タンパク質とgRNA を導入した出芽酵母ミトコンドリア内において qPCR により酵母内 mtDNA 量を測定することで、mtDNA の切断が行われたことを確認した。その結果、MTS-Cas9 複合タンパク質とgRNA を導入した酵母では、mtDNA 量が他と比較して著しく減少し、出芽酵母 mtDNA 欠失株 (ρ^0株) が多数出現していることが示された。</p> <p>これらの結果から、MTS を Cas9 タンパク質に付加することで mtDNA を標的と</p>			

した「mito-CRISPR」システムが稼働することを確かめた。

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

CRISPR-base editor システムでは、二本鎖切断活性を欠失し一本鎖のみを切断できるニッカーゼ Cas9 (nCas9) を用いる。末端部位に「塩基編集酵素」と呼ばれるタンパク質を付加することで、標的とする一塩基が修復可能であり、編集の際に donor DNA を必要としないゲノム編集技術となる。そこで、標的とする mtDNA に対して二本鎖切断を行わずに一塩基編集を行う mtDNA 編集技術である「mito-base editor」システムの開発を試みた。

まず、nCas9 タンパク質のN末端にMTS、C末端に *Sea lamprey* 由来のシチジンデアミナーゼである PmCDA1 を融合させたタンパク質を発現するプラスミドを構築し、ミトコンドリアへの輸送を試みた。その結果、MTSを結合させていない nCas9-PmCDA1 は細胞質に、MTS を結合した nCas9-PmCDA1 ではミトコンドリアに局在することを観察した。さらに mtDNA のG-C塩基対が多く存在する配列を標的とした gRNA を発現するプラスミドを作製し、そのプラスミドを同時に発芽酵母に導入することで目的の mtDNA 塩基編集を試みたところ、gRNA が標的とした mtDNA の一塩基がCからTへ編集されていることを観察した。これにより、標的 mtDNA を一塩基編集する「mito-base editor」システムの稼働を確かめた。

さらに、gRNA ライブラリーを作製し、mtDNA 新規機能変異を獲得することで、「mito-base editor」システムが mtDNA エンジニアリングツールとして働くことを実証した。mtDNA にコードされている 21S rRNA を標的として、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシンへの新規耐性変異の獲得を試みた。まず、21S rRNA 領域のうち、gRNA 作製可能な領域内にシチジン塩基を持つ部位を探索し57種類の gRNA を作製した。ライブラリーが導入された形質転換体に「mito-base editor」システムを導入してエリスロマイシン耐性となる新規 mtDNA 変異の探索を試みた。その結果、複数のコロニーを獲得することができた。獲得したコロニーの 21S rRNA 配列を解析した結果、1950番目のグアニンがアデニンに変換されていることが見い出された。この変異は、出芽酵母において、これまでの研究で発見されていないエリスロマイシンに対する耐性変異であることから、「mito-base editor」システムによる新規 mtDNA 機能変異の獲得を示唆した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ヒトミトコンドリア病は、mtDNA の塩基変異が主な原因であり、現在でも治療が困難な病気である。本研究では、核ゲノム編集技術として用いられてる CRISPR/Cas9 システムを酵母ミトコンドリア内で機能させることで mtDNA を標的とした二本鎖切断に成功した。また、CRISPR-base editor システムをミトコンドリア内で機能させることで、mtDNA 内の標的配列を狙った塩基編集技術を開発した。成果として評価する点は以下の2点である。

1. Cas9 タンパク質のN末端にミトコンドリア輸送配列である MTS を付加させることでミトコンドリアへの輸送に成功した。さらに、mtDNA を標的とする gRNA とともに出芽酵母内へ導入することで、mtDNA 特異的に二本鎖切断を生じさせることで mtDNA 欠失株 (ρ^0 株) の作製に成功した。これらの結果から、MTS-Cas9 複合タンパク質と mtDNA を標的とした gRNAを用いることで、mtDNA 特異的に二本鎖切断を引き起こすことができる技術が開発できたことが示された。

2. 二本鎖切断活性を欠失し一本鎖のみを切断できるニッカーゼ Cas9 (nCAs9) に塩基編集酵素である PmCDA1 タンパク質と MTS を付加させることで、nCAs9-PmCDA1 複合タンパク質をミトコンドリアへ輸送することに成功した。さらに、mtDNA を標的とする gRNA とともに出芽酵母内に導入することで、標的とした mtDNA の一塩基を編集することに成功した。また、mtDNA 内にコードされている 21S rRNA 領域を認識する gRNA ライブラリーを利用することで新規の mtDNA 機能変異の獲得に成功した。

以上のように、本論文は mtDNA を標的とする塩基編集技術の開発に成功した。これらの技術は、今まで行うことが困難であったミトコンドリア病に関わる塩基変異の修復をすることによる治療などの医療応用への貢献が期待できる。さらに、mtDNA を標的とした遺伝子導入、mtDNA 欠失が原因のミトコンドリア病モデル生物の作製、gRNA ライブラリーによる新規機能変異の探索を行うためのエンジニアリングツールとして用いることができると期待できる。これらの結果は、生体高分子化学、遺伝子工学、合成生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和3年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)