

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20749

研究課題名(和文) 休眠中の動物が少ない酸素消費量でも生きられるのはなぜなのか？

研究課題名(英文) Why can hibernating animals survive even with a low oxygen consumption?

研究代表者

小野 宏晃 (Hiroaki, Ono)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80908591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は肝臓をモデル臓器としたCRISPRゲノムワイドスクリーニングによって、休眠中の低代謝耐性に必須な遺伝子のリストを得ることにある。本研究課題の成果として、以下の4つを達成した。まずは(1)生体内で100%の肝臓細胞に遺伝子を導入するプロトコルの確立と、(2)肝臓細胞を90%以上の生細胞率で分散させるプロトコルを確立した。また、同プロトコルを用いたscRNA-seqによって、(3)低代謝に固有な応答を示す分子マーカーを同定した。さらに同定した分子マーカーを標識するために、(4)生体内でRNAを標的とし、レポーター遺伝子などの任意のタンパク質発現を誘導することができるツールを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休眠中は正常状態の30%以下のエネルギー使用量(低代謝)になるにも関わらず、細胞障害を呈することはない(低代謝耐性)。本研究は、休眠中の低代謝耐性の分子基盤を明らかにするために、哺乳類の全遺伝子から低代謝耐性に必須な遺伝子群を抽出することが目的である。本研究の成果によって、低代謝状態の細胞を特徴づける分子と、それを標識する技術を開発することができた。この技術を駆使することで、低代謝耐性の分子基盤が明らかとなれば、休眠現象の理解を飛躍的に進めるだけでなく、エネルギーの供給が不足することが問題となる多くの疾患への画期的な治療方法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to compile a list of essential genes for hypo-metabolic resistance during hibernation, using the liver as the model organ and performing CRISPR genome-wide screening. The project has achieved four significant outcomes. First, I have established a protocol to introduce genes into nearly 100% of hepatocytes in vivo (1). Secondly, I have established a protocol to isolate hepatocytes with a high viability rate of over 90% (2). By combining this protocol and scRNA-seq, I have identified molecular markers that respond uniquely to hypo-metabolism (3). Moreover, to label the identified molecular markers, I have developed a tool that can target RNA itself in vivo and induce the expression of any protein, such as reporter genes (4).

研究分野：冬眠生物学

キーワード：合成生物学 休眠 CRISPRスクリーニング ウイルスペクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物はエネルギー需要とエネルギー供給を一定に保つことで生命機能を維持している。しかし、冬季・乾季などでエネルギー供給不足が生じると、能動的にエネルギー需要を低下させることで生存を図る種が存在する。このエネルギー需要を能動的に低下させた状態を休眠と呼ぶ。実際に休眠中の動物は酸素消費量が 30%以下に低下する。正常時は生体に供給される酸素量が低下すると、最低限必要なエネルギー需要(基礎代謝)に見合うエネルギー供給を保てなくなり生命の危機に瀕するが、休眠中の生体では組織障害を呈さずに生存可能である(低代謝耐性)。休眠中の動物が少ない酸素消費量でも生きられるのはなぜなのか? 現在、生理学的に低代謝耐性が存在することが確認されているが、その分子的な原理は全くわかっていない。休眠は個体レベルの現象であるが、全ての細胞に基礎代謝が存在していることを鑑み、細胞の低代謝耐性とそれに関わる遺伝子を調べることで、個体レベルの低代謝耐性を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「休眠における低代謝耐性に重要な遺伝子を明らかにすること」である。従来の休眠研究では、遺伝学的ツールが乏しい非モデル生物を用いて休眠前後の遺伝子発現やタンパク質を比較する観察研究が主流であった。しかし本研究では、遺伝学的ツールが豊富な代表的モデル生物であるマウスを用いた休眠研究を展開することで、遺伝子と低代謝耐性の因果関係を検証する。

3. 研究の方法

低代謝耐性に重要な遺伝子を検索するために CRISPR/Cas9 を用いた個体内での 1 細胞 KO スクリーニングを実施する。ゲノムスケールの網羅的な遺伝子 KO を達成するために、プールされた gRNA ライブラリとウイルスベクターを用いて肝臓で 1 細胞遺伝子 KO を実施(肝臓 1 細胞 KO マウス)し、細胞単位の選別によって低代謝耐性に重要な遺伝子を絞り込む。

(1) 細胞レベルの低代謝耐性評価系を樹立

マウスでは視床下部に位置する *Qrfp* 陽性神経細胞を刺激することで休眠を誘導することができる(Q neurons-induced hypothermia: QIH) (Takahashi et al., *Nature*, 2020)。そこで QIH を用いて細胞レベルの低代謝耐性が存在することを明らかにする。具体的には、肝臓に含まれる細胞の中で障害を受けている細胞の割合を FACS によって測定し、QIH 前後で定量比較する。細胞障害の指標は細胞死の早期マーカーである PI と Annexin V を用いるが、代替案として Caspase-3 による細胞標識も想定する。系の樹立では、CCl4 による薬剤性肝障害モデル (Slater et al., *Nature.*, 1966) を作製し、細胞障害を検出できることを確認する。細胞レベルの低代謝耐性が存在すれば、QIH 前後の細胞障害が同じ水準であると予想される。

(2) 低代謝耐性の遺伝子候補のリストアップ

QIH を誘導すると、低代謝耐性に重要な遺伝子が KO された細胞は障害を受ける。そこで肝臓において 1 細胞ごとに遺伝子を KO し、細胞毎の細胞障害を評価することで候補遺伝子を絞り込む。具体的には、ゲノムワイドの網羅的な遺伝子 KO を達成するために、プールされた gRNA (GeCK0v2: genome-scale CRISPR knockout library; Sanjana et al., *Nat Methods*, 2014) をパッケージしたウイルスベクターのライブラリを作製し、肝臓に感染させることで、1 細胞毎に異なる遺伝子が KO されたマウス(肝臓 1 細胞 KO マウス)を作製する。Cas9 は全細胞 Cas9 発現マウス (Platt et al., *Cell*, 2016) を用いるか、gRNA と Cas9 を単一ベクターに搭載して発現させる。肝臓 1 細胞 KO マウスに QIH を誘導し、1. で確立された評価系によって細胞障害を検出する。障害が検出された細胞をソートし、ゲノム精製によって gRNA を回収する。回収された gRNA は低代謝耐性に重要な遺伝子を標的にしている可能性が高い。そこで、回収された gRNA からウイルスベクターを再合成し、再び肝臓 1 細胞 KO マウスを作製したうえで同様の実験を行う。このプロセスを繰り返すことで、低代謝耐性に重要な遺伝子を標的にした gRNA を濃縮し、最終的に候補遺伝子を 10 個程度まで絞り込む。

4. 研究成果

本研究は肝臓をモデル臓器とした CRISPR ゲノムワイドスクリーニングによって、休眠中の低代謝耐性に必須な遺伝子のリストを得ることにある。そのために、低代謝耐性を発動した細胞を標識し、その細胞における遺伝子型との相関を検出する必要がある。

初年度は、実験計画通りに Cas9 全細胞発現マウス (Platt et al., *Cell*, 2014) を導入し、十分な匹数のホモ個体とヘテロ個体を得ることができた。またウイルスベクター作製系の樹立に関しては、レンチウイルスと AAV 作製系をそれぞれ確立した。その結果、レンチウイルスについては 10^8 ゲノムコピー/ml 程度、AAV については 10^{14} ウイルスゲノム/ml の濃度で安定的に作製することができることを確認した。また肝臓を 1 細胞毎に分散してサンプリングする系の樹立については、肝臓細胞の生存率と収量を最適化パラメータとしてコラゲナーゼの種類と濃度、還流速度、温度、門脈へのアプローチ方法を順次最適化していった。その結果、肝臓を分散

させる段階で相当数の肝臓細胞が障害されてしまうため、生細胞を濃縮しなければ肝臓細胞を分取することが難しいことが判明した。研究計画の段階では、低代謝誘導に伴う細胞死を指標としたスクリーニングを実施する計画であったが、これでは正常状態であっても相当数の細胞死が含まれてしまうためノイズが大きいスクリーニング系になってしまう。そこで“低代謝状態の分子マーカー”を指標にしたスクリーニングに切り替えることにした。計画変更に伴い肝臓分散プロトコルに密度勾配遠心によって生細胞を濃縮する方法を採用することで、生存率(> 90%)かつ高収量(10^7 細胞数オーダー)で肝臓細胞をサンプリングできるプロトコルに整備することができた。

2年目は、scRNA-seqによって休眠中の肝臓細胞から低代謝に固有な応答を示す転写産物を探索し、“低代謝耐性のマーカー分子”を同定・標識することを目標とした。動物が休眠状態になると、低代謝かつ低体温状態になる。したがって、実験データから低代謝と低体温を分離できるように実験条件を設定することが必要不可欠である。そこで、実験条件として“休眠”と“通常状態”に加えて、正常体温だが低代謝になる条件である“32 環境下での休眠”と“32 環境下での通常状態”の4群を設定した。この実験条件と、前年度に確立した肝臓細胞を高い生細胞率で分散させるプロトコルを組み合わせたscRNA-seqを実施した。その結果、“休眠”と“32 環境下での通常状態”で発現が亢進するが、“通常状態”と“32 環境下での通常状態”では発現が亢進しない転写産物を同定した。この転写産物は低代謝に固有な応答を示すことから細胞の低代謝状態の有用な分子マーカーになることが予想される。次に、生体内で分子マーカーを標識するために、RNAを標的としたRNAスイッチを開発した。このスイッチはRNAそのものを標的とし、レポーター遺伝子などの任意のタンパク質発現を誘導することができる。培養細胞を用いた検討によって、RNAスイッチが動作することを確認しており、今後はS/N向上やバックグラウンドの低減を目指した最適化を進める計画である。最後に、このツールを肝臓に遺伝子導入するためにウイルスベクターを用いた遺伝子送達の方法について検討した。その結果、特定のウイルスベクターを用いた場合に、肝臓細胞のほぼ100%に目的遺伝子を送達し、かつCRISPR/Cas9によって遺伝子をKOできることを見出した。今後は、研究期間に得られた技術を駆使してCRISPRスクリーニングを実施する予定である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 小野 宏晃、砂川 玄志郎	4. 巻 81
2. 論文標題 人工冬眠の実現にむけた休眠研究の取り組み	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 141 ~ 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/lowtemsci.81.141	査読の有無 無
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 -

〔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
---------	---------