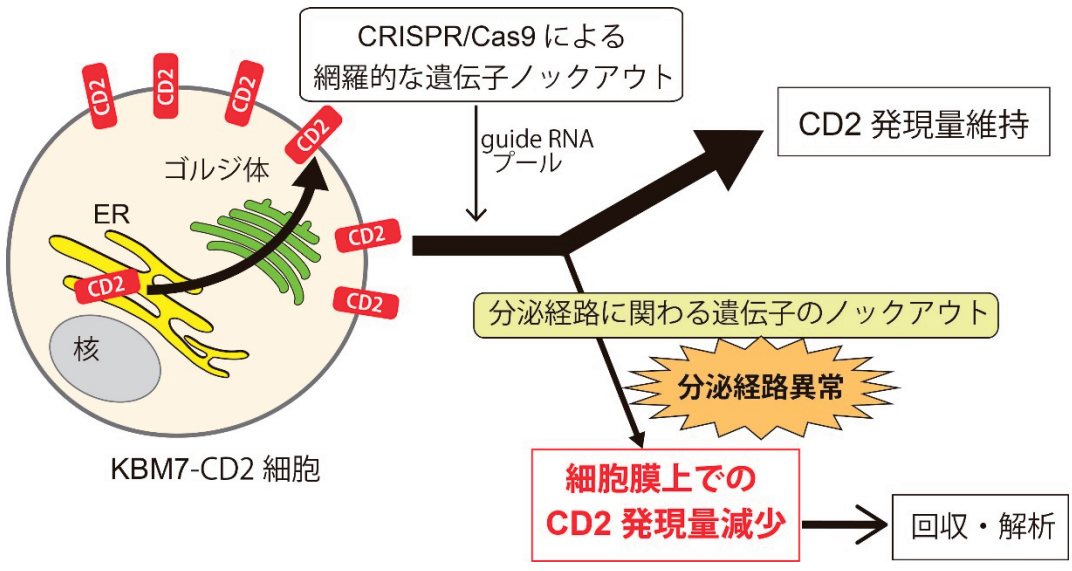
125　タンパク質分泌経路の分子機構の解析	立松　恵

【目的】骨髄系細胞におけるタンパク質分泌経路において重要な機能をもつ新規分子を探索する。さらに、タンパク質分泌経路の破綻が発症機序に関与することが示唆されている、重症先天性好中球減少症（SCN）の新たな責任遺伝子を同定することを目的とする。

【方法】本研究では、骨髄系細胞において分泌経路に着目したノックアウトスクリーニングを行うこととした。骨髄系細胞においてタンパク質分泌経路に関わる分子群を網羅的に解析するため、慢性骨髄性白血病細胞株である KBM7 細胞において、CD2 をレポーターとする分泌経路の新規モニターシステムを構築した。CD2 発現強度の減弱が分泌経路の機能障害を反映することは、小胞体ストレス誘導剤の添加および初期分泌経路に関与する分子のノックダウンを行って確認した。CRISPR ノックアウトスクリーニングではゲノムワイドの single-guide RNA（sgRNA）ライブラリ用いて遺伝子を網羅的にノックアウトし、分泌経路に障害を引き起こした細胞群を回収して次世代シークエンスにより解析した。さらに、スクリーニングで得られた遺伝子についてタンパク質分泌経路における役割を調べるために、KBM7 細胞に CD2-ERHook を導入して可逆的タンパク質繋留（RUSH：Retention using selective hooks）システムを構築した。候補遺伝子の個別のノックアウト細胞を作製して RUSH システムにより、タンパク質分泌経路のどの部分で機能するのかを調べた。

【結果】KBM7 細胞におけるノックアウトスクリーニングの結果、CD2 自身も含めて 325 遺伝子がヒットした。このうち、膜タンパク質であり小胞体およびゴルジ体に発現することが知られている分子に特に着目していくつかの遺伝子について個別のノックアウト株を作製し、同様のシステムにより、CD2 分子の細胞膜発現の減弱を確認した。さらに、RUSH システムの利用により、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 *LARGE2* 遺伝子のノックアウト細胞において、タンパク質輸送がゴルジ体で停止することが明らかとなった。LARGE2 分子の強制発現による再構成実験において、タンパク質分泌経路が部分的ながら回復することも確認した。*LARGE2* のノックアウト細胞において、薬剤誘導によるゴルジ体ストレス応答が亢進したことから、LARGE2 はゴルジ体ストレスを制御することにより、正常なタンパク質分泌経路の維持に寄与することが示唆された。

ノックアウトスクリーニングの概念図



125. タンパク質分泌経路の分子機構の解析

立松　恵

秋田大学 大学院医学系研究科 微生物学講座

Key words：タンパク質分泌経路，骨髄系細胞，ゴルジ体ストレス

緒　言

本研究では、骨髄系細胞におけるタンパク質分泌経路において重要な機能をもつ新規分子を探索し、さらに重症先天性好中球減少症（SCN）の新たな責任遺伝子を同定することを目的とする。

SCN は、好中球分化障害により成熟好中球が不足し、乳幼児期より重篤な感染症を繰り返す遺伝性疾患である。これまでに複数の SCN 責任遺伝子が報告されてきたものの、SCN 患者の 20～30%では原因となる遺伝子変異が不明である。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* や *JAGN1* の変異では、小胞体機能を含むタンパク質分泌経路の異常により好中球分化に障害が起こることが示唆されている［1～3］。しかしながら、SCN の発症メカニズムにおいてタンパク質分泌経路がどのように関与するのかはわかっていない。

これまで、小胞体およびゴルジ体機能、タンパク質膜輸送について数多くの研究がなされてきたが、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タンパク質分泌経路に関連する遺伝子群の同定を試みることとした。

方　法

1. タンパク質分泌モニターシステム

慢性骨髄性白血病細胞株 KBM-7 細胞に hCD2 を導入し、hCD2 の細胞膜上の発現量をタンパク質分泌経路機能の指標とした。CD2 は、T 細胞に発現する短鎖の I 型膜貫通タンパク質であり、小胞体からゴルジ体を通って細胞膜へ輸送される。KBM-7 に導入した CD2 の細胞膜上での発現量が、タンパク質分泌経路の機能異常を反映するかどうかについて、小胞体ストレッサーであるジチオスレイトール（DTT）およびツニカマイシン処理により調べた。

2. ノックアウトスクリーニング

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（gRNA）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。コントロールまたは single-guide RNA（sgRNA）ライブラリプラスミドより作製したレンチウイルスを KBM-7-hCD2 細胞に感染させ、感染細胞をピューロマイ

シン処理により選択した。

3. RUSH システム

KBM-7 細胞においてタンパク質輸送の経時的観察を可能にする可逆的タンパク質係留（RUSH：Retention using selective hooks）システムを導入した[4]。小胞体局在シグナルおよびストレプトアビジンをもつ ER-Hook と共に、ストレプトアビジン結合配列（SBP）と蛍光タンパク質を融合させた CD2 をレポーター分子として発現させた。したがって、CD2-GFP は、ストレプトアビジンと SBP との結合により、小胞体に係留された状態となる。そこに、ビオチンを細胞培養液中に添加すると、細胞内に取り込まれ、ビオチンがストレプトアビジンに競合的に結合することで、ER-Hook とレポーター分子 CD2-GFP が解離することとなる（図 1）。このことを利用すると、ビオチン添加時点からレポーター分子の小胞体から細胞膜への輸送を経時的に追跡することが可能となる。本研究では、ビオチン添加から 0 分、15 分、30 分、45 分、60 分後のレポーター分子の動きを、小胞体マーカーとして Calnexin、ゴルジ体マーカーとして GM130 を染色して共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

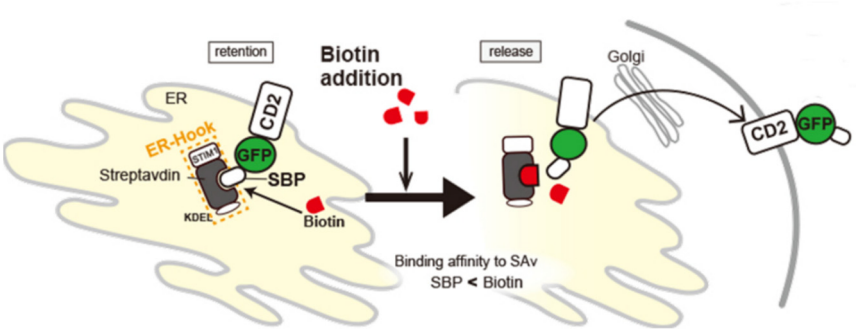


図 1. ER-Hook と CD2-GFP による RUSH システムの概要

4. ゴルジ体ストレス応答

ゴルジ体ストレス応答のうち、CREB3 経路を刺激するブレフェルジン A により 12 時間処理し、細胞を回収した。RNA を抽出して逆転写反応により cDNA を取得、定量 PCR により ARF4 および GAPDH の発現量を測定した。

結果および考察

1. CD2 レポーターによるタンパク質分泌経路のモニター

CD2 を発現させた KBM7-CD2 細胞において、DTT およびツニカマイシン処理後に CD2 の細胞表面での発現量をフローサイトメトリーにより測定した結果、CD2 の細胞表面発現が未処理細胞と比較して減少した（図 2）。このことから、CD2 の細胞膜発現は小胞体機能を障害すると減弱し、CD2 がレポーターとして機能することが分かった。

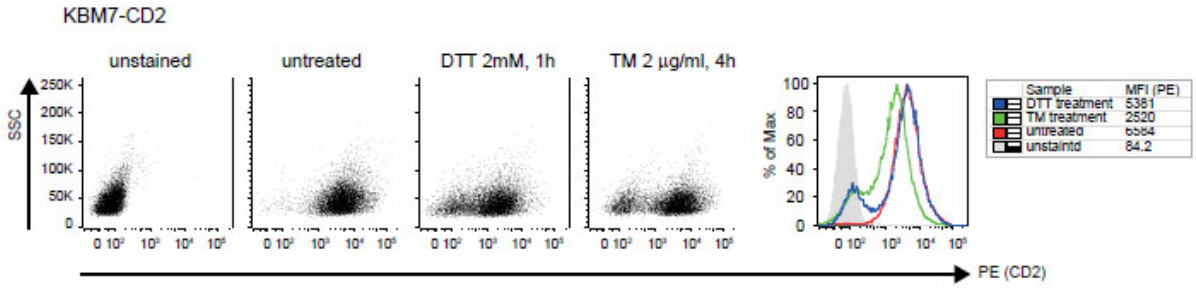


図 2. DTT およびツニカマイシン(TM)処理による CD2 発現の変化
KBM7-CD2 細胞において、DTT（2 mM）で 1 時間、ツニカマイシン（2 μg/mL）で 4 時間処理した後、細胞膜上の CD2 をフローサイトメーターにて測定した。代表的なプロットおよびヒストグラムを示す。

2. ノックアウトスクリーニング

sgRNA ライブラリプラスミド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。生存細胞について 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、sgRNA 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。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、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 2 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、次世代シークエ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 HiTSelct 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。

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る LARGE2 について、さらに機能解析を行うこととした。

3. *LARGE2* ノックアウト細胞におけるタンパク質分泌経路の障害

KBM-7 細胞に CD2-ER-Hook を導入し KBM7-CD2-RUSH 細胞を樹立した。*LARGE2* ノックアウト KBM7-CD2-RUSH 細胞とコントコール KBM7-CD2-RUSH 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 分後から 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 3）。

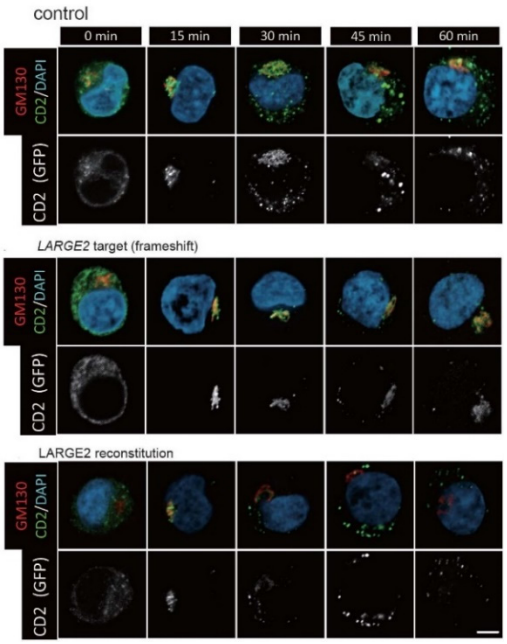


図 3. RUSH システムによるタンパク質輸送の経時的観察
KBM7-CD2-RUSH細胞を用いて、CD2の小胞体から細胞膜への輸送についてビオチン添加0分から60分後まで観察した（scale bar＝10 μ m）。

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。さらに、レンチウイルスを用いて *LARGE2* ノックアウト細胞に LARGE2 を発現させて再構成実験を行ったところ、*LARGE2* ノックアウト細胞におけるゴルジ体でのタンパク質輸送の停滞が部分的に回復された（図 3）。

4. *LARGE2* ノックアウト細胞におけるゴルジ体ストレス応答

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、ブレフェルジン A により 12 時間細胞を処理し、ARF4 の mRNA 発現を測定した。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 4）。また、*LARGE2* のノックアウトによってゴルジ体構造そのものには影響がないことを顕微鏡観察にて確認した。

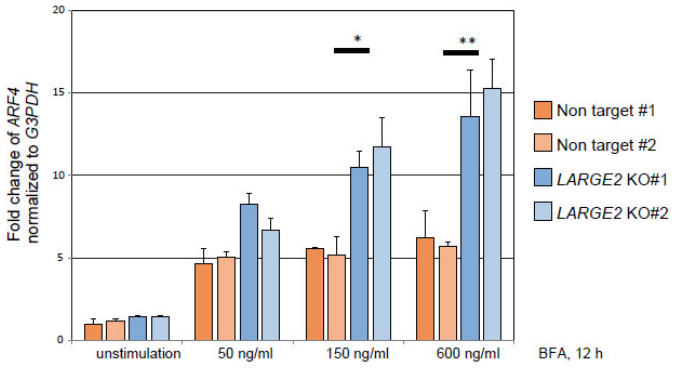


図 4. *LARGE2* ノックアウト細胞におけるゴルジ体ストレス応答
KBM7 細胞を用いて、ブレフェルジン A（BFA）添加後の ARF4mRNA 発現を RT-qPCR により測定した。*p＜0.05、**p＜0.01（t 検定）。

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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ミュンヘン大学付属小児病院クリストフ・クライン教授である。教授および研究室員には、本研究に多大なるご協力をいただき、心より感謝いたします。

文　献

1) Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, Xia J, Boxer LA, Dale D, Dinauer MC, Link DC. Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. Blood 2007 2007 Dec 15;110(13):4179-87. PMID: 17761833 DOI: 10.1182/blood-2006-11-057299

2) Boztug K, Järvinen P, Salzer E, Racek T, Mönch S, Garncarz W, Gertz EM, Schäffer AA, Antonopoulos A, Haslam SM et al. JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia. Nat Genet. 2014 Sep ;46(9):1021-7 PMID: 25129144 DOI: 10.1038/ng.3069

3) Linder MI, Mizoguchi Y, Hesse S, Csaba G, Tatematsu M, Łyszkiewicz M, Ziętara N, Jeske T, Hastreiter M, Rohlfs M et al. Human genetic defects in SRP19 and SRPRA cause severe congenital neutropenia with distinctive proteome changes Blood 2023 Feb 9;141(6):645-658..PMID: 36223592 DOI: 10.1182/blood.2022016783

4) Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, Mercanti V, Jollivet F, Raposo G, Perez F. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. Nat Methods. 2012 Mar 11;9(5):493-8. PMID: 22406856 DOI: 10.1038/nmeth.1928.