

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16062

研究課題名（和文）CRISPRスクリーニングによるミトファジー制御機構の解明と心不全治療への応用

研究課題名（英文）CRISPR screening for mitophagy regulation and its Application to therapy of heart failure

研究代表者

樋口 雄亮（Higuchi, Yusuke）

京都府立医科大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50883089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：CRISPRスクリーニングからは低酸素下でのミトファジーを正に制御する遺伝子の一つにSlc25a11が上位に挙がった。各遺伝子のノックアウトによるスクリーニング結果の検証実験からも強い制御を認めた。野生型のSlc25a11に加え、ミトファジー認識配列であるLIRモチーフに変異を加えた変異Slc25a11を過剰発現させた時のミトファジーの解析を行った。過剰発現によりミトファジーは促進された。LIRモチーフの変異を加えた場合、ミトファジーは野生型と比較して部分的に抑制することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは心筋細胞に多く存在し、エネルギー産生の中心であるとともに細胞の恒常性維持に非常に重要です。心不全が進行する原因の一つに心筋に血液が十分に供給されない状態が関与しています。心不全における心筋のミトコンドリアには形態的にも機能的にも異常が起こっていることが知られています。異常なミトコンドリアはミトファジーで分解され、新たなミトコンドリアを合成します。そこで本研究では低酸素環境下でのミトコンドリア制御機構を細胞を用いたスクリーニング実験で調べたところ、Slc25a11という遺伝子が重要であることがわかりました。

研究成果の概要（英文）：The CRISPR screen with hypoxia showed that Slc25a11 was one of the top genes that positively regulates mitophagy. Validation experiments of the screening results using knockout cells for each gene showed that Slc25a11 was a strong suppressor of mitophagy, similar to the screening results. We analyzed mitophagy when overexpression of wild-type Slc25a11 and mutant Slc25a11 with a mutation in the LIR motif, a mitophagy recognition sequence, was performed. Overexpression of slc25a11 promoted mitophagy. However, overexpression of the LIR motif mutation resulted in partial suppression of mitophagy compared to the wild type.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ミトファジー ミトコンドリア CRISPRスクリーニング 低酸素環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において心不全患者とその予防や治療に伴う医療費の増加は世界中で大きな問題となっている。心不全の死亡率は診断から5年で50%であり、悪性腫瘍の死亡率と同等かそれ以上とも報告されている。このことは新たなメカニズムによる治療の必要性を表している。心不全に至る原因疾患として虚血性心疾患・高血圧症・弁膜症などが挙げられるが、これらは心臓における心筋虚血が大きく関与していることが明らかとなっている。心筋細胞はその筋収縮運動に多くのエネルギーを必要とする。ミトコンドリアは細胞におけるエネルギー産生の中心であり、酸化ストレスや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重要である。実際に心不全患者においては心筋細胞のミトコンドリアに形態的・機能的異常が生じており、心不全の進行に伴って起こる心筋細胞死・肥大・線維化といった心筋リモデリングにおいてもミトコンドリア機能障害が主な原因となっている。機能低下をきたしたミトコンドリアはマイトファジーで分解され、新たなミトコンドリアが合成されることは知られている。

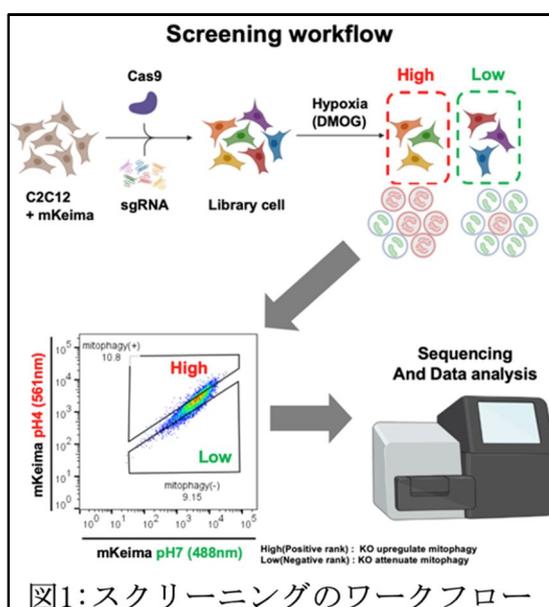
以上から、心不全においてミトコンドリア品質管理機構であるマイトファジーの破綻に伴う異常ミトコンドリアの蓄積が存在することから、マイトファジーの活性化は異常ミトコンドリアを除去するために有望な治療標的として考えられた。マイトファジー誘導経路としてはこれまでにPINK1-Parkinが関与する経路が分子メカニズムも含め詳細に知られているが、低酸素状態におけるマイトファジーの誘導においてはFUNDC1が代表遺伝子としては知られているものの、その他に主要な原因遺伝子や分子メカニズムについては十分に理解されていない。

2. 研究の目的

生理的条件を反映する低酸素下でのミトコンドリアの品質管理機構であるマイトファジーの制御機構については十分に解明されていない。そこで、本研究ではCRISPRスクリーニングライブラリを用いた網羅的手法により低酸素下でのマイトファジー制御遺伝子を探索し、その遺伝子を中心としたマイトファジー制御メカニズムを解明することで新たな心不全治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

主な研究方法として、(1)CRISPRスクリーニングライブラリを用いたマイトファジー制御因子の同定と検証実験(2)スクリーニングでのヒット遺伝子を中心としたタンパクタンパク相互作用を用いたマイトファジー制御機構の解明、(3)心不全モデルマウスでの機能評価が挙げられる。(1)に関してはマイトファジーをフローサイトメトリーで検出できるようにするため、C2C12細胞にmito-Keimaを導入した細胞を作成する。続けて、CRISPRライブラリ(レンチウイルスのプールライブラリ)を導入することで約20000種類の異なる遺伝子がノックアウトされたライブラリ細胞を用意する。低酸素刺激としてHIFインヒビターであるDMOG刺激を行



い、ミトファジーが誘導された群 (High)と誘導されなかった群(Low)の細胞をソーティングで回収し、ディープシーケンスで gRNA の集積を解析する。gRNA の集積が上位だった遺伝子をそれぞれロックアウトして実際に検証実験を行う(図 1)。(2) タンパク相互作用の解析方法として、ターゲット遺伝子に対して BioID (近位依存性ピオチン標識法)を行うことで相互作用するタンパク質の同定・細胞内局在の解析を行う。非刺激時と低酸素刺激時での比較を行うことで刺激による相互作用の変化を評価する。

(3) 圧負荷心不全モデルである TAC モデルを用いることで心不全の経時的変化における役割について評価する。生存率、心エコーによる収縮能・拡張能、組織染色などに加えて、RNA sequence を行うことで *In Vivo* の心臓に与える影響を評価する。

4. 研究成果

(1)CRISPR スクリーニングの結果は、遺伝子をロックアウトすることでミトファジーが亢進するランキングにはミトコンドリア機能障害に関与する遺伝子が多く含まれた。逆にロックアウトすることでミトファジー誘導を抑制する遺伝子ランキングには上位 10 遺伝子に Hif1a, Hif1b などを含む結果を認めた。もっともミトファジーが誘導される遺伝子として Slc25a11()をランキングのトップに認めた。上位 10 遺伝子のロックアウト細胞を作成した検証実験でも多くの遺伝子でコントロールと比較してミトファジーは抑制されたが、その中でも Slc25a11 が一番顕著であったため、この遺伝子に注目して解析を行った(図 2)。

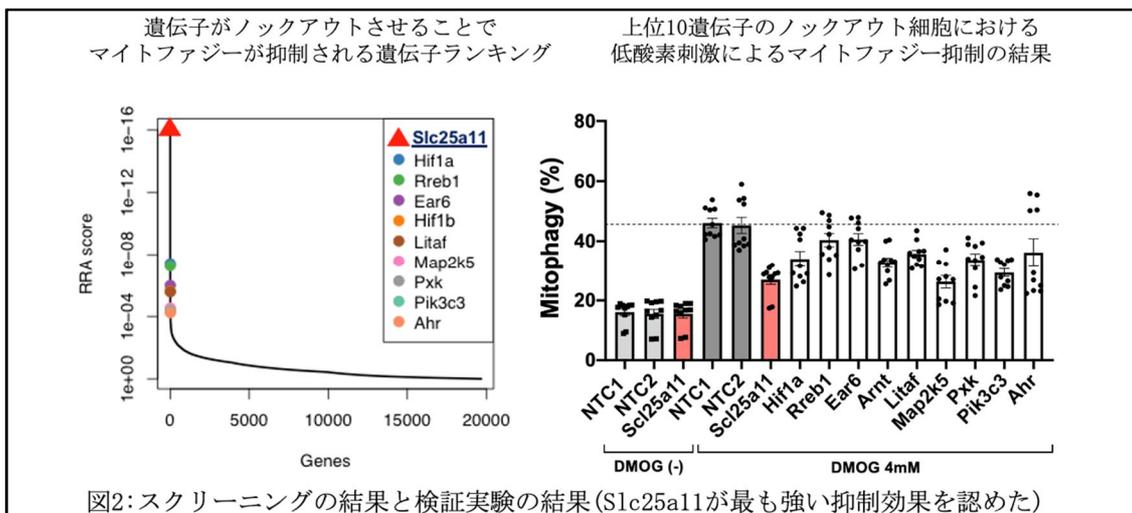


図2:スクリーニングの結果と検証実験の結果(Slc25a11が最も強い抑制効果を認めた)

そこで Slc25a11 のアミノ酸配列や構造を In Silico で評価したところ、Slc25a11 の主な機能としてはミトコンドリアトランスポータとしての機能であること、加えてアミノ酸配列 295-300 番目に LC3 と相互作用をする LIR 配列が存在することが確認された。まず野生型の Slc25a11 を過剰発現させたところ、ロックアウトの実験と相関するように野生型 Slc25a11 を導入した細胞ではミトファジーは亢進した。続けて LIR 配列に変異を加えた変異型 Slc25a11 を導入したところ、野生型と比べてミトファジーの亢進はかなり減弱した(図 3)。

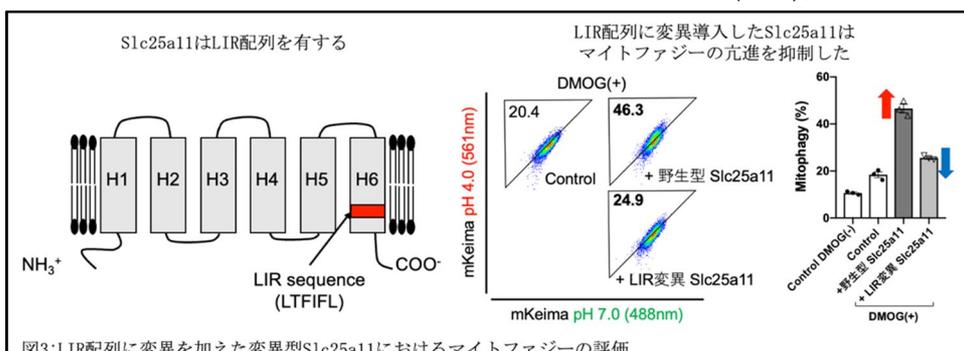


図3:LIR配列に変異を加えた変異型Slc25a11におけるミトファジーの評価

Slc25a11 はミトコンドリアトランスポーターであり、トランスポーター機能を失活させる変異はいくつか報告されている。そこで先ほど同様にトランスポーター機能を低下させる変異を加えた変異型 Slc25a11 を過剰発現させてマイトファジーを評価した。マイトファジーへの影響は変異部位によって様々であった(図 4)。

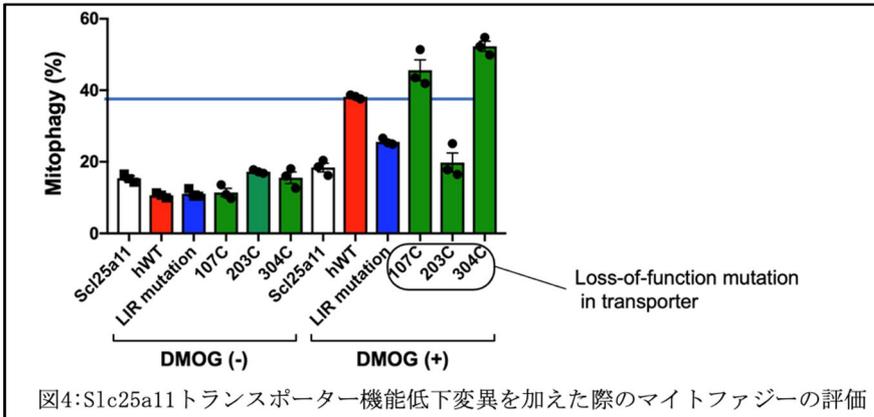


図4:Slc25a11トランスポーター機能低下変異を加えた際のマイトファジーの評価

以上の結果からは、Slc25a11 の LIR 配列がマイトファジーの制御に影響を与えている可能性が考えられたが、Slc25a11 のアミノ酸配列 295-300 番目は膜貫通領域に近いこともあるためにその詳細なメカニズムに関しては今後も検討する必要があると考えられた。

(2) Slc25a11 に対するタンパクタンパク相互作用を用いたマイトファジー制御機構の解明

Slc25a11 に対してピオチンリガーゼ酵素(BirA)を用いた BioID を行うために、Slc25a11 の N 末端と C 末端に BirA を結合した融合タンパクを作成した。今後、それぞれの局在が野生型の Slc25a11 と同様の局在を示すことを確認していく。内在性と同レベルの Slc25a11 の発現を Tet-on システムを用いることで調整することで BioID を行なっていく準備段階にある (図 5)。

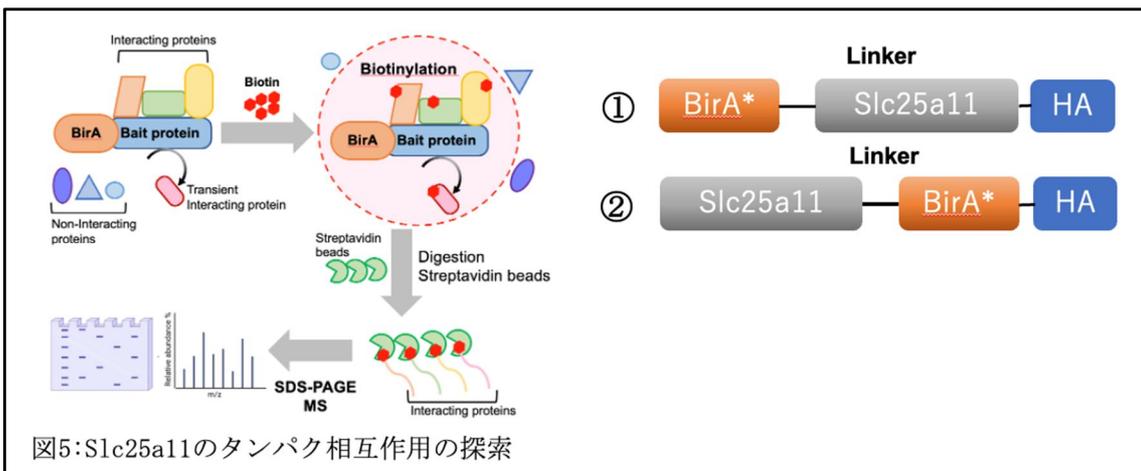


図5:Slc25a11のタンパク相互作用の探索

(3) 心不全モデルである TAC を用いた Slc25a11 ノックアウトマウスでの機能評価

Slc25a11-flox マウスを作成し、当研究室で飼育している Myh6-MerCreMer マウスと交配することで心筋細胞特異的 Slc25a11 欠損マウスを作成する。圧負荷心不全モデルである TAC モデルを作成することで表現型を確認していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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