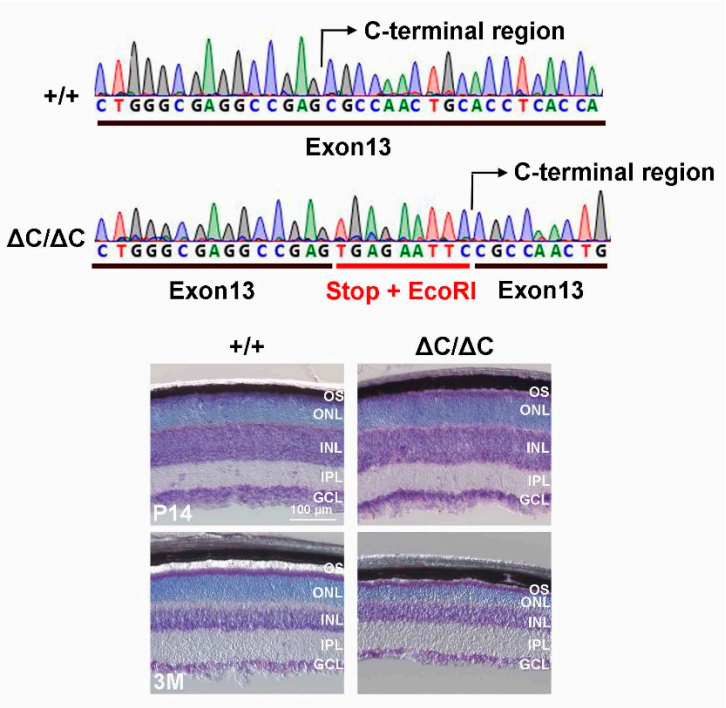
152　疾患モデルを用いた繊毛病に対する治療法の探索	茶屋　太郎

【目的】繊毛は細胞の表面に突出した微小管を軸とした細胞小器官であり、生物の発生や恒常性維持に重要な役割を担っている。ヒトにおける繊毛の機能不全は、水頭症、網膜色素変性症、嚢胞腎、肥満、糖尿病、不妊、内臓逆位、難聴、多指症、短肢症などの症状が見られる「繊毛病」と呼ばれる一群の疾患を引き起こす。しかし、繊毛病の根本的な治療法はまだ確立されておらず、繊毛病の発症・病態メカニズムについてもまだ不明な点が多く残っている。私たちは以前、互いに相同性の高いセリンスレオニンキナーゼである Intestinal cell kinase（Ick）と Male germ cell-associated kinase（Mak）が、繊毛内タンパク質輸送と繊毛の長さを制御することを明らかにした。ヒト *ICK* 遺伝子のミスセンス変異は、致死となる繊毛病の原因であることが報告されている。また、ヒト *MAK* 遺伝子の変異は網膜色素変性症の原因となることが知られている。

【方法】繊毛病の分子病態メカニズムを明らかにするため、Ick と相互作用する分子を酵母ツーハイブリッド法により探索し候補因子を得て、免疫沈降法によって Ick や Mak との結合部位を同定した。結合部位を欠損するマウスを CRISPR/Cas9 法を用いたノックインにより作製し、網膜における組織学的解析を行った。

【結果】Ick と相互作用する分子をスクリーニングにより探索し、繊毛病原因遺伝子として知られる *Serologically defined colon cancer antigen 8*（*Sdccag8* ）を候補因子として同定した。免疫沈降法によって、Ick と Mak は Sdccag8 の C 末端領域（Sdccag8-C）と相互作用することが明らかとなった。ヒト SDCCAG8 の C 末端領域を欠損させると考えられる短縮型変異が、網膜の変性などの様々な臓器の異常と関連すると報告されていることを踏まえ、私たちは、*in vivo* における Sdccag8-C の役割を明らかにするために、ゲノム編集を用いて Sdccag8-C が欠失するように終止コドンをノックインした *Sdccag8* 部分欠失（*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$）マウスを作製した。*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスを解析したところ、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$ マウスは、繊毛病で見られる表現型の 1 つである網膜変性を示した。また、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$ マウスの表現型は、*Ick* 欠損マウスや *Mak* 欠損マウスの表現型と一部類似していた。以上の結果から、Sdccag8-C は繊毛形成に必要であること、Sdccag8 は Ick、Mak と機能的に相互作用していることが示唆された。本研究により、繊毛病原因タンパク質の相互作用ネットワークと繊毛病の病態メカニズムの一端が解明されたと考えられる。

Sdccag8 $^{\Delta C/\Delta C}$マウスの作製と網膜における表現型解析



152. 疾患モデルを用いた繊毛病に対する治療法の探索

茶屋　太郎

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能学研究部門 分子発生学研究室

Key words：繊毛，繊毛病，網膜，マウス，ゲノム編集

緒　言

繊毛は細胞の表面に突出した微小管を軸とした細胞小器官であり、生物の発生や恒常性維持に重要な役割を担っている。ヒトにおける繊毛の機能不全は、水頭症、網膜色素変性症、嚢胞腎、肥満、糖尿病、不妊、内臓逆位、難聴、多指症、短肢症などの症状が見られる「繊毛病」と呼ばれる一群の疾患を引き起こす。しかし、繊毛病の根本的な治療法はまだ確立されておらず、繊毛病の発症・病態メカニズムについてもまだ不明な点が多く残っている。

私たちは以前、互いに相同性の高いセリンスレオニンキナーゼである Intestinal cell kinase（Ick）と Male germ cell-associated kinase（Mak）が、繊毛内タンパク質輸送と繊毛の長さを制御することを明らかにした［1〜3］。ヒト *ICK* 遺伝子のミスセンス変異は、致死となる繊毛病の原因であることが報告されている。また、ヒト *MAK* 遺伝子の変異は網膜色素変性症の原因となることが知られている。私たちは、繊毛病の分子病態メカニズムを明らかにするため、Ick と相互作用する分子をスクリーニングにより探索し、繊毛病原因遺伝子として知られる *Serologically defined colon cancer antigen 8*（*Sdccag8* ）を候補因子として同定した。免疫沈降法によって、Ick と Mak は Sdccag8 の C 末端領域 （Sdccag8-C）と相互作用することが明らかとなった。ヒト SDCCAG8 の C 末端領域を欠損させると考えられる短縮型変異が、網膜の変性などの様々な臓器の異常と関連すると報告されている。私たちは、*in vivo* における Sdccag8-C の役割を明らかにするために、ゲノム編集を用いて Sdccag8-C が欠失するように終止コドンをノックインした *Sdccag8* 部分欠失（*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$）マウスを作製した。*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスを解析したところ、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスは、繊毛病で見られる表現型の 1 つである網膜変性を示した。また、*Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウスの表現型は、*Ick* 欠損マウスや *Mak* 欠損マウスの表現型と一部類似していた。以上の結果から、Sdccag8-C は繊毛形成に必要であること、Sdccag8 は Ick、Mak と機能的に相互作用していることが示唆された。本研究により、繊毛病原因タンパク質の相互作用ネットワークと繊毛病の病態メカニズムの一端が解明されたと考えられる［4］。

方　法

1. 免疫沈降法

HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した発現プラスミド、HA タグを付加した発現プラスミドを共発現させた。遺伝子導入から 48 時間後に細胞培養液を除き、Tris-buffered saline で 2 回洗浄した。Lysis buffer（20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、1 mM EDTA、1 mM PMSF、2 μg／μL leupeptin、5 μg／μL aprotinin、3 μg／μL pepstatin A）で細胞を懸濁した。その細胞溶解液に対して 15,100 g、5 分間による遠心分離を 2 回行った。上清に対して Anti-FLAG M2 Affinity Gel（Sigma-Aldrich）を加え 4℃で一晩反応させた。Wash buffer（20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、1 mM EDTA）を用いて一晩反応させたビーズを 5 回洗浄後、Elution buffer（20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、5 mg/ml 1×FLAG peptide）を用いて 4℃で 30 分間溶出させた。溶出した上清に 2×SDS サンプルバッファーを加え室温で 30 分間反応させた。サンプルはウェスタンブロッティングにより解析した。

2. *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウスの作製

Sdccag8$^{\Delta C/\Delta C}$マウスは Alt-R CRISPR-Cas9 system（IDT）を用いて作製した。crRNA（IDT）は CRISPRdirect（http://crispr.dbcls.jp/）を用いて *Sdccag8* 遺伝子のエクソン 13 を標的とするように設計した。また、Arg537Stop コドンおよび EcoRI 認識配列とその両側に 60 bp の *Sdccag8* 遺伝子と相同配列を持つ一本鎖 DNA（ssDNA）（IDT）を設計した。crRNA と tracrRNA（IDT）は duplex buffer（IDT）中、37℃で 5 分間反応し室温に戻した。guideRNA 複合体は Cas9 nuclease 3NLS（IDT）と混和し室温で 5 分間の反応ののち、Opti-MEM（Gibco）中で ssDNA と混和した。ribonucleoprotein 複合体と ssDNA は B6C3F1 マウスの受精卵にエレクトロポレーションした。ファウンダーマウスは C57BL/6J マウスとバッククロスした。

3. 免疫組織化学染色

マウスの眼球は 4% paraformaldehyde/phosphate-buffered saline（PBS）を用いて室温で 15 秒、5 分または 10 分間固定し、OCT compound 4583（Sakura）に包埋した。クライオスタットにより 20 μm の厚さの凍結切片を作製し、免疫組織化学染色に使用した。凍結切片を PBS で洗浄後、5%正常ロバ血清／0.1% Triton X-100/PBS を用いて室温で 30 分間ブロッキングを行った。その後 5%正常ロバ血清／0.1% Triton X-100/PBS で希釈した 1 次抗体を 4℃で一晩反応させた。1 次抗体反応終了後 PBS で洗浄し、5%正常ロバ血清／0.1% Triton X-100/PBS で希釈した 2 次抗体および核染色試薬 DAPI（ナカライテスク）を室温で 2 時間反応させた。2 次抗体反応終了後、切片は PBS を用いて洗浄し、Gelvatol で封入した。標本はレーザー共焦点顕微鏡 LSM700（Carl Zeiss）により観察した。

結　果

1. Ick と Mak は Sdccag8 の C 末端領域と相互作用する

繊毛病の分子メカニズムを調べるために、私たちは酵母ツーハイブリッド法により Ick と結合するタンパク質をスクリーニングし Sdccag8 を同定した。まず、私たちは HEK293T 細胞を用いた免疫沈降により、Ick と Mak が全長の Sdccag8（Sdccag8-FL）と相互作用することを確認した（図 1）。ヒト SDCCAG8 は 8 つの coiled-coil モチーフから構成されると予想されており、これに基づいて N 末端領域、真ん中の領域、C 末端領域の 3 つの領域に分割することができる。Sdccag8 のどの領域が Ick や Mak と相互作用するか調べるために、私たちはマウス Sdccag8 を N 末端領域（Sdccag8-N）、真ん中の領域（Sdccag8-M）、C 末端領域（Sdccag8-C）の 3 領域に分割し、それらと Ick あるいは Mak との相互作用を免疫沈降法により調べた。その結果、Ick と Mak は Sdccag8-C とは相互作用したが、Sdccag8-N や Sdccag8-M とは相互作用しなかった（図 1）。これらの結果から、Ick と Mak は Sdccag8-C と相互作用することが示唆された。

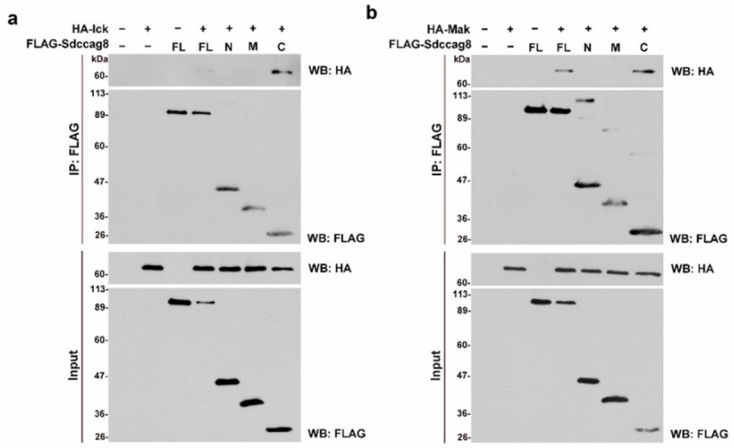


図 1. Sdccag8 と Ick および Mak との相互作用

a）Ick と Sdccag8-FL、Sdccag8-N、Sdccag8-M および Sdccag8-C との免疫沈降解析。

b）Mak と Sdccag8-FL、Sdccag8-N、Sdccag8-M および Sdccag8-C との免疫沈降解析。

2. Sdccag8 の C 末端領域の欠損は網膜変性を引き起こす

Sdccag8-C の生体における役割を調べるために、私たちは CRISPR/Cas9 システムを用いて *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスを作製した。*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスにおいては、Sdccag8-C をコードする DNA 配列の前に終止コドンと制限酵素 EcoRI の認識配列をノックインした（図 2a）。EcoRI 認識配列は終止コドンの検出を促進するために挿入した（図 2b）。

網膜における Sdccag8-C の役割を調べるために、私たちは野生型と *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスの網膜切片を用いた組織学的解析を行った。トルイジンブルー染色を行ったところ、生後 14 日目の野生型と *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜では有意な差は認められなかったが、生後 6 週以降において *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の視細胞層の厚みが進行性に薄くなっていた（図 3a、b）。一方、野生型と *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$ マウス網膜の他の層の厚みには有意な差は見られなかった（図 3a、c）。これらの結果から、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$ マウスは進行性の網膜視細胞変性を示すことが明らかとなった。*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の外節を観察するために、私たちはロドプシン（桿体視細胞の外節のマーカー）、青色オプシン（青色錐体視細胞の外節のマーカー）、緑色オプシン（緑色錐体視細胞の外節のマーカー）に対する抗体を用いて網膜切片の免疫組織化学染色を行った。生後 14 日目の *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜において外節の乱れと、ロドプシン、青色オプシン、緑色オプシンの視細胞の細胞体への異所性の局在が観察された（図 3d）。Sdccag8 の視細胞における局在を調べるために、私たちは *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の視細胞において Sdccag8 とγチューブリンを免疫染色し、野生型マウス網膜の視細胞と比較して *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の視細胞では基底小体における Sdccag8 のシグナルが減弱しており（図 3e）、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の視細胞においては Sdccag8 の基底小体への局在が弱くなっていることが示唆された。また、私たちはアセチル化αチューブリンを免疫染色し、野生型マウス網膜と比較して *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜においては視細胞の繊毛の数が有意に減少していた（図 3f、g）。予想に反して私たちは野生型マウス網膜と比較して *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜においては、長い視細胞の繊毛が多くなっていた（図 3f、h）。これらの結果から、Sdccag8-C は視細胞の繊毛形成に必須であることが示唆された。

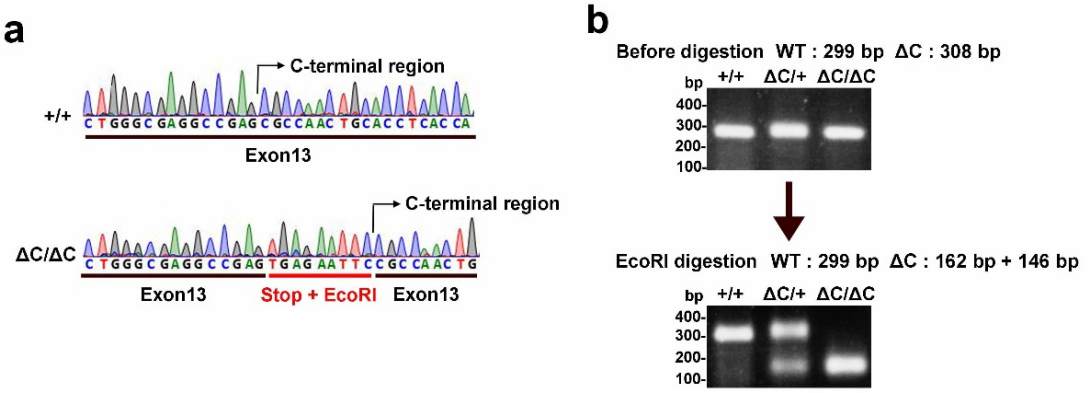


図 2. *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスの作製

a) 野生型と *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスにおける Sdccag8 の C 末端領域周辺をコードする DNA 配列。

b) 野生型、*Sdccag8* $^{\Delta C/+}$、*Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$マウスの PCR 解析。*Sdccag8* $^{\Delta C/+}$マウスと *Sdccag8* $^{\Delta C/\Delta C}$ マウスからの PCR 産物は制限酵素 EcoRI により切断された。

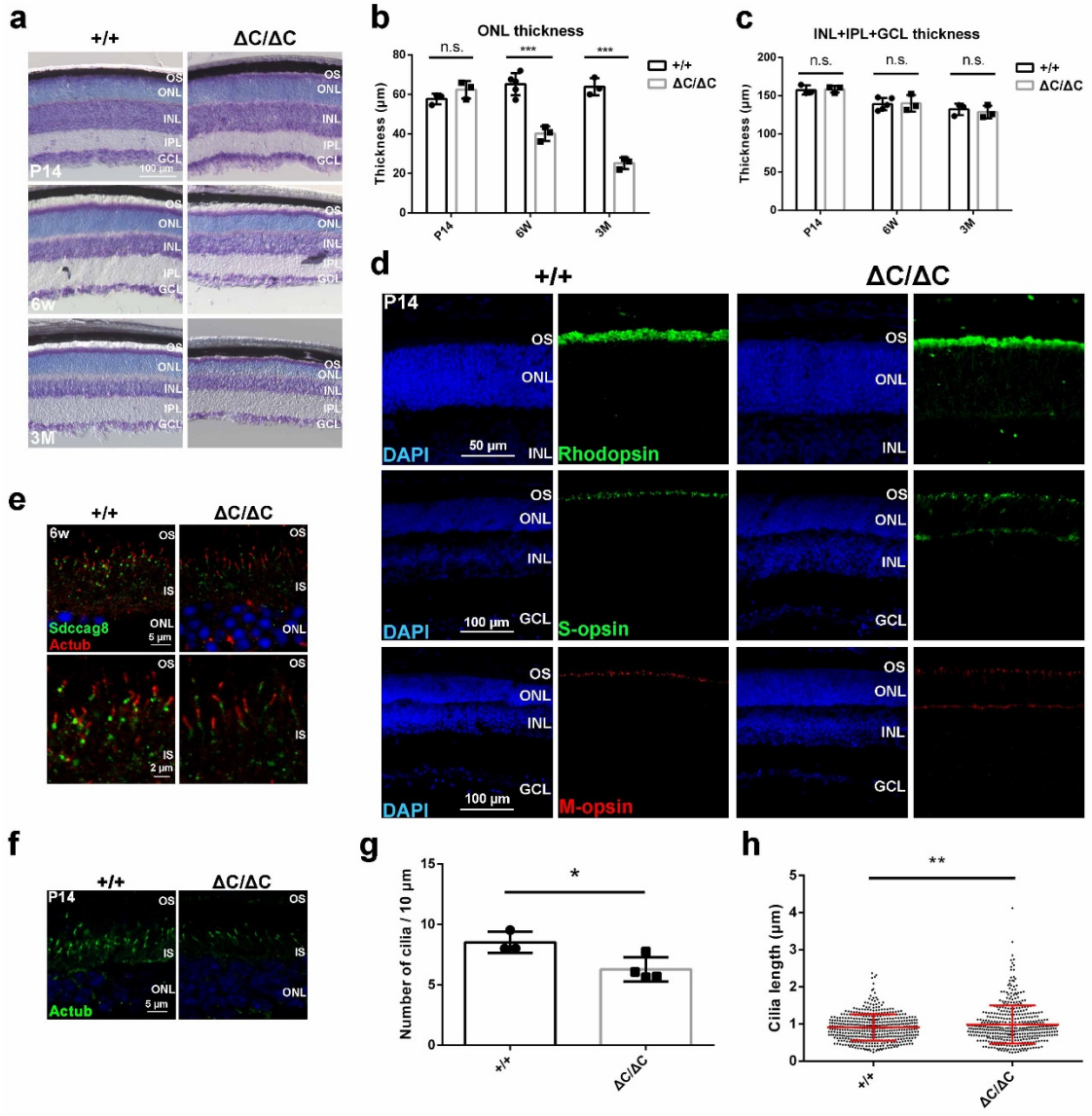


図 3. *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の解析

a) 生後 14 日齢、6 週齢、3 か月齢の野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウスの網膜切片を用いたトルイジンブルー染色。スケールバー：100 μm。

b, c) a）をもとに野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウス網膜の ONL（b）と INL+IPL+GCL（c）の厚さを定量化した。n.s.：有意差なし、***P<0.001（unpaired t test）。

d) 生後 14 日齢の野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：50 μm（上）、100 μm（真ん中、下）。

e) 6 週齢の野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$ マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：5 μm（上）、2 μm（下）。

f) 生後 14 日齢の野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$マウスの網膜切片を用いた免疫染色。スケールバー：5 μm。

g, h) f）をもとに野生型と *Sdccag8*$^{\Delta C/\Delta C}$ マウス網膜の視細胞の繊毛の数（g）と長さ（h）を定量化した。*P<0.05、**P<0.01（unpaired t test）。

OS：外節、IS：内節、ONL：外顆粒層（視細胞層）、INL：内顆粒層、IPL：内網状層、GCL：神経節細胞層。

考　察

ヒトの *SDCCAG8* 遺伝子において、SDCCAG8 の C 末端領域を欠失すると予想される変異が網膜変性をはじめとした多様な臓器の障害と関連することが報告されている。私たちの結果より、Sdccag8-C は Sdccag8 の中心体や基底小体への局在に必要な Ick や Mak との結合モジュールを構成し、繊毛形成とそれに関連した臓器の発生や恒常性維持に必須であることが示唆された。本研究により、*SDCCAG8* 遺伝子の変異と関連した繊毛病の病態メカニズムに対する知見を得ることができた。今後の Sdccag8 と Ick および Mak との関係に焦点を当てた研究により、詳細な繊毛病の分子病態メカニズムの理解が進むことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所分子発生学研究室の古川貴久教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1) Omori Y, Chaya T, Katoh K, Kajimura N, Sato S, Muraoka K, Ueno S, Koyasu T, Kondo M, Furukawa T. Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 28;107(52):22671-6. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21148103 doi: 10.1073/pnas.1009437108.

2) Chaya T, Omori Y, Kuwahara R, Furukawa T. ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. EMBO J. 2014 Jun 2;33(11):1227-42. Epub 2014 May 5. PMID: 24797473 doi: 10.1002/embj.201488175.

3) Okamoto S, Chaya T, Omori Y, Kuwahara R, Kubo S, Sakaguchi H, Furukawa T. Ick Ciliary Kinase Is Essential for Planar Cell Polarity Formation in Inner Ear Hair Cells and Hearing Function. J Neurosci. 2017 Feb 22;37(8):2073-2085. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28115485 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3067-16.2017.

4) Tsutsumi R, Chaya T, Tsujii T, Furukawa T. The carboxyl-terminal region of SDCCAG8 comprises a functional module essential for cilia formation as well as organ development and homeostasis. J Biol Chem. 2022 Feb 4;298(3):101686. PMID: 35131266 doi: 10.1016/j.jbc.2022.101686.