

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03658

研究課題名（和文）ミトコンドリア機能制御の基盤となるミトコンドリアー核ネットワークの包括的解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis to uncover molecular network between mitochondria and nucleus underlying mitochondrial homeostasis

研究代表者

星野 温（Hoshino, Atsushi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50737210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの分解と整合性の協調的制御機構の解明として、アンバイアスな方法としてCRISPRライブラリースクリーニング、ATACシーケンス、シングルセル解析を行い、これらの結果を統合解析することで新たにRREB1-ESR1シグナル経路が新規ミトコンドリア生成制御因子としてミトコンドリアの数的な恒常性維持に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞のエネルギー産生を中心であるとともに酸化ストレスや慢性炎症、細胞死の制御に関連しておりその機能は細胞の恒常性維持に非常に重要です。不良ミトコンドリアはオートファジーによる分解され、新たなミトコンドリアが合成されますが、それらがどのようにして協調的に制御されているかはよく分かっていません。本研究では多面的オミクス解析でRREB1という転写因子がミトコンドリア分解後の生合成に重要であることが分かりました。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the coordinated mechanism of mitochondrial degradation and biogenesis, CRISPR library screening, ATAC sequence, and single-cell analysis were performed as unbiased methods, and these results were analyzed with integrative approach and revealed that a novel RREB1-ESR1 signaling pathway is important for maintaining the numerical homeostasis of mitochondria.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア生合成 マイトファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアはエネルギー産生、カルシウムやレドックス代謝、細胞死制御により細胞の恒常性維持に関与している事がよく知られているが、近年このミトコンドリアの質的、量的変化が多様な細胞特性の制御に関与していることが明らかになっている。がんの分野では一部の癌腫においてミトコンドリア機能が増殖や転移能力に影響し、免疫の分野では単球マクロファージの極性分化に、また T 細胞、B 細胞の活性化や運命決定に関与し、代謝の分野ではベージュ細胞の活性化制御にミトコンドリアの生合成やオートファジーによるミトコンドリア分解 (マイトファジー) が関与していることが報告されている。循環器領域でも心不全の次世代治療として心筋の分化誘導や心筋再生が大きなテーマとなっているが、ES 細胞や iPS 細胞からの心筋分化においてはミトコンドリアをいかに成熟化させるかが重要な課題であり、また心筋再生では細胞周期を回すのにミトコンドリア機能を抑制させることが肝要である。また古くから心不全心筋では心不全の進行に伴いミトコンドリアの機能異常を認めることがよく知られている。障害ミトコンドリアはエネルギー産生が低下するだけでなく、酸化ストレスや心筋細胞死、また近年ではミトコンドリア DNA が放出され、それに伴う自然免疫反応から慢性炎症が誘導されることがわかっている。通常、不良ミトコンドリアはマイトファジーにより分解処理されるが、心不全心筋ではマイトファジーが抑制されるために障害ミトコンドリアが蓄積していることを申請者もこれまでに報告している。以上より心不全の病態解明ならびに次世代心不全治療の確立にミトコンドリアの分解、生合成、成熟化の協調的制御における分子基盤の解明が重要となっている。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは非常に動的な細胞小器官で分裂と融合を繰り返し、機能不全のミトコンドリアはマイトファジーで分解処理される。また同時に PGC-1 α を中心とした制御系でミトコンドリア生合成が行われ、分解とのバランスが保たれる事で恒常性が維持される。実際に培養細胞系でマイトファジーを強制的に誘導すると一過性にミトコンドリア量の低下を認めるが、ミトコンドリア生合成が亢進しミトコンドリア量としては数日で元のレベルまで回復する。また PGC-1 α はミトコンドリアの成熟、呼吸鎖の発達にも関与しており、ミトコンドリア-核間のクロストークにてミトコンドリアの分解と生合成、さらに成熟化が協調して制御されることでミトコンドリア機能が維持されている (図1)。

これまでに細胞の恒常性維持、細胞特性決定に重要なミトコンドリア制御の基盤となるミトコンドリア-核ネットワークの解明は盛んに行われてきたが、実験モデルの限界もあり十分に解明されずミトコンドリア生物学に残された大きな課題の一つとなっている。本研究ではこの課題に対して、CRISPR ライブラリーを用いて、マイトファジー誘導後のミトコンドリア生合成における上流因子の網羅的解析を行う。さらに従来は心不全におけるミトコンドリア分解・生合成が抑制された系のみで検討が行われていたが、それに加え申請者が独自に開発した遺伝学的手法によるマイトファジー誘導マウスを用いて、ミトコンドリア分解・生合成が亢進した、すなわちミトコンドリアのターンオーバーが亢進したモデルにおいて、トランスクリプトームとエピゲノムの解析を行い、また研究分担者が独自に開発したシングルセル解析を加えた *in vivo*, *in vitro* 多階層解析により、ミトコンドリア-核ネットワークの全貌を明らかにし次世代心不全治療の技術開発につなげる。

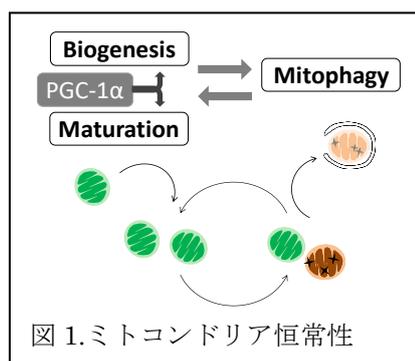


図1.ミトコンドリア恒常性

3. 研究の方法

研究の柱は (1) CRISPR ライブラリーによる順遺伝学的スクリーニング、(2) マイトファジー誘導におけるトランスクリプトームとエピゲノム解析、(3) シングルセル解析によるマイトファジーの抗心不全効果の評価、の3点でミトコンドリア-核ネットワークを解明し、(4) マウス圧負荷心不全モデルでこの制御機構に介入することがミトコンドリアの機能改善効果、心不全抑制効果を有することを証明する。

(1) CRISPR ライブラリースクリーニングによるミトコンドリア生合成分子基盤の同定
CRISPR ライブラリーは Addgene で提供されているレンチウイルスのプールライブラリーを使用する。このウイルスをラージスケールでマウス C2C12 細胞に感染させ、異なる遺伝子がノックアウトされたライブラリー細胞を用意する。マイトファジー誘導後のミトコンドリア生合成は PGC-1 α ノックアウト細胞では部分的に障害されるため①PGC-1 α 非依存的、②PGC-1 α 依存的、両経路があると考えている。

① PGC-1 α 非依存的経路のスクリーニング

ライブラリー細胞に Parkin 過剰発現とミトコンドリア脱共益剤 CCCP または呼吸鎖阻害剤カクテル (Oligomycin + Antimycin A) にてマイトファジーを誘導する。3日後に MitoTracker でミ

トコンドリアを定量評価し、ソーティングにてミトコンドリアが多い群(High)と少ない群(Low)の細胞を回収。ディープシーケンスで gRNA の集積を解析する。この場合、Low がミトコンドリア合成が低下した細胞集団となる。(図 3)。

② PGC-1a 依存的経路のスクリーニング

CRISPR 技術で PGC-1a-2A-mCherry ノックイン細胞を作製し、この endogenous PGC-1a レポーター細胞を用いてスクリーニングを行う。①のスクリーニングと同様にマイトファジー誘導後 3 日目に mCherry のシグナルの高い群と低い群の細胞を回収し解析を行う。

これらのスクリーニングはマイトファジーの誘導が亢進、低下しているとその影響を受ける。申請者はこれまでに CRISPR ライブラリーを用いて PINK1-Parkin によるマイトファジーの制御機構の網羅的解析を MitoTracker を含めた多面的なスクリーニングにて行い多数の新たな因子を同定した(論文投稿中)。そのため①、②のスクリーニングの結果から解析済みのマイトファジー制御機構スクリーニングで同定されたマイトファジーの制御因子を除く事で真にミトコンドリア合成の制御因子を抽出することが可能となる。

(2) マイトファジー誘導細胞におけるクロマチン・トランスクリプトーム解析

マイトファジー誘導細胞において RNA-seq によるトランスクリプトーム解析と、ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の解析を行い、これらの統合解析にてマイトファジー後のミトコンドリア合成遺伝子発現調節機構を網羅的に解析する。

(3) シングルセル解析によるマイトファジー解析

マイトファジー誘導後のミトコンドリア合成に関して、各タイムポイントの細胞をシングルセル解析することでミトコンドリア分解から誘導される転写ネットワークを明らかにする。

(4) マウス圧負荷心不全モデルによる評価

(1) から (3) の多階層網羅的解析により明らかにされるミトコンドリア核ネットワークへの介入がミトコンドリアターンオーバーの矯正ならびに心不全進行抑制効果を有することを確認する。具体的にはマウス横行大動脈狭窄による圧負荷心不全モデルにて、化合物や CRISPR/Cas によるゲノム編集、エピゲノム編集によりミトコンドリア合成の主要因子である PGC-1a やミトコンドリアタンパクの遺伝子発現の変化並びに酸素消費量等によるミトコンドリア機能評価ならびに心エコーでの心機能の評価を行う。

4. 研究成果

(1) CRISPR ライブラリースクリーニングによるミトコンドリア合成分子基盤の同定

マイトファジー後のミトコンドリア合成を指標に行った CRISPR ライブラリースクリーニングから合成に関与する因子を同定したところ、TNF-NFκB シグナル経路と TP53, RREB1 などの転写因子の関与が明らかとなった。BIRC2, BRCK1, TRAF3, RNF31 が TNF-NFκB シグナル経路の構成因子で、これらは p53 との関連が知られている。また p53 は心不全進行における重要な制御因子であることが報告され、またミトコンドリア合成の主要制御因子である PGC-1a と関連することでミトコンドリア合成に関与することが知られている。

(2) マイトファジー誘導細胞におけるクロマチン・トランスクリプトーム解析

マイトファジー後のミトコンドリア合成亢進状態の細胞でアクセシビリティが亢進している gene set として、”regulation of transcription”, ”cell differentiation”, ”regulation of ion transmembrane transport” があり、低下しているものとしては”DNA methylation”, ”DNA replication”, ”positive regulation of gene expression”, ”nucleosome assembly” が挙げられた。モチーフ解析では SP1, SP2, Sp3, Sp8, KLF5, KLF16, RREB1, ZNF 740 のモチーフがミトコンドリア合成においてよりオープンになっていることが分かった。この結果を CRISPR ライブラリースクリーニングの結果と照らし合わせると RREB1 がミトコンドリア合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

RREB1 の下流を見るために、RREB1 のモチーフ結合ピークと RNA シークエンスによる遺伝子発現データを統合解析したところ、50 個ほどの遺伝子がヒットした。これらの中でエストロゲン受容体 (Esr1) がミトコンドリア合成に関与しており、RREB1-ESR1 経路がミトコンドリア合成に重要であることが示唆された。

(3) シングルセル解析によるマイトファジー解析

シングルセル解析は CRISPR ライブラリシークエンスでミトコンドリア合成に関連する遺伝子 10 個をノックアウトした細胞集団で perturb シークエンスを行った。マイトファジー誘導前、

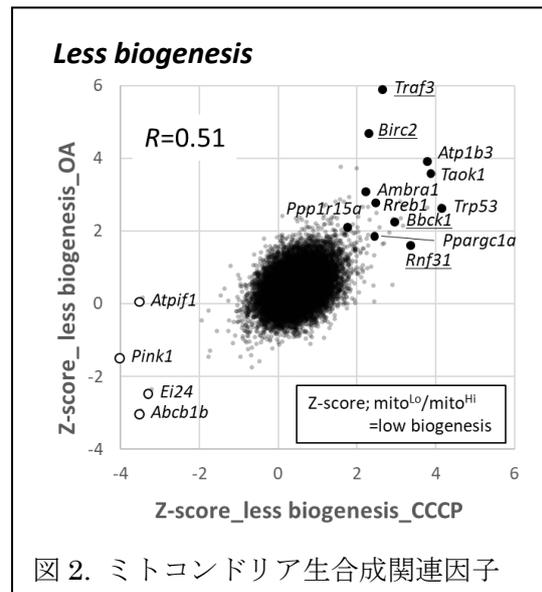


図 2. ミトコンドリア合成関連因子

1, 2, 3日後の4タイムポイントでサンプルを回収し、合計16616個細胞で解析を行った。クラスターとしては7つの集団を認め、タイムポイントよりマイトファジーの後、ミトコンドリア合成でミトコンドリア量が正常化する細胞集団と、合成に失敗して細胞老化に陥る2群に分かれることが判明した。シュードタイム解析で分岐点の決定因子を探ろうとしたがこちらはうまく機能しなかった。perturb シークエンス解析としては mixcape 解析でエスケープ細胞を除いた細胞での解析から RREB1 と p53 が強くミトコンドリア合成に関与していることが確認された。この実験はマウスの金が細胞を用いて行ったが RREB1 は細胞周期を正に、p53 は負に制御し、細胞周期とミトコンドリア合成の関連も示唆される結果であった。

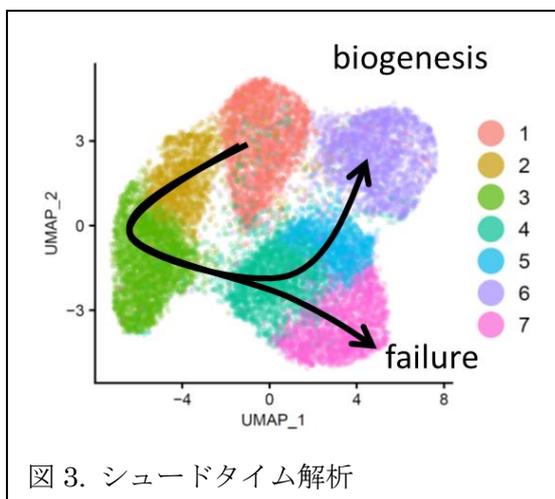


図 3. シュードタイム解析

(4) マウス圧負荷心不全モデルによる評価

ミトコンドリア分解と関連したミトコンドリア合成に RREB1 が重要と考えられたため RREB1 の動物モデルでの評価として、iGONAD 法を用いて RREB1-fllox マウスを作製し、Myh6-MerCreMer マウスと掛け合わせて、心筋特異的 RREB1 ノックアウトマウスで表現型を確認していく準備段階にある。この系とは別にミトコンドリア移行シグナルにオートファゴソームをリクルートする LIR 配列を結合したマイトファジーアダプタータンパク質遺伝子のトランスジェニックマウスを作製している。この薬剤誘導マイトファジーマウスと RREB1 ノックアウトマウスを掛け合わせることでミトコンドリア合成不全が表現型としてどのように影響するかを検討する準備も進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshino Atsushi, Wang Wei-jia, Wada Shogo, McDermott-Roe Chris, Evans Chantell S., Gosis Bridget, Morley Michael P., Rathi Komal S., Li Jian, Li Kristina, Yang Steven, McManus Meagan J., Bowman Caitlyn, Potluri Prasanth, Levin Michael, Damrauer Scott, Wallace Douglas C., Holzbaaur Erika L. F., Arany Zoltan	4. 巻 575
2. 論文標題 The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 375-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1667-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野温
2. 発表標題 Mitochondrial biogenesis coupled with mitophagy-mediated mitochondrial degradation
3. 学会等名 第37回国際心臓研究学会日本部会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野温
2. 発表標題 多層性CRISPRスクリーニングによるミトファジー制御因子の網羅的同定
3. 学会等名 高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野温
2. 発表標題 オートファジーによるミトコンドリア品質管理と創薬応用
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小室一成	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 210
3. 書名 Cutting Edge of Molecular Cardiology 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学	

1. 著者名 石原直忠ほか82名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 458
3. 書名 ミトコンドリアダイナミクス	

〔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
研究 分 担 者	野村 征太郎 (Nomura Seitaro) (10722118)	東京大学・医学部附属病院・特任助教 (12601)	

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
---------	---------