

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06833

研究課題名（和文）核スペckル異常症病態機構の解明：NKAP関連症候群をモデルとして

研究課題名（英文）Molecular mechanism of nuclear speckle disorders: NKAP-related syndrome as a model

研究代表者

泉 幸佑（Izumi, Kosuke）

東京大学・定量生命科学研究所・客員准教授

研究者番号：40383707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は希少精神運動発達遅滞症候群であるNKAP関連症候群をモデルとして、核スペckルの異常がどのように細胞機能に影響を与えるかを検討し、NKAPの新たなRNA代謝制御因子としての役割・核スペckルの構造タンパクとしての役割を明らかにした。NKAPがSON/SRRM2といった核スペckル構成蛋白の細胞内局在を制御し、協調して核スペckル機能制御を行っていることが明らかになった。NKAPのみならず、SRRM2・SON遺伝子変異も精神運動発達遅滞を合併する希少疾患を引き起こすため、NKAP・SON・SRRM2の遺伝子変異により同様の分子機構により精神運動発達を発症する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核スペckル異常症は精神運動発達遅滞の原因として知られているが、その病態機構は不明であり、核スペckル異常症の治療法は確立されていない。我々はNKAP関連症候群をモデルとして、核スペckル異常症の分子病態を検討した。我々はNKAPのRNA代謝制御因子としての役割・核スペckルの構造タンパクとしての役割が明らかにし、NKAP/SRRM2/SONは協調して核スペckル機能を制御していることが明らかになった。NKAP同様SRRM2・SON遺伝子変異も精神運動発達遅滞を引き起こすためNKAP・SON・SRRM2の遺伝子変異による核スペckル異常症では、共通の創薬ターゲットが存在する可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this work, we investigated the molecular mechanism of NKAP-related syndrome, which is a prototype diagnosis of nuclear speckleopathies. We discovered two novel functions of NKAP and those include its role in RNA metabolism and structural maintenance of nuclear speckle. We discovered that NKAP depletion caused intranuclear distribution alterations of SON and SRRM2, two key interacting molecules of NKAP. As SON and SRRM2 are also in neurodevelopmental disorders, our finding suggests the possibilities that these neurodevelopmental disorders are due to the disruption of common molecular pathways.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：核スペckル ゲノム RNA代謝

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現調節は細胞機能調節の根底を担い、その制御機能破綻は多くの精神運動発達異常を伴う遺伝性疾患につながる。近年の網羅的遺伝子解析により精神運動発達異常を伴う症候群の原因として、核スペックルタンパク質の異常が同定されてきた。核スペックルは核内オルガネラの一つであり、転写調節因子、mRNA スプライシング因子、RNA 結合タンパクなどの遺伝子発現制御因子が集積しており、遺伝子発現調節を担っていると考えられている。我々のグループは核スペックルタンパクの一つである NKAP 異常により NKAP 関連症候群を発症することを明らかにした (Fiordaliso et al. Am J Hum Genet 2019)。NKAP 関連症候群は精神運動発達遅滞、筋緊張低下、細長い手指や胸郭変形などの骨格異常、共通した顔貌を主張とする。NKAP 関連症候群は NKAP 遺伝子異常により発症する。NKAP 遺伝子は X 染色体に位置する遺伝子である。NKAP 関連症候群は X 連鎖遺伝形式をとり、NKAP 関連症候群は男性のみ発症する。NKAP は核スペックルタンパク・RNA スプライス因子として知られているが、その役割の全容は明らかになっていない。NKAP の他にも ZTTK 症候群といった類似した精神運動発達遅滞症候群が核スペックル構成タンパクの異常により引き起こされていることが知られている。そこで本研究では NKAP 関連症候群をモデルとして、核スペックルが遺伝子発現調節を行う機構、さらにその機能破綻により精神運動発達異常を引き起こす病態メカニズムを明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では NKAP 関連症候群をモデルとして、NKAP がどのように核スペックル機能制御に関わっているのか、そして核スペックル異常がどのように精神運動発達遅滞につながるような遺伝子発現異常を引き起こすか、を明らかにすることを目的とした。核スペックル機能異常症は NKAP 関連症候群のみならず、ZTTK 症候群、TARP 症候群等数多く存在する。これら核スペックル機能異常症は臨床上の共通点も多く、類似した分子病態メカニズムの関与が想定される。そこで、本研究では核スペックル異常症全体の病態メカニズム理解を目指した。

## 3. 研究の方法

### NKAP-AID 細胞：

NKAP はノックアウトできない細胞必須遺伝子である。そこで NKAP 機能解析のために、Auxin-Inducible Degron (AID) 法によるタンパク質分解除去システムを応用した NKAP-AID 細胞を樹立した。NKAP-AID 細胞はドキシサイクリンとオーキシシン添加により、NKAP タンパクが細胞内で分解される。NKAP 関連症候群患者リンパ芽球細胞を用いた実験と同様に、NKAP 除去後の NKAP-AID 細胞は、ゲノムワイドな遺伝子発現異常を呈した。DAPI 染色からはクロマチン形態・染色体構造異常が疑われる核異常が認められた。興味深いことに NKAP 除去により細胞内の核スペックル構造が消失した。同様に精神運動発達異常を引き起こす遺伝性疾患である ZTTK 症候群の原因遺伝子 SON によりコードされる核スペックルタンパクである SON、そして、SRRM2 関連症候群の原因遺伝子 SRRM2 によりコードされる SRRM2 タンパクの核内分布異常を同定した。これらデータから NKAP・SON・SRRM2 が遺伝子発現を協調して制御している可能性が示唆された。

### 免疫沈降タンパク質量解析：

NKAP がどのようなタンパクと結合し核スペックル機能を制御しているかを明らかにするため、Flag タンパクタグ付き NKAP をコードした cDNA ベクターを細胞に発現させ、Flag 抗体を用いた免疫沈降タンパク質量解析を行った。一番高頻度に結合が確認されたのは SRRM2 タンパクであった。結合タンパクのリストを用いて Gene Ontology 解析を行なったところ poly(A)RNA binding, ribonucleoprotein, mRNA catabolic process といった過程に関与しているタンパク質が NKAP 結合因子に高頻度で認められることが明らかになり、NKAP が RNA 代謝に関与している可能性が示唆された。内在性の NKAP を認識する抗体を用いて免疫沈降タンパク質量解析も行い、同様の結果を確認している。

次に野生型 NKAP と患者で認められた変異 (p. R333Q, p. R361Q) を有する NKAP タンパクの結合タンパクプロファイルと比較した。p. R333Q と p. R361Q 変異 NKAP タンパクの結合タンパクプロファイルを比較したところ、類似した結合タンパクプロファイルの変化は認められなかった。そのため NKAP 関連症候群は特徴的な NKAP 結合タンパクの異常を呈さないと考えられた。

### NKAP cross-linking and immunoprecipitation sequencing (CLIP-seq)

NKAP が細胞内でどのような RNA と結合しているかを検討するため、NKAP AID 細胞を用いて NKAP CLIP-seq を行なった。36,801 箇所の NKAP 結合サイトを同定し、89.7% の NKAP 結合サイトは翻訳領域に同定された。その一方、スプライスサイトへの NKAP 結合はほぼ認めなかった (5' スプライスサイト: 0.39%、3' スプライスサイト: 0.14%)。このデータから NKAP は RNA スプライシングが行われた後に、mRNA と結合し、RNA 代謝を制御している可能性が強く示唆された。

NKAP AID 細胞において NKAP 欠乏により遺伝子発現の変化する遺伝子は RNA-sequencing により同定している。そこで NKAP 結合が認められた mRNA の発現量変化が NKAP 欠乏により引き起こされるかを検討したが、明らかな mRNA 発現量変化は認めなかった。

### 核内・細胞質 RNA-sequencing 解析：

CLIP-seq の結果から、NKAP は RNA スプライシングが行われた後に機能している可能性が示唆された。そこで、NKAP が mRNA 核外輸送を制御している可能性を考えた。NKAP 免疫沈降タンパク質量解析において、RNA 輸送タンパク (TREX 複合体構成因子, NXF1, XPO1) といった mRNA 核外輸送に関与する因子を NKAP 結合タンパクとして同定している。そこで NKAP AID 細胞を用いて核内・細胞質 RNA-sequencing 解析を行ない、NKAP 欠乏が核内と細胞質のトランスクリプトームにどのような影響を与えるかを調べた。核内・細胞質 RNA-sequencing の相関を調べたところ、弱い相関のみが認められ、NKAP が mRNA 核外輸送を制御している可能性が示唆された。

### SRRM2/SON AID 細胞作成：

NKAP 結合因子がどのように NKAP と協調して核スペックル機能を制御しているかを明らかにするため、SON, SRRM2 といった NKAP 結合因子の AID 細胞の作成を試みた。しかしながら、細胞内の 2 コピーの SRRM2 遺伝子・SON 遺伝子に AID タグの付加された細胞を得ることは出来なかった。AID タグの付与によっても SRRM2・SON タンパク機能に影響があり、核ス

ペックル機能異常を引き起こし細胞死につながる可能性が示唆された。

#### 4. 研究成果

本研究を通じて、NKAP の新たな RNA 代謝制御因子としての役割・核スペックルの構造タンパクとしての役割を明らかにした。さらに NKAP が SON/SRRM2 といった核スペックル構造タンパクの細胞内局在を制御し、協調して核スペックル機能制御を行っていることが明らかになった。NKAP のみならず、NKAP 結合タンパクである SON と SRRM2 遺伝子変異も精神運動発達遅滞を引き起こすことが知られている。そのため、NKAP・SON・SRRM2 の遺伝子変異により同様の分子機構により精神運動発達を発症する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kelly E Regan-Fendt , Kosuke Izumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Nuclear speckleopathies: developmental disorders caused by variants in genes encoding nuclear speckle proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00439-023-02540-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白髭 克彦 (Shirahige Katsuhiko)  (90273854)	東京大学・定量生命科学研究所・教授   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	フィラデルフィア小児病院		