

GM130 遺伝子破壊細胞樹立の試み

長崎 貴郁*

中村 暢宏**

要旨

GM130 はゴルジ体のシス層表面に局在するタンパク質であり、輸送小胞とゴルジ体の繫留と融合、ゴルジ体の層板構造維持に重要な役割を果たしていると考えられている。以前に GM130 欠損 CHO 細胞が温度感受性となり 39.5°C ではゴルジ体が分散し、ゴルジ体を經由した小胞輸送経路が停止して致死となることが報告されていた。一方最近、ヒト遺伝病の研究や GM130 遺伝子破壊マウスの解析から、GM130 欠損は細胞レベルでは致死ではないが、神経系の異常や精子形成異常を示すことが報告された。これらのケースでは、GM130 遺伝子のフレームシフトにより、N 末端 300 ~ 400 アミノ酸残基の発現が残存している可能性がある。一方、先の GM130 欠損 CHO 細胞では GM130 欠損の原因変異が特定されていないため、GM130 欠損は致死ではなく、GM130 欠損以外の原因で温度感受性致死となっていた可能性が示唆された。そこで本研究では CRISPR/Cas9 法を用いて培養細胞レベルで GM130 遺伝子破壊を行い、この可能性を検証することを試みた。Ann Ran らによって開発されたプラスミドと薬剤選択を用いる CRISPR/Cas9 法により HEK293 細胞と HeLa 細胞で GM130 遺伝子破壊を行った。その結果、GM130 陰性細胞の生成を確認することができたが、これらの細胞のほとんどがアポトーシスにより死滅することが明らかとなった。このことから、GM130 が細胞の生存に必須の役割を果たしていることが示唆された。

キーワード：小胞輸送、ゴルジ体、ゲノム編集、プラスミドベクター、ピューロマイシン、

2. 序論

ゴルジ体は小胞体で新規合成されたタンパク質や脂質を受け取り修飾を行って細胞膜や細胞外、リソソームなどのオルガネラへと輸送する役割を果たしている。脊椎動物の細胞では、ゴルジ体は扁平な槽が重なった層板構造をとる (1, 2)。小胞体側からシス、中間、トランスと呼ばれる領域に分かれており、それぞれの槽には、糖転移酵素やグリコシダーゼが反応の順に整然と並んで局在し、糖鎖修飾の効率と正確性に寄与している (3)。

GM130 はゴルジ体のシス槽表面に存在する 4 量体タンパク質であり、GRASP65 や p115 などのタ

* 学部生 総合生命科学部 生命システム学科

** 教授 生命科学部 先端生命科学科

ンパク質と特異的に結合し、輸送小胞とゴルジ槽の繋留・融合や槽同士の接着などに重要な役割を果たしていると考えられる (4, 5)。しかし、これまでに報告された GM130 の発現阻害や遺伝子破壊の結果は、致死性や異常の有無で一貫していない。ほとんどの報告では、GM130 の欠損は細胞に致死的ではない (6-13)。一方、CHO 細胞の変異により生じた GM130 欠損 (LDL-G) がゴルジ体解体分散とゴルジ体を経由した小胞輸送の停止を伴う温度感受性致死となるとの報告があるが (14)、この細胞がどのような変異で GM130 欠損となっているのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、プラスミドを用いた CRISPR-Cas9 法で GM130 を培養細胞レベルで遺伝子破壊し、GM130 が温度感受性致死となるかどうか確かめる事を試みた。HeLa 細胞と HEK293 細胞の 2 種類の細胞について GM130 遺伝子破壊細胞を樹立することを目標に実験を行なった。

3. 実験方法

(1) 細胞培養, コラーゲンコート処理

10% のウシ胎児血清 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を含む D-MEM (FUJIFILM Wako Chemicals, Osaka, Japan) を用いて、HEK293 細胞と HeLa 細胞を 5% CO₂, 37°C で培養した。コラーゲンコート処理は、プラスチック培養皿、あるいはカバーガラスを入れた培養皿に、1.0% (v/v) コラーゲン (Cellmatrix Type I-P, 新田ゼラチン, 大阪) を含む D-MEM を加えて 20 分静置することで行った。

(2) CRISPR/Cas9 コンストラクトの作成

CRISPR/Cas9 コンストラクトは Ann Ran らの方法にしたがって、pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (addgene, Watertown, MA, USA) を用いて構築した (15)。二本のオリゴ DNA (100 μ M: 5'-CACC aggacaatgtgtactactcta-3', 5'-AAACTagagtagcagcattgtcct-3', Thermo Fisher Scientific) を等量混合し冷却しアニールさせた。これを T4 キナーゼでリン酸化処理した後、BbsI でカットした pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 にライゲーションし、配列決定により組換え体を取得確認した。

(3) トランスフェクションと遺伝子破壊細胞の選別

ϕ 9cm 培養皿に 2.0×10^6 個の細胞をまき、16 時間培養し定着させた。プラスミドは Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) と FuGene6 (Promega Corp, Madison, Wisconsin, USA) を用いて細胞に導入した。24 時間後、トリプシン処理で剥離し 3 枚の ϕ 9cm 培養皿に 1/3 ずつ分注した後、最終濃度それぞれ 1.0, 2.0, 5.0 μ g/ml になるようピューロマイシン (FUJIFILM Wako Chemicals) を加えた。3 日間後に薬剤を除去し、さらに 3 日おきに培養液を交換しコロニーを形成させた。コロニーが目視できるサイズになった時点 (14 日～30 日程度) でトリプシンを用いて限界希釈法あるいはペニシリンカップ法で回収し増殖させた。2cm 培養皿で 50% コンフルエント以上に達したクローンを蛍光抗体染色により観察した。

(4) 細胞の剥離を行わない場合のトランスフェクション

カバーガラスの入ったφ3.5cm 培養皿を6枚用意し (HEK293 細胞を用いる場合はコラーゲンコート処理をおこなった), それぞれに 1.0×10^5 個の細胞懸濁液を加え 37°C で 16 時間インキュベートした。プラスミドを Opti-MEM と FuGene6 を用いてトランスフェクションし, 32°C あるいは 37°C で 24 時間培養した。ピューロマイシンを規定濃度になるように添加, 培養し免疫蛍光染色を行った。

(5) 間接的免疫蛍光染色

細胞の固定・染色・観察法は以前に報告した (16)。用いた抗体は次の通りである。ウサギ抗 giantin 抗体 (17), マウス抗 GM130 抗体モノクローナル抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), Alexa488 結合抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher Scientific), CY3 結合抗マウス抗体 (Thermo Fisher Scientific)。核染色には Hoechst33258 を用いた。

4. 結果

(1) GM130 遺伝子破壊標的配列の決定

ヒト GM130 のエクソン構造と CRISPR/Cas9 による標的配列を図 1 に示した。Thermo Fisher Scientific 社の Gene Art を用いて, ヒト GM130 の遺伝子について CRISPR/Cas9 による破壊標的配列の検索を行った。候補配列上位 3 種に関して標的配列の位置を確認したところ, 第 1 位の標的配列 (標的配列 1) は, ヒト mRNA#1 (図中に示すバリエントの 1 種) のエクソン 3 の 5' 末端付近のアンチセンス鎖, 第 2 位の標的配列 (標的配列 2) は, エクソン 1 の 5' 末端付近のアンチセンス鎖, 第 3 位の配列 (標的配列 3) は第 1 位の配列の 9bp 下流のセンス鎖に相当していた。標的配列 3 は開始コドン付近であり, 完全に翻訳を停止させる可能性もあるが, GM130 は N 末端付近に複数の開始コドンがあるため, 下流開始コドンからの翻訳開始が起こる可能性があるため排除した。標的配列 1 は, 標的配列 2 より 14 アミノ酸残基短いことが予測されるため, より短い産物が残ると考えられる標的配列 1 で実験を行うこととした。

図 1B に示すように, この配列を用いた場合に期待される DNA 切断後の挿入/欠失により, N 末端約 72 アミノ酸残基の断片が生じることが予測された。以前に報告された GM130 遺伝子破壊マウスでは第 14 エクソン (ヒト mRNA#1 のエクソン 12 に相当) を標的としており, GM130 の N 末端約 292 残基が残存していることが予測された (6)。同様に, 神経筋障害患者で同列された GM130 遺伝子変異では, 第 16 エクソンに変異があり, N 末端約 394 アミノ酸残基の断片が残存していることが予測された (8)。対照的に, 本実験では p115 結合部位のみが発現するものの, より完全に GM130 が遺伝子破壊されることが予測された。

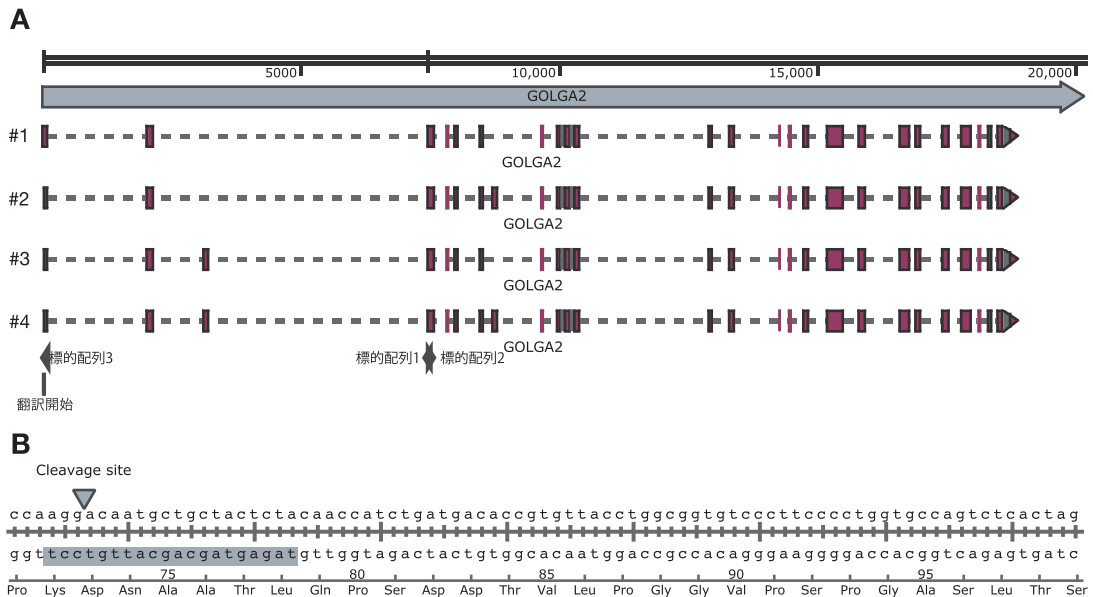


図1 ヒト GM130 のエクソンマップと KO ターゲット配列の位置 (A) NCBI データベースに登録されているヒト GM130 のリファレンス付 mRNA 4 種のエクソンのゲノム上分布を図示した。#1 はラット GM130 mRNA と相同であり、その他の mRNA 配列 (#2~4) は二カ所でのエクソンの挿入の有無によるバリエーションである。標的候補配列を # 4 の下に示した (標的配列 1~3)。翻訳開始コドンは第 1 エクソン上にある。(B) #1 の第 3 エクソン部分の配列を示した。標的配列 1 をグレーで、切断予想部位を上を示した (cleavage site)。塩基の挿入欠失により、73 アミノ酸付近からフレームシフトが起きると予測される。1 塩基欠失では、195 アミノ酸残基の断片、2 塩基欠失では、81 アミノ酸残基の断片が生じると予測される。

(2) HEK293 細胞の遺伝子破壊：トリプシンによる再播種

まず、より正常細胞に近いと考えられる HEK293 細胞について pSpCas9 (BB) -2A-Puro (PX459) V2.0 を用い、論文に記載された手法に基づいて遺伝子破壊細胞の樹立を試みた (15)。以前に当研究室でこのプラスミドを用いて YIPF β 3A 遺伝子破壊細胞の樹立に成功した時と同様に (未発表データ)、プラスミド開発者である Ann Ran らのプロトコルに基づいてトランスフェクション及び選別作業を行った。なお、GM130 欠損 CHO 細胞が温度感受性となり、39.5 度では致死となるが、34°C では生存増殖が可能となることが報告されていたことから (14)、トランスフェクション後、32°C で培養を行った。ピューロマイシン添加後 3 日培養した後、通常培地に交換し 12 日間培養した。生き残った細胞をトリプシン処理で剥離して細胞をカウントし、96 穴の培養皿に、1 個 / 穴、5 個 / 穴、10 個 / 穴で播種した (限界希釈法)。残りの細胞は 9cm の培養皿に播種し 32°C で培養を継続した (ペニシリンカップ法)。5 日後に観察したところ、96 穴の培養皿では細胞の生育が見られず、また、9cm の培養皿でも細胞の生育が悪く、コロニーの形成は見られなかった。この実験の過程でトランスフェクションの後にトリプシン処理を行っていたが、GM130 遺伝子破壊によって分泌経路が阻害

され、トリプシン処理によって失われた細胞接着に機能する分子の細胞と基質の接着面への配送が阻害されたため、GM130 遺伝子破壊細胞が基質に接着できなかった可能性が考えられた。このため、これ以降の実験ではトリプシン処理を回避し、また、コラーゲンコート培養皿、および10%コラーゲンで処理をしたカバーガラスを用いることにした。

(3) HEK293 細胞の遺伝子破壊：セルスクレーパーによる再播種

トリプシン処理の影響を回避するため、細胞を培養皿から剥がす際にセルスクレーパーを用いて実験を行った。また、32°Cの培養温度が低すぎた可能性を考慮し、37°Cとの比較も行った。ピューロマイシン添加後3日間培養した後、通常培地に交換し12日間培養した。生き残った細胞をセルスクレーパーで剥がした後、コラーゲンコートしたカバーグラスを入れた2枚のディッシュに播種し、37°C、32°Cそれぞれで3日間培養し定着させた。この細胞を免疫蛍光染色したところ、全ての細胞がGM130陽性であり、遺伝子破壊細胞が得られていないことが明らかとなった（結果省略）。従って、HEK293細胞では剥離した遺伝子破壊細胞はトリプシン処理に関わらず基質に接着しなかった可能性が高いと考えられた。

(4) HeLa 細胞の遺伝子破壊

次に、以前にYIPFb3Aの遺伝子破壊に成功しているHeLa細胞で遺伝子破壊細胞の樹立を試みた。プラスミドトランスフェクション後32°C及び37°Cの2種の条件でスクリーニングを行った。トランスフェクション24時間後（Day1）にセルスクレーパーで細胞を剥離し、それぞれの温度につき3枚ずつの培養皿に分注し、ピューロマイシンを1.0µg/mL、2.0µg/mL、5.0µg/mLとなるように加え2日培養した（Day3）。十分な細胞の死滅が見られなかったため、さらに同濃度のピューロマイシンが入った培地に交換し、さらに3日間培養した（Day6）。有意な細胞死が認められたため、通常培地に交換して5日間培養したところ（Day11）、2.0µg/mL、5.0µg/mLの培養皿でコロニーの形成が認められた。さらに2日間（Day13）培養した後、ペニシリンカップ法にてコロニーを採取し96穴培養皿にて増殖させた。1～2週間増殖させて2cm培養皿にスケールアップした後、免疫蛍光染色で観察を行った。残念ながら、32°C、37°C、いずれの培養条件においても、ピックアップした25個全てのクローン（37°C 5.0µg/ml:6個、37°C 2.0µg/ml:8個、32°C 5.0µg/ml:11個）でGM130の残存が確認された（図2）。このことからHeLa細胞においても、細胞の剥離を行うとGM130遺伝子破壊細胞が再接着せずに失われている可能性が示唆された。

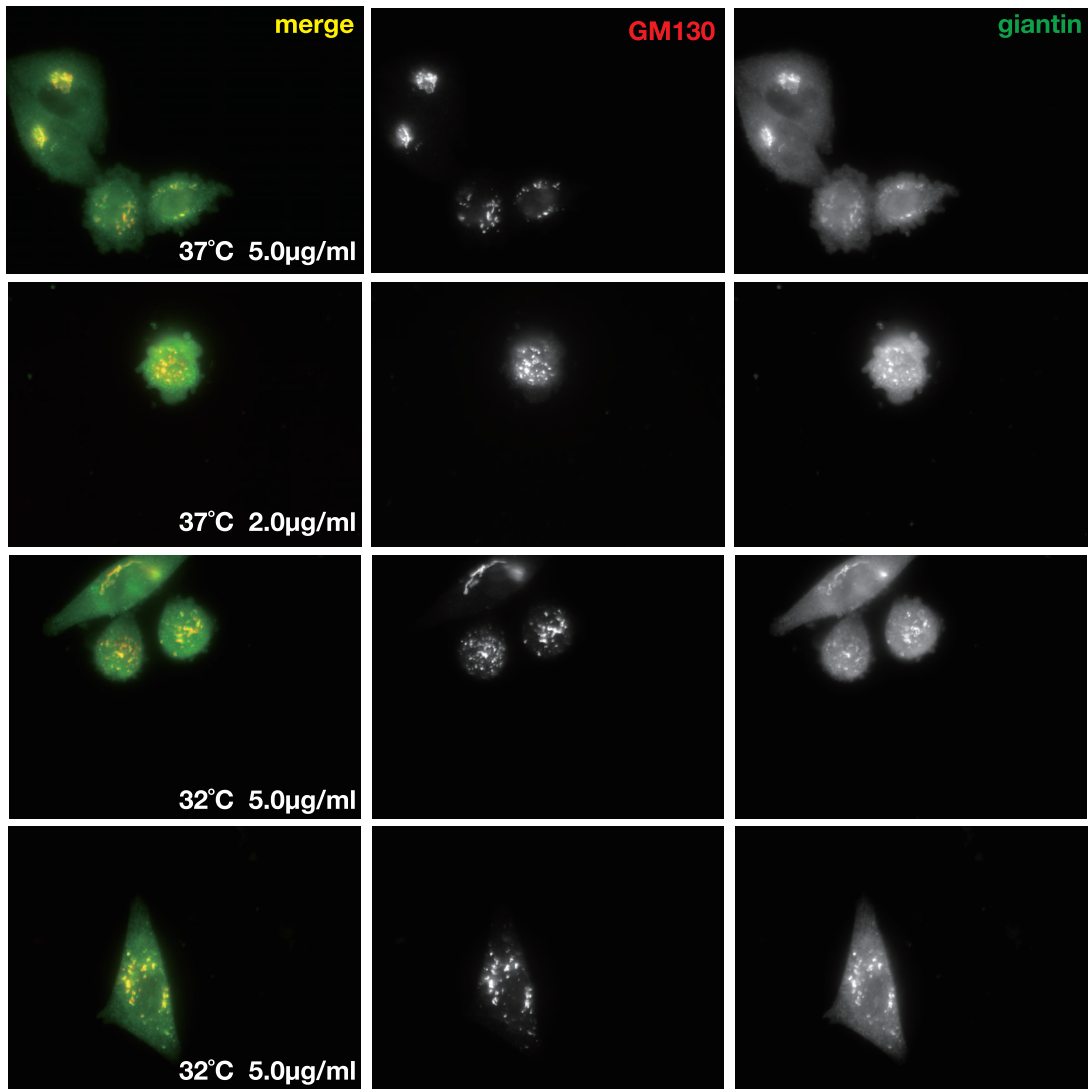


図2 採取した細胞の免疫蛍光染色結果 抗 GM130 抗体 (中列: [CY3] 赤), 抗 giantin 抗体 (右列: [Alexa488] 緑) で二重染色を行った。左列: 重ね合わせ像。採取した細胞の培養温度, ピューロマイシン処理濃度を左下に記した。それぞれの条件での代表例を示す。

(5) 細胞剥離操作の影響の検討

これまでの実験ではトランスフェクション後, 免疫染色でスクリーニングを行うまでに計 2 回, 細胞を培養皿から剥離する過程があった。GM130 遺伝子破壊細胞では, 細胞接着過程に異常が生じ, スクレーパーで細胞表面のタンパク質や細胞外基質を破壊しない条件で剥離しても再接着できなかった可能性が考えられた。そこで, 細胞の播種から免疫染色まで一度も細胞の剥離を行わないことで遺伝子破壊細胞が生成しているか確かめる事とした。

カバーガラス上に HEK293 細胞を播種し、カバーガラスに接着させたままトランスフェクションと薬剤処理を行った。トランスフェクション 16 時間後に 32°C 及び 37°C の各温度のインキュベーターに移し、ピューロマイシン（最終濃度 1.0µg/mL, 2.0µg/mL, 5.0µg/mL）を添加し 2 日培養した。通常培地に交換してさらに 3～4 日おきに培地交換を行い 11 日間培養を行った。ピューロマイシン 1.0µg/mL では細胞が過剰に増殖していたため、また、5.0µg/mL では細胞のほとんどが死滅していたため解析に用いなかった。ピューロマイシン 2.0µg/mL の条件では 1% ほどの確率で GM130 の染色が著しく減少した細胞が確認された（図 3）。これらの細胞のほとんどで、核が複数の断片となっているものや、細胞サイズの縮小などの形態の異常が観察された。また、細胞が盛り上がり接着進展が減少している様子も観察された。この結果から、プラスミドトランスフェクションによって GM130 遺伝子破壊細胞が生じてはいるが、薬剤処理や、細胞剥離処理による選抜過程で失われている可能性が強く示唆された。

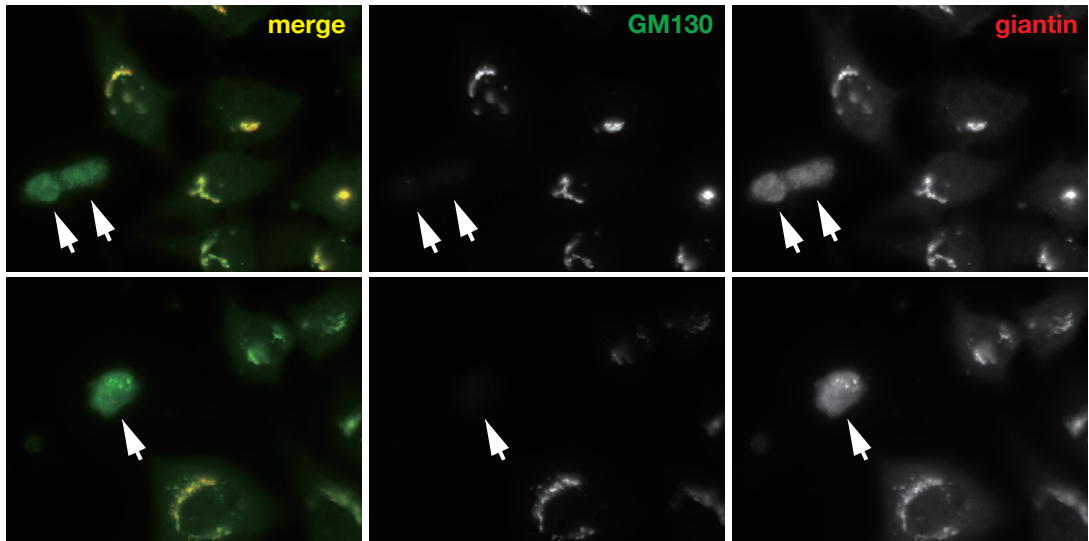


図 3 非剥離条件でのノックアウト細胞生成の確認 HEK293 細胞をカバーガラス上に播種し、トランスフェクション、薬剤選択処理し、剥離操作することなく抗 GM130 抗体（中列：赤 [CY3]）、抗 giantin 抗体（右列：緑 [Alexa488]）で二重染色して観察を行った。GM130 が染色されていない細胞を矢印で示した。左列：重ね合わせ画像

次に HeLa 細胞を用いて同様の実験を行った。ピューロマイシン（最終濃度 1.0µg/mL, 2.0µg/mL, 5.0µg/mL）を添加し 3 日培養した。その後 3～5 日おきに通常培地で培地交換を行い、21 日間培養した。ピューロマイシン 5.0µg/mL, 37°C 処理での細胞数は 5.0µg/mL, 32°C 処理に比べて 1/3 程度であった。32°C ではピューロマイシン 2.0µg/mL と 5.0µg/mL で細胞数の違いはほとんどなかった。1.0µg/mL の条件では温度に関わらず細胞の過剰増殖が見られた。

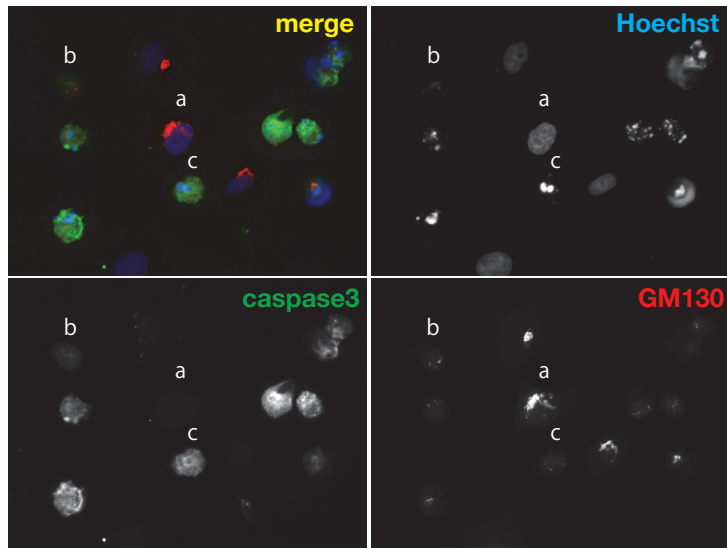


図4 GM130 陰性細胞とカスパーゼ3 陽性細胞 プューロマイシン 5 μ g/mL, 32 $^{\circ}$ C 処理を行った HeLa 細胞の典型的な 3 重染色像 (左上: 重ね合わせ像, 右上: Hoechst33258 [青], 左下: 抗カスパーゼ3 抗体 [緑: Alexa488], 右下: 抗 GM130 抗体 [赤: CY3]) を示す。各分類の代表例を細胞上部に a~c で記した。(a) GM130 陽性細胞, (b) GM130 陰性, カスパーゼ3 陰性細胞, (c) GM130 陰性, カスパーゼ3 陽性細胞

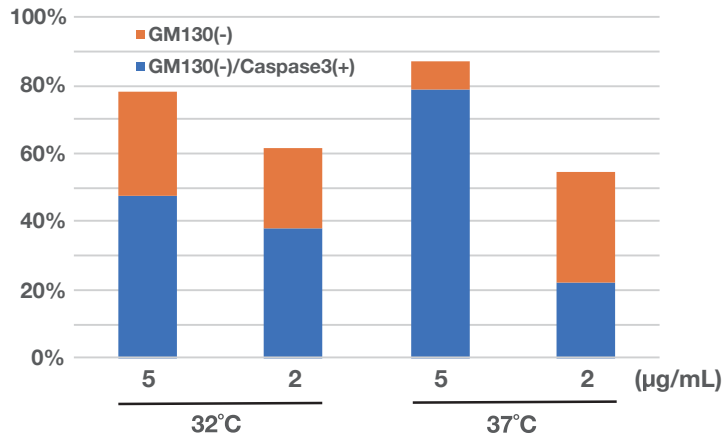


図5 GM130 陰性細胞およびカスパーゼ3 陽性細胞の割合 プューロマイシン処理濃度と培養温度をグラフ下に示した。GM130 陽性でかつカスパーゼ3 陽性の細胞は観察されなかった。棒グラフの高さはトータルの GM130 陰性細胞の割合を示す。(青: カスパーゼ3 陽性細胞, オレンジ: カスパーゼ陰性細胞)

免疫蛍光染色を行なった結果、全ての条件で、GM130 陰性細胞が確認された (図 4)。しかしながら、ピューロマイシン 1.0 μ g/mL では GM130 陰性細胞の割合が 10% 以下であったため以降の解析には用いなかった。それ以外の条件では、50% 以上の細胞が GM130 陰性であった (図 5)。ピューロマイシン 5.0 μ g/mL, 37°C 処理では、他の条件に比べて細胞数が少なかったため、細胞死が昂進している可能性が考えられた。この可能性を検証するため、抗 GM130 抗体 (CY5)、抗カスパーゼ 3 抗体 (Alexa488)、さらに核を Hoechst33258 にて蛍光 3 重染色し解析を行った (図 4)。その結果、GM130 陰性細胞の中にカスパーゼ 3 陽性細胞が存在することが明らかとなった。また、カスパーゼ 3 陽性細胞のほとんどで、核の凝縮と断片化が観察され、これらの細胞がアポトーシスを起こしていることが強く示唆された。

ピューロマイシン 2.0 μ g/mL, 5.0 μ g/mL, 32°C, 37°C で処理した時の GM130 陰性細胞、カスパーゼ 3 陽性細胞の割合を図 5 に示した。32°C 処理では、GM130 陰性細胞中のカスパーゼ 3 陽性細胞数の割合はいずれのピューロマイシン濃度でも約 60% であったため、カスパーゼ 3 の活性化はピューロマイシン濃度に非依存的であることが示唆された。また、ピューロマイシン除去後 21 日後の観察であることからピューロマイシン処理の急性効果によってカスパーゼ 3 が活性化しているのではないことが示唆された。さらに、カスパーゼ 3 陽性でかつ GM130 陽性の細胞は観察されなかった。以上のことから、カスパーゼ 3 の活性化は、ピューロマイシン非依存的に GM130 陰性細胞でのみ生じていることが示唆された。37°C 処理でピューロマイシン 5.0 μ g/mL 処理時の細胞数が他の条件に比べて顕著に少なかったこと、また、GM130 陰性細胞でのカスパーゼ 3 活性化の比率が高かったことから、GM130 陰性細胞でのカスパーゼ活性化とそれに起因する細胞死が 37°C 処理で高くなっていたことが示唆された。

5. 考察

Ann Ran らによって開発されたプラスミドベクターによる CRISPR/Cas9 システムを用いて GM130 の遺伝子破壊を試みたが、残念ながら HEK293 細胞、HeLa 細胞のいずれにおいても GM130 遺伝子破壊株を取得することができなかった。当研究室では、同じベクターを用いて HeLa 細胞の YIPF β 3A の遺伝子破壊に成功している (未発表データ)。したがって、実験手法に大きな問題があった可能性は低いと考えられる。トランスフェクション後トリプシン処理やスクレイパーを用いて細胞剥離処理を行った場合、遺伝子破壊細胞を全く確認することができなかった (図 2)。そこで、細胞剥離処理を回避して、GM130 遺伝子破壊細胞が生成しているかどうか調べたところ、HEK293 細胞、HeLa 細胞のいずれにおいても GM130 陰性細胞が有意に生成選別されている事が明らかとなった (図 3, 4)。したがって、細胞剥離処理を伴う通常の方法で GM130 遺伝子破壊細胞が取得できなかったのは、GM130 遺伝子破壊細胞が基質から剥離後、再接着・増殖できなかったためであると考えられた。一方、GM130 陰性細胞の多くがカスパーゼ 3 陽性になっていたことから、GM130 遺伝子破壊細胞でアポトーシスが誘導され死滅していることが強く示唆された (図 4, 5)。このことから、今回用いた

手法で GM130 の遺伝子破壊に成功しているものの、GM130 遺伝子破壊によってアポトーシスが誘導され死滅したことにより、遺伝子破壊細胞の樹立ができなかったものと考えられた。

ヒト GM130 の変異やマウス GM130 の遺伝子破壊変異では、様々な病態を伴うものの、生育可能な個体が産出されることが示されている (6-10)。ヒト疾患の GM130 変異は、394 アミノ酸残基でフレームシフトが起こり、N 末端 394 残基が発現している可能性がある (8)。また、マウス GM130 の遺伝子破壊変異では、292 アミノ酸残基でフレームシフトが起こり、N 末端 292 残基が発現している可能性がある (6)。一方、今回の実験では、第 3 エクソンを標的としたため、N 末端 72 残基の断片しか残存しないと予想される。先の報告と合わせて考えると、胚発生や個体の生存には 300 ~ 400 アミノ酸残基の GM130 断片の発現で十分であるが、より短い断片になると細胞レベルで致死になる可能性が示唆された。

GM130 遺伝子破壊細胞には、細胞の基質への進展が悪い細胞が多く観察された (図 3, 4)。GM130 の遺伝子破壊により、細胞の接着と進展に必須な受容体の細胞膜への配送や細胞外基質の分泌が異常になったため、細胞の基質への進展が阻害された可能性が考えられる。一方、GM130 陰性細胞でカスパーゼ 3 の活性化が有意に起こっていたことから (図 4, 5)、これらの形態異常がアポトーシスの結果である可能性も考えられる。

GM130 欠損 CHO 細胞は温度感受性を示し、39.5°C ではゴルジ体が分散し分泌経路が阻害されるが、34°C 以下ではゴルジ体の構造と正常な分泌経路の機能が維持されることが報告されていた (18)。このことから、初期の実験では 32°C で遺伝子破壊細胞の選抜を行ったが、遺伝子破壊細胞を得ることはできなかった。そこで、32°C と 37°C の両方の温度で再度遺伝子破壊細胞の選抜を行い結果を比較したところ、GM130 遺伝子破壊細胞はどちらの温度でも確認された。しかしながら、37°C では生存率が 1/3 程度まで減少するとともに、より多くの GM130 陰性細胞でカスパーゼ 3 の活性化が確認された (図 5)。したがって、37°C では 32°C より GM130 遺伝子破壊細胞のアポトーシスの活性化がより強く起こっている可能性が示唆された。この結果は、CHO 細胞で GM130 欠損により温度感受性致死が見られた事と類似している。GM130 欠損の効果が種や細胞の分化状態などで異なる可能性は十分考えられる。したがって、CHO 細胞は低温において GM130 欠損に対する耐性が高いため遺伝子破壊株を取得することができたが、HeLa 細胞や HEK293 は GM130 欠損に対する耐性が低く遺伝子破壊株が取得できなかった可能性が考えられる。

GM130 の遺伝子破壊によりアポトーシスによる細胞死が引き起こされる可能性が示唆されたことから、GM130 は培養細胞レベルで生存に必須の役割を果たしており、pSpCas9 (BB) -2A-Puro (PX459) V2.0 を用いた通常の方法では、GM130 遺伝子破壊の作出が困難であることが強く示唆された。この問題を解決するためには、Cre-Lox システムと相同組み換えを用いた誘導性遺伝子破壊細胞株を取得する方法などが有効であろう。今後、これらの方法に挑戦する予定である。

6. 参考文献

1. Nakamura, N., Wei, J.-H., and Seemann, J. (2012) Modular organization of the mammalian Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 467–474
2. 中村暢宏 (2018) Golgipathies and the novel functions of the Golgi apparatus. *生化学*. **90**, 21–26
3. Xiang, Y., Zhang, X., Nix, D. B., Katoh, T., Aoki, K., Tiemeyer, M., and Wang, Y. (2013) Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nature communications*. **4**, 1659
4. Ishida, R., Yamamoto, A., Nakayama, K., Sohda, M., Misumi, Y., Yasunaga, T., and Nakamura, N. (2015) GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *Febs J.* **282**, 2232–2244
5. Nakamura, N. (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci.* **112**, 255–264
6. Liu, C., Mei, M., Li, Q., Roboti, P., Pang, Q., Ying, Z., Gao, F., Lowe, M., and Bao, S. (2017) Loss of the golgin GM130 causes Golgi disruption, Purkinje neuron loss, and ataxia in mice. *Proceeding of National Academy of Science U.S.A.* **114**, 346–351
7. Han, F., Liu, C., Zhang, L., Zhou, Y., Qin, Y., Wang, Y., Chen, M., Duo, S., Cui, X., Bao, S., and Gao, F. (2016) Globozoospermia and lack of acrosome formation in GM130-deficient mice. *Cell death & disease*. **8**, 1–12
8. Shamseldin, H. E., Bennett, A. H., Alfadhel, M., Gupta, V., and Alkuraya, F. S. (2016) GOLGA2, encoding a master regulator of golgi apparatus, is mutated in a patient with a neuromuscular disorder. *Human genetics*. **135**, 245–251
9. Baschieri, F., Allmen, E. U., Legler, D. F., and Farhan, H. (2015) Loss of GM130 in breast cancer cells and its effects on cell migration, invasion and polarity. *Cell Cycle*. **14**, 1139–1147
10. Zhang, C.-H., Wang, Z.-B., Quan, S., Huang, X., Tong, J.-S., Ma, J.-Y., Guo, L., Wei, Y., Ouyang, Y.-C., Hou, Y., Xing, F.-Q., and Sun, Q.-Y. (2014) GM130, a cis-Golgi protein, regulates meiotic spindle assembly and asymmetric division in mouse oocyte. *Cell Cycle*. **10**, 1861–1870
11. Kodani, A., Kristensen, I., Huang, L., and Sütterlin, C. (2009) GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Molecular biology of the cell*. **20**, 1192–1200
12. Kodani, A., and Sütterlin, C. (2008) The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Molecular biology of the cell*. **19**, 745–753
13. Puthenveedu, M. A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F., and Linstedt, A. D. (2006) GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nature Cell Biology*. **8**, 238–248
14. Vasile, E., Perez, T., Nakamura, N., and Krieger, M. (2003) Structural integrity of the Golgi is temperature sensitive in conditional-lethal mutants with no detectable GM130. *Traffic*. **4**, 254–272
15. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. **8**, 2281–2308
16. Yoshida, Y., Suzuki, K., Yamamoto, A., Sakai, N., Bando, M., Tanimoto, K., Yamaguchi, Y., Sakaguchi, T., Akhter, H., Fujii, G., Yoshimura, S., Ogata, S., Sohda, M., Misumi, Y., and Nakamura, N. (2008) YIPF5 and YIP1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. *Experimental Cell Research*. **314**, 3427–3443
17. Toki, C., Fujiwara, T., Sohda, M., Hong, H.-S., Misumi, Y., and Ikehara, Y. (1997) Identification and characterization of rat 364-kDa Golgi-associated protein recognized by autoantibodies from a patient with rheumatoid arthritis. *Cell Struct. Funct.* **22**, 565–577

18. Vasile, E., Oka, T., Ericsson, M., Nakamura, N., and Krieger, M. (2006) IntraGolgi distribution of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex. *Experimental Cell Research*. **312**, 3132–3141

Knockout of GM130 in cultured cells

Takafumi NAGASAKI
Nobuhiro NAKAMURA

Abstract

GM130 is a peripheral membrane protein localized on the surface of the *cis*-Golgi cisternae. It has an important role in the docking and fusion of transport vesicles to the Golgi cisternae and also for the maintenance of the structure of the Golgi apparatus. It was reported that the loss of GM130 in CHO cells renders the cells to be temperature sensitive and lethal at 39.5°C because of the inhibition of the vesicular transport through the Golgi apparatus concomitant with the disassembly of the Golgi apparatus. On the other hand, recent reports of human genetic disease and knockout mouse studies revealed that the organisms missing normal GM130 are viable while they have multiple lesions, i.e., neuronal disorders and abnormal spermatogenesis. In these cases, frameshift mutations of GM130 caused premature termination of GM130 at 300~400 amino acid residues from the N-terminus. On the other hand, the cause of GM130 loss has not been elucidated in the above-mentioned study of CHO cells. Therefore, the loss of GM130 may not cause temperature sensitivity and lethality. Here, we tried to evaluate this possibility by producing GM130 knockout cells by a CRISPR/Cas9 system developed by Ann Ran et al. The results of the trials revealed that the GM130 knockout cells can be produced but apoptosis was induced in those cells leading to cell death. From these results, it was strongly suggested that GM130 has an essential role in cell survival.

Keywords : Vesicular transport, Golgi apparatus, genome editing, plasmid vector, puromycin

