

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860063

研究課題名(和文)複合的スクリーニングによるミトコンドリア品質管理の機能と制御構造の解明

研究課題名(英文)Dissecting the function and regulation of mitochondrial quality control system using multi-matrixed screening assay

研究代表者

北見 俊守(Toshimori, Kitami)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70708594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアの機能低下は多種の疾患の原因に繋がっている。ミトコンドリアの機能を上げるには、ミトコンドリアの量と品質を上げる2種類のメカニズムがある。我々はミトコンドリアの機能低下により活性化される炎症パスウェイに着目した。まず、ミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子が炎症反応にどのような影響を及ぼすか、遺伝子強制発現と遺伝子ノックアウトを用い検証した。また、全ゲノムレベルで炎症反応に関わる遺伝子を探索し、この中からミトコンドリアに関わるものを調べた。これらの結果は、ミトコンドリアと炎症反応の関係を明らかにするだけでなく、ミトコンドリアと炎症に関わる新たな遺伝子の発見に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Decline in mitochondrial function is associated with variety of complex diseases including type 2 diabetes, neurodegenerative disease, and cardiovascular disease. Mitochondrial function is maintained at the level of abundance and quality. We sought to study the role of mitochondrial quality control in complex disease pathway called NLRP3 inflammasome. This pathway triggers the release of inflammatory cytokine and is involved in variety of complex diseases. We performed focused genetic over-expression and knockout screens to assess the impact of mitochondrial quality control genes on inflammatory phenotype. In addition, we performed genome-wide knockout screens for NLRP3 inflammasome activation to assess which mitochondrial genes are involved in this disease pathway. The results of the study will help clarify the role of mitochondria in inflammation as well as identify novel genes involved in regulating NLRP3 inflammasome.

研究分野：ミトコンドリア生物学

キーワード：ミトコンドリア スクリーニング 炎症

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの機能低下は多種の疾患(2型糖尿病、パーキンソン病、心血管疾患)の原因に繋がっている。ミトコンドリアの機能を上げる方法の一つにミトコンドリアの品質管理を活性化させるメカニズムがある。しかし、ミトコンドリア品質管理には合計約 30 以上の遺伝子が関わり、それらがミトコンドリア機能にどのような影響を与えるか、またそれぞれが疾患にどのように関わっているか明らかではない。ミトコンドリアと疾患の関係を検証するにあたって、複数の疾患パスウェイが挙げられる。中でも、ミトコンドリア品質管理の低下により悪化する炎症反応 NLRP3 インフラマソームは、ミトコンドリアが炎症反応の中核にあると報告されている。しかし、どのようなミトコンドリア関連の遺伝子がどのように炎症反応と関わっているか明らかではない。

2. 研究の目的

ミトコンドリア品質管理には (A)タンパク質フォールディング調整 (B)タンパク質分解 (C)ミトコンドリアの融合・分裂、(D)オートファジーの 4 種類があり、また一種類に複数の遺伝子が関わり計 30 以上の遺伝子が存在する。これら約 30 種の遺伝子が自然免疫細胞内のミトコンドリア機能にどのような影響を与えるか、またそれぞれが炎症反応にどのような影響を及ぼすか明らかではない。本研究ではマクロファージ細胞株を用い各遺伝子を強制発現またはノックアウトし、ミトコンドリア機能と炎症反応への影響を測定する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子強制発現スクリーニング

ミトコンドリア品質管理機能を活性化させるため、品質管理に関わる遺伝子をレンチウイルス用ベクターで強制発現させる。発現にはシーケンスに異変の無いオープンリーディングフレーム(ORF)を用いた強制発現ライブラリーを用いる。ORF を発現させるベクターを含むレンチウイルスをマクロファージ細胞株 THP-1 に感染させ、薬剤セクションにより感染された細胞のみを集める。遺伝子候補には、ミトコンドリア品質管理に関わる 30 の遺伝子とそれら遺伝子に発現パターンが似ているもの 60 個を選んだ。これら遺伝子の強制発現が炎症反応にもたらす影響を炎症性サイトカイン IL-1B の分泌により測定する。サイトカイン量はウェル内の細胞数で

ノーマライズさせる。

(2) 遺伝子ノックアウトスクリーニング

ミトコンドリア品質管理機能が、通常の培養条件で低下しているとは限らない。よって品質管理を活性化させても、ミトコンドリア機能に変化があるとは限らない。逆に、ミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子をノックアウトすることで、それら遺伝子の機能が失われ、炎症反応における役割がより明確になると考えられる。上記 1 と同様に THP-1 細胞株を用い、CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトを行う。CRISPR/Cas9 はターゲット遺伝子配列と同じ配列を持つガイド RNA を発現させることで、二重鎖切断が行われ、その切断を修復する際にヌクレオチドの挿入、削除が行われ、ストップコドンが作られ、遺伝子がノックアウトされる仕組みである。CRISPR/Cas9 にはレンチウイルスを用いた LentiCRISPR システムを使い、Cas9 とガイド RNA を 2 週間程発現し続けることで、高い割合でターゲット遺伝子のノックアウトが可能になる。

(3) 全ゲノムノックアウトスクリーニング

上記 1 と 2 の研究では現在同定されている品質管理関連の遺伝子のみ検証できる。しかし、新たなミトコンドリア関連の遺伝子が炎症反応に関わっているかは検証できない。そのためには、全ゲノムの遺伝子を検証する必要がある。全ゲノム遺伝子を網羅的にノックアウトさせ、炎症反応への影響を検証するため、プールドスクリーニングを用いる。この手法では、全ゲノム遺伝子に対するガイド RNA と Cas9 を発現させるライブラリーを用い、1 度に全ゲノムに対する CRISPR レンチウイルスを作成し、低濃度で細胞感染させることで、1 細胞あたり 1 遺伝子がノックアウトされる。

4. 研究成果

(1) 遺伝子強制発現スクリーニング

ミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子 30 とそれら遺伝子と発現パターンが似ている遺伝子 60 を THP-1 細胞により強制発現させ、炎症性サイトカイン IL-1B の分泌量を測定した。その中から、強制発現により IL-1B の分泌が下がった遺伝子を再度検証した(図 1)。その中で分泌量を最も下げたものはミトコンドリア品質管理遺伝子の転写制御を行う転写因子 DDIT3(CHOP)であった。LacZ を強制発現させたネガティブコントロール細胞に比べ、DDIT3 を強制発現させた細胞では、15 倍程 DDIT3 の発現が上がった(図 2)。また、炎症性サイトカイン IL-1B 自体の発現量には

影響がなかった。DDIT3 の下流にあるミトコンドリア品質管理遺伝子 CLPP と HSPA5 の発現を検証したところ、DDIT3 の強制発現では大きな差が見られなかった(図 2)。ミトコンドリア品質管理遺伝子は DDIT3 以外の複数の遺伝子により制御されていることから、変化が見られなかったと考えられる。また DDIT3 はミトコンドリア品質管理遺伝子の転写制御の他に、小胞体ストレス応答にも関わっていることから、IL-1B 分泌量の減少は、ミトコンドリア以外の理由を伴うことも考えられる。この実験での仮定は、品質管理遺伝子を強制発現させることでミトコンドリアの品質を上げることである。しかし、最適化された細胞培養条件内でミトコンドリアの品質が下がっており、強制発現によりそれらが回復されるとは限らない。よって、品質管理遺伝子の機能を欠損させ、ミトコンドリアの品質を下げ、それらが炎症反応にどのような影響を及ぼすか検証する必要がある。

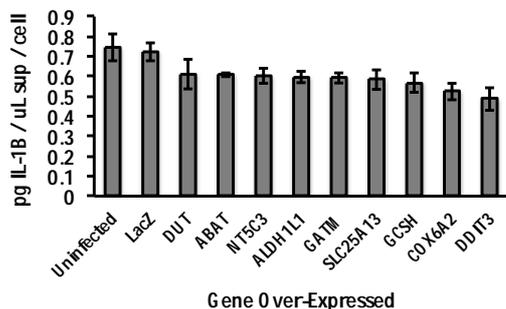


図 1. ミトコンドリア品質管理遺伝子の強制発現による炎症性サイトカイン IL-1B 分泌量への影響。

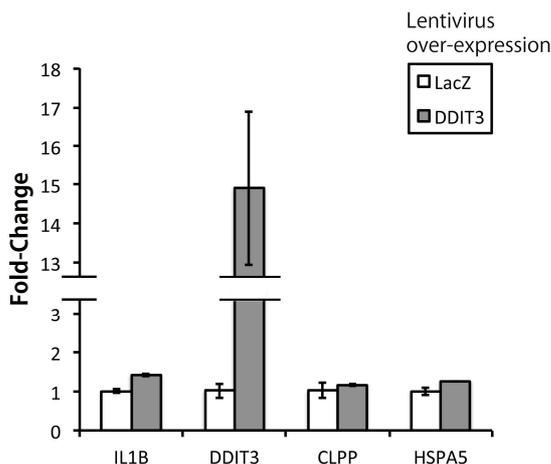


図 2. 転写因子 DDIT3(CHOP)の強制発現による遺伝子発現への影響。CLPP と HSPA5 は DDIT3 の下流にあると報告されているミトコンドリア品質管理遺伝子である。

(2) 遺伝子ノックアウトスクリーニング

ミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子 30 個とそれら遺伝子と発現パターンが似ている遺伝子 60 個を CRISPR/Cas9 により THP-1 細胞でノックアウトさせ、炎症性サイトカイン IL-1B の分泌量を測定した。そのなかで、IL-1B 分泌量を下げた遺伝子は RHOT1 であった(図 3)。RHOT1 はミトコンドリアの輸送に関わり、特にミトコンドリアの品質が低下した時のミトコンドリア除去にも機能している。過去の論文からの予想では、RHOT1 のノックアウトはミトコンドリアの品質を下げ、IL-1B の分泌量を上げると考えられる。しかし、IL-1B の分泌がノックアウトにより下がった。RHOT1 ノックアウトがミトコンドリアに及ぼす影響を測定するため、複数のアッセイを用いた。1 細胞あたりのミトコンドリア量はネガティブコントロールに比べ、少し低かった(図 4a)。また、ミトコンドリアにダメージを与えてしまうミトコンドリア活性酸素量(図 4b)も減っていた。また、ミトコンドリア ATP 産生に必要な膜電位差も下がった(図 4c)。これらの結果から、RHOT1 のノックアウトはマクロファージでミトコンドリアの機能と量を下げることが分かった。しかしながら、炎症性サイトカインの分泌に関しては、分泌量の減少が見られた。

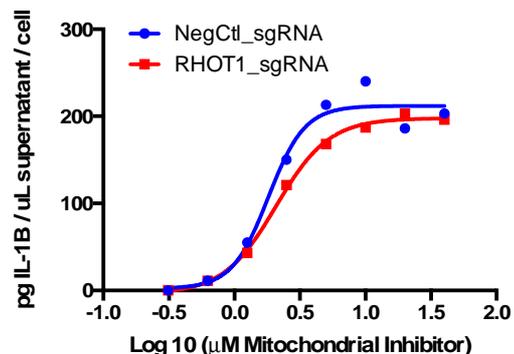


図 3. RHOT1 遺伝子に対するガイド RNA とネガティブコントロールガイド RNA を用いたノックアウト細胞による炎症性サイトカイン IL-1B 分泌への影響。

その他の遺伝子では、ミトコンドリア DNA 維持に関わる TFAM のノックアウトが細胞の生存に関わり、細胞死を引き起こしていたことが明らかになった。ミトコンドリア活性酸素により酸化されたミトコンドリア DNA の放出は炎症反応の引き金になっていると考えられているので、ノックアウトによる IL-1B 分泌の減少が期待されていた。しかし、細胞死を引き起こすことから、ノックアウトによる機能欠損の他に RNAi による遺伝子機能の低下も実験の手法に用いる必要があると考えられた。

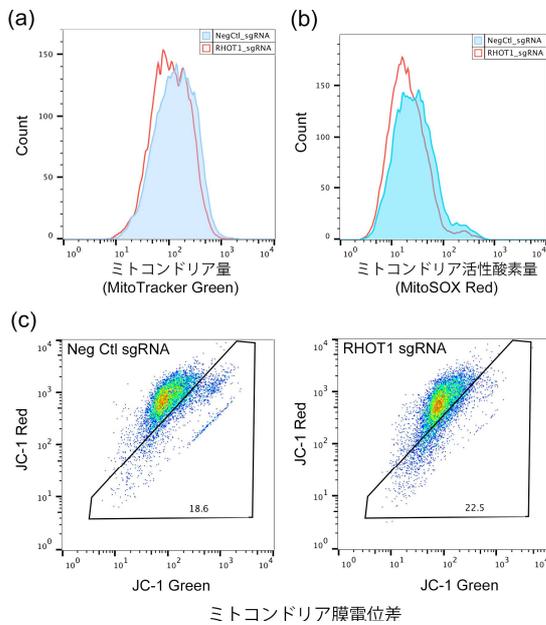


図4.ミトコンドリア品質管理遺伝子RHOT1のノックアウトによるミトコンドリア機能への影響。(a)ミトコンドリア量、(b)ミトコンドリア活性酸素量、(c)ミトコンドリア膜電位差の測定をRHOT1ノックアウト細胞とネガティブコントロール細胞で比較した。

(3) 全ゲノムノックアウトスクリーニング

上記の1と2で行ったミトコンドリア品質管理遺伝子の強制発現とノックアウトでは、数の限られた遺伝子の影響のみ検証された。しかし、未知の遺伝子の機能などがミトコンドリア品質管理や炎症反応に関わっている可能性もある。全ゲノム遺伝子をノックアウトさせるため、CRISPR/Cas9を用いたプールドノックアウトスクリーニングを行った。炎症性サイトカインIL-1Bの分泌は細胞死を引き起こすことから、遺伝子ノックアウトにより生存した細胞を回収し、次世代シーケンサーによるガイドRNA配列の読み取りにより、ノックアウトされた遺伝子の同定を行った。ノックアウトには、 6.0×10^6 細胞を用い、MOIを0.3に設定し、計算上1ガイドRNAあたり、500のノックアウト細胞が作成された。1遺伝子あたり6ガイドRNAがあるので、1遺伝子あたり合計3000個のノックアウト細胞があると考えられる。

炎症反応を伴わない遺伝子をp値でランク付けしたところ、炎症反応の中核にある遺伝子NLRP3が上位に上がった(図5)。これら上位50の遺伝子を再度1個ずつノックアウトさせ、IL-1B分泌への影響を測定した。この上位50の中からIL-1Bの分泌を下げたものはNLRP3のみであった。また、炎症反応が悪化し、細胞死を促進させた遺伝子上位50も検証し、IL-1B分泌量が上がったか検証した。

しかし、上位50の中からIL-1B分泌量を上げられるものはみつからなかった。

上位50の中からIL-1B分泌に影響を及ぼす遺伝子が見つからない理由にはプールドスクリーニングではアッセイのノイズが高く、大きな影響をもたらす遺伝子以外は同定できないと考えられる。また、ノックアウトされた遺伝子を次世代シーケンサーで同定する際にPCRバイアスがかかり、遺伝子のランクがこのバイアスにより大きく影響してしまったことも考えられる。プールドスクリーニングの労力とコストから考えると、全ゲノムノックアウトではなく、精製された数千個の遺伝子を丁寧にノックアウトさせ、ミトコンドリア機能と炎症反応への影響を測定する方がより効率的であると考えられる。

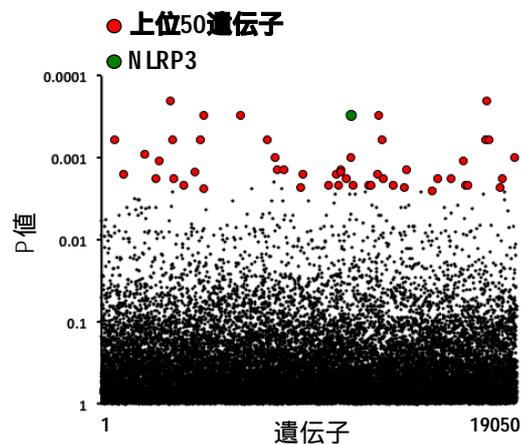


図5.ノックアウトにより炎症反応を抑えた遺伝子のp値。ポジティブコントロールのNLRP3は上位に上がっている。

(4) 今後の展開

上記1と2では限られた遺伝子を丁寧に検証し、ミトコンドリア機能と炎症反応への影響を測定した。上記3では遺伝子数に縛られず網羅的に全ゲノム遺伝子を検証したが、アッセイ系のノイズやプールドスクリーニングによるPCRのバイアスなど様々な理由により、大きな変化以外は同定できなかった。ミトコンドリアを形成する遺伝子は1000個程あるので、上記1と2で確立させた手法を1000個の遺伝子に広げ、炎症反応への影響を検証することで、ミトコンドリアと炎症反応の関係が明確になると期待される。

(5) まとめ

現在同定されているミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子の多くは、炎症反応NLRP3インフラマソームに影響を及ぼさなかった。本研究から炎症反応への影響が同定できた遺伝子にはDDIT3とRHOT1が挙げられるが、

特に RHOT1 のノックアウトはミトコンドリア機能の低下が確認されたが、炎症反応は予想していた結果とは異なり、減少した。今後は本研究で確立された手法を生かし、さらに多くのミトコンドリア関連の遺伝子と炎症反応の関係を検証しようと計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1 北見 俊守 Dissecting the role of mitochondria in NLRP3 inflammasome activation via chemical and genomic toolkits. 第15回 日本ミトコンドリア学会年会、2015年11月19日、福井県国際交流会館、福井県福井市宝永。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.riken.jp/labo/47/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北見 俊守 (Toshimori Kitami)
理化学研究所・統合生命医科学研究
センター・上級研究員
研究者番号：70708594