

2021 年度  
創発的研究支援事業 年次報告書

研究担当者	荒磯 裕平
研究機関名	金沢大学
所属部署名	医薬保健研究域 保健学系
役職名	助教
研究課題名	ミトコンドリア動態に着目した初期発生の研究
研究実施期間	2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日

### 研究成果の概要

卵・精子成熟異常や受精卵の不育とミトコンドリア機能・動態の関連を検討するため、ゲノム編集技術を用いて病態モデルゼブラフィッシュの作成を試みた。遺伝子変異導入の高効率化のため、任意の遺伝子に対して CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子切断箇所を 4 か所選定し、4 種類のガイド RNA を作成した。これらを一細胞期胚へ 4 つ同時に注入することにより、標的遺伝子の indel 導入効率を大幅に上昇させることに成功し、今後の遺伝子欠損ライブラリー作成の基礎を構築することができた。本実験系を用いて、ミトコンドリア関連遺伝子のノックアウト作成を加速・拡大させることが可能となり、ミトコンドリア生合成に関わる遺伝子群、ミトコンドリア内でステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群を中心に 10 遺伝子を超えるノックアウト系統作成を軌道に乗せることができた。F0 において体軸形成に影響の出ている系統も認められ、ミトコンドリアのエネルギー産生能低下による影響を検討している。

また、変異体系統のミトコンドリア動態解析の予備実験として、野生型系統を用いてミトコンドリアのイメージングを試みた。ミトコンドリア移行シグナルを付加した蛍光蛋白質をコードした mRNA を一細胞期胚へ注入し、胚から単離したミトコンドリア画分に対してウエスタンブロットを行うことで、蛍光蛋白質がミトコンドリアに輸送されたことを確認した。さらに単離細胞を蛍光顕微鏡観察することでミトコンドリア様の蛍光シグナルを観察することができた。上記の変異体系統が確立され次第、本実験系を適用しミトコンドリア動態解析へ進む。

1 年目では、研究に必要な基本的な実験系を一通り立ち上げ、2 年目以降にミトコンドリア機能と初期発生の関連を検証するための基盤が構築された。