

**【目的】**ミトコンドリア病は最も頻度の高い先天代謝疾患として知られ、厚労省の定める指定難病となっている。本研究では、ミトコンドリア病のゲノム解析から同定されたミトコンドリア遺伝子変異の有害性検証するため、ミトコンドリアゲノムを対象としたゲノム編集ツール mitoTALEN の技術構築を目的とする。

**【方法】**従来の TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) にミトコンドリア局在シグナルを付加したベクターを構築し、ミトコンドリア局在型の mitoTALEN を作製した。さらに Left TALEN と Right TALEN の細胞内導入が確認できるように、EGFP と mCherry の蛍光マーカーをそれぞれに導入した。先行研究で同定したミトコンドリア遺伝子変異をターゲットとする mitoTALEN を構築した。株化細胞 HEK293 あるいはミトコンドリア遺伝子変異を有する患者線維芽細胞に対して、リポフェクションにより mitoTALEN を導入した。

**【結果】**まず mitoTALEN を処理した HEK293 細胞で、ミトコンドリアを分画し、mitoTALEN の細胞内局在を確認した。TALEN の十分なミトコンドリア局在を確認することができた。また、免疫染色でも mitoTALEN のミトコンドリア局在を確認することができた。mitoTALEN を処理した HEK293 細胞では十分な蛍光タンパク質の発現を確認することができたが、患者線維芽細胞での導入効率は高くなかった。そこで、セルソーターを用いて、EGFP と mCherry のダブルポジティブ細胞を選択した。この細胞でのミトコンドリア変異率の変動を定量し、7%程度の変異減少を観察した。

mitoTALEN によるミトコンドリアゲノム編集

