

令和 2 年 8 月 2 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 20186003

氏 名 志村 勇

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ミュンヘン (国名: ドイツ連邦共和国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

好中球分化と小胞体恒常性維持機構の関連

3. 派遣期間: 平成 30 年 11 月 1 日 ~ 令和 2 年 7 月 18 日

4. 受入機関名及び部局名

ルートヴィック・マキシミリアン大学ドクター・フォン・ハウナー小児病院 クープスリサーチセンター

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

重症好中球減少症(SCN)は、末梢血中の好中球が不足する遺伝性疾患であり、SCN患者は乳幼児期から重篤な細菌感染をくりかえす。SCNの責任遺伝子はすでに10以上報告されているものの、30%から40%の症例において原因となる遺伝子変異は不明である。ほとんどのSCN患者は骨髄中での顆粒球分化に異常があるために、好中球生産が制限されている。したがって、SCN責任遺伝子の機能解析は、好中球の分化機構の解明につながるものである。

また、これまでのところ、それぞれの遺伝子変異におけるSCNの発症機序の詳細は解明されていないものの、顆粒球系の前駆細胞における小胞体機能やタンパク質分泌経路の異常が好中球分化の不全を引き起こすことが示唆されている。既知の責任遺伝子の中で、最も頻度が高い変異は好中球エラスターゼELANEをコードするELA2で見つかっており、変異したELANEタンパク質が不良なフォールディングを起こし、小胞体内に蓄積することが小胞体ストレスを亢進させるために前駆細胞のアポトーシスを誘導し、結果として好中球が成熟しないものと考えられている。また、その他の責任遺伝子のうち、G6PC3およびJAGN1の変異においても小胞体ストレスがSCN発症機序に関与することが示唆されており、本研究では、小胞体機能と好中球分化機構の関連に着目することとした。

これまで、小胞体ストレス応答や小胞体機能について多くの報告があるが、骨髄系細胞を用いた研究は少なかった。本研究では慢性骨髄性白血病細胞株KBM-7細胞を用いたノックアウトスクリーニングによって小胞体機能に関連する遺伝子群の同定を試みることとした。

KBM-7細胞株は、クロモソーム8とクロモソーム15の一部を除き、ほぼ一倍体であり、CRISPR/Cas9システムによるノックアウトの作製効率が高い。スクリーニングのため、Cas9およびピューロマイシン耐性遺伝子発現カセットを持つレンチウイルスベクターlentiCRISPRv2にguideRNAが挿入されたプラスミドライブラリ(gRNA pooled library in lentiCRISPRv2, addgene #73179)を用いることとした。このライブラリには、19,114のヒト遺伝子をターゲットとして、非常に小さな遺伝子を除きほとんどの遺伝子に対して4つのターゲットがデザインされ、総計76,441種類のガイド配列が組み込まれている。また、コントロー

ルとして、スクランブル配列を挿入した lentiCRISPRv2 ベクターを用意した。

小胞体機能およびタンパク質分泌経路をモニターするため、細胞表面に発現するタンパク質の発現量を測定することとした。本研究では、レンチウイルスにより導入した CD2 を指標とする。転写、翻訳された CD2 の細胞表面への移行は、小胞体での適切なフォールディング、ゴルジ体での糖鎖修飾を経て小胞輸送システムにより管理される。したがって、CD2 の細胞表面における発現量は、小胞体機能やタンパク輸送システムに障害があると減少することとなる。このことは、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンや DTT によって KBM-7-CD2 細胞を刺激して抗 CD2 抗体によって FACS によって細胞表面の CD2 発現量を測定することにより確認した (図 1)。

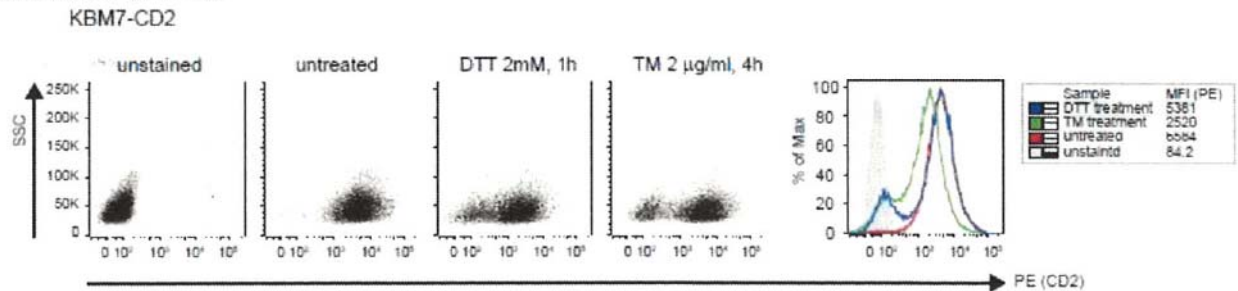


図 1. ツニカマイシン、DTT 処理による CD2 発現量の変化

プラスミドライブラリおよびコントロールプラスミドより作製したレンチウイルスを KBM-7-CD2 細胞に感染させ、感染した細胞をピューロマイシン処理により選択した。選択した細胞について、FACS Aria を用いて細胞表面の CD2 発現量を測定したところ、scramble gRNA を導入したコントロール細胞に比べ、gRNA library を導入した細胞において、2-3%程度の細胞が低発現を示した (図 2)。CD2 細胞膜発現が抑制された細胞群をソーティングして回収した。

また、全生細胞をコントロールとして同様に回収した。CD2 低発現細胞およびコントロール細胞より、ゲノム DNA を抽出した。レンチウイルス感染から同様の操作をさらに二度繰り返し、計 3 回のスクリーニングからゲノム DNA を得て PCR により gRNA 配列領域を増幅し、次世代シーケンサーにより各サンプルに含まれる gRNA 配列をカウントした。その結果について、解析ソフトウェア HiTSelect を用いて解析し、CD2 発現抑制細胞群においてコントロール群と比べて濃縮されたターゲット遺伝子を算出された FDR (q-value) を用いて順位付けした。

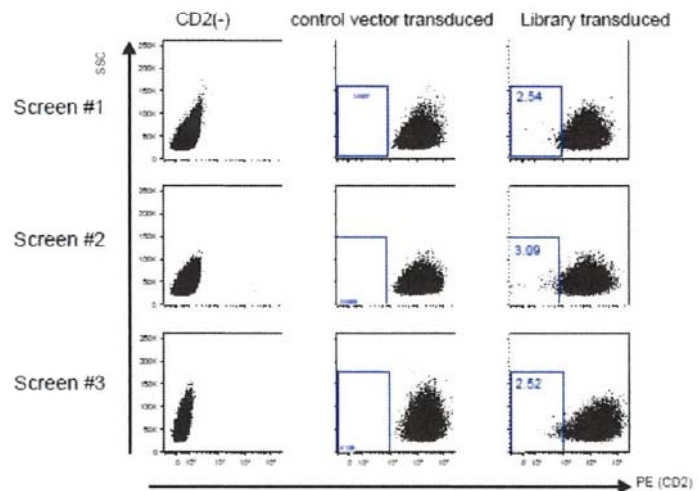


図 2. ライブラリ導入 KBM-7-CD2 細胞における CD2 発現

その結果から上位となった遺伝子を選び、スクリーニングの評価のため、それぞれの遺伝子のノックアウト株を作製した。作製したノックアウト細胞において、CD2 の細胞表面発現量をコントロール細胞と比較したところ、9 遺伝子中 7 遺伝子で CD2 発現量の減少が確認された。また、CD2 は KBM7 細胞にもともと発現していないが、解析において、CD2 が最も FDR の小さい約 300 遺伝子に含まれていることもスクリーニングが機能したことを示した。

スクリーニングの評価に用いた 9 遺伝子のうち、ゴルジ体に局在することが知られ LARGE2 について、さらに機能解析を行った。タンパク質輸送について評価するため、

KBM-7 細胞に CD2-ER-Hook を導入し RUSH システムを用いることとした。RUSH システムにおいては、小胞体局在シグナルおよびストレプトアビジンをもち Hook タンパク質とともにストレプトアビジン結合タンパク (SBP) および蛍光タンパク質を融合させたレポーター分子を導入し、レポーター分子を小胞体に係留する。ビオチンを細胞外から加えると、小胞体内へ取り込まれたビオチンがストレプトアビジンへ競合的に結合することでレポーター分子の小胞体からの輸送が開始される (図 3)。

RUSH system with CD2 reporter

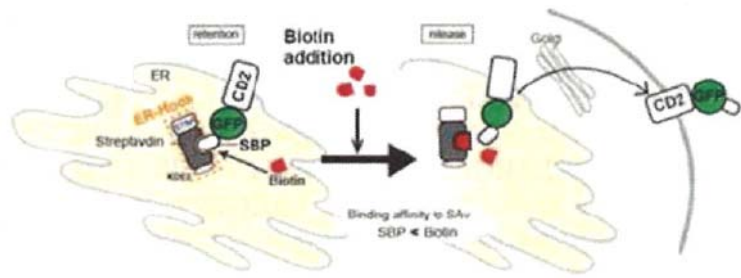


図 3. RUSH システムの概要

したがって、ビオチン添加からレポーター分子である CD2 の局在を追跡することができる。この RUSH システムを用いて *LARGE2* ノックアウト細胞とコントロール細胞におけるタンパク質輸送の変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。コントロール細胞ではビオチン添加 15 分後には CD2-GFP は主にゴルジ体に局在し、30 分後、60 分後にはドット状に観察され、ゴルジ体から小胞輸送により細胞表面へと分布された様子が見られた。一方、*LARGE2* ノックアウト細胞においては、ゴルジ体へ移行した後、30 分後および 60 分後においてもゴルジ体にとどまり、パーティクルはほとんど見られなかった (図 4)。さらに、ノックアウト細胞に *LARGE2* を発現させたところ、部分的に輸送が回復した。統計解析のため、ImageJ のパーティクルカント機能を用いて自動でドット状になった GFP の数をカウントしたところ、コントロール細胞に対して、*LARGE2* ノックアウト細胞では有意に減少した。

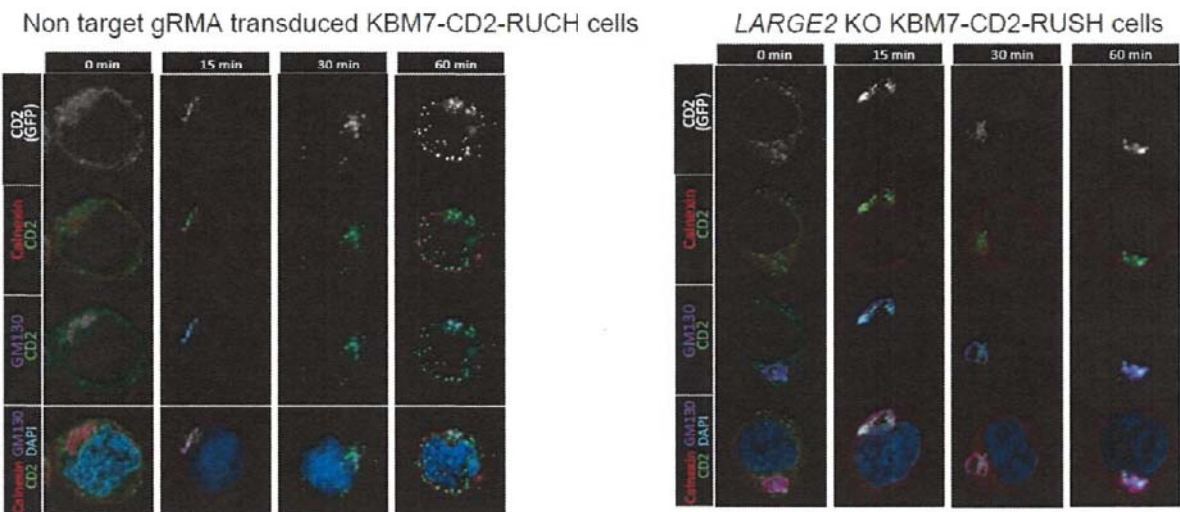


図 4. コントロールおよび *LARGE2* ノックアウト細胞における CD2 の輸送

また、*LARGE2* ノックアウト細胞において、ゴルジ体ストレス応答を調べた。ゴルジ体ストレス応答の中で、CREB3 経路を刺激する、プレフェルジン A により 12 時間細胞を処理し、*ARF4* の mRNA 発現上昇を測定した。その結果、コントロール細胞に比べて *LARGE2* ノックアウト細胞ではストレス応答が増強されることが明らかとなった (図 5)。

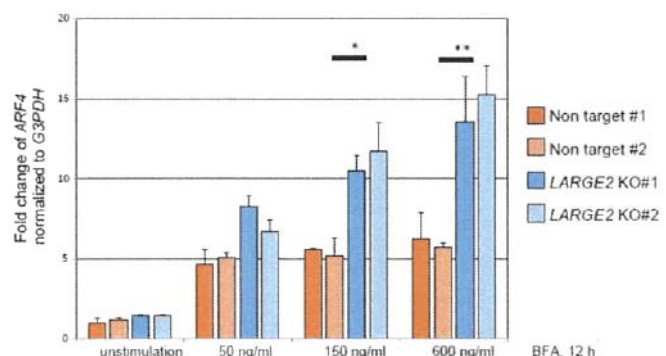


図 5. コントロールおよび *LARGE2* ノックアウト細胞におけるゴルジ体ストレス応答

ゴルジ体に局在する *LARGE2* をノックアウトすることにより、ゴルジ体の形態に変化がないかについて、シスゴルジのマーカーとして GM130 をトランスゴルジのマーカーとして TGN46 を染色して共焦点レーザー顕微鏡により観察した(図 6)。その結果、コントロール細胞、*LARGE2* ノックアウト細胞、および *LARGE2* 再構成細胞において顕著な差は認められなかったことから、*LARGE2* はゴルジ体の構造そのものの維持にはかかわっていないと考えられた。

さらに、*LARGE2* 再構成細胞において、導入した *LARGE2* の細胞内局在を観察してところ、ゴルジ体マーカー共局在したことから、予想された通り、*LARGE2* はゴルジ体に局在することがわかった(図 7)。

LARGE2 は、グリコシル-キシロシルトランスフェラーゼであり、ゴルジ体においてタンパク質の糖鎖修飾に関与すると報告されている。これまでのところ、その基質として α -ジストログリカンが知られているが、その他のタンパク質に対する機能は知られていない。本研究では内在性タンパク質を用いた解析は行っていないが、*LARGE2* ノックアウト細胞ではゴルジ体ストレス応答が増強され、タンパク質輸送が抑制されることが示唆された。今後、糖鎖解析などを用いて詳細な分析を行いたい。また、当初のスクリーニングの目的であった、SCN を含めヒト疾患の原因となる遺伝子の探索についても本研究で得られたデータセットの解析により続けていく予定である。

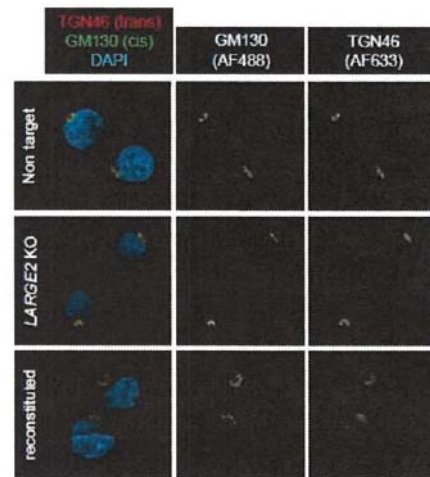


図 6. コントロールおよび *LARGE2* ノックアウト細胞におけるゴルジ体構造



図 7. *LARGE2* の細胞内局在