

【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) ライブラリを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ケ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繫留 (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注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

