

## 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 2019年(平成31年)度

受付番号 201970003

氏名 黒田 友紀子

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： フィラデルフィア （国名： アメリカ ）

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。

3D ゲノム構造異常による先天異常発症メカニズム：CHOPS 症候群をモデルとして

3. 派遣期間：令和 元年 9 月 1 日 ～ 令和 3 年 8 月 31 日（ 731 日間）

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： Children's Hospital of Philadelphia

部局名： Human Genetics

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、英語で記入も可)**

## 【記載事項】

- ・ 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
  - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等
- (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。

発生段階での遺伝子発現異常が先天異常の発症に関与することが知られている。DNA メチル化やヒストン修飾をはじめとしてエピゲノム修飾異常が個体発生に重篤な影響を与えることが知られているが、3D ゲノム構造制御による遺伝子発現制御も遺伝子発現制御に大きな役割を果たすことが明らかになってきた。発生過程において3D ゲノム構造はダイナミックに変化することが知られている。近年、染色体構造異常により引き起こされる局所的な3D ゲノム構造異常が四肢異常といった先天異常を引き起こすことが明らかになった。しかしながら、ゲノムワイドな3D 高次構造異常がヒト初期発生にどのような影響を及ぼすかは明らかになっていない。3D ゲノム構造異常がどのように先天異常発生につながるのかを明らかにするために研究をすすめた。

今回は *NKAP* 遺伝子異常症をモデルにゲノム構造異常がどのように先天異常症候群を発症するのかを研究をおこなった。当初のモデルとして考えていた CHOPS 症候群の原因遺伝子である *AFF4* とともに *NKAP* は核スペckル (nuclear speckle) に存在する分子である。

核スペckルは膜をもたず liquid phase separation により droplet 構造を形成し、周辺よりも

タンパク濃度がやや濃い凝集体として核内に存在する。含まれているタンパクの半分以上が RNA 転写とスプライシングの過程に関わるタンパクであり、スプライシングが行われているゲノムの近くに形成される。さらにタンパクリン酸化などの修飾に関わる酵素も存在し、翻訳後タンパク修飾にも関わっていることが明らかになっている。ゲノムの 3D 構造を解析する Hi-C 解析でも活発に転写が行われているゲノム領域 (Hi-C compartment A) に核スペckルが存在しており、核スペckルはゲノム 3D 構造の形成を担っていると予想される。*AFF4* や *NKAP* 以外にも核スペckルに存在する分子をコードする遺伝子が先天異常症候群の原因となる例が報告されている。Mandibulofacial dysostosis with microcephaly の原因である *EFTUD2* や ZTTK 症候群の原因である *SON* などがあげられる。核スペckルの機能異常が 3D ゲノム構造異常をきたし先天異常を発症することが想定された。

NKAP 異常症は知的障害、自閉症、骨格奇形、マルファン体形を特徴とする先天異常症候群であり 2019 年に当研究室より発表された [Fiordaliso SK et al., AJHG 2019]。NKAP はヒストン脱アセチル化酵素である HDAC3 とともに働いて転写を調整するだけではなく、核スペckルに存在し、RNA スプライシングや染色体分配など複数の機構に関わる分子である。NKAP 異常症は X 連鎖遺伝形式をとり患者はいずれも男性で、知的障害、筋緊張低下、Marfan 症候群に類似した細長い手指や胸郭変形 (Marfan 様体型) などの骨格異常を持ち、共通した顔貌などの身体的特徴を認めた。さらに一部の患者では中心性肥満や僧帽弁逆流、心房・心室中隔欠損、大動脈拡張などの心血管系異常や泌尿器系の異常など全身の症状を認めた。変異は患者間で重複しており HDAC3 の結合部位である C 末端部位 (codon 330-361) に集中し、8 家系 10 人のうち 5 種類の変異 (p. Arg330Cys, p. Arg330His, p. Arg333Gln, p. Ile337Thr, p. Arg361Gln) を同定した。患者由来のリンパ芽球での RNA シークエンスから 455 遺伝子での発現増加、721 遺伝子での発現減少を認め、*NKAP* 以外の遺伝子発現へ影響を与えていることが明らかになった。ゼブラフィッシュの *nkap* 遺伝子 C 末端に 1 塩基欠失を有する機能喪失変異モデルで検討を行った結果、ヘテロ接合体には表現型異常は認めなかったが、ホモ接合体変異体では受精後 4 日以内に眼の浮腫や中枢神経の壊死、脊椎の変形をきたして全例が死亡し、胚発生に必須の遺伝子であることが確認された。同変異では mRNA が発現しており、NMD (nonsense-mediated mRNA decay) をきたさない機能喪失変異であった。

NKAP 異常症をモデルに、NKAP 変異によりどのようなゲノム高次構造異常が発症するのか、個体発生段階における影響をしらべた。

#### NKAP mAID 細胞を用いた機能解析：ChIP(クロマチン免疫沈降)解析、biotin IP 解析

これまでの研究より異常症は *NKAP* 遺伝子の機能喪失により発症に至っていることから、機能喪失モデルである mAID 細胞による解析を進めた。mAID 細胞は siRNA と異なり目的の遺伝子を速やかにかつ可逆的にノックダウンを行うことができる。これは AID (mutant Auxin-inducible degron) にタグづけされた標的タンパクが auxin (IAA) 投与により速やかに分解される仕組み (Auxin-inducible degron technology) を利用した [Natsume et al., Cell Reports 2016]。タンパク分解のため機能する SCF<sup>0sTIR1</sup> E3 ligase complex を形成する OsTIR1 は Tet (Dox) により発現するようになっており、Dox と IAA の投与により速やかに mAID (mini AID) にタグづけされた標的タンパクが分解される (図 1)。NKAP を標的とした mAID 細胞 (NKAP mAID cell) がすでに樹立されており開始後 24 時間で完全に NKAP タンパク発現は認められないことを確認した。NKAP タンパクを欠乏させた細胞の核は、明らかなクロマチン形態異常が確認された。これらのデータから NKAP が核内のクロマチ

ン構造制御に関与していることが示唆された。

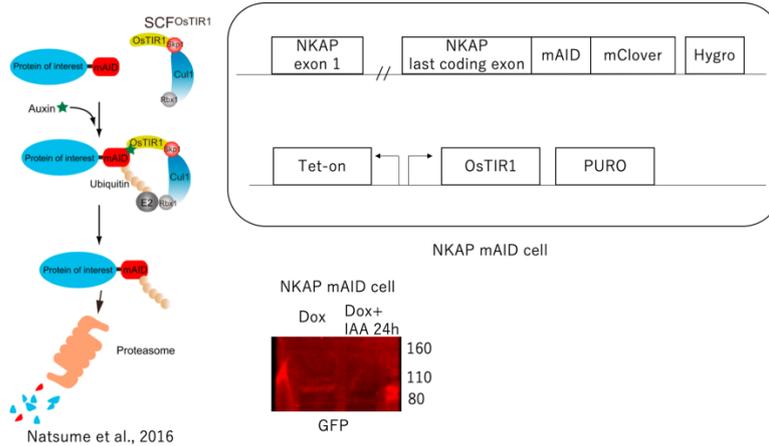


図 1.

(左) mAID によるタンパク分解

[引用 : Natsume et al., 2016]

(右上) NKAP mAID 細胞

(右下) NKAP mAID 細胞への

IAA 投与 24 時間後のタンパク

発現 (80-110 kDa,

western blotting, GFP-Ab)

*NKAP* mAID 細胞を用いた ChIP 解析により *NKAP* のゲノムとの結合、局在部位とゲノム高次構造を解析した。ChIP に適した *NKAP* 抗体がなく、mAID 細胞は GFP をタグに持つことから GFP 抗体による ChIP を行ったが、GFP 抗体による ChIP では優位なピークを得ることができなかった。*NKAP* は可溶性が困難なタンパクであることから ChIP が困難である可能性が考えられた。

ChIP で解析困難な *NKAP* に対して APEX2 (ascorbate peroxidase enzyme) によるビオチン化機構を用いて *NKAP* タンパクとその近傍に存在する分子をビオチン化することで *NKAP* の機能を解明することが可能と考えた [Padron et al., Mol Cell 2019]。この手法により *NKAP* タンパクの RNA 結合、タンパク結合因子を解析することとした。*NKAP* mAID 細胞の C 末に APEX2 タグを挿入した細胞ライン (*NKAP*-mAID-APEX2 細胞) を CRISPR/Cas9 でのゲノム編集により樹立してビオチン化を試みたが、*NKAP* タンパクおよびその近傍タンパクともにビオチン化されなかった。この手法の問題点として APEX2 を付加したタンパク発現量が少ない場合にはビオチン化がされないことから *NKAP* は生理的発現量でのビオチン化は困難であることがわかった。*NKAP*-APEX2 ベクターをトランスフェクションにより *NKAP* mAID 細胞に一過性に導入しビオチン化を行なったところ、ビオチン化分子を検出することができた (図 2)。*NKAP* mAID 細胞を用いることにより、内在性の *NKAP* を IAA 投与により depletion し、ベクターと置き換えた上でビオチン化を行うこともできる。患者変異と同じ R361 変異を導入した *NKAP* R361-APEX2 ベクターも mutagenesis により作成し、今後ビオチン化 RNA、ビオチン化タンパクの免疫沈降を進める計画である。

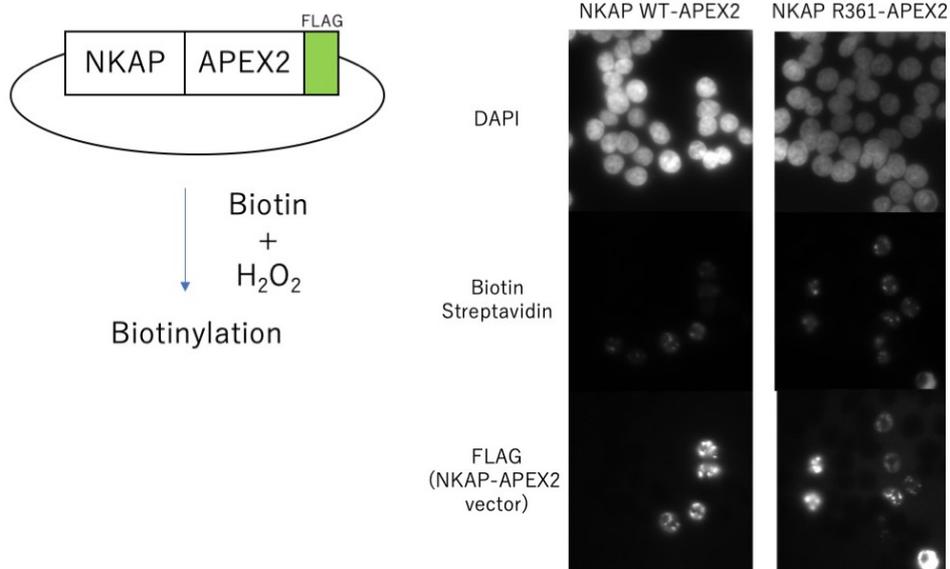


図 2. (左) *NKAP*-APEX2 ベクターの構築とビオチン化過程 (右) ビオチン化分子の検出、streptavidin 標識抗体を用いた biotin 化分子の免疫染色とベクターの免疫染色。FLAG ベクターを *NKAP* mAID 細胞にトランスフェクション後、biotin tyramide と  $H_2O_2$  を投与して *NKAP* と近傍に存在する分子のビオチン化を検出することができた。

### NKAP と関連する分子の機能解析

*NKAP* と関連する遺伝子についても、mAID 細胞の樹立をすすめた。関連タンパクの mAID 細胞を CRISPR/Cas9 でのゲノム編集により樹立することができた。GFP、ターゲット分子の抗体を用いた免疫染色と western blotting により IAA 投与により標的タンパクの発現が多数の細胞で消失することを確認した (図 3)。今後これらの細胞を用いて、関連タンパクのノックダウンにより *NKAP* の核内分布やの核スペckル構造への影響、タンパク発現解析をすすめる予定である。

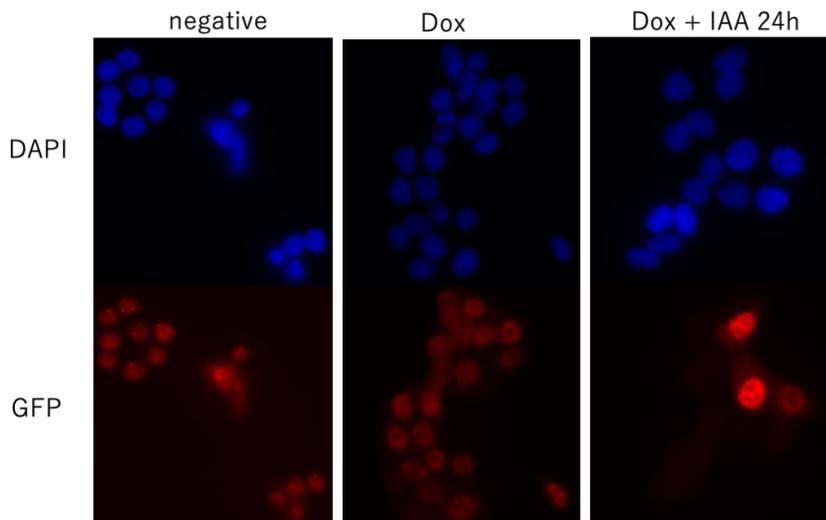


図 3. 新たに作成した mAID 細胞の免疫染色 IAA 投与によりほとんどの細胞で GFP(標的タンパク)が消失している。

## NKAP 変異マウス (疾患モデル) の解析

患者と同じ変異(p. Arg361 (R361))をもつ *Nkap* R361 変異マウスを CRISPR/Cas9 により当研究室で作成した。*NKAP* 遺伝子異常は知的障害、中枢神経構造異常を認めることから特に脳の機能解析を行った。*NKAP* 異常症は X 連鎖遺伝形式をとり、男性で症状を認める。R361 変異マウスオスと野生型コントロールオスマウス 11 週齢で脳切片のマクロ染色、NKAP モノクローナル抗体の組織免疫染色を行った。マクロの HE 染色では明らかな脳構造異常や層構造の異常は認めなかった。また、組織免疫染色では明らかな NKAP の分布のちがいは認めなかった。細胞内の局在を調べるため、大脳皮質、海馬の神経細胞を培養(primary neuron cell culture)して免疫染色による検討をおこなったが、NKAP タンパクの局在に大きな変化は認められなかった(図 4)。日齢 5 の *Nkap* R361 変異オスマウスでは NKAP 発現量に変動は認められず、患者と同様に遺伝子発現量の変化ではなく機能に影響を与えていると考えられた。

同じく 8 週齢オスで脳の RNA シークエンスにより、遺伝子発現のちがいを検討した。RNA 抽出は大脳皮質と海馬にわけておこなった。大脳皮質では明らかな発現変動を認めなかったが、海馬では 15 個の遺伝子で変異マウスにおける発現低下を認めた。発達段階ではより多くの遺伝子発現変動が認められる可能性があることから、新生仔期での解析も進める計画である。

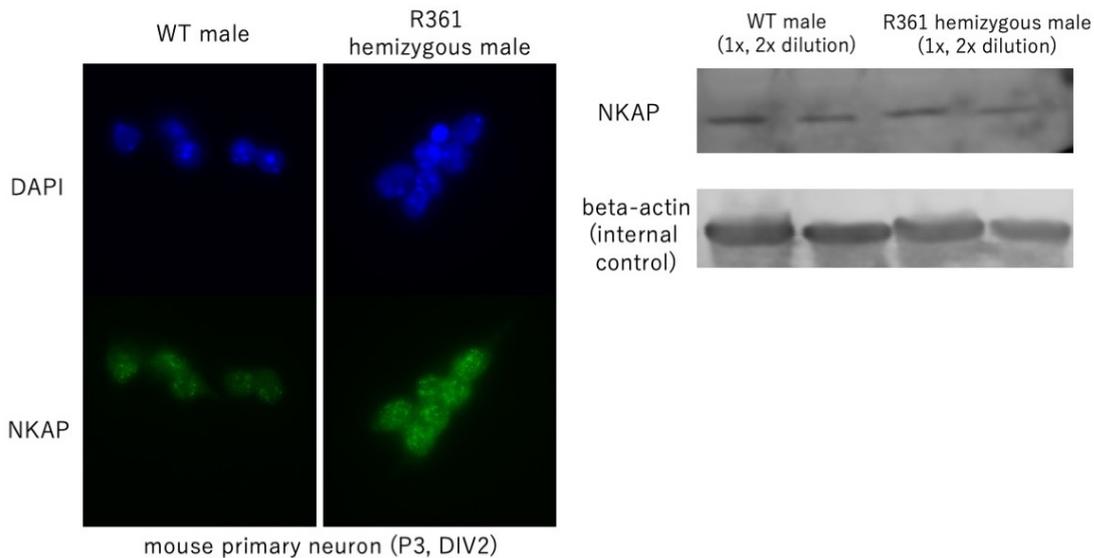


図 4. (左) *Nkap* R361 オス変異マウス (P3) より 2 日間培養した初代培養ニューロンでの NKAP 免疫染色。局在は WT コントロールと比較して大きな差はなかった。(右) *Nkap* R361 オス変異マウス前脳(大脳皮質・海馬、P5)の NKAP タンパク発現。WT コントロールと比較して発現量に大きな差はなかった。