

126. ミトコンドリア恒常性のシステムの解析

北見 俊守

Key words : ミトコンドリア, 炎症, スクリーニング,
CRISPR

理化学研究所
統合生命医科学研究センター

緒言

ミトコンドリアの機能低下は多くの加齢性疾患（2型糖尿病, パーキンソン病, 心血管疾患）に関与し, 特に2型糖尿病では複数の組織・細胞でミトコンドリア機能の低下が見られる. ミトコンドリア機能を回復させるアプローチとして, ミトコンドリア恒常性維持機構を増強する生物応答調整剤が研究されている^{1,2)}. しかし, 化合物を用いたミトコンドリア機能の正常化には組織特異性が見られ, 細胞毒性を伴う化合物も多い. そこで我々は, 複数の組織においてミトコンドリア恒常性がどのように制御され, また病態と共にどう変化してくるかを検証するため, 2型糖尿病の病態の中核の1つであるマクロファージの炎症反応とミトコンドリア恒常性を基盤に, ミトコンドリアの恒常性維持機構に重要な遺伝子を検索した. マクロファージによる炎症反応の中でも白色脂肪組織のインスリン抵抗性と膵β細胞の毒性を引き起こすNLRP3インフラマソーム活性化にはミトコンドリア内の活性酸素の上昇が重要だとされ, ミトコンドリア恒常性維持機構の阻害はインフラマソーム活性化を起しやすくすることも報告されている. 本研究ではマクロファージのミトコンドリア活性酸素量とNLRP3インフラマソーム活性化を制御する遺伝子を全ゲノムレベルで探索し, ミトコンドリアと加齢性疾患を結ぶ鍵となる遺伝子の同定を行った.

方法および結果

ミトコンドリアの恒常性維持機構とNLRP3インフラマソームの活性化に関わる遺伝子を同定するため, 我々は近年報告されたCRISPR/Cas9を用いた遺伝子ノックアウト手法を研究に用いた. CRISPR/Cas9はゲノム遺伝子配列にマッチする特有のガイドRNA (sgRNA) を用いゲノムDNAを切断し, それを修復する際に遺伝子配列の変異が起り, ストップコドンが作られ遺伝子がノックアウトされる原理である. 中でもレンチCRISPRを用いた手法では, CRISPR/Cas9とガイドRNA (sgRNA) を細胞のゲノムに組み込ませ, 数週間強制発現することで, 高い効率で遺伝子がノックアウトされる. 2週間に及ぶCRISPR/Cas9とNLRP3インフラマソームに重要な遺伝子のガイドRNA (NLRP3, PYCARD, CASP1それぞれ) の発現により, THP-1マクロファージのIL-1 β 分泌が95%以上抑制できることが確認できた (図1A).

CRISPR/Cas9による遺伝子ノックアウトスクリーニングを行うには1遺伝子に対して1つ, 又は複数のレンチウイルスを作製し遺伝子特異的なガイドRNAの影響をIL-1 β 分泌量などで1つずつ検証する必要がある. しかし, 全ゲノム遺伝子約2万個以上のレンチウイルスを1つずつ作製し, それらの影響をELISAなどで検証するには1人で行える実験量を遥かに超えてしまう. しかし, Pooledスクリーニングでは, 全ゲノム遺伝子に対するレンチCRISPRのブラズミドが混合したDNAを用い, 数万種のウイルスを一度に作製し, 1細胞あたり0.3ウイルスが感染するようにウイルス濃度を調整し, 感染した細胞を数週間セクションすることで, 1細胞あたり1遺伝子がノックアウトされる手法である. よって全ゲノム遺伝子1つずつに対してノックアウト細胞が一度に作られる. 作製されたノックアウト細胞の中でミトコンドリア活性酸素量とNLRP3インフラマソームの活性化に影響を及ぼす物を検出するには, FACSアッセイで細胞をソートする必要がある. 我々はカスパーゼ1活性をカスパーゼ1インヒビターに蛍光タンパク質を付けたFAM-YVAD-FMKプローブと, ミトコンドリア活性酸素量を測定するMitoSOX Redを同時測定できるアッセイ

を最適化した。NLRP3 をノックアウトした細胞では、ミトコンドリア阻害剤の投与後ミトコンドリア活性酸素の上昇は保たれるが、カスパーゼ1の活性化は抑えられ、アッセイが機能していることを確認した (図1B)。

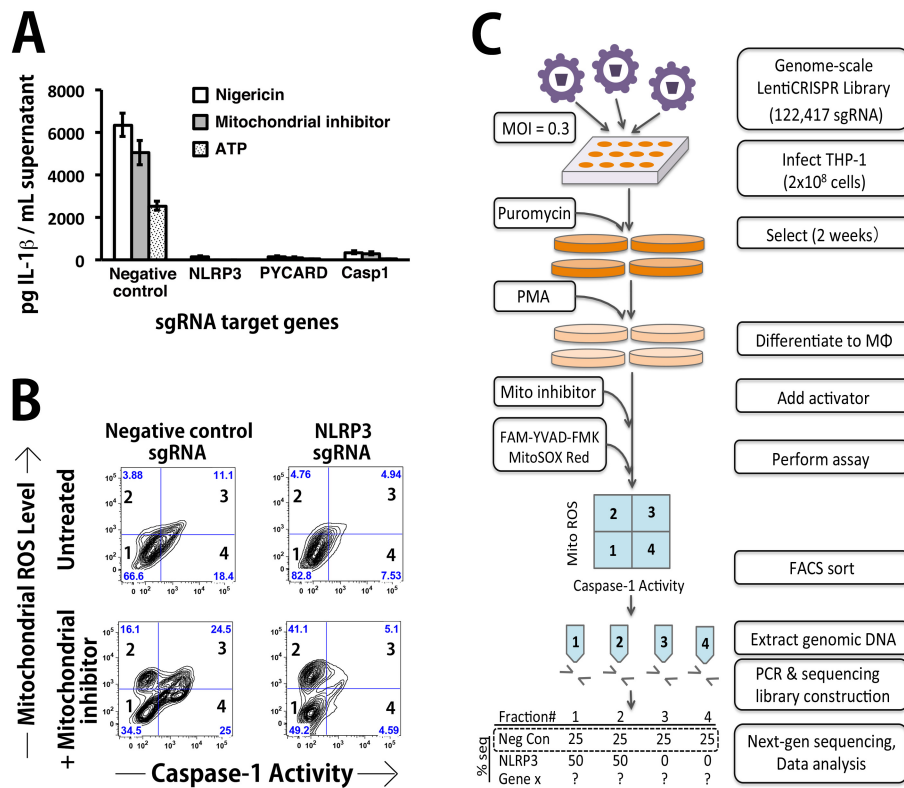


図1. CRISPR/Cas9による遺伝子ノックアウトスクリーニング。

A) レンチウイルスベクターにより CRISPR/Cas9 と遺伝子特異的なガイド RNA (sgRNA) を2週間発現した後、NLRP3 インフラマソームの活性により分泌される炎症性サイトカイン IL-1 β の分泌量を ELISA で測定した。B) ミトコンドリア活性酸素量と NLRP3 インフラマソーム活性によるカスパーゼ1活性をネガティブコントロールと NLRP3 ガイド RNA を用いたノックアウト細胞で FACS 測定した。C) レンチ CRISPR を用いた全ゲノム遺伝子スクリーニングのプロトコール。

全ゲノム遺伝子スクリーニングを行うため、我々は 200 \times 10⁶ の THP-1 細胞を1細胞あたり 0.3 ウイルス量で感染させた。これにより、ノックアウトライブラリー (約2万遺伝子 \times 6ガイド RNA=12万ガイド RNA) を500倍のカバー率でスクリーニングすることができた (図1C)。FACSアッセイで細胞をソートした後、次世代シーケンサーで分類された細胞にどの遺伝子がノックアウトされていたかガイド RNA の配列を基に解析した。まずはポジティブコントロールの NLRP3/PYCARD/CASP1 遺伝子ノックアウト細胞がカスパーゼ1活性度の低い方に多く FACS で回収されたか検証した。しかし、ポジティブコントロールのガイド RNA 配列はカスパーゼ1活性度の低い方と高い方では大きな差が見られなかった。スクリーニングがポジティブコントロールを正しく検出できなかった理由を探るため、今までに得たデータを振り返り原因をいくつか特定した。まずは、カスパーゼ1が活性された細胞はその後細胞死に直面するため、いずれはカスパーゼ1のプロープが細胞から流れ出し、活性度が低い細胞に分類されてしまっていた (図2A)。これは細胞死のマーカーを FACS アッセイに加えることで最小限に抑えられると想定する。また、THP-1 細胞をマクロファージへ誘導、そして FACS ソートを行う際多くの細胞が失われるため次世代シーケンサーで解析される細胞数が当初の500倍のカバー率から10倍程に大幅に下がっていた (図2B)。よってデータがよりノイズなどで大きく影響されやすくなっていた (図2C)。特に Pooled スクリーニングでは PCR バイアスが大きなノイズの原因となることから、スクリーニングで用いる細胞数を増やす必要が見出された。

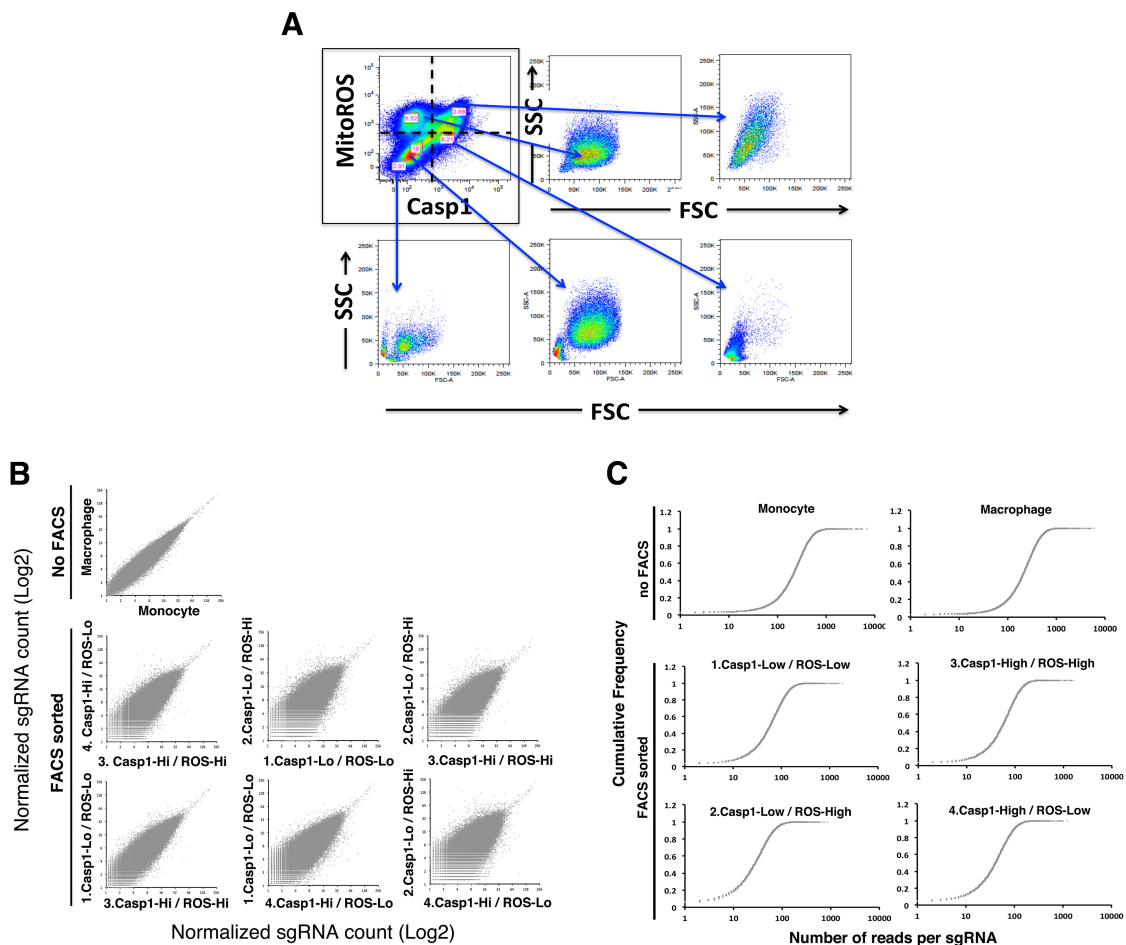


図2. CRISPR/Cas9 全ゲノム遺伝子スクリーニングのクオリティーコントロール。

A) ミトコンドリア活性酸素量とカスパーゼ1 活性度により FACS ソートされた細胞の大きさ (FSC) と複雑さ (SSC) を比較した。活性酸素量とカスパーゼ1 活性度の低い細胞では FSC/SSC が低い死細胞が多く含まれていると予測される。B) FACS ソートされた細胞から得られたガイド RNA に対するシーケンスのリード数と FACS ソートを行わなかった細胞のリード数の確率分布。FACS ソートを行わなかった細胞では 80% 以上 (Frequency=0.2) のガイド RNA で 100 倍以上のカバー率が得られたが、FACS ソートを行った細胞では 80% 以上のガイド RNA で 10 倍程のカバー率しか得られなかった。C) ノックアウト細胞から検出されたガイド RNA の数をサンプルごとに比較したプロット。FACS ソートを行わなかった細胞ではカバー率が低いガイド RNA でも大きな差は見られなかった。しかし、FACS ソートされた細胞では、サンプルごとに見られる差が一番多いのはカバー率が低かったガイド RNA であった。よって FACS ソートをされた細胞で見られるサンプルの差はカバー率の低いガイド RNA によるノイズが強く影響していると予測される。

考 察

本研究ではミトコンドリアの恒常性維持機構と NLRP3 インフラマソームの活性化に重要な遺伝子を同定するスクリーニング手法を最適化し、スクリーニングを行った。スクリーニング手法は論文で 1 年程前に報告されたばかりの技術であり当初から数回に及ぶ最適化が必要だと予想されていた。今回の実験で得たデータを基に、より信頼性のあるスクリーニングデータが得られると期待される。特に NLRP3 インフラマソームの活性化には細胞内カルシウムの上昇など他のパスウェイも重要であり、またミトコンドリアも細胞内のカルシウム³⁾や他のパスウェイを制御することから、同定された遺伝子がミトコンドリアと他のパスウェイにどのように関与しているか検証することが、ミトコンドリアと加齢性疾患の関係をより明確にするステップとして必要だと考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所統合生命医科学研究センターの小原 収先生である。最後に、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Wagner, B. K., Kitami, T., Gilbert, T. J., Peck, D., Ramanathan, A., Schreiber, S. L., Golub, T. R. & Mootha, V. K. : Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. *Nat. Biotechnol.*, **26** : 343-351, 2008.
- 2) Kitami, T., Logan, D. J., Negri, J., Hasaka, T., Tolliday, N. J., Carpenter, A. E., Spiegelman, B. M. & Mootha, V. K. : A chemical screen probing the relationship between mitochondrial content and cell size. *PLoS ONE*, **7** : e33755, 2012.
- 3) Sancak, Y., Markhard, A. L., Kitami, T., Kovács-Bogdán, E., Kamer, K. J., Udeshi, N. D., Carr, S. A., Chaudhuri, D., Clapham, D. E., Li, A. A., Calvo, S. E., Goldberger, O. & Mootha, V. K. : EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*, **342** : 1379-1382, 2013.