

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	Wolfram症候群の原因遺伝子であるWFS1遺伝子の変異解析
Title(English)	
著者(和文)	徳間啓
Author(English)	Hiraku Tokuma
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12515号, 授与年月日:2023年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:糸 昭苑,白木 伸明,田口 英樹,田川 陽一,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12515号, Conferred date:2023/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文
Doctor's Thesis

Wolfram 症候群の原因遺伝子である
WFS1 遺伝子の変異解析

東京工業大学生命理工学院
生命理工学系生命理工学コース博士後期課程

徳間 啓

2023年3月

指導教員 桑 昭苑 教授

白木 伸明 准教授

目次

略語一覧.....	4
要旨.....	5
1. 背景と目的.....	8
1-1 糖尿病とは	8
1-2 遺伝子変異に起因する糖尿病.....	9
1-3 Wolfram 症候群に着目したきっかけ	11
1-4 Wolfram 症候群	13
1-5 目的	20
2. 実験方法.....	21
2-1 化合物	21
2-2 プラスミドの構築.....	21
2-3 細胞培養	28
2-4 WFS1 KO iOE iPS 細胞の樹立と解析	28
2-5 アデノウイルスの作製.....	33
2-6 HaloTag システムを用いた変異型 WFS1 タンパク質の安定性の解析.....	33
2-7 Wfs1_knockdown (Wfs1_KD) _MIN6 細胞の樹立	34
2-8 Wfs1_KD_MIN6 細胞の解析	35
2-9 遺伝子発現解析.....	36
2-10 Western blotting.....	37
2-11 免疫細胞化学による細胞内局在の解析.....	38
2-12 統計学的解析	39
3. WFS1 KO iOE iPS 細胞の樹立と解析.....	40
3-1 WFS1 KO iOE iPS 細胞の樹立	40
3-2 WFS1 KO iOE iPS 細胞の解析	43
3-3 考察	46
4. 変異型 WFS1 タンパク質の安定性の解析	48
4-1 C 末端が欠損した hWFS1 は MIN6 細胞において不安定である	48
4-2 MIN6 細胞において変異型 hWFS1 タンパク質を強制発現させても内在の WFS1 タンパク質に影響はない.....	50
4-3 MIN6 細胞では C 末端が欠損した変異型 hWFS1 タンパク質はプロテアソームに より分解される	51
4-4 変異型 hWFS1 タンパク質の分解様式は MIN6 細胞と HEK293T 細胞で異なる ..	54
4-5 変異型 hWFS1 タンパク質の分解様式は MIN6 細胞と COS7 細胞で異なる	55
4-6 考察	56

5. WFS1 がインスリン分泌に与える影響に関する解析	59
5-1 MIN6 細胞における mouse <i>Wfs1</i> のノックダウン	59
5-2 MIN6 細胞において <i>Wfs1</i> 遺伝子発現の抑制はインスリン分泌を低下させる.....	60
5-3 MIN6 細胞において hWFS1 (WT) の一部は細胞膜またはその近傍に存在する...	62
5-4 hWFS1 は Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの流入を制御する	64
5-5 考察	66
6. 結語.....	68
学位の骨格となる関連論文及びその他論文リスト	70
学位の骨格となる関連論文.....	70
その他論文リスト	70
学会発表リスト	70
謝辞.....	71
参考文献.....	72

略語一覽

略	正式名称
AAVS1	Adeno-associated virus integration site 1
ATP	Adenosine triphosphate
AUC	Area under the curve
CAG promoter	Hybrid construct consisting of the cytomegalovirus enhancer fused to the chicken beta-actin promoter
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
COS	CV-1 origin, SV40
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated proteins 9
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ER	Endoplasmic reticulum
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal Bovine Serum
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
iPS 細胞	induced Pluripotent Stem 細胞
ITS-X	Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine
KD	Knockdown
KO	Knockout
KRB buffer	Krebs-Ringer Bicarbonate buffer
MIN6	Mouse Insulinoma 6
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
NeoR	Aminoglycoside phosphotransferase, neomycin resistance
NKX6-1	Homeobox protein Nkx-6-1
OCT 3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered salts
PCR	Polymerase chain reaction
PDX1	Pancreatic and Duodenal Homeobox 1
PFA	Paraformaldehyde
PGK	Phosphoglycerate kinase
PuroR	Puromycin N-acetyltransferase, puromycin resistance
PVDF	Polyvinylidene fluoride
R-GECO	Red fluorescent Genetically Encoded Ca ²⁺ indicators for Optical imaging
rpm	rotations per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	short hairpin RNA or small hairpin RNA
SOX17	SRY-box 17
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
WFS1	Wolfram Syndrome 1
WT	wild-type
hWFS1	human WFS1

要旨

Wolfram 症候群の原因遺伝子である *WFS1* 遺伝子の変異解析

徳間 啓 指導教員 糸 昭苑 教授・白木 伸明 准教授

【背景・目的】

Wolfram 症候群は若年での糖尿病を初発症状とする遺伝性希少疾患である。原因の 70% は *Wolfram Syndrome 1 (WFS1)* 遺伝子変異である。*WFS1* は脳や心臓、腎臓などで発現し、膵臓では膵β細胞で発現している。Wolfram 症候群患者ではインスリン分泌能の低下や膵細胞数の減少が報告されている。

WFS1 は 890 aa の 9 回膜貫通型タンパク質で主に小胞体に局在している。現在までに Wolfram 症候群患者では 200 以上の *WFS1* 遺伝子変異が報告されている。報告されている変異の中でも *WFS1* タンパク質の nonsense と frameshift 変異を持つ患者は missense 変異に比べ、より若年で糖尿病を発症する。この変異による症状が異なる分子機序が不明である。そこで、本研究では変異型 *WFS1* タンパク質の安定性・インスリン分泌における機能を解析し、Wolfram 症候群における膵β細胞機能不全発症のメカニズムを解明することを目指した。

【方法】

1. *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立と解析

私が所属している研究室ではヒト iPS 細胞からグルコース濃度に応じてインスリンを分泌することのできる膵β様細胞を分化誘導することが可能である。そこで、内在性の *WFS1* 遺伝子を欠失させ、かつ Doxycycline の添加によって *WFS1* の発現を誘導できる *WFS1* KO iOE iPS 細胞 (*WFS1* KnockOut inducible OverExpression iPS 細胞) を樹立した。

2. 変異型 *WFS1* タンパク質の安定性の解析

Wolfram 症候群の中でも糖尿病を若年 (10 歳未満) 発症する *WFS1* タンパク質の nonsense 変異 (W837X, Y735X, Y652X, Q266X) と frameshift 変異 (409fs/ter440)、あるいはより後期 (10 歳以降) に糖尿病を発症する missense 変異 (P724L) に着目した。異なる HaloTag システムを用いることで、時間差で異なる蛍光リガンドを用いて標識することでマウス膵β細胞由来の細胞株 MIN6 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来 COS7 細胞、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞における *WFS1* タンパク質の安定性の解析を試みた。

3. *WFS1* がインスリン分泌に与える影響に関する解析

Wolfram 症候群患者は常染色体潜性変異の疾患である。そこで、変異型 *WFS1* タンパク質の性状を MIN6 細胞で解析するにあたり、内在性の *WFS1* タンパク質の影響を排除したいと考えた。そこで、*Wfs1* 遺伝子に対する shRNA を用い MIN6 細胞において *Wfs1* 遺伝子の発現を抑制した細胞株を樹立した (*Wfs1*_KD MIN6 細胞)。変異型 *WFS1* タンパク質がインスリン分泌能に与える影響を解析するために、*Wfs1*_KD MIN6 細胞にアデノウイルスを用いて野生型 *WFS1* タンパク質あるいは変異型 *WFS1* タンパク質を強制発現した。次に、ELISA 法を用いてインスリン分泌能を評価した。さらにカルシウムイメージング法により、細胞内カルシウムの動態を解析した。

【結果】

1. *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立と解析

WFS1 KO iPS 細胞のセーフハーバー部位 *AAVSI* 領域に Doxycycline の誘導により *WFS1* を発現できるカセットの導入を行い、*WFS1* KO iOE iPS 細胞を樹立した。

2. 変異型 *WFS1* タンパク質の安定性の解析

N 末端に HaloTag を付加した野生型 *WFS1* タンパク質または変異型 *WFS1* タンパク質を MIN6 細胞において強制発現した。その結果、MIN6 細胞では野生型 *WFS1* タンパク質及び missense 変異型 *WFS1* タンパク質に比べ、nonsense や frameshift 変異型 *WFS1* タンパク質の発現量が低いことが分かった。

次に可逆的プロテアソーム阻害剤である MG132 処理後の *WFS1* タンパク質の蓄積を解析した。MIN6 細胞では強制発現されたヒト *WFS1* タンパク質は nonsense 変異型タンパク質である場合はタンパク質量の増加がみられたが、missense 変異型タンパク質はその効果が低かった。

MIN6 細胞を MG132 処理で HaloTag-h*WFS1* タンパク質の分解を阻害した後、MG132 非存在下でタンパク質量を経時的に解析する Pulse-chase 実験を行った。その結果、MIN6 細胞において nonsense 変異型 *WFS1* タンパク質は野生型 *WFS1* タンパク質よりも顕著に速い分解速度を示した。同様の Pulse-chase 実験をヒト胎児腎臓上皮由来 HEK293T 細胞及びアフリカミドリザル腎臓由来 COS7 細胞でも行った。その結果、HEK293T 細胞において野生型 *WFS1* タンパク質は nonsense 変異型 *WFS1* タンパク質よりも顕著に速い分解速度を示した。一方、COS7 細胞では野生型 *WFS1* タンパク質と nonsense 変異型 *WFS1* タンパク質に分解速度の差は見られなかった。

3. *WFS1* がインスリン分泌に与える影響に関する解析

*Wfs1*_KD_MIN6 細胞及び non-targeting shRNA を導入した MIN6 細胞 (scramble_MIN6 細胞) においてインスリン分泌を解析した。scramble_MIN6 細胞はグルコース濃度に応じインスリン分泌量が有意に増加した。一方、*Wfs1*_KD_MIN6 細胞では、scramble_MIN6 細胞のようなグルコース濃度への依存性がみられなかった。*Wfs1* 遺伝子抑制によるインスリン分泌能の低下は、野生型 *WFS1* タンパク質の強制発現により回復した。

また、カリウムチャンネル阻害剤 Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌も野生型 *WFS1* タンパク質の強制発現により回復した。次に *Wfs1* KD MIN6 細胞に野生型 *WFS1* タンパク質あるいは変異型 *WFS1* タンパク質を強制発現後、Tolbutamide 刺激によるカルシウムの流入を解析した。その結果、*Wfs1* の抑制により Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの細胞内流入量は減少したが、野生型 *WFS1* タンパク質及び missense 変異型 *WFS1* タンパク質の強制発現により回復した。一方、nonsense 変異型 *WFS1* タンパク質の強制発現では回復しなかった。

【考察】

WFS1 KO iOE iPS 細胞は *WFS1* を強制発現しても内分泌前駆細胞へ分化誘導することができなかった。一方、*Wfs1* ノックアウトマウスや Wolfram 症候群患者では膵臓は正常に発生していることから、*WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立にあたり問題が生じてしまったと考えられる。

膵β細胞である MIN6 細胞では、COS7 細胞や HEK293T 細胞とは異なり、*WFS1* の nonsense や frameshift 変異型タンパク質といった C 末端側のペプチドを欠く *WFS1* 変異

型タンパク質はプロテアソームにより速やかに分解される。これに対して、野生型 WFS1 タンパク質や missense 変異型 WFS1 タンパク質はプロテアソームによる分解が遅いことがわかった。膵β細胞では C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質と完全長の WFS1 タンパク質の分解速度が異なるため、WFS1 の C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質を特異的に分解する機構があると推察している。また、*Wfs1* を抑制した MIN6 細胞では Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの細胞内流入が減少した。一方、WFS1 タンパク質は細胞膜近傍にも存在していることが判明した。以上の 2 点から WFS1 タンパク質の一部は膜近傍に局在し、カリウムチャネルの閉口・脱分極・電位依存性カルシウムチャネルの開口といった細胞膜の近傍で起こる現象にも関わることが示唆された。

【結論】

本研究により膵β細胞では WFS1 タンパク質は C 末端が欠損することでユビキチン-プロテアソーム系により速やかに分解されることがわかった。また、WFS1 タンパク質はグルコース刺激によるインスリン分泌においてカリウムチャネルの閉口・脱分極・カルシウムイオンの細胞内流入に関わることが示唆された。

【主な参考文献】

Matsunaga, K., *et al.*, (2014). Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of *wfs1* gene and characterization of clinical features. PLoS One, 9.

【研究発表】

○徳間 啓、坂野 大介、糸 昭苑、WFS1 の発現低下とインスリン分泌の関連性の解明、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年 12 月 2 日、横浜

APRIN e-Learning 「JST コース（1）生命医科学系」修了証番号：JB0000404418

1. 背景と目的

1-1 糖尿病とは

糖尿病は慢性的に高血糖状態が続く代謝疾患である。日本糖尿病学会による主な診断基準は早朝空腹時血糖値が 126 mg/dL 以上、75 g 経口糖負荷試験の 2 時間後の値が 200 mg/dL 以上、随時血糖値 200 mg/dL 以上の 3 つのうちいずれかを示し、かつ全ヘモグロビン中ブドウ糖と結びついたヘモグロビンの割合を表す Hemoglobin A1C が 6.5 % 以上を示すかである。

血糖値は膵臓に存在する膵島中の膵 β 細胞から分泌されるインスリンというホルモンによって制御される。糖分を含む食物を摂取すると、糖分は消化酵素によりグルコースにまで分解され小腸で血中に取り込まれ血糖値が上昇する。血糖値の上昇は膵 β 細胞にインスリンの分泌を促す。インスリンは骨格筋・筋肉・脂肪細胞を刺激しグルコースの流入を促進させることで、血糖値を低下させる。また、インスリンは肝臓の糖新生に関わる酵素の発現を抑制、グルコースからグリコーゲンへの合成を促進し血糖値を減少させる。

糖尿病は主に 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病、遺伝子異常や他の疾患に伴い発症する糖尿病の 4 つに分類される。

1 型糖尿病は自己免疫系の異常により膵 β 細胞が破壊され、インスリンの絶対量が不足する疾患である。主な治療法はインスリン製剤の注射だが、重篤化すると膵島や膵臓の移植が必要になる。

2 型糖尿病は遺伝的・環境的要因により膵 β 細胞から分泌されるインスリン分泌量及び肝臓・筋肉におけるインスリン感受性が低下しインスリン量の相対的な不足により発症する。主な治療法は栄養バランスの改善といった食事療法、運動療法である。改善が見られない場合はインスリン製剤の注射やインスリン分泌を促進する glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体作動薬、GLP-1 の分解を阻害する dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 阻害薬の投与による治療を行う。GLP-1 は膵 β 細胞に作用し、インスリン分泌を促進するインクレチンというホルモンの 1 つで、GLP-1 受容体に結合し、cAMP の増加によりインスリン分泌を促進する。DPP-4 はインクレチンの不活性化させる酵素である。

妊娠糖尿病とは妊娠中に胎盤から分泌されるプロゲステロンやヒト胎盤性ホルモンによりインスリン感受性が減少し発症する糖尿病である(Gao *et al.*, 2021)。治療法はインスリン製剤の注射や運動療法、食事療法があげられる。

遺伝子変異や他の疾患に伴い発症する糖尿病は膵 β 細胞の発生・機能あるいはインスリン受容体に関わる遺伝子異常や糖尿病を伴う遺伝的症候群、膵疾患、内分泌疾患、肝疾患、薬物使用、化学物質の暴露、ウイルス感染により発症する糖尿病が含まれる。本研究で着目している Wolfram 症候群は遺伝子異常や他の疾患に伴い発症する糖尿病に分類されている。

1-2 遺伝子変異に起因する糖尿病

世界保健機関 (WHO) や日本糖尿病学会によると遺伝子変異に起因する糖尿病は膵β細胞の機能に関わる単一遺伝子の変異、インスリンの作用に関わる単一遺伝子の変異、糖尿病を伴う遺伝的症候群の3つに分けられる。図1に代表的な遺伝子変異に起因する糖尿病について記す。

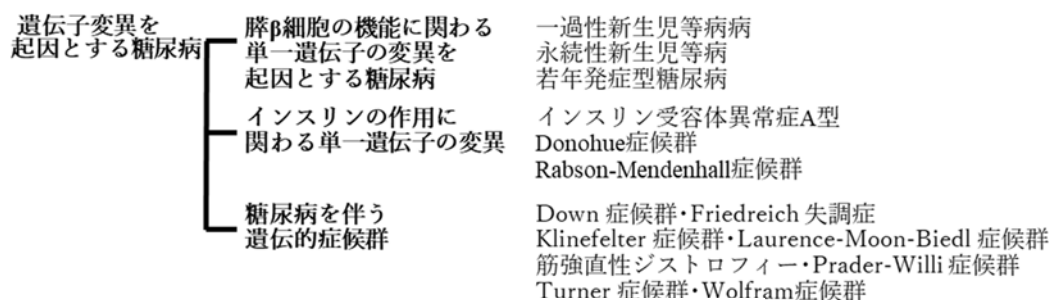


図1 遺伝子変異に起因する糖尿病

1-2-1 膵β細胞の機能に関わる単一遺伝子の変異に起因する糖尿病

膵β細胞の機能に関わる単一遺伝子の変異に起因する糖尿病は新生児糖尿病・若年発症型糖尿病 (MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young) に分けられる。いずれも顕性遺伝による遺伝子疾患である。

新生児糖尿病の生後6か月までに発症し、18か月までに症状が改善する一過性新生児糖尿病とその後も症状が持続する永続性新生児糖尿病に分けられる。永続性新生児糖尿病は一生涯を通じて対処していく必要がある。

永続性新生児糖尿病の原因遺伝子は *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11 (KCNJ11)* 遺伝子と *ATP binding cassette subfamily C member 8 (ABCC8)* 遺伝子あるいはインスリン遺伝子の顕性変異によるものが50%以上を占める。KCNJ11とABCC8はグルコース刺激に対するインスリン分泌経路において重要な役割を果たすATP依存性カリウムチャネルを構成する。また、インスリン遺伝子変異は現在90以上の変異が報告されている。Open Reading Frame 中の変異はインスリンタンパク質の不活性化、ミスフォールディングを引き起こし異常タンパク質となって小胞体ストレスを上昇させる。一方、イントロンや非翻訳領域の変異ではインスリン遺伝子のスプライシングやmRNAの安定性を低下させる(Støy *et al.*, 2021)。Maらはインスリン遺伝子に変異をもつ永続性新生児糖尿病患者の線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、膵β様細胞へ分化させたところ、インスリン分泌不全がみられたことを報告している。一方、CRISPR/Ca9システムを用いてこのiPS細胞のインスリン遺伝子の変異を修復したところ、インスリン分泌不全が改善したと報告している(Ma *et al.*, 2018)。

MODYは、25歳以下で糖尿病を発症・兄弟姉妹の約半分が糖尿病であり、少なくとも3世代にわたって糖尿病が確認されることが診断基準とされている。MODYの原因とされる遺伝子は現在14個が特定されているが、多くは *hepatocyte nuclear factor-4α (HNF-4α)* (MODY1)、 *glucokinase (GCK)* (MODY2)、 *HNF-1α* (MODY3) 遺伝子の変異である。*HNF-1α* や *HNF-4α* は膵β細胞の発生に関わる転写因子であるため、膵β細胞の機能不全によるインスリン分泌量が減少し糖尿病を発症する。また、*HNF-1α* や *HNF-4α* の変異型タンパク質は正常なタンパク質と凝集し、その機能を阻害する(Stoffel and Duncan, 1997; Yamagata *et al.*, 1998)。GCKは膵β細胞において取り込んだグルコースをグルコース-6リン酸へ代謝する酵素であるため、MODY2はインスリン分泌不全を

示すが、MODY1やMODY3に比べ症状が軽度である。主な治療法はK_{ATP} channelの活性を阻害しインスリン分泌を促進するスルホニル尿素薬かインスリン製剤の注射による血糖値の制御である。MODY2患者で報告されているGCKの変異はGCKタンパク質の立体構造が変化することで活性が低下すると報告されている (Estalella *et al.*, 2008)。

ここまで述べてきたような種々の報告が示すように、遺伝性疾患の発症機序研究において従来の遺伝子欠失モデルではなく変異型タンパク質を発現させ、その機能的な変化を解析することは有効な治療法の開発に必要だと考えている。

1-2-2 糖尿病を伴う遺伝的症候群

糖尿病を伴う遺伝的症候群の代表例を表1にまとめた。Wolfram症候群のみが糖尿病を主症状とすることから日本糖尿病学会の2019年のガイドラインではWolfram症候群を糖尿病に伴う遺伝的症候群に分類している。一方、WHOは膵β細胞の機能に関わる単一遺伝子の変異に起因する糖尿病に分類している(図1)。

表1 糖尿病を伴う遺伝的症候群

病名	原因遺伝子	主な症状	備考
Down症候群	21トリソミー	・扁平な顔立ち・つり目 ・成長が緩やか ・心臓疾患・消化器系疾患	糖尿病を伴うことがある
Friedreich失調症	ミトコンドリアの鉄代謝に関わるFrataxin遺伝子変異の常染色体潜性遺伝	・運動機能障害 ・末梢神経障害	膵B細胞の機能不全による糖尿病を発症することが多い
Klinefelter症候群	男性においてX染色体が2つ以上ある	・無精子症などによる不妊 ・高身長	約半数がメタボリックシンドロームとなり、一部で糖尿病を発症
Laurence-Moon-Biedl症候群	BBS1~BBS17遺伝子変異の常染色体潜性遺伝	・肥満 ・知的障害 ・視力低下	肥満により糖尿病を発症することがある
筋強直性ジストロフィー	DM1あるいはDM2遺伝子変異の常染色体顕性遺伝	・筋肉の萎縮と筋力低下 ・筋強直現象 ・多臓器障害	インスリン抵抗性の増大による糖尿病を発症することがある
Prader-Willi症候群	15q11-13の父性発現遺伝子の不活化	・過食傾向 ・中度の知的障害	過食・運動不足による糖尿病
Turner症候群	女性におけるX染色体の一部が欠乏	・性腺機能不全による不妊 ・低身長	30%以下の割合で糖尿病を発症する
Wolfram症候群	WFS1(常染色体潜性遺伝)	糖尿病・視神経萎縮・尿崩症・難聴	糖尿病が主症状である

1-3 Wolfram 症候群に着目したきっかけ

重篤な 1 型糖尿病患者や膵 β 細胞の機能に関わる単一遺伝子の変異に起因する糖尿病患者の有効な治療法の 1 つとして膵島や膵臓移植がある。しかし慢性的にドナー不足という問題を抱えており、多能性幹細胞から分化誘導した膵 β 様細胞が新たな移植源の 1 つとして期待されている。2000 年に Soria らが多能性幹細胞からインスリン分泌能を持つ膵 β 様細胞を *in vitro* で作製に成功したと報告 (Soria *et al.*, 2000) して以来、改良が進められてきた。現在では、*in vitro* で生体の膵 β 細胞と同等のグルコース濃度に応じたインスリン分泌を持つ膵 β 様細胞を iPS 細胞から発生系譜を模倣して分化誘導することが可能である (Hogrebe *et al.*, 2020; Nair *et al.*, 2019; Velazco-Cruz *et al.*, 2019)。

私が所属する研究室でも発生系譜に従った多能性幹細胞から膵 β 様細胞への分化誘導法の改良に取り組んできた (Sakano *et al.*, 2014; Shahjalal *et al.*, 2014; Sim *et al.*, 2022) (図 2A)。現在、ヒト膵島と同等の遺伝子発現を示す機能的な膵 β 様細胞の作製が可能である (図 2B Sim *et al.*, 2022 Figure S5 を引用)。

一方、ゲノム編集技術を用いて健常者由来のヒト iPS 細胞の糖尿病関連遺伝子に変異を導入し、膵 β 様細胞へ分化させるという糖尿病モデルの開発報告がある (Zeng *et al.*, 2016; Leavens *et al.*, 2020)。また、インスリン遺伝子に変異を持つ新生児糖尿病患者からヒト iPS 細胞を樹立しゲノム編集技術を用いて変異を修復し、インスリンタンパク質の機能を回復させた事例もある (Balboa *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2018)。

そこで、私が所属する研究室の健常者由来のヒト iPS 細胞に対して *WFS1* 遺伝子のゲノム編集を行うことで Wolfram 症候群モデルの iPS 細胞由来膵 β 様細胞が作製可能ではないかと考え、ヒト iPS 細胞を用いた Wolfram 症候群モデルの開発を目指した。

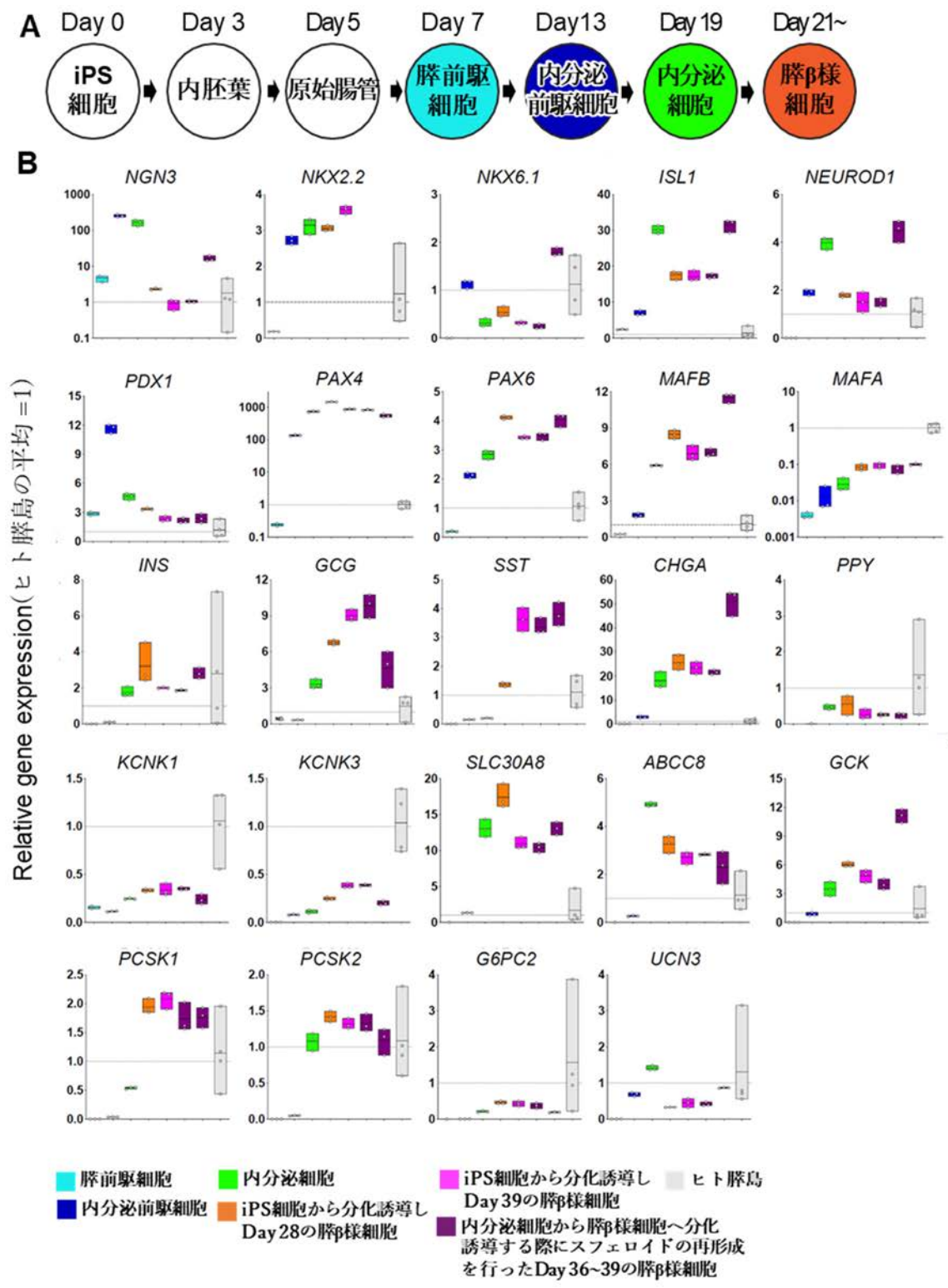


図 2 ヒト iPS 細胞由来膵 β 様細胞への分化

(A) 発生系譜を模倣したヒト iPS 細胞から膵 β 様細胞への分化誘導の概略。未分化 iPS 細胞を用いスフェロイド形成を行った後、段階的に適切な液性因子を含む培養液で培地交換を行うことで内胚葉、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、内分泌細胞を経て膵 β 様細胞へと分化させる。

(B) Sim *et al.*, 2022 Figure S5 を改変。私が所属する研究室でヒト iPS 細胞から、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、内分泌細胞、膵 β 様細胞への分化過程の細胞における遺伝子発現解析結果 (Sim *et al.*, 2022)。

1-4 Wolfram 症候群

1-4-1 Wolfram 症候群とは

Wolfram 症候群は 1938 年に Wolfram と Wagener によって 8 人兄弟中 4 人が家族性の糖尿病 (Diabetes Mellitus) と視神経萎縮 (Optic Atrophy) の合併症として報告した疾患である (Wolfram D.J and Wagener H.P., 1938)。その後、尿崩症 (Diabetes Insipidus) や難聴 (Deafness) との併発が多く報告され、この 4 つの頭文字 (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness) をとって DIDMOAD 症候群とも呼ばれる (Najjar *et al.*, 1985)。

Wolfram 症候群の主な原因遺伝子は 4 番染色体に存在する *Wolfram Syndrome1 (WFS1)* の変異であることが井上らによって報告された。また、Wolfram 症候群の遺伝形式は常染色体潜性遺伝性であることも報告された (Hiroshi Inoue *et al.*, 1998)。現在までに Wolfram 症候群患者において 200 以上の *WFS1* 遺伝子の変異が報告されている (De Franco *et al.*, 2017)。

1-4-2 *WFS1* 遺伝子の発現

WFS1 タンパク質は細胞内で主に小胞体に局在する 9 回膜貫通型タンパク質である (Takeda *et al.*, 2001)。一方、膵β細胞では小胞体に加えインスリン顆粒でも発現が確認されている (Hatanaka *et al.*, 2011a)。

また、*WFS1* mRNA は脳、心臓、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、膵臓での発現が確認されている。組織特異性は見られないが、特に脳、心臓、胎盤、肺、膵臓での発現が強い (図 3A) (Strom *et al.*, 1998)。

一方、各組織内での発現に均一性はない。例えば、脳では海馬の CA1 領域、扁桃体、腹側線条体などでの *WFS1* タンパク質の発現が強い (Luuk *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2001)。膵臓では *WFS1* タンパク質は膵島中の膵β細胞でしか発現しない (Ishihara *et al.*, 2004)。ラットの膵臓の発生過程において *WFS1* タンパク質は胎生 15.5 日目の胎児から単離した膵臓で発現しており、胎生 18.5 日目以降はインスリン陽性細胞でしか発現しない (Xu *et al.*, 2009)。

一方、マウス膵β細胞株において *WFS1* の発現は小胞体ストレスの上昇により mRNA レベルで増加することが報告されており (Ueda *et al.*, 2005)、小胞体ストレスを制御する転写因子が関係していると考えられた。そこで、垣内らがヒト、マウス、ラット、チンパンジーのプロモーター配列を比較したところ、小胞体関連遺伝子の転写制御に関わる配列 (ERSE; ER stress response element) に似ている配列を見つけた。しかし、*WFS1* の発現を制御する転写因子を同定することはできなかった (図 3B) (Kakiuchi *et al.*, 2006)。

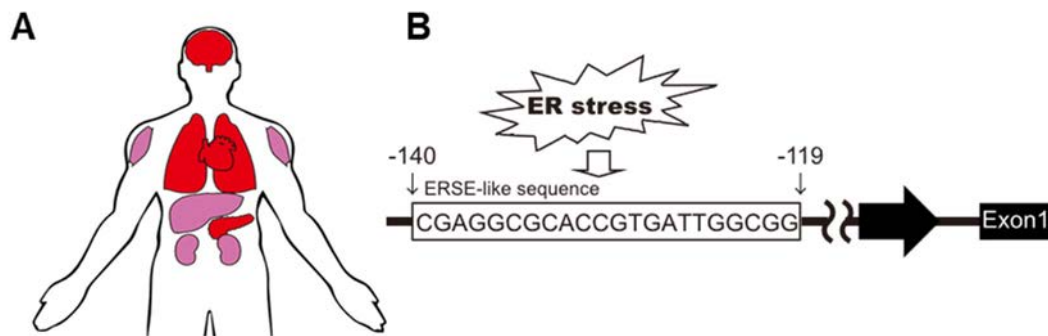


図 3 WFS1 遺伝子の発現

(A) 組織における WFS1 の発現 (Strom *et al.*, 1998)。発現している組織をピンク、その中でも発現が強い組織を赤で示した。(B) WFS1 プロモーターの概略 (Kakiuchi *et al.*, 2006)。

1-4-3 Wolfram 症候群における糖尿病発症のメカニズム

Wolfram 症候群における糖尿病の研究は主に *Wfs1* ノックアウトマウスを用いて行われてきた。*Wfs1* ホモノックアウトマウスは正常に発生するが、生後 6 週齢以降に耐糖能の上昇、10 週齢以降は随時血糖値が上昇する。そこで、*Wfs1* ホモノックアウトマウスから単離した膵島を解析したところ、グルコース刺激に応じたインスリン分泌能の低下がみられた。一方、膵臓組織の免疫組織化学による解析では加齢とともに小胞体ストレスマーカーや酸化ストレスマーカーの発現が上昇することで膵 β 細胞のアポトーシスが誘導され、膵 β 細胞数が減少すると報告されている (Abreu *et al.*, 2020; Ishihara *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2018; Morikawa *et al.*, 2022)。

WFS1 欠失によるインスリン分泌能の低下には WFS1 欠失による ATP 産出能低下 (図 4A) が報告されている。小胞体に局在する WFS1 は Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1)、inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) と複合体を形成する。WFS1-NCS1-IP3R1 複合体はミトコンドリアに存在する Glucose Regulated Protein 75 (GRP75)-Voltage-dependent anion channel1 (VDAC1)-mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) 複合体と結合して小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの輸送を促進する。ミトコンドリアへ輸送されたカルシウムイオンは電子伝達系を活性化させ、ATP の産出を促進する。WFS1 が欠失すると、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの伝達が弱まり、ATP の産出量が減少する (図 4B Delprat *et al.*, 2018 を参考に作製) (Angebault *et al.*, 2018a; Nguyen *et al.*, 2020)。

また、WFS1 タンパク質とインスリン顆粒との関連性も報告されている。インスリンはプレプロインスリンとして生合成され、小胞体へ移行する。小胞体でシグナル配列が切断され、3つのジスルフィド結合が形成され、プロインスリンとなる。プロインスリンは小胞体からゴルジ体へ輸送され、インスリンと C-peptide へ切断され、インスリン顆粒内に蓄えられる (図 4C Tsuchiya *et al.*, 2016 を参考に作製)。インスリンの小胞体からゴルジ体への輸送は輸送するタンパク質を Sar1、Sec23、Sec24、Sec13、Sec31 の複合体で覆われた COP II 被覆小胞で覆い、輸送する。WFS1 は Sec24 と結合することで COP II 被覆小胞が小胞体から放出されるのを補助している。しかし、WFS1 が欠失してしまうと小胞体からゴルジ体へ輸送されるプロインスリンが減少する (Wang *et al.*, 2021) (図 4D Bisnett *et al.*, 2021 と Wang *et al.*, 2021 を参考に作

製)。また、インスリン顆粒は顆粒内が酸性に維持されていることで細胞膜との融合が促進される (Li *et al.*, 2009)。Wfs1 ノックアウトマウスではインスリン顆粒の酸性化が阻害され、細胞膜との融合が減少することから WFS1 はインスリン顆粒の酸性化にも関わっていると考えられている。(図 4E) (Hatanaka *et al.*, 2011b)。

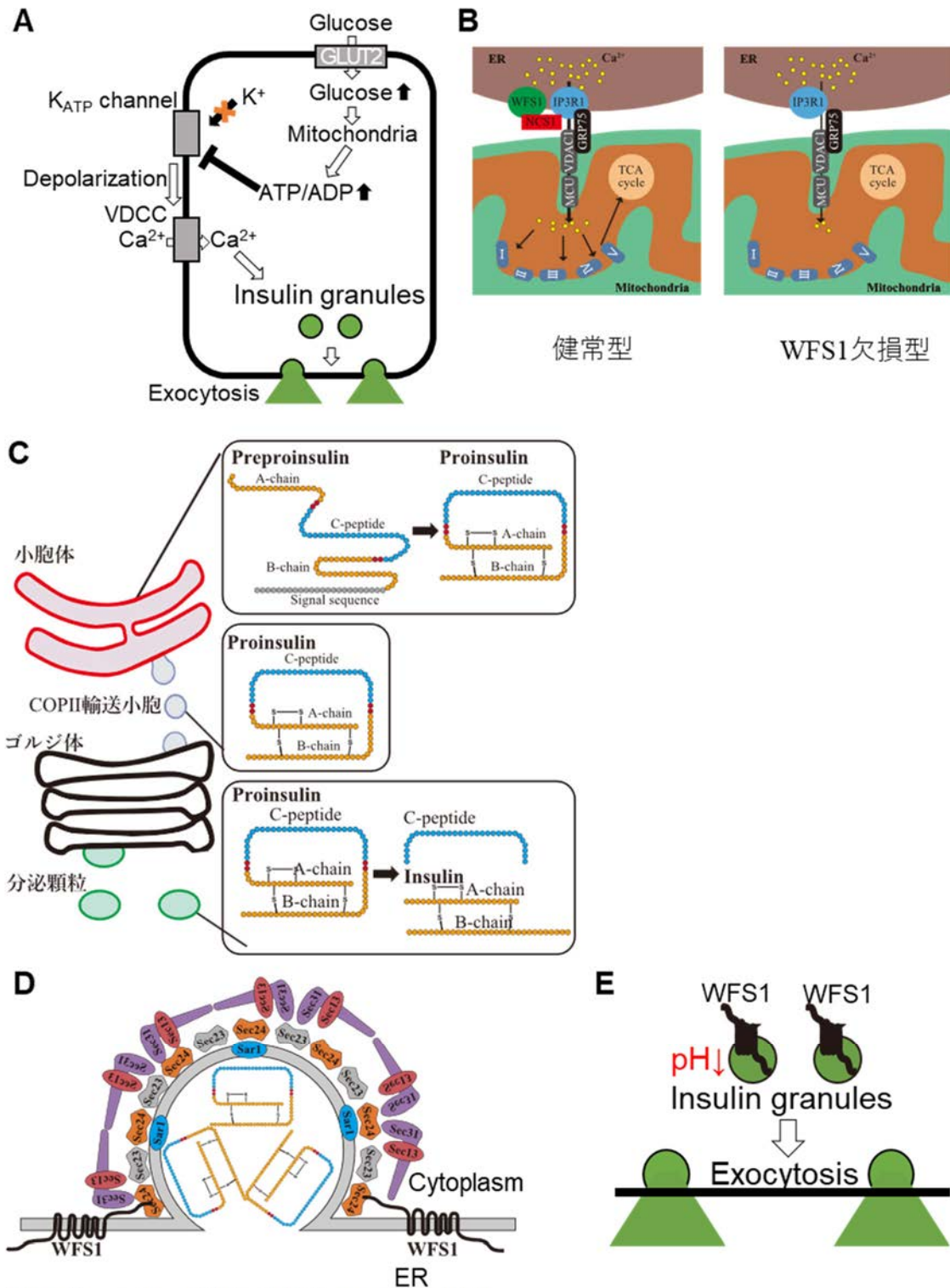


図4 インスリン分泌における WFS1 の役割

(A) 膵β細胞のグルコース刺激によるインスリン分泌様式。

(B) WFS1が欠失すると、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオンの受け渡しが弱まり、ATPの産出量が減少する (Delprat *et al.*, 2018; Angebault *et al.*, 2018a; Nguyen *et al.*, 2020)。

(C) インスリンのプロセッシング (Tsuchiya *et al.*, 2016)。

(D) WFS1はCOPII輸送小胞のSec24と結合し、小胞体からゴルジ体へのプロインスリン輸送を促進する (Bisnett *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021)。

(E) 分泌顆粒に局在するWFS1は分泌顆粒の酸性化を促進する (Hatanaka *et al.*, 2011b)。

小胞体ストレスは環境的要因により正常にフォールディングされなかったタンパク質が異常タンパク質として小胞体に蓄積されていく状態である。異常タンパク質が蓄積されると新規タンパク質の翻訳抑制・小胞体シャペロン *GRP78/BiP* (*binding immunoglobulin protein*) の転写量を増加させ、フォールディングを促進・異常タンパク質をユビキチン化しプロテアソームによる分解に導く小胞体関連分解の 3 つを活性化させる。異常タンパク質の蓄積に伴う翻訳抑制から小胞体関連分化までの一連の反応は小胞体ストレス応答と呼ばれるが、小胞体ストレスを解消しきれない場合は細胞をアポトーシスに導く 3 つ経路 (センサータンパク質) が知られている。いずれも小胞体膜状に存在し、*PERK* (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) 経路・*IRE1* (*Inositol requiring 1*) 経路・*ATF6* (*Activating Transcriptional Factor 6*) 経路と呼ばれている (Adams *et al.*, 2019) (図 5A)。

小胞体ストレスがない軽度な状態では BiP タンパク質が *PERK*、*IRE1*、*ATF6* の 3 つのタンパク質にそれぞれ結合し不活性している。しかし、異常タンパク質が小胞体内に蓄積すると異常タンパク質に結合しフォールディングを試みるため、*PERK*、*IRE1*、*ATF6* の 3 つのタンパク質から BiP タンパク質が離れ、活性化される。BiP が解離した *PERK* は二量体を形成・自己リン酸化により活性化する。活性化した *PERK* は *eIF2 α* をリン酸化し、小胞体ストレスの転写因子の 1 つである *ATF4* の転写を誘導する。*ATF4* は *DDIT3* などの転写を誘導し、*DDIT3* はアポトーシスを誘導する。

また、*IRE1* も BiP の解離により二量体形成および自己リン化を起こし、*Xbp-1* の mRNA をスプライシングする。スプライシングされた *Xbp-1* mRNA 由来のタンパク質は転写因子として小胞体ストレス応答に関連するタンパク質の転写を制御する。

最後に BiP が解離した *ATF6* はゴルジ体へ移動する。ゴルジ体へ移動した *ATF6* は膜貫通領域が切断され、核移行し、転写因子として機能し *Xbp-1*、*DDIT3*、小胞体シャペロンの転写を活性化する。*IRE1*、*PERK*、*ATF6* 経路の中で *WFS1* は *ATF6* 経路とのかかわりが報告されている。*WFS1* は E3 Ubiquitin ligase の 1 種である *HRD1* を介して *ATF6* と結合している。*HRD1* は *ATF6* をユビキチン化することでユビキチン-プロテアソーム系への分解へ導き、*ATF6* の核への輸送を防いでいる。しかし、*WFS1* を欠失すると *WFS1-HRD1-ATF6* 複合体の形成ができなくなり、*ATF6* が核内へ輸送され小胞体ストレスが上昇する (図 5B) (Fonseca *et al.*, 2010)。また、*Wfs1* ノックアウトマウスにおいて *ATF4* の上昇 (Morikawa *et al.*, 2022) や酸化ストレスマーカーの一つである Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) (Kondo *et al.*, 2018) の発現上昇も報告されているが、詳しい作用機序に関する報告はない。

このように Wolfram 症候群における糖尿病は多段階的なインスリン分泌能の低下と小胞体ストレスの上昇による膵 β 細胞数の減少により発症すると考えられている。

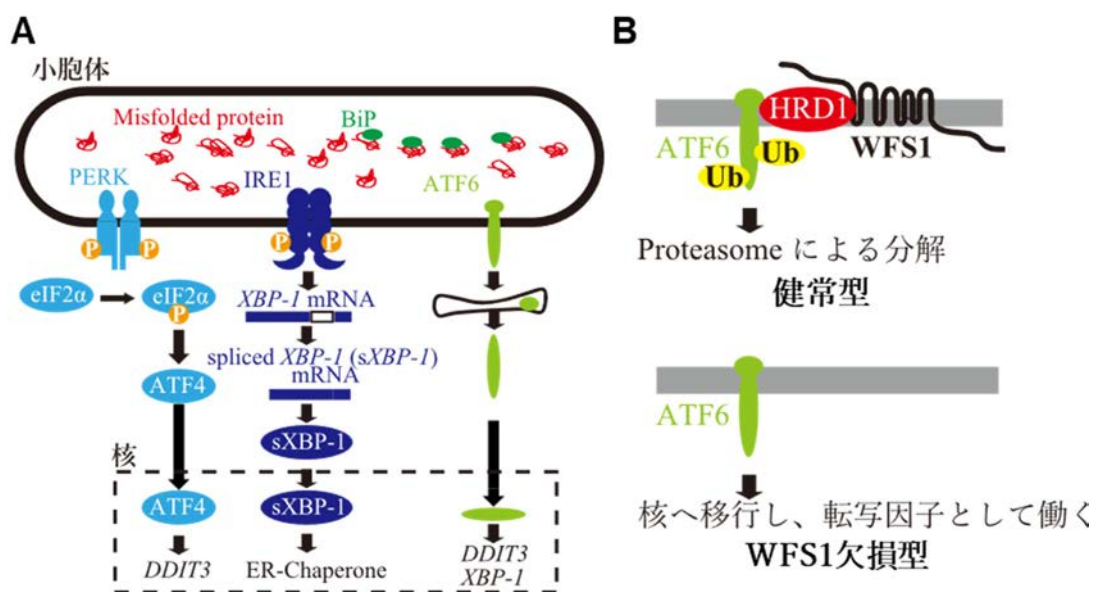


図5 小胞体ストレスにおける WFS1 の役割

(A) 小胞体ストレスの概要 (Adams *et al.*, 2019)。(B) WFS1 は HRD1 と ATF6 とで複合体を形成し、ATF6 の活性を抑制する (Fonseca *et al.*, 2010)。

1-4-4 Wolfram 症候群に対する治療法

Wolfram 症候群に対する根治療法は開発されていないが、WFS1 欠失モデルの研究をもとに治療が試みられている。WFS1 欠失モデルでは小胞体ストレスによる膵 β 細胞のアポトーシスが糖尿病発症の要因の 1 つであることから、小胞体ストレスを軽減する化合物が候補として挙げられている。例えば、4-Phenylbutyric acid (4-PBA) や tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) といったケミカルシャペロンである。これらの化合物は小胞体の異常タンパク質のフォールディングを助け、タンパク質を安定化させることで小胞体ストレスを軽減する。Wolfram 症候群患者から樹立されたヒト iPS 細胞由来膵 β 細胞では健常者由来のものに比べ、小胞体ストレスの上昇がみられるが、4-PBA や TUDCA の添加により小胞体ストレスを軽減することが確認されている (Kitamura *et al.*, 2022; Shang *et al.*, 2014)。また、バルプロ酸は小胞体シャペロン誘導剤であり、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞においてタプシガルギンによる小胞体ストレス誘導を軽減する (Li *et al.*, 2017)。一方、バルプロ酸はてんかんや双極性障害の治療薬としても使用されている。バルプロ酸は小胞体ストレスを誘導を期待できる点と人体への使用実績から現在バーミンガム大学が中心となって Wolfram 症候群患者に対する治験が進められている (NCT03717909 Phase II)。

また、2型糖尿病の治療薬である GLP-1 受容体作動薬も治療薬候補である。GLP-1 受容体作動薬は膵 β 細胞の GLP-1 受容体へ結合し細胞内の cAMP を上昇させることでインスリン分泌を促進する。GLP-1 受容体作動薬を *Wfs1* ノックアウトマウスに 4 週間投与したところ、投与していないマウスに比べ血中インスリン量が増加するなど糖尿病の病態が改善した。また、すでに糖尿病を発症し、インスリン注射により血糖値を制御している Wolfram 症候群患者に GLP1 受容体作動薬を投与したところ、インスリンの投与量を減少させることができた (Kondo *et al.*, 2018)。

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集技術も Wolfram 症候群の治療法として期待されている。Wolfram 症候群患者から樹立したヒト iPS 細胞由来膵 β 細胞は健常者

のものに比べ、小胞体ストレスの上昇やインスリン分泌能の減少など Wolfram 症候群患者と同様の症状を示した。そこで、CRISPR/Cas9 を利用して *WFS1* の変異を修復したヒト iPS 細胞を樹立し、膵β細胞へと分化誘導したところ小胞体ストレスが減少し、インスリン分泌能が改善された (Maxwell *et al.*, 2020)。そこで、*WFS1* 変異を修正する CRISPR/Cas9 システムを搭載したベクターや野生型 human *WFS1* を Wolfram 症候群患者に強制発現させるアデノ随伴ウイルスを感染させ治療できないかと新規治療法が模索されている (Abreu and Urano, 2019)。

1-5 目的

本研究の目的は Wolfram 症候群患者で報告されている *WFS1* 変異に着目し、変異型 *WFS1* タンパク質の性状を比較することで新たな創薬標的を同定することである。

先行研究から *WFS1* の破壊は膵 β 細胞において小胞体ストレスの上昇とインスリンの分泌の減少を引き起こすことで糖尿病を発症する。しかし、Wolfram 症候群患者の *WFS1* 遺伝子は破壊されておらず、変異型 *WFS1* タンパク質を発現していると考えられる。現在までに Wolfram 症候群患者で *WFS1* 遺伝子の変異は 200 以上報告されている。また、Wolfram 症候群患者は 10 歳以下で糖尿病を発症する患者に加え、30 歳程度を発症する患者も報告されている (Matsunaga *et al.*, 2014)。中でも *WFS1* の nonsense 変異や frameshift 変異を持つ患者は報告されている変異の 3 分の 1 程度であるが missense 変異を持つ患者に比べ、糖尿病の発症時期が早い。*WFS1* 変異による糖尿病の発症時期の違いを *WFS1* 欠失モデルで解明することは難しい。そこで、変異型 *WFS1* タンパク質の安定性やインスリン分泌における作用機序を解明することで Wolfram 症候群新たな創薬標的の同定の一助となると考えられる。

本研究では Wolfram 症候群患者で報告されている変異型 *WFS1* タンパク質を強制発現するベクターを構築した。*WFS1* の発現に組織特異性が低いことに着目して、変異型 *WFS1* タンパク質を強制発現するベクターをヒト胎児腎臓上皮由来 HEK293T 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来 COS7 細胞、マウス膵 β 細胞株 MIN6 細胞に導入し変異型 *WFS* タンパク質の性状を比較した。

また、インスリン分泌において変異型 *WFS1* タンパク質がどのような機能を示すかを解析するために、内在性の *Wfs1* の発現を抑制した *Wfs1* knockdown MIN6 細胞 (*Wfs1_KD_MIN6* 細胞)を樹立した。*Wfs1_KD_MIN6* 細胞に変異型 *WFS1* タンパク質を強制発現した。次にグルコース及び K_{ATP} チャンネル阻害剤刺激によるインスリン分泌能やカルシウム動態を解析することで変異型 *WFS1* タンパク質がインスリン分泌においてどのような役割を果たすか解析した。

2. 実験方法

2-1 化合物

化合物は表 2 に従い、DMSO に溶解させ-80°Cで保存した。ただし、Doxycycline は MilliQ 水に溶解し、0.22 μm の filter で滅菌し使用した。

表 2 本研究で使用した化合物

化合物名	保存濃度	使用濃度	購入先	商品番号	作用
Doxycycline	1 mg/mL	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Clontech	631311	Tet-ON system activator
MG-132	10 mM	10 μM	Chem Scene LLC.	CS-0471	Proteasome inhibitor
HaloTag® R110Direct™ Ligand	100 μM	100 nM	Promega	G3221	Green fluorescent HaloTag ligand
HaloTag® TMR Ligand	5 mM	5 μM	Promega	G8252	Red fluorescent HaloTag ligand
Thapsigargin	1.5 mM	100 nM	富士フィルム 和光純薬	209-17281	SERCA inhibitor (ER stress inducer)
Tolbutamide	500 mM	100 μM	富士フィルム 和光純薬	209-09172	Potassium channel blocker

2-2 プラスミドの構築

使用したプライマーは表 3 へ、使用・構築したベクターは表 4 にまとめた。

2-2-1 pCAG-Cre-T2A-ZsGreen1 の作製

pCAGGS-Cre (熊本大学 荒木 喜美教授より供与(Araki *et al.*, 1995)) を鋳型に CAG promoter-NLS-Cre、pTet-DualON (Clontech, Cat: 63112) を鋳型に T2A-ZsGreen1-bGH40pA を KOD FX Neo (Toyobo, Cat: KFX-201) を用いた PCR によって増幅した。次に増幅した 2 つの PCR 産物を In-Fusion (Takara, Cat: 639633) を用いて pBluescript SK (-) (Agilent Technologies, Cat: 212206) の Xho I /EcoRV に挿入し、pCAG-Cre-ZsGreen1 と命名した。

2-2-2 AAVS1 領域のゲノム編集に使用するプラスミド

TALEN 法による遺伝子組み換えには AAVS1 領域の第一イントロンの一部に結合し切断する AAVS1 TALEN-L (Addgene, Cat: 59025, 標的配列: CCCCTCCACCCCACAGT), AAVS1-TALEN-R (Addgene, Cat: 59026, TTTCTGTCACCAATCCT) (González *et al.*, 2014) を利用した。また、AAVS1 領域に組み込むドナーベクターとして CAG プロモーター下で Tet-activator である improved tetracycline-controlled transactivator (以下、rtTA) を恒常的に発現するベクター-AAVS1-Neo-M2rtTA (Addgene, Cat: 60843) (DeKolver *et al.*, 2010) を使用した。Puro-iDEST (Addgene, Cat: 75336) (Zhu *et al.*, 2016) と修士論文研究において作製した 3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry_pENTR1A を Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, Cat: 1179120) を用いて反応させ、TRE プロモーター下で 3×FLAG-hWFS1 (WT) と mCherry を発現する Puro-iDEST-3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry を構築し、AAVS1 領域に組み込むドナーベクターとして使用した。

2-2-3 WFS1_ORF の取得

ヒト臍島 (KAC) から RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Cat: 74106) により RNA を抽出し SuperScript VILO Master Mix (Invitrogen, Cat: 11755500) を用いて cDNA を作製した。次に、ヒト臍島から作製した cDNA を鋳型にして、human *WFS1* (*hWFS1*) の ORF (nt. 1-2673; NP_005996.1aa: 1-890) を WFS1_ORF_F、WFS1_ORF_R をプライマーとして KOD Plus Neo (Toyobo, Cat: KOD-401) を用いた PCR により増幅した。PCR で増幅した *hWFS1* を pET28a (+) (Novagen, Cat: 69864-3CN) の NdeI/XhoI サイトに In-Fusion を用いて挿入し、*hWFS1* (WT)_pET28a (+) と命名した。

2-2-4 HaloTag-hWFS1 を強制発現するベクターの構築

HaloTag_pGEX-6P-3 (HaloTag は *Rhodococcus rhodochrous* の haloalkane dehalogenase をコードする *DhaA* 遺伝子をもとに作られた自己標識化タグである (Ohana *et al.*, 2009) (ベクターは近藤 科江教授・門之園 哲哉テニユアトラック助教より供与) を鋳型に HaloTag の ORF と、*hWFS1* (WT)_pET28a (+) を鋳型に *hWFS1* の ORF を KOD FX Neo を用いた PCR により増幅した。以下のすべての PCR はこの酵素を使用した。次に In-Fusion を用いて Gateway pENTR 1A Dual Selection Vector (Thermo Fisher Scientific, Cat: A10462、以後、pENTR1A) の Kpn I/Xho I へ HaloTag と *hWFS1* (WT) を挿入した。pENTR1A に HaloTag と *hWFS1* (WT) を挿入したベクターを HaloTag_*hWFS1* (WT)_pENTR1A と命名した。

hWFS1 の ORF 部位に 1 塩基変異を入れるために、Raman らの報告 (Raman and Martin, 2014) を参考に In-Fusion の融合部位に 1 塩基が入るようにプライマーを設計した。次に Inverse PCR と In-Fusion クローニング法により 1 塩基変異を導入し、HaloTag-*hWFS1* (Q266X, 409fs/ter440, Y652X, Y735X, W837X, P724L)_pENTR1A と命名した。

HaloTag-*hWFS1*_pENTR1A を Sall/EcoRV で処理し、HaloTag-*hWFS1* を pCAGGS (RDB08938) (Hitoshi *et al.*, 1991) の XhoI/EcoRV へ Ligation high (Toyobo, Cat: LGK-101) を用いて挿入した。pCAG-HaloTag-*hWFS1* と命名した。

HaloTag-*hWFS1*_pENTR1A と pAd/CMV/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific, Cat: V49320) を Gateway LR Clonase II Enzyme mix を用いて LR 反応を行い、HaloTag-*hWFS1* を pAd/CMV/V5-DEST へ組み込んだ。これらのベクターを pAd/CMV/HaloTag-*hWFS1*/V5-DEST と命名した。

2-2-5 レンチウイルスベクターの構築

ZsGreen1 を pTet-DualON を鋳型に PCR で増幅した。PCR で増幅した ZsGreen1 を pLKO.1 (Thermo Fisher Scientific, Cat: RHS4080) の BamH I /KpnI 部位に In-Fusion を用いて挿入した。以降、ZsGreen1 を挿入したレンチウイルスベクターを pLKO.1_ZsGreen1_scramble とした。

Addgene が公開しているプロトコル (<https://www.addgene.org/protocols/plko/>) に従い、mouse *Wfs1* mRNA (NM_011716.2) の CGAAGAGCACTTTACAGAT を標的とする Oligo DNA (m*Wfs1*_shRNA V3LMM_523584_F と m*Wfs1*_shRNA V3LMM_523584_R) を設計し、95°C、10 分で処理し、室温に戻るまで静置しアニールさせることで mouse *Wfs1* に対する shRNA を含む断片を調製した。調製した mouse *Wfs1* shRNA の断片を pLKO.1_ZsGreen1_scramble の Age I /EcoR I 部位に挿入した。Mouse *Wfs1* に対する shRNA を挿入したレンチウイルスベクターを pLKO.1_ZsGreen1_m*Wfs1*_shRNA とした。

2-2-6 3×FLAG-hWFS1 を強制発現するベクターの構築

修士論文研究において作製した3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry_pENTR1AをEcoRI/XbaI で処理した。また、Stuffer_F2とStuffer_R2を混合し、95 °C 10分で処理して室温に戻るまで静置してアニールしたオリゴをLigation highを用いて挿入し、3×FLAG-hWFS1 (WT)_pENTR1Aとした。次に、2-2-2と同様に1塩基変異を導入し、3×FLAG-hWFS1 (Y652X, W837X, P724L)_pENTR1Aとした。最後に2-2-4と同様に3×FLAG-hWFS1 を pAd/CMV/V5-DEST へ組み込んだ。これらのベクターを pAd/CMV/3×FLAG-hWFS1/V5-DESTと命名した。

2-2-7 mCherry-ER の作製

Addgeneに登録されているプラスミド (Addgene plasmid#55041) を参考に作製した。修士論文研究の際に作製したmCherry_pENTR1Aを鋳型にInverse PCRを行い、mCherryの末端にER局在化シグナルであるKDELアミノ酸配列 (AAGGATGAGCTC) を付加したmCherry_KDEL_pENTR1Aを作製した。2-2-1で作製したcDNAを鋳型にCalreticulinをPCRで増幅した。また、mCherry_KDEL_pENTR1Aを鋳型としてinverse PCRを行った。2つのPCR産物をIn-Fusionを用いて融合し、mCherry-ER_pENTR1Aとした。最後に2-2-4と同様にmCherry-ERをpAd/CMV/V5-DESTへ組み込み、pAd/CMV/mCherry-ER/V5-DESTと命名した。

2-2-8 R-GECO の構築

Kalkoらの報告 (Kalko *et al.*, 2011) を参考に作製した。2-2-1で作製したcDNAを鋳型にCalmodulinとcalmodulin-binding peptideをPCRにより増幅した。赤色蛍光タンパク質mAppleの断片をPCRにより増幅した。次にIn-Fusionを用いて、増幅したCalmodulin、calmodulin-binding peptide、mappleをpENTR1AのXho I /BamH I へ挿入し、R-GECO_pENTR1Aと命名した。最後に2-2-4と同様にR-GECOをpAd/CMV/V5-DESTへ組み込み、pAd/CMV/R-GECO/V5-DESTと命名した。

表3 プラスミド構築の際に使用したプライマー

プライマー名	配列	使用目的
WFS1_ORF_F	CGCGCGGCAGCCATATGGACTC CAACACTGCTCC	hWFS1 ORF の取得
WFS1_ORF_R	GGTGGTGGTGCTCGAGCTACAC ATGGTCGCAAGGTC	
CAG_INF_F	CGGGCCCCCCTCGAGCGTTAC ATAACTTACGGTAAATGG	pCAG-Cre-T2A-ZsGreen1 の作製
Cre_INF_R	CTCGGCCCTCACGCGTATCGCC ATCTTCCAGCAG	
T2A_INF_F	TATAGGGCGAATTGGAGCTCCA ACGCGTGAGGGCAGAGGAAGT CTGC	pCAG-Cre-T2A-ZsGreen1 の作製
BGHpA_INF_R	AGTTCTAGAGCGGCCGCCATA GAGCCCACCGCATC	
HaloTag_N_INF_F	AGTCGACTGGATCCGGCCACCA TGGCAGAAATCGGTAATGGCTT	HaloTag ORF の増幅
HaloTag_N_INF_R	GCGGCCGCGAATTCGCATATGA CCGGAAATCTCC	

プライマー名	配列	使用目的
HaloTag_hWFS1_INF_F	AGATTTCGGTCATATGGACTC CAACACTGCTCCG	HaloTag-hWFS1 (WT)_pENTR1A の作製
HaloTag_hWFS1_INF_R	GTCTAGATATCTCGAGTCAGGC CGCCGACAGG	
hWFS1 (P724L)_F	ATGCTCCTGTTCTTCATCGGC	HaloTag-hWFS1 (WT)_pENTR1A の作製
hWFS1 (P724L)_R	GAAGAACAGGAGCATGTTGAT GG	
hWFS1 (W837X)_F	GCAAGTGACCTGICTTCGAGCTCAAG	HaloTag-hWFS1 (W837X)_pENTR1A の作製
hWFS1 (W837X)_R	AGACAGGTCACCTTGCTGCCAG	
hWFS1 (Y735X)_F	GCCTCTAAGGCGAGGCCTACC	HaloTag-hWFS1 (Y735X)_pENTR1A の作製
hWFS1 (Y735X)_R	CCTCGCCTTAGAGGCAGCG	
hWFS1 (Y652X)_F	TATGTGTAAACGCTCAGAGGGCATG	HaloTag-hWFS1 (Y652X)_pENTR1A の作製
hWFS1 (Y652X)_R	TGAGCGTTACACATAGAACCAGCAG	
hWFS1 (409fs/ter440)_F	ATTTCCTGICTCTGICTTCTTCGTC	HaloTag-hWFS1 (409fs/ter440)_pENTR1A の作製
hWFS1 (409fs/ter440)_R	ACAGAGACAGGAAATGGGCATAG	
hWFS1 (Q266X)_F	TGTTCTGTAGGACGACGAAG	HaloTag-hWFS1 (Q266X)_pENTR1A の作製
hWFS1 (Q266X)_R	CGTCCTACAGGAACAGGCTGC	
ZsGreen_INF_F2	CTCCCCAGGGGATCCGCCACC ATGGCCCAGTCCAAG	ZsGreen1 の増幅
ZsGreen_INF_R2	TCATTGGTCTTAAAGGTACCTC AGGGCAAGGCGGAG	
mWfs1_shRNA V3LMM_523584_F	ccggCGAAGAGCACTTTACAGAT CTCGAGATCTGTAAAGTGCTCT TCGttttg	mouse <i>Wfs1</i> に対する shRNA の作製
mWfs1_shRNA V3LMM_523584_R	aattcaaaaaCGAAGAGCACTTTACA GATCTCGAGATCTGTAAAGTGC TCTTCG	
CaM_F	GCTACGCGTGACCAACTGACTG AAGAGCAGATTG	Calmodulin の増幅
CaM_R	CCTCGAGTCACTTTGCTGTCAT CATTTGTACAAAC	
CaM_BP_F	GTGGATCCGGCCACCATGGTCG ACTCATCACGTCG	calmodulin-binding peptide の増幅
CaM_BP_R	CGGGTGAGCTCAGCCGACCTAT	
mApple_F1	GGCTGAGCTCACCCGTGGTTTC CGAGCGGATGTACCCCGAGG	mApple 断片の増幅
mApple_R1	CAGACTCCCGCCTGTACCTCCC TTGTACAGCTCGTCCATGCC	
mApple_F2	ACAGGCGGGAGTCTGGTGAGC AAGGCGGAG	mApple 断片の増幅
mApple_R2	GCAGGTCGACTCTAGACGCGTA GCCTCCCAGCCCATGGTCTTC	
mCherry_KDEL_F	AAGGATGAGCTCTAGATCTAGA CCCAGCTTTC	mCherry-KDEL_pENTR1A の作製
mCherry_KDEL_R	CTAGAGCTCATCCTTCTTGAC AGCTCGTCCATG	

プライマー名	配列	使用目的
CALR_F	GCATACCTGCGGATAATGCTGC TATCCGTGCCGTTGCTG	Calreticulin の増幅
CALR_R	GCCCTTGCTCACCATCGACCGG TCGGCGACGGCCAGGCC	
mCherry_KDEL_F2	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	mCherry-ER_pENTR1A の 作製
mCherry_KDEL_R2	TATCCGCAGGTATGCACGCGTG	
Stuffer_F2	AATTCACGCGTGCATACCTGCGGA	3×FLAG-hWFS1 (WT)_pENTR1A の作製
Stuffer_R2	CTAGTCCGCAGGTATGCACGCGTG	

表 4 本研究で使用したプラスミド

プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
pBluescript SK (-)	Agilent Technologies, Cat: 212206	pCAG-Cre-T2A-ZsGrrenの作製
pCAGGS-Cre	熊本大学 荒木 喜美 教授より供与 (Araki <i>et al.</i> , 1995)	pCAG-Cre-T2A-ZsGrrenの作製
pTet-DualON	Clontech, Cat: 63112	pCAG-Cre-T2A-ZsGrren 、 pLKO.1_ZsGreen1_scrambleの作製
pCAG-Cre-T2A- ZsGreen1	This study Accession No. OQ427853	WFS1 KO iPS細胞からの 薬剤カセットの除去
Puro-iDEST	Addgene Cat: 75336 (Zhu <i>et al.</i> , 2016)	Puro-iDEST-3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherryの作製
3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry_pENTR1A	修士論文研究 Accession No. OQ238874	3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2 -mCherryを挿入したEntry Vector
Puro-iDEST-3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mChery	This study Accession No. OQ427855	AAVS1領域に対するゲノム編集
AAVS1 TALEN-L	Addgene, Cat: 59025 (González <i>et al.</i> , 2014)	AAVS1領域に対するゲノム編集
AAVS1 TALEN-R	Addgene, Cat: 59026 (González <i>et al.</i> , 2014)	AAVS1領域に対するゲノム編集
AAVS1-Neo-M2rtTA	Addgene, Cat: 60843 (DeKelver <i>et al.</i> , 2010)	AAVS1領域に対するゲノム編集
HaloTag_pGEX-6P-3	近藤研究室より供与 (Ohana <i>et al.</i> , 2009)	HaloTag ORFの鋳型
Gateway pENTR1A Dual Selection Vector	Thermo Fisher Scientific, Cat: A10462	Gateway Entry Vector
pAd/CMV/V5-DEST	Thermo Fisher Scientific, Cat: V49320	アデノウイルスを作製するた めのDestination Vector
pCAGGS	RDB08938 (Niwa <i>et al.</i> , 1991)	pCAG-HaloTag-hWFS1を作製する ために使用

プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
HaloTag-hWFS1 (WT) _pENTR1A	This study Accession No. OQ102498	HaloTag-hWFS1 (WT) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (WT) /V5-DEST	This study Accession No. OQ200484	HaloTag-hWFS1 (WT) の強制発現用アデノウイルスベクター
pCAG_HaloTag-hWFS1 (WT)	This study Accession No. OQ362366	HaloTag-hWFS1 (WT) の強制発現用ベクター
HaloTag-hWFS1 (P724L) _pENTR1A	This study Accession No. OQ238869	HaloTag-hWFS1 (P724L) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (P724L) /V5-DEST	This study Accession No. OQ362365	HaloTag-hWFS1 (P724L) の強制発現用アデノウイルスベクター
pCAG_HaloTag-hWFS1 (P724L)	This study Accession No. OQ362369	HaloTag-hWFS1 (P724L) の強制発現用ベクター
HaloTag-hWFS1 (W837X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ200482	HaloTag-hWFS1 (W837X) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (W837X) /V5-DEST	This study Accession No. OQ200485	HaloTag-hWFS1 (W837X) の強制発現用アデノウイルスベクター
pCAG_HaloTag-hWFS1 (W837X)	This study Accession No. OQ362367	HaloTag-hWFS1 (W837X) の強制発現用ベクター
HaloTag-hWFS1 (Y735X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ238870	HaloTag-hWFS1 (Y735X) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (Y735X) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427857	HaloTag-hWFS1 (Y735X) の強制発現用アデノウイルスベクター
HaloTag-hWFS1 (Y652X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ200483	HaloTag-hWFS1 (Y652X) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (Y652X) /V5-DEST	This study Accession No. OQ200486	HaloTag-hWFS1 (Y652X) の強制発現用アデノウイルスベクター
pCAG_HaloTag-hWFS1 (Y652X)	This study Accession No. OQ362368	HaloTag-hWFS1 (Y652X) の強制発現用のベクター
HaloTag-hWFS1 (409fs/ter440) _pENTR1A	This study Accession No. OQ238872	HaloTag-hWFS1 (409fs/ter440) を挿入した Entry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (409fs/ter440) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427859	HaloTag-hWFS1 (409fs/ter440) の強制発現用アデノウイルスベクター

プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
HaloTag-hWFS1 (Q266X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ238873	HaloTag-hWFS1 (Q266X) を挿入したEntry Vector
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (Q266X) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427860	HaloTag-hWFS1 (Q266X) の強制発現用アデノウイルスベクター
プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
pLKO.1	Thermo Fisher Scientific Cat: RHS4080	レンチウイルス作製用ベクター
pLKO.1_ZsGreen1_scramble	This study Accession No. OQ427862	scramble_MIN6細胞樹立用のレンチウイルスベクター
pLKO.1_ZsGreen1_mWfs1_shRNA	This study Accession No. OQ427864	Wfs1_KD_MIN6細胞樹立用のレンチウイルスベクター
mCherry_pENTR1A	修士論文研究 Accession No. OQ262948	mCherryを挿入したEntry Vector
pAd/CMV/mCherry/V5-DEST	修士論文研究 Accession No. OQ427866	mCherryの強制発現用アデノウイルスベクター
pAd/CMV/3×FLAG-WFS1 (WT) -IRES2-mCherry/V5-DEST	修士論文研究 Accession No. OQ427867	3×FLAG-WFS1 (WT) とmCherryの強制発現用アデノウイルスベクター
mCherry-ER_pENTR1A	This study Accession No. OQ262949	mCherry-ERを挿入したEntry Vector
pAd/CMV/mCherry-ER/V5-DEST	This study Accession No. OQ427865	ERに局在するmCherryの強制発現用アデノウイルスベクター
3×FLAG-hWFS1 (WT) _pENTR1A	This study Accession No. OQ262950	3×FLAG-WFS1 (WT) を挿入したEntry Vector
pAd/CMV/3×FLAG-hWFS1 (WT) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427863	3×FLAG-WFS1 (WT) の強制発現用アデノウイルスベクター
3×FLAG-hWFS1 (P724L) _pENTR1A	This study Accession No. OQ262952	3×FLAG-WFS1 (P724L) を挿入したEntry Vector
pAd/CMV/3×FLAG-hWFS1 (P724L) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427861	3×FLAG-WFS1 (P724L) の強制発現用アデノウイルスベクター
3×FLAG-hWFS1 (W837X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ262951	3×FLAG-WFS1 (W837X) を挿入したEntry Vector
pAd/CMV/3×FLAG-hWFS1 (W837X) /V5-DEST	This study Accession No. OQ427858	3×FLAG-WFS1 (W837X) の強制発現用アデノウイルスベクター
3×FLAG-hWFS1 (Y652X) _pENTR1A	This study Accession No. OQ262953	3×FLAG-WFS1 (Y652X) を挿入したEntry Vector

プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
pAd/CMV/3×FLAG-hWFS1 (Y652X)/V5-DEST	This study Accession No. OQ427856	3×FLAG-WFS1 (Y652X) の強制発現用アデノウイルスベクター
pAd/CMV/V5-GW/lacZ	Invitrogen Cat: V49320	lacZの強制発現用アデノウイルスベクター
R-GECO_pETNR1A	This study Accession No. OQ238871	R-GECOを挿入したEntry Vector
プラスミド名	参考文献、購入元, Cat	用途
pAd/CMV/R-GECO/V5-DEST	This study Accession No. OQ427854	R-GECOの強制発現用アデノウイルスベクター

2-3 細胞培養

2-3-1 ヒト iPS 細胞の維持と継代

健康者由来のヒト iPS 細胞株 RPChiPS771-2 (リプロセル) と CRISPR/Cas9 システムにより *WFS1* 遺伝子の開始コドンが存在するエキソン2を欠失した *WFS1* KnockOut iPS 細胞 (修士論文研究で樹立、*WFS1* KO iPS 細胞) を使用した。未分化維持は Synthemax II self-coating (Corning, Cat: 3535) で 16 時間以上コーティングした 10cm dish (Corning, Cat: 3296) 上で StemFitAK02N (AJINOMOTO) を 10 mL/dish、37°C、CO₂ 5% 下で行った。2 日毎に、培地を全量交換した。細胞の播種、継代前後 1 日、ストック作製前日には Y-27632 (Tocris Bioscience, Cat: 125450) が 10.0 μM になるように添加した。また、細胞の保存は STEM-CELLBANKER GMP grade (Takara, Cat: CB045) に 5×10⁵ cells/mL/tube で懸濁したのち、使用するまで -150°C で保存した。

また、免疫細胞化学やウェスタンブロットを行う際は、まず Synthemax II で 16 時間以上コーティングした 96-well plate (Corning, Cat: 3595 以下) を準備した。次にヒト iPS 細胞を TrypLE Express Enzyme (Life Technologies, Cat 1256311) を 37°C 5 分間処理することで剥離した。その後、ピペティングで完全に単一細胞にし、1×10⁴ cells/well の細胞密度で 96 well plate に播種し、2 日間培養したものを解析サンプルとして使用した。

2-3-2 HEK293A, HEK293FT, HEK293T, MIN6, COS7 細胞の維持と継代

HEK293A は P10~P20、HEK293FT は P28~P30、MIN6 細胞は P15~P22 のものを使用した。0.1%ゼラチン/PBS (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.1% Gelatin) で 16 時間以上コーティングした 10 cm dish (Corning, Cat: 430167) 上で 37°C CO₂ 5% 下で培養した。培養液は 10% FBS/DMEM (DMEM 25 mM glucose (Gibco, Cat: 11995073), 10 % fetal bovine serum (Serena, Cat: S-FBS-NL-015), 100 μM non-essential amino acids (Nacalai tesque, Cat: 1140-050), 2 mM L-glutamine (Nacalai tesque, Cat: 16948-04), 50 units/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin (Nacalai tesque, Cat: 26252-94), 100 μM 2-mercaptoethanol (Sigma, Cat: 3148)) を使用した。

2-4 *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立と解析

2-4-1 *WFS1* KO iPS 細胞の *WFS1* 領域の *NeoR* と *PuroR* カセットの除去

WFS1 KO iPS 細胞は StemFitAK02N 培地で未分化維持培養を行った。遺伝子導入は Neon Transfection System 100 μ L Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat: MPK10096)を用いた。1.0 \times 10⁷ cells/mL 細胞 Cre-Electroporation buffer で懸濁し、100 μ L (1.0 \times 10⁶ cells/tip) 分取した。その後、Neon Transfection System を用いて、950 V、30 ms、2 pulses でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションした細胞は 2.0 \times 10⁵ cells/mL となるように懸濁し、10 cm dish 1 枚にした。

エレクトロポレーションから 2 日後に S3e Cell Sorter (Bio-Rad Laboratories, Cat: 1451008J1) を用いて ZsGreen 陽性の単一細胞を 96-well (1 \times 8 Stripwell) (Corning, Cat: 9102) の 1 well に播種し、10 日間培養し、24-well (Corning, Cat: 3337)、6-well Plates (Corning, Cat: 3335)を経て増殖培養し、使用するまで-150 $^{\circ}$ Cに保存した。

2-4-2 TALEN を用いた AAVS1 領域のゲノム編集

Neon Transfection System 100 μ L Kit に付属している R buffer に AAVS1 TALEN-L、AAVS1-TALEN-R、AAVS1-Neo-M2rtTA、Puro-iDEST-3 \times FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry がそれぞれ 12.5 ng/ μ L となるように添加した (以下、AAVS1-Electroporation buffer)。次に 2-4-1 と同様に、合計 6 \times 10⁶ cells の細胞にエレクトロポレーションによってプラスミドを導入し、10 cm dish に播種した。翌日は、10 mL の StemFitAK02N で培地交換を行った。

エレクトロポレーションから 2 日目以降は 75.0 μ g/mL G418 (Sigma, Cat: A1720)で、エレクトロポレーションから 6 日目以降は 75.0 μ g/mL G418 + 0.25 ng/mL Puromycin (Invivo Gen, Cat: ant-pr) / StemFitAK02N で選択培養を行った。エレクトロポレーションから 9 日後は 75.0 μ g/mL G418 + 0.25 ng/mL Puromycin + 10.0 μ M Y-27632 / Stemfit AK02N で選択培養を行った。

エレクトロポレーションから 10 日後に倒立顕微鏡下で 3 個のコロニーをピックアップし、WFS1 KO iOE iPS 細胞 No.1~3 とした。以降は 2-4-1 と同様に操作し、フリーズストックを作製した。ただし、培養液は 75.0 μ g/mL G418+0.25 ng/mL Puromycin/Stemfit AK02N を使用した。

2-4-3 ヒト iPS 細胞のゲノム PCR

ヒト iPS 細胞を 2 \times 10⁵ cells を回収後、lysis buffer (0.1 M NaCl, 50.0 mM Tris-HCl (pH8.0), 10.0 mM EDTA (pH8.0), 0.1% SDS, 0.5 mg/mL Proteinase K) を加え、55 $^{\circ}$ C で 16 時間処理した。その後、フェノール/クロロホルム (1:1 混合)を加え、1 時間攪拌した。13500 g、室温、10 分間遠心後、上清を捨て、同量の 2-プロパノールを加え、13500 g、室温で 10 分遠心した。上清を捨て、70%エタノールを加え、同様の操作を繰り返した。風乾後、TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解し、ゲノム抽出液とした。次に、AAVS1-F (CTGCCGTCTCTCTCCTGAGT)、と Puro-R (GIGGCTTGACTCGGTCAT)、AAVS1-F と Neo-R (CTCGTCCTGCAGTTCATTCA)、WFS1_KO_GT_F (TGGGCACAGAGCCAGGAGTA) と WFS1_KO_GT_R (GGACGCTGGGTCATCTACTTAAGC) のいずれかをプライマーとしてゲノム PCR を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲルを用い、TAE buffer (40.0 mM Tris-acetate, 1.0 mM EDTA) 中で 100V、40 分の電気泳動したのちに、エチジウムブロマイド染色にて解析した。なおアガロースゲルはアガロース (Nacalai tesque, Cat: 01158-85) を TAE で溶解し、作製した。

2-4-4 ヒト iPS 細胞から内分泌前駆細胞への分化誘導と解析

以下の実験は 1 μ g/mL Doxycycline 存在下あるいは非存在下で行った。

ヒト iPS 細胞でのスフェロイド形成 (Day -1)

ヒト iPS 細胞株を、TrypLE Express Enzyme により 37°C 5 分間処理して剥離した。その後、細胞を 5×10^6 cells/well の割合で低吸着 6 well plate (Corning, Cat: 3471) に 5 mL/well に播種した。なお、培養液は 10.0 μ M Y-27632/StemFitAK02N を使用した。この日を Day -1 とした。RemoteShake 加湿対応ロータリーシェーカー (WAKEN, Cat: WB-101SRC) を用いて 95 rpm、37°C、CO₂ 5% で 24 時間培養し、スフェロイドを形成した。

ステージ 1: 未分化状態から内胚葉への分化誘導 (Day 0-2)

前日 (Day -1) に播種した細胞を 1 well/15 mL tube (Corning, Cat: 430791) で回収し、室温で 5 分間静置し、培養液を除去した。次に、D-PBS (+) (D-PBS (-) (Nacalai tesque, Cat: 14249-24) +D-PBS (+) 調製用 Ca, Mg 溶液 (Nacalai tesque, Cat: 02492-94) 1/100) を 5 mL/tube で加え、洗浄した。続いて、S1 Medium に CHIR99021 (Wako, Cat: 034-23103) を 3.0 μ M、Y-27632 を 10.0 μ M になるように添加した S1 Medium を 5 mL/tube で加え、1 tube/well で再播種し、95 rpm、37°C CO₂ 5% で 24 時間培養した。その後、2 日間は S1 Medium で 5 mL/well で培養液を交換した。

S1 Medium	会社, Cat	ストック濃度	最終濃度	ストック保存条件
MCDB131	Gibco, Cat: 10372019			4°C 保存
Penicillin (P)- Streptomycin (S)	Nacalai tesque, Cat: 26252-94	P: 10.0 mg/mL S: 10.0 mg/mL	P: 0.1 mg/mL, S: 0.1 mg/mL	-20°C 保存
Glucose	Otsuka, Cat: 15800AMZ00387	555.0 mM	8.0 mM	0.22 μ m フィルターで 滅菌後 4°C に保存
NaHCO ₃	Nacalai tesque, Cat: 31213-15	-	2.46 mg/mL	粉末状で室温保存
FAF-BSA	Proliant Biologicals, Cat: 68700-100G	-	5.0 mg/mL	粉末状で 4°C 保存
L-Glutamine	Nacalai tesque, Cat: 16948-04	0.2 M	2.0 mM	-20°C 保存
ITS-X	Gibco, Cat: 41400-045	-	20.0 nL/mL	4°C 保存
Activin	API, Cat: GF-001-3000L	100.0 μ g/mL	100.0 ng/mL	0.1% BSA/PBS に溶解 させ、-80°C 保存

ステージ 2: 内胚葉から原始腸管への分化誘導 (Day 3-5)

1 well/15 mL tube で回収し、室温で 5 分間静置し培養液を除去した。続いて、S2 Medium を 5 mL/tube で加え、播種した。Day 5 にも S2 Medium で培地交換を行った。

S2 Medium	会社, Cat	ストック濃度	最終濃度	ストック保存条件
MCDB131	Gibco, Cat: 10372019			4°C 保存
Penicillin (P)- Streptomycin (S)	Nacalai tesque, Cat: 26252-94	P: 10.0 mg/mL, S: 10.0 mg/mL	P: 0.1 mg/mL, S: 0.1 mg/mL	-20°C 保存
Glucose	Otsuka, Cat: 15800AMZ00387	555.0 mM	8.0 mM	0.22 μ m フィルターで 滅菌後、4°C に保存
NaHCO ₃	Nacalai tesque, Cat: 31213-15	-	1.23 mg/mL	粉末状で室温保存

FAF-BSA	Proliant Biologicals, Cat: 68700-100G	-	5.0 mg/mL	粉末状で 4°C 保存
L-Glutamine	Nacalai tesque, Cat: 16948-04	0.2 M	2.0 mM	-20°C 保存
Vitamin C	Sigma, Cat: SLBN3833V	4.4 mg/mL	44.0 µg/mL	MilliQ 水に溶解後、 0.22 µm フィルターで 滅菌後、-20°C に保存
ITS-X	Gibco, Cat: 41400-045	-	20.0 nL/mL	4°C 保存
KGF	Wako, Cat: 116-00811	50.0 µg/mL	50.0 ng/mL	0.1% BSA/PBS に溶解 させ、-80°C 保存

ステージ 3: 原始腸管から腭前駆細胞への分化誘導 (Day 6)

ステージ 2 と同様に S2 Medium から S3 Medium へ培養液を交換した。

S3 Medium	会社, Cat	ストック濃度	最終濃度	ストック保存条件
MCDB131	Gibco, Cat: 10372019			4°C 保存
Penicillin (P) Streptomycin (S)	Nacalai tesque, Cat: 26252-94	P: 10.0 mg/mL, S: 10.0 mg/mL	P: 0.1 mg/mL, S: 0.1 mg/mL	-20°C 保存
Glucose	Otsuka, Cat: 15800AMZ00387	555.0 mM	8.0 mM	0.22 µm のフィルター で滅菌後、4°C に保存
NaHCO ₃	Nacalai tesque, Cat: 31213-15	-	1.23 mg/mL	粉末状で室温保存
FAF-BSA	Proliant Biologicals, Cat: 68700-100G	-	5.0 mg/mL	粉末状で 4°C 保存
L-Glutamine	Nacalai tesque, Cat: 16948-04	0.2 M	2.0 mM	-20°C 保存
Vitamin C	Sigma, Cat: SLBN3833V	4.4 mg/mL	44.0 µg/mL	MilliQ 水に溶解後、 0.22 µm のフィルター で滅菌後、-20°C 保存
ITS-X	Gibco, Cat: 41400-045	-	5020.0 nL/mL	4°C 保存
KGF	Wako, Cat: 116-00811	50.0 µg/mL	50.0 ng/mL	0.1% BSA/PBS に溶解 させ、-80°C 保存
SNAT1	Sigma, Cat: S4572	2.5 mM	250.0 nM	DMSO に溶解させ、 -80°C 保存
All-Trans Retinoic Acid	Stemgent, Cat: 04-0021	0.1 M	2.0 µM	DMSO に溶解させ、 -80°C 保存
PdBU	LC Laboratories, Cat: P-4833	5.0 mM	0.5 µM	DMSO に溶解させ、 -80°C 保存
Y-27632	Tocris Bioscience, Cat: 125450	10.0 mM	10.0 µM	滅菌水へ溶解し、 -80°C 保存
LDN193189	Wako, Cat: SML0559	1.0 mM	100.0 nM	滅菌水に溶解させ、 -80°C 保存

ステージ 4: 腭前駆細胞から内分泌前駆細胞への分化誘導 (Day 7-11)

Day 7 にステージ 2 と同様に S3 Medium から S4 Medium へ培養液を交換した。Day 9、11 も S4 Medium で培地交換を行い、Day 12 で終了とした。

S4 Medium	会社, Cat	ストック濃度	最終濃度	ストック保存条件
MCDB131	Gibco, Cat: 10372019			4°C保存
Penicillin (P)- Streptomycin (S)	Nacalai tesque, Cat: 26252-94	P: 10.0mg/mL, S: 10.0mg/mL	P: 0.1 mg/mL, S: 0.1 mg/mL	-20°C保存
Glucose	Otsuka, Cat: 15800AMZ00387	555.0 mM	8.0 mM	0.22 μm のフィルター で滅菌後、4°C保存
NaHCO ₃	Nacalai tesque, Cat: 31213-15	-	1.23 mg/mL	粉末状で室温保存
FAF-BSA	Proliant Biologicals, Cat: 68700-100G	-	5.0 mg/mL	粉末状で 4°C保存
L-Glutamine	Nacalai tesque, Cat: 16948-04	0.2 M	2.0 mM	-20°C保存
Vitamin C	Sigma, Cat: SLBN3833V	4.4 mg/mL	44.0 μg/mL	MilliQ 水に溶解後、 0.22 μm のフィルター で滅菌後、-20°C保存
ITS-X	Gibco, Cat: 41400-045	-	5020.0 nL/mL	4°C保存
KGF	Wako, Cat: 116-00811	50.0 μg/mL	50.0 ng/mL	0.1%BSA/PBS に溶解 させ、-80°C保存
SNAT1	Sigma, Cat: S4572	2.5 mM	250.0 nM	DMSO に溶解させ、 -80°C保存
All-Trans Retinoic Acid	Stemgent, Cat:04-0021	0.1 M	1.0 nM	DMSO に溶解させ、 -80°C保存
Y-27632	Tocris Bioscience, Cat: 125450	10.0 mM	10.0 μM	滅菌水へ溶解し、 -80°C保存
Activin	API, Cat: GF-001-3000L	100.0 μg/mL	5.0 ng/mL	0.1%BSA/PBS に溶解 させ、-80°C保存

免疫細胞化学による分化効率の評価

内胚葉への分化誘導が終了した Day 3 あるいは内分泌前駆細胞 (Day 12) を採取した。4% PFA/PBS (-) (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 4% Paraformaldehyde) で固定した。PBS-T (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20) で洗浄後、1% Triton (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1% Triton-X100) を用い 10 分間透過処理を行った。PBS-T で洗浄後、Blocking one (nacalai tesque, 03953-95) を PBS-T で 5 倍希釈したものをを用い 90 分間ブロッキングを行った。その後、1 次抗体を用いて 4°C で 16 時間反応させ、PBS-T で洗浄後、2 次抗体で 90 分、室温で反応させた。PBS-T で洗浄後解析した。

免疫細胞化学を行ったスフェロイドの写真を ImageXpress Micro Confocal で取得後、MetaXpress (ともに Molecular Devices) を用いて解析した。

内胚葉細胞の免疫細胞化学の 1 次抗体は Goat anti-Human SOX17 Antibody (R&D Systems, Cat: AF1924) (1/100)、Mouse anti-Oct-3/4 Antibody (C-10) (Santa Cruz, Cat: sc -

5279) (1:100) を用いた。2次抗体は Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Cat: 705-547-003)、Alexa Fluor 647 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 715-607-003) (1/1000) 及び 25 µg/mL DAPI である。

内分泌前駆細胞の免疫細胞化学の 1次抗体は Mouse anti-NKX6-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Cat: F55A10; RRID: AB_532378)、Goat anti-Human PDX-1/IPF1 Antibody (Goat, Cat: AF2419) である。2次抗体は Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 715-547-003) (1/1000)、Alexa Fluor 647 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-goat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 705-607-003) (1:1000) 及び 25 µg/mL DAPI(Roche, Cat: 10236276001) である。

2-5 アデノウイルスの作製

2-5-1 アデノウイルスの作製

HEK293A 細胞を 10 cm dish (Corning, Cat: 430167) 上で維持した。5.0×10⁵ cells を 6-well Plates (Corning, Cat: 3516) の 1 well に播種した。播種後すぐに Pac I で処理したアデノウイルスベクターを Lipofectamine3000 (Thermo Fisher Scientific, Cat: L3000008) を用いて、HEK293A 細胞に導入した。2日後または3日後に 80% になったのを確認した時点で、10 cm dish に全細胞を播種した。翌日、再度、アデノウイルスベクターを HEK293A 細胞に導入した。その後、80% がプラークになるまで培養し、培養液と合わせて回収した。回収した細胞を凍結融解 (-80°C 30 分、37°C 15 分) を 2 回繰り返して破壊し、1680 g、室温、15 分で遠心後、上清からアデノウイルスを粗精製した。粗精製したアデノウイルス 100 µL を 10 cm dish 上でコンフルエントにした HEK293A 細胞に添加し、80% がプラークになるまで培養した。さらに、同様の手法を繰り返すことでアデノウイルスの 2 次ストック及び 3 次ストックを作製した。

2-5-2 アデノウイルスの力価測定

50% Tissue Culture Infectious Dose 法を用いた。Takara の web 上 (https://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech_info_detail.php?mode=2&masterid=M100003075&unitid=U100004264) で公開されているプロトコル及び Asada らの報告 (Asada *et al.*, 2018) に従った。なお、細胞は HEK293A P15 を使用した。

2-6 HaloTag システムを用いた変異型 WFS1 タンパク質の安定性の解析

2-6-1 Pulse labeling

Easy iMatrix-511 (Matrixome, Cat: 892018) で 16 時間以上コーティング処理した Corning 96-well plate (Corning, Cat: 3595) に 1 well あたり 5.0×10⁴ cells の密度で播種した。細胞を播種する際、培養液中にアデノウイルス 3 次ストックを MOI (multiplicity of infection) = 3.35 PFU/cells となるように加え、アデノウイルスを感染させた。

アデノウイルス感染を行った 32 時間後に 0.1 µM 緑色蛍光リガンド HaloTag® R110Direct™ Ligand を含む培養液に交換し 16 時間培養した。HaloTag-hWFS1 タンパク質が緑色蛍光 R110 ligand で標識されたのを確認して、培養液で洗浄した。次に、10 µM MG132 あるいは DMSO を 1000 分の 1 の割合で加えた培養液に交換し、37°C CO₂ 5% 下で 7 時間培養した。7 時間後、10 µM MG132 あるいは DMSO を 1000 分の 1 の割

合で加え、さらに 5 μ M 赤色蛍光リガンド HaloTag® TMR Ligand となるように添加した培養液に交換し、15 分培養した。培養液で洗浄後、再度 30 分培養し、再度洗浄した。次に、それぞれ培養液の半量を 4% PFA/PBS (-)室温で固定した (15 分 \times 2 回)。D-PBS (-) で洗浄後、DAPI 25 μ g/mL で染色した。ImageXpress Micro で画像を取得した。解析は MetaXpress (Molecular Devices) を用いて、DAPI を基準に細胞を認識し、細胞膜の蛍光強度を算出した。次にバックグラウンドの値を引いて、グラフに示した基準値が 1 となるように相対値を算出した。

また、COS7 細胞も同様に行ったが、96 well plate には 1.0×10^4 cells の密度で播種し、アデノウイルス 3 次ストックは MOI = 50 PFU/cells となるように加えた。一方、HEK293T 細胞は 96 well plate に 1.0×10^4 cells の密度で播種し、アデノウイルス感染ではなく、Lipofectamine 3000 を用いベクターを導入した。

表 5 使用したベクター、形状、細胞の組み合わせ

使用したベクター	導入した形状	導入した細胞
pAd/CMV/HaloTag-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y735X, Y652X, 409fs/ter440, Q266X) /V5-DEST	アデノウイルス	MIN6, COS7 細胞
pAd/CMV/V5-GW/lacZ	アデノウイルス	MIN6, COS7 細胞
pCAG-HaloTag-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y652X)	ベクター	HEK293T 細胞
pCAGGS	ベクター	HEK293T 細胞

2-6-2 Pulse-chase assay

MIN6 細胞、COS7 細胞、HEK293T 細胞を 96 well plate に 1.0×10^4 cells の密度で播種し、Lipofectamine 3000 を用いて、ベクター (pCAG-HaloTag-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y652X)) を導入した。次に、2-6-1 と同様に MG132、HaloTag® R110Direct™ Ligand、HaloTag® TMR Ligand で処理した。そして、Hoechst 33342 (Bio-Rad Laboratories Inc., Cat: 1351304) を用いて細胞核を染色後に、特定の細胞の画像を 0, 8, 16, 24 時間後に ImageXpress Micro を用いて取得し、2-6-1 と同様に解析した。

2-7 Wfs1_knockdown (Wfs1_KD) _MIN6 細胞の樹立

2-7-1 レンチウイルスの産出

10 cm dish 上で 80% コンフルエントになった HEK293FT 細胞を 5.0×10^5 cells を 6-well plate の 1 well に播種した。翌日、Lipofectamine3000 を用いて pLKO.1_ZsGreen1_scramble あるいは pLKO.1_ZsGreen1_mWfs1_shRNA 及び Trans-Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific, Cat: TLP4606) を HEK293FT 細胞に導入した。2 日後及び 3 日後に上清を回収し、190 g、室温、5 分で遠心後、上清をレンチウイルス溶液とした。

2-7-2 Wfs1_KD _MIN6 細胞の単離

80% コンフルエントの MIN6 細胞 5.0×10^5 cells を 6-well Plate 1 well に播種し、翌日、培養液をレンチウイルス溶液に交換し、レンチウイルスを MIN6 細胞へ感染させた。更に翌日に 10% FBS/DMEM に交換した。

5 日後に D-PBS (-) で洗浄後、S3e Cell Sorter を用いて単一細胞を 96-well (1 \times 8 Stripwell) の 1 well に播種し、scramble_MIN6 細胞及び Wfs1_KD_MIN6 細胞を樹立した。

2-8 Wfs1_KD_MIN6 細胞の解析

2-8-1 小胞体ストレス誘導

2-6 と同様に 96-well plate に scramble_MIN6 細胞または Wfs1_KD_MIN6 細胞を播種し、24 時間培養した。次に、1.5 mM Thapsigargin を 15000 分の 1 の割合で DMEM/10% FBS に添加し、100 nM Thapsigargin となるようにした培養液を用意した。また、コントロールとして DMEM/10% FBS に 15000 分の 1 の割合で DMSO を添加した培養液を用意した。次に、200 μ L/well の割合で培養液を交換し、24 時間培養した。24 時間後、2-6 と同様に細胞を固定した。その後、1% Triton/PBS(-) を用い、10 分間透過処理を行った。次に PBS-T で洗浄後、Blocking one を PBS-T で 5 倍希釈したものを用い 90 分間ブロッキングを行った。その後、1 次抗体を用いて 4°C で 16 時間反応させ、PBS-T で洗浄後、2 次抗体で 90 分、室温で反応させた。PBS-T で洗浄後解析した。解析は ImageXpress Micro で画像を取得した。その後、MetaXpress (Molecular Devices) で解析した。なお、使用した 1 次抗体は ATF-4 (D4B8) Rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Cat: 11815)、Anti-ATF6 α (Santa Cruz, Cat: sc-166659)、2 次抗体は CF568 Donkey Anti-mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed (Biotium Cat: 20802) (1/1000)、Alexa Fluor 647 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 711-607-003) (1/1000) 及び 25 μ g/mL DAPI である。

2-8-2 グルコースまたは Tolbutamide 刺激に応じたインスリン分泌能の解析

2-6 と同様に 96-well plate に scramble_MIN6 細胞または Wfs1_KD_MIN6 細胞を播種し、アデノウイルスを感染させた。感染から 3 日後、C-peptide 分泌の解析を行った。各 well から培養液を全量取り除き、2.5 mM glucose/KRB buffer (133.4 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 5.0 mM NaHCO₃, 10.0 mM HEPES, 0.2% Bovine Serum Albumin (Sigma, Cat: A9205)) を 200 μ L/well の割合で加えた。その後、2.5 mM glucose/KRB buffer を取り除き、細胞を 3 回洗浄した。次に、2.5 mM glucose/KRB buffer を 200 μ L/well の割合で加え、30 分 37°C CO₂ 5% 下で培養した。30 分後培養液を全量取り除き、2.5 mM glucose/KRB buffer を 200 μ L/well の割合で加え、1 時間 37°C CO₂ 5% 下で培養した。1 時間後、加えた 2.5 mM glucose/KRB buffer をすべて回収し、20.0 mM glucose/KRB buffer あるいは 2.5 mM glucose+100 μ M Tolbutamide/KRB buffer を 200 μ L/well の割合で加え、再度 1 時間 37°C CO₂ 5% 下で培養した。再び、培養液をすべて回収し、各 well を D-PBS (-) で洗浄後、1% Triton/PBS (-) 100 μ L/well で細胞をすべて剥離し、回収した。また、回収した培養液は 700 g、室温、5 分で遠心後、50 μ L のみを -80°C で保存した。細胞を回収した 1% Triton/PBS (-) も同様に -80°C で保存した。

保存した 2.5 mM glucose/ KRB buffer, 20.0 mM glucose/KRB buffer、2.5 mM glucose+100 μ M Tolbutamide/KRB buffer はマウス C-peptide 測定用 ELISA キット、レビス C-ペプチド-マウス (U タイプ) (富士フイルムワコーシバヤギ, Cat: AKRCP-031) を用いて測定した。なお、キットに添付されている緩衝液で 2.5 mM glucose/KRB buffer を 10 倍、20.0 mM glucose/KRB buffer を 50 倍、2.5 mM glucose+100 μ M Tolbutamide/KRB buffer を 50 倍に希釈し測定、解析した。また、1% Triton/PBS (-) 中に含まれる総タンパク質量は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat: 23225) を用いて測定した。吸光度はともに、高感度マルチモードプレートリーダー GloMax® Discover System (Promega, Cat: Gm3000) で測定した。

2-8-3 Tolbutamide 刺激に応じた Ca²⁺ imaging

2-6と同様に96-well plateにMIN6細胞を播種し、アデノウイルスを感染させた。感染から3日後、Ca²⁺ imagingを行った。2-8-2と同様に細胞を3回洗浄した。次に、2.5 mM glucose/KRB bufferを200 µL/wellの割合で加え、30分37°C CO₂ 5%下で培養した。30分後、各wellから培養液を全量取り除き、2.5 mM glucose/KRB bufferを80 µL/wellの割合で加えた。次に、倒立型リサーチ顕微鏡 IX83 (オリンパス) のステージにセットし、対物レンズ UAPON100XHOTIRF (NA=1.49; オリンパス) およびIMMERSION OIL TYPE-F (オリンパス)、MetaMorph (Molecular Device) を用いて、1秒ごとに5分間画像を取得した。画像取得中に2.5 mM glucose+500 µM Tolbutamideを20 µL加え、最終濃度を2.5 mM glucose+100 µM Tolbutamide/KRB bufferにし、1秒ごとに10分間画像を取得した。画像を取得中のZ軸の焦点のずれを防ぐために対物レンズと細胞dishの距離を検出しピントを調整する IX3-ZDC2 (オリンパス) を用いた。撮影した画像はMATLAB R2020b (Mathwork) を用いて細胞ごとの蛍光強度の変化を解析した。

2-9 遺伝子発現解析

2-9-1 cDNA の作製

3.0×10⁵ cellsをシカジーニアス® RNA プレップキット (組織用) (関東化学, Cat: 08057-96) に添付されたLysis bufferに溶解し、-RNAを抽出した。次にPrimeScript RT Master Mix (Takara, Cat: RR036B) を用いて逆転写反応37°C 15分、酵素の失活85°C 5秒で行い、cDNAを作製した。なお、逆転写に用いた反応液組成は以下に示すとおりである。

PrimeScript RT Master Mix	2.0 µL
鋳型 RNA	500.0 ng 相当
RNase free water	to 10.0 µL
Total	10.0 µL

2-9-2 Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

遺伝子発現量解析は上記で作成したcDNAを用いて、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo, Cat: QPX-201) によるReal-Time quantitative PCRを行った。反応はStepOneリアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific, Cat: 4376357) を用いて、熱変性反応95°C 15秒、アニーリング及び伸長反応60°C 30秒の40サイクル、融解曲線反応95°C 15秒、60°C 1分、95°C 15秒で行った。Relative Standard Curve法により発現量を定量した。使用したプライマーは表5に示した。

THUNDERBIRD Next SYBR qPCR premix	8.0 µL
25 mM primer Forward primer	1.0 µL
25 mM primer Reverse primer	1.0 µL
cDNA	2.0 µL
MilliQ 水	8.0 µL
Total	20.0 µL

表 6 RT-qPCR に使用したプライマー

Gene	Forward	Reverse
mouse <i>β-actin</i>	TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG	CGTGGGCCCGCCCTAGCACCA
<i>HaloTag-hWFS1</i>	CAAAGCCTGCCTAACTG	AAGGGGATTTCCATGTCTCC
mouse <i>Wfs1</i>	CTGGAAACTCAACCCCAAGA	TTGGATTCCTGCTGACGAG

2-10 Western blotting

2-10-1 サンプルの調製

2-6 と同様に 96 well plate に MIN6 細胞を播種し、2 日間培養した。2 日後に、33 $\mu\text{L}/\text{well}$ の割合で 2×Sample buffer (0.1 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% Glycerol, 1.7 M 2-mercaptoethanol) で溶解し、55 °C 16 時間で処理した。あるいは、loading buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 41.6 mM dithiothreitol) に溶解後、超音波破碎を 20 秒行い、55°C 40 時間処理した。

2-10-2 SDS-PAGE によるタンパク質の分離

Laemmli らの方法に従った (Laemmli, 1970)。タンパク質の分離は 8% アクリルアミドゲルによる SDS-PAGE で行い、SDS-PAGE の電気泳動槽は Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, Cat: 5535)、電気泳動のバッファーは Tris/Glycine/SDS buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) を使用した。電気泳動は PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, Cat: 1645052) を用いて、室温中で濃縮ゲル中では 10 mA 30 分・分離ゲル中では 20 mA 120 分、あるいは氷上で 10 mA 180 分でタンパク質を分離した。

2-10-3 タンパク質の PVDF メンブレンへの転写

セミドライ式の転写

イモビロン (Immobilon) -P メンブレン, PVDF (Millipore, Cat: IPVH00010、以下 PVDF) を分離ゲルの大きさに切断後、メタノール (Nacalai tesque, Cat: 21915-93) で 5 分以上浸して活性化した。ブロッキング用ろ紙 (GE Healthcare, Cat: 3030-909) を分離ゲルの大きさに切断後、Transfer buffer A (0.3 M Tris, 20% MeOH), B (2.5 mM Tris, 20% MeOH), C (2.5 mM Tris-Boric acid (pH9.5), 20% MeOH) に 30 分以上浸した。また、PVDF を Transfer buffer B に 30 分以上浸した。SDS-PAGE 後のゲルから濃縮ゲルを切断後、分離ゲルを下図 (セミドライ式による分離ゲルから PVDF 膜への転写) に従いセットした。次に Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Cat: 170-4150J1) を用いて、110 mA/枚の定電流を 30 分間加えた。転写後、PBS-T (137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.1% Tween-20)、室温で 70 rpm 10 分で洗浄を 2 回行った。

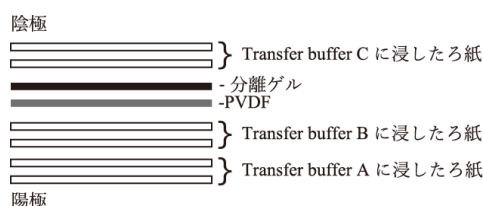


図 セミドライ式による分離ゲルから PDVF 膜へのタンパク質の転写

ウェット式の転写

PVDF、ブロッキング用ろ紙を分離ゲルと同じ大きさに切断した。PVDF をメタノールを用いて活性化させ、ブロッキングろ紙・ファイバーパッド (Criterion™ Blotter With Plate Electrodes (Bio-Rad, Cat: 1704070) に付属) とともにウェット式用転写バッフ

アー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% MEOH)に 2 時間以上浸した。分離ゲルを下図 (図 ウェット式による分離ゲルから PVDF 膜への転写) に従いセットした。次に Criterion Blotter With Plate Electrodes を用いて、100 mA/枚の定電流を 120 分間氷上で加え、分離ゲルから PVDF にタンパク質を転写した。転写後、PBS-T、室温で 70 rpm 10 分で洗浄を 2 回行った。

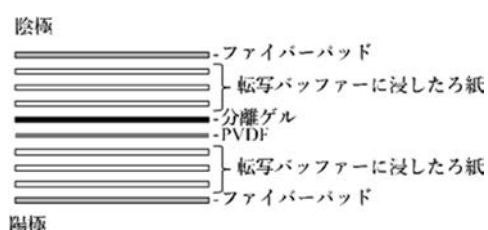


図 ウェット式による分離ゲルから PVDF 膜へのタンパク質の転写

2-10-4 目的のタンパク質の検出

洗浄した PVDF を 3% スキムミルク/PBS-T、室温で 70 rpm で 90 分ブロッキングを行った。3% スキムミルク/PBS-T で希釈した 1 次抗体 (表 6) で 4°C 16 時間以上反応した。次に、PBS-T で室温 10 分間×3 回洗浄した。次に、3% スキムミルク/PBS-T で希釈した 2 次抗体 (表 6) で、室温 90 分反応した。反応後、PVDF を PBS-T で、70 rpm 10 分間×3 回洗浄した。最後に、Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Cat:161443) で、室温 5 分間反応した。検出は Vilber-Lourmat FUSION-SOLO.4S.WL (エムエス機器) を使用した。

表 7 western blotting で使用した抗体

抗体名	希釈倍率	購入元
Anti-HaloTag® Monoclonal Antibody (mAb)	1/1000	Promega, Cat: G9211
Rabbit anti-mouse WFS1	1/1000	山口大学 谷澤 幸生教授より供与いただいた。
ANTI-FLAG M2 mAb, Affinity Purified	1/1000	Sigma, Cat; F1804
Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse	1/2000	Sigma, Cat: T6074
β -Actin (D6A8) Rabbit mAb (HRP Conjugate)	1/1000	Cell Signaling Technology, Cat: 12620S
Goat Anti-Rabbit IgG Ab, (H+L) HRP conjugate	1/20000	Merck Millipore, Cat: 12-348
Goat Anti-mouse IgG Ab, (H+L) HRP conjugate	1/20000	Merck Millipore, Cat: AP308P

2-11 免疫細胞化学による細胞内局在の解析

2-6 と同様に MIN6 細胞を剥離し、アデノウイルスを感染させた。アデノウイルスが感染した細胞 2×10^4 cells/dish で 35 mm glass bottom dish (MATSUNAMI, Cat: D109507) に播種し培養した。

感染から 72 時間後に 2-8-1 と同様に免疫細胞化学による解析を行った。1 次抗体は Anti-FLAG M2 Monoclonal Antibody (1/1000), Anti-mCherry antibody (Biorbyt, Cat: orb11618) (1/200), Anti-Sodium Potassium ATPase antibody (以後、Anti-Na⁺ K⁺ ATPase antibody) (abcam, Cat: ab76020) (1/500) である。また、2 次抗体は Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 715-547-003) (1/1000)、CF568 Donkey Anti-Goat IgG (H+L), highly cross-adsorbed (Biotium Cat: 20106) (1/1000), Alexa Fluor 647 AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Cat: 711-607-003) (1/1000) 及び 25 µg/mL DAPI である。画像は倒立共焦点顕微鏡 LSM780 (ZEISS) で取得した。

2-12 統計学的解析

データは特に記述がない場合は平均(mean)±標準偏差 (S.D.) を用いて表記した。また、統計学的解析は one-way ANOVA と Dunnett's multiple comparison test、two-tailed paired Student's t-test あるいは Mann-Whitney's U-test を用いた。

3. *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立と解析

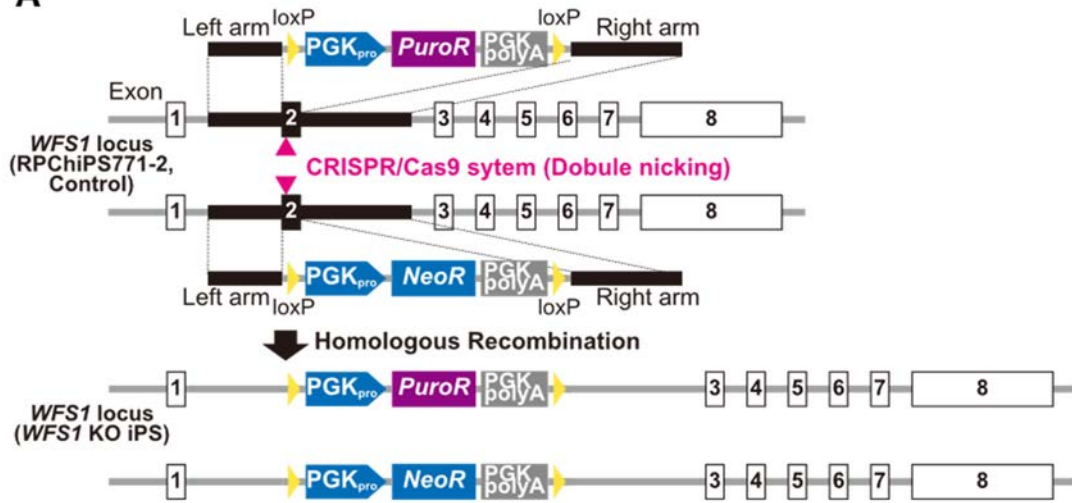
3-1 *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立

WFS1 KnockOut iPS 細胞 (以後、*WFS1* KO iPS 細胞; 修士課程で樹立した細胞株) は開始コドンが存在する *WFS1* 遺伝子のエクソン 2 を欠失させたヒト iPS 細胞株である (図 6A)。*WFS1* KO iPS 細胞株は、薬剤セレクションマーカを Double nicking 法を利用した CRISPR/Cas9 システムによって導入して樹立した。Double nicking 法とは DNA の 2 本鎖ではなく、1 本鎖のみを切断する Cas9 (D10A) 変異体により、近接する位置で別々の鎖を 2 つの gRNA を用いて切断する方法である。Double nicking 法によりオフターゲット効果の抑制が期待できる (Ran *et al.*, 2013)。

WFS1 KO iPS 細胞に導入された薬剤カセットは loxP 配列に挟まれているため、Cre を強制発現させることで取り除くことができる。そこで、CAG プロモーター下で Cre と緑色蛍光タンパク質 ZsGreen を共発現するベクターをエレクトロポレーションによって iPS 細胞に導入した。さらに、Cell sorter を用いて ZsGreen 陽性の細胞を 15 個単離したのちに培養した。培養した 15 個の ZsGreen 陽性細胞クローンからゲノム抽出を行い、薬剤セレクションマーカの存在有無を *WFS1* 遺伝子座に対して *WFS1_KO_GT_F* と *WFS1_KO_GT_R* をプライマーとしてゲノム PCR を行い、確認した (図 6B)。薬剤セレクションマーカが存在する場合は 6.1 kbp (kilo base pair)、薬剤セレクションマーカが含まれない場合は 3.5 kbp を示す。その結果を図 6C に示す。単離した 15 個のクローンすべてで *WFS1* 遺伝子座から薬剤セレクションマーカが除かれていることを確認した。単離したクローン名を *WFS1* KO iPS 細胞 (*NeoR*-*PuroR*-) No.1~15 と命名した。

次に、*WFS1* KO iPS 細胞 (*NeoR*-*PuroR*-) No.1 のセーフハーバー部位 *AAVS1* 領域に対して doxycycline の存在下で 3×FLAG-hWFS (WT) と mCherry を共発現するカセットの組み込みを行った。*AAVS1* 領域に対する TALEN と Tet-ON システムを組み込んだドナーベクター (*Puro*-iDEST-3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry, *AAVS1*-Neo-M2rtTA) をエレクトロポレーションにて導入した。さらに、G418 と Puromycin に対する薬剤選択を行った結果、3 クローンが単離できた。*AAVS1* 領域にドナーベクターが組み込まれているかをゲノム PCR によって確認した (図 6C)。*Puro*-iDEST-3×FLAG-hWFS1 (WT) -IRES2-mCherry が組み込まれた場合は、1.0 kbp、*AAVS1*-Neo-M2rtTA が組み込まれている場合は 1.2kbp となるようにプライマーを設計した。その結果、3 つのクローンで両アリルそれぞれに 2 つのドナーベクターの組み込みが確認された。ドナーベクターの組み込みを確認できた 3 つのクローンを *WFS1* KO iOE (inducible OverExpression) iPS 細胞 No.1~No.3 と命名した。次に *AAVS1* 領域に組み込んだ Tet-ON システムが正しく動作するかを確認するために *WFS1* KO iOE iPS 細胞 No.1 に対して Doxycycline 添加し、2 日間培養した。その後、免疫細胞化学 (図 6D) とウェスタンブロット (図 6E) を行った。その結果、Doxycycline の添加によって、すべての細胞で 3×FLAG-WFS1 (WT) と mCherry を発現していた。また、ウェスタンブロットでは Doxycycline の添加によって、3×FLAG-WFS1 (WT) のアミノ酸から予測される大きさ (103 kDa) 付近にタンパク質の発現が誘導されていることを確認した。以上の結果より *WFS1* KO iOE 細胞の樹立に成功したと考えた。

A



B

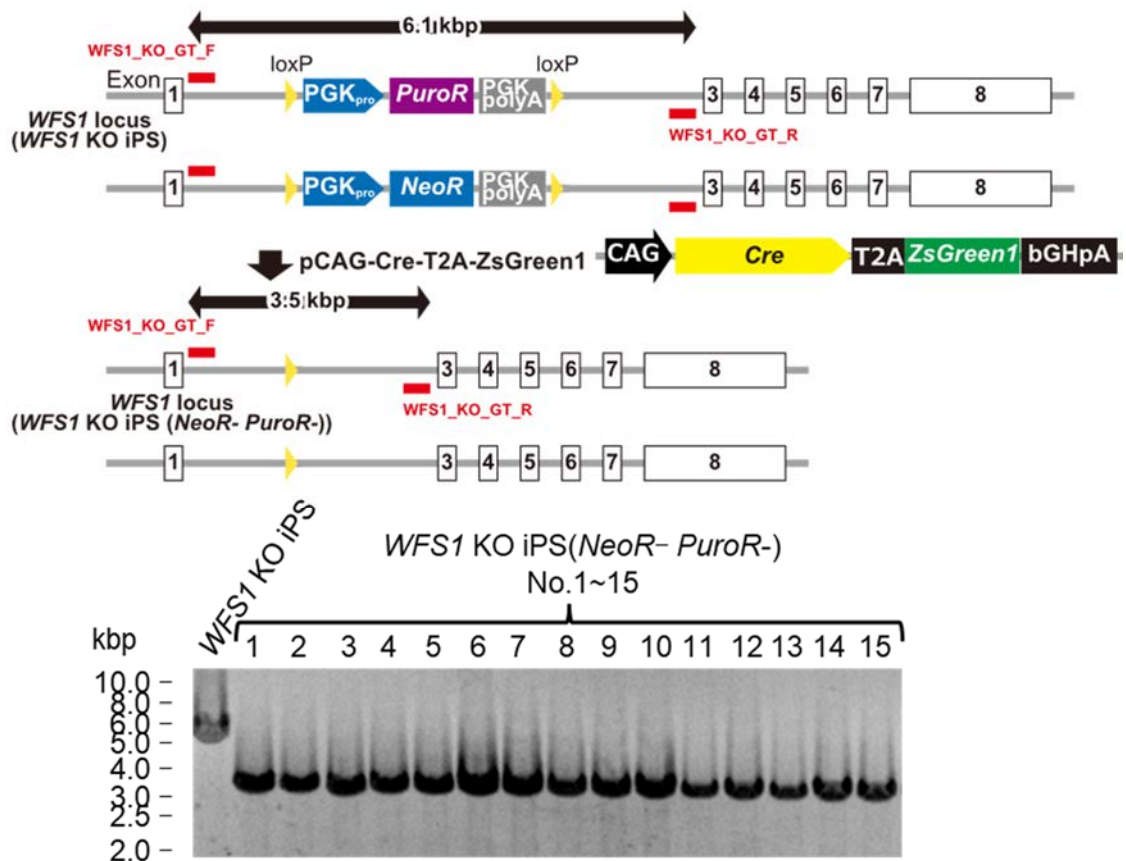


図 6 *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立

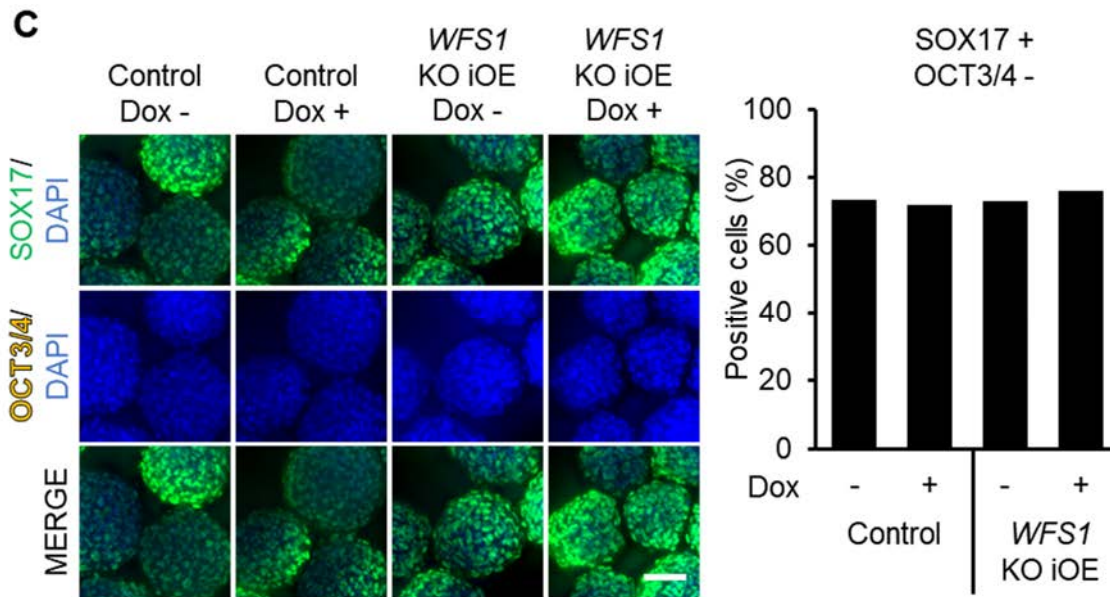
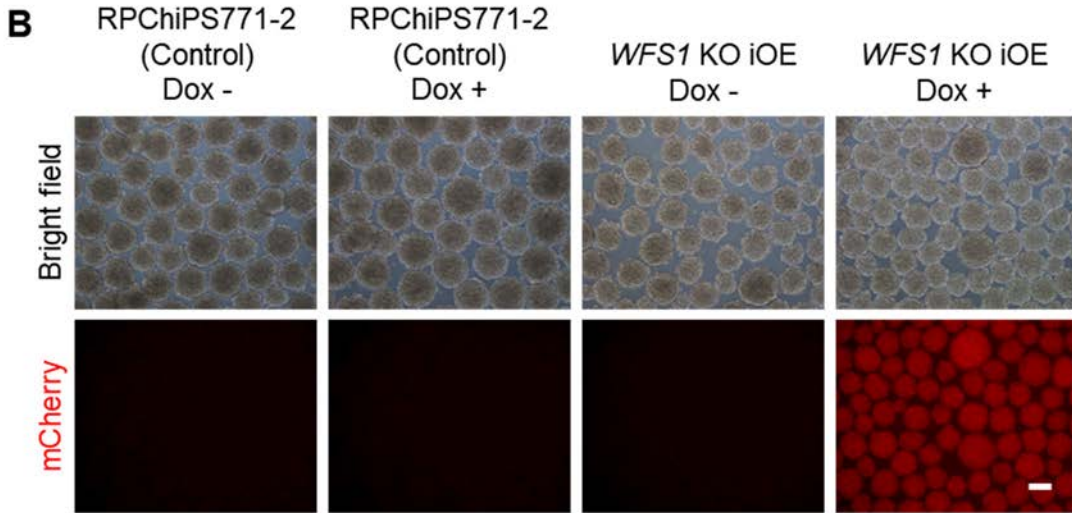
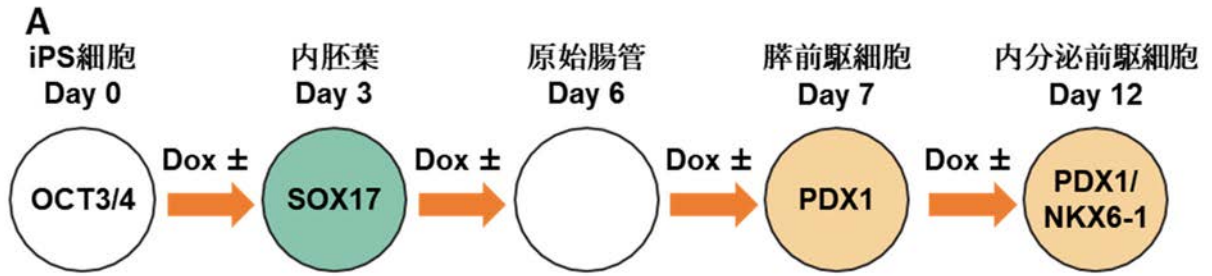
(A) *WFS1* KO iPS 細胞の概略。(B) 上: *WFS1* KO iPS 細胞からの薬剤カセットの取り除き *WFS1* KO iPS (*NeoR*-*PuroR*-) iPS 細胞作製の概略。ゲノム PCR の際に使用したプライマーを赤色で示した。下: *WFS1* KO iPS 細胞あるいは *WFS1* KOiPS (*NeoR*-*PuroR*-) 細胞のゲノムを鋳型としたゲノム PCR の結果。(C) 上: *WFS1* KO iOE iPS 細胞の樹立の概略。ゲノム PCR で使用したプライマーを赤で示した。下: RPChiPS771-2 (Control) 細胞、*WFS1* KO iPS 細胞、*WFS1* KO iPS (*NeoR*-*PuroR*-) 細胞 No.1, *WFS1* KO iOE iPS 細胞 No.1~3 のゲノムを鋳型としたゲノム PCR の結果。AAVS1-F+*NeoR*、AAVS1-F+*PuroR* をプライマーとして行ったゲノム PCR を順に *NeoR*、*PuroR* と示した。

(D) *WFS1* KO iOE iPS 細胞 No.1 を Doxycycline 存在下あるいは非存在下で 2 日間培養したものを免疫細胞化学により解析した結果。緑: FLAG、赤: mCherry、青: DAPI。Scale bar = 50 μ m. (E) *WFS1* KO iOE iPS 細胞 No.1 を Doxycycline 存在下あるいは非存在下で 2 日間培養したものをウェスタンブロットにより解析した結果。

3-2 *WFS1* KO iOE iPS 細胞の解析

次に、回転培養によって、*WFS1* KO iOE iPS 細胞 No.1 を Doxycycline (Dox) の存在下あるいは非存在下でスフェロイドを形成後、段階的に適切な液性因子を添加した培養液で細胞を培養することでヒト iPS 細胞を内胚葉、腭前駆細胞、内分泌前駆細胞へと分化させた (図 7A)。なお同時に、Control としてゲノム編集をしていない RPChiPS771-2 細胞も同時に分化させた。最初に内胚葉への分化をスフェロイドの観察 (図 7B) と免疫細胞化学を用いて評価した (図 7C)。その結果、*WFS1* KO iOE iPS 細胞由来の内胚葉は Doxycycline (Dox) の添加により mCherry の発現誘導を確認した。また、スフェロイドの直径は *WFS1* KO iOE iPS 細胞由来の内胚葉に比べ Control の方が大きかった (図 7B)。一方、免疫細胞化学による解析では内胚葉のマーカである SOX17 の陽性率に差はなかった (図 7C)。SOX17 の陽性率を評価した免疫細胞化学の結果から内胚葉に問題なく分化したと判断した。

続いて内分泌前駆細胞への分化も同様にスフェロイドの観察と免疫細胞化学によって評価した。スフェロイドの観察では、*WFS1* KO iOE 由来のものでは Doxycycline の添加によって mCherry の発現を確認できた。また、コントロールである RPChiPS771-2 細胞由来のスフェロイドは Doxycycline の有無にかかわらず球状を維持していた。しかし、*WFS1* KO iOE iPS 細胞由来のスフェロイドは Doxycycline の有無にかかわらず、球状を維持していなかった (図 7D)。次に、免疫細胞化学によって内分泌前駆細胞のマーカである PDX1 と内分泌前駆細胞で発現する転写因子 NKX6-1 タンパク質の発現の確認を試みた。その結果、コントロールである RPChiPS771-2 の分化培養実験では PDX1 タンパク質と NKX6-1 タンパク質の発現は確認できた。これに反して *WFS1* KO iOE iPS 細胞由来の細胞では Doxycycline の有無にかかわらず、PDX1 タンパク質の発現は確認できたが、NKX6-1 タンパク質の発現が確認できなかった (図 7E)。



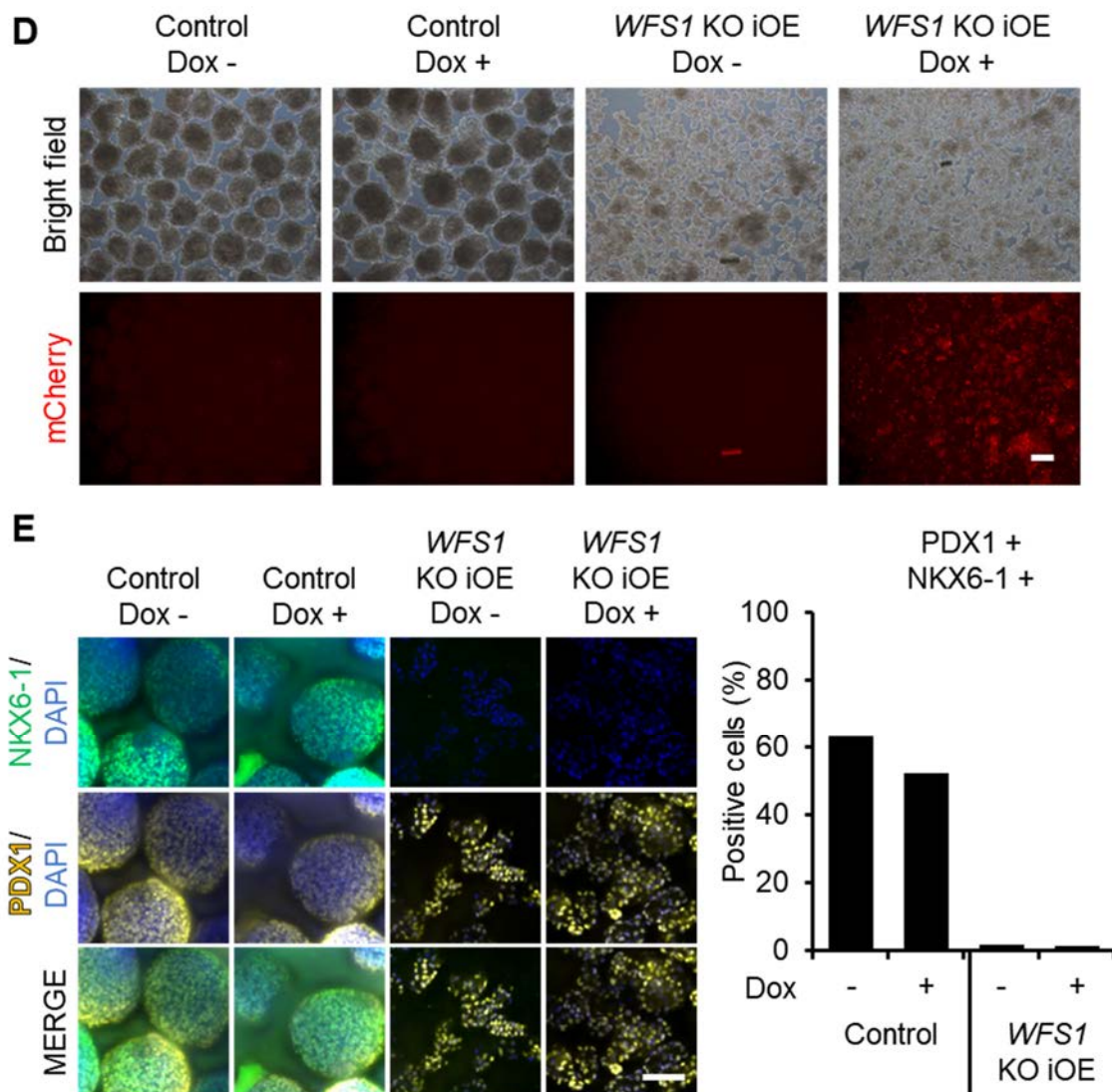


図7 WFS1 KO iOE iPS 細胞の解析

(A) ヒト iPS 細胞から内分泌前駆細胞への分化誘導の概略。(B) 内胚葉 (Day 3) における明視野と mCherry の観察。(C) 内胚葉 (Day 3) における免疫細胞化学。緑: SOX17、黄色: OCT3/4、青: DAPI。(D) 内分泌前駆細胞 (Day 12) における明視野と mCherry の観察。(E) 内分泌前駆細胞 (Day 12) における免疫細胞化学。緑: NKX6-1、黄色: PDX1、青: DAPI。RPChiPS771-2 を Control として使用した。Doxycycline: Dox, Scale bar = 100 μ m, N = 1.

3-3 考察

本研究で樹立した *WFS1* KO iOE iPS 細胞は内分泌前駆細胞への分化が進行しなかった (図 7)。これらの結果から、*WFS1* KO iOE iPS 細胞は *WFS1* の効果を検証する評価系として利用できないと思われる。

また、Wolfram 症候群患者や *Wfs1* ノックアウトマウスの膵臓は正常に発生し、生後糖尿病を発症する (Inoue *et al.*, 1998; Ishihara *et al.*, 2004)。このことから、*WFS1* 欠失が膵臓細胞の分化に影響を与えないと推察している。したがって *WFS1* KO iOE iPS 細胞が内分泌前駆細胞へ分化できない原因は、*WFS1* KO iOE iPS 細胞を作製する過程に問題があった可能性が高いと考えている。あるいは、ヒトはマウスと異なり、発生過程において *WFS1* が関与する可能性がある。

最初に、*WFS1* KO iOE iPS 細胞を樹立した際に使用したプラスミドに問題がある可能性について考える。AAVSI 領域を編集した AAVSI-TALEN 及びドナーベクターはヒト iPS 細胞から膵 β 細胞への分化実績があり (González *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2016)、AAVSI-TALEN のオフターゲット効果や AAVSI 領域への Tet-ON システムの挿入が問題ではない可能性が高い。

次に、強制発現した 3×FLAG-h*WFS1* (WT) が N 末端に FLAG タグを付加したことで機能不全に陥っている可能性を考える。後述するが、3×FLAG-h*WFS1* (WT) は本研究にてインスリン分泌において正常に動作することを確認 (図 16) しており、3×FLAG-h*WFS1* (WT) が FLAG タグにより機能不全に陥っている可能性は低い。この 2 点 (Tet-ON システムの挿入が問題ではない可能性が高い点、3×FLAG-h*WFS1* (WT) が FLAG タグにより機能不全に陥っている可能性は低い点) から AAVSI 領域のゲノム編集による機能不全が理由である可能性は低いと考えている。

そこで、*WFS1* KO iOE iPS 細胞を作製する前の段階である *WFS1* KO iPS 細胞での問題の可能性がある。*WFS1* KO iPS 細胞は Double nicking 法を用いた CRISPR/Cas9 システムを利用して *WFS1* 遺伝子の開始コドンが存在するエキソン 2 に薬剤カセットを挿入することで欠失させた。*WFS1* 遺伝子のエキソン 2 を欠失させる際に使用した guide RNA (以下、gRNA) による Off-target の可能性がある。そこで、使用した 2 つの gRNA の配列 (CTGGAAGAAAAGTCAAGGTC と GGACTCCAACACTGCTCCGC) を DNA-gRNA の mismatches に加え、PAM 配列からの DNA-gRNA の mismatches 位置を考慮に入れ、オフターゲットを予測するサイト (<https://rth.dk/resources/crispr/crisproff/>) (Alkan *et al.*, 2018) を用いて off-target となりうる遺伝子を検索した。その結果、*ZFN628*, *NAT14*, *PRKCH*, *PHF21B*, *NUP50*, *PSD3*, *HDAC9*, *FTMT*, *XG*, *SRFBP1*, *RASA4B* が候補遺伝子として挙がっていた。

しかし、これらの遺伝子が膵臓分化に影響を与えるという報告はなかった。また、double nicking 法は通常の CRISPR/Cas9 システムに比べ off-target 効果が 1/1500 から 1/50 にまで抑えられていると報告されている (Ran *et al.*, 2013)。gRNA のオフターゲット予測結果と Double nicking 法を使用した点からも使用した CRISPR/Cas9 システムの可能性も低い。しかし、あくまでもオフターゲットの予測は *in silico* であることから、使用した CRISPR/Cas9 システムの可能性を排除するには全ゲノム配列解析が有効であると考えている。

ここまで論じてきたように、内分泌前駆細胞への分化で生じた問題は AAVSI 領域のゲノム編集、CRISPR/Cas9 システムによる *WFS1* 遺伝子のエキソン 2 を欠失させるためのゲノム編集が原因となる可能性は低いと考えている。

最後にヒト iPS 細胞で *WFS1* が必要な遺伝子である場合を考える。ラットの膵臓の発生過程において *WFS1* タンパク質は内分泌前駆細胞の段階である胎生 15.5 日目の胎児から単離した膵臓で発現しており、胎生 18.5 日目以降はインスリン陽性細胞でしか発現しない (Xu *et al.*, 2009)。しかし、ラットやマウスでは *Wfs1* が欠失しても正常には発生する (Ishihara *et al.*, 2004; Plaas *et al.*, 2017)。この 3 つの報告から *WFS1* は膵 β 細胞において発生期には発現するが、発生に必須の遺伝子ではないと推察している。一方、*WFS1* 遺伝子は未分化状態のヒト iPS 細胞から発現しており、膵 β 細胞へ分化が進むにつれて発現が上昇する (Maxwell *et al.*, 2020)。このように、膵 β 細胞への発生や分化の過程で長期的に *WFS1* が発現している点に関してはラットやマウスの発生とヒト iPS 細胞の分化で一致している。この点からもヒト iPS 細胞から膵 β 細胞の分化に *WFS1* は必須の遺伝子である可能性は低い。一方、ヒト iPS 細胞においても *WFS1* 遺伝子は発現している。このため、ヒト iPS 細胞の段階で *WFS1* 遺伝子を破壊したことで、変化を与えたことが否定できない。

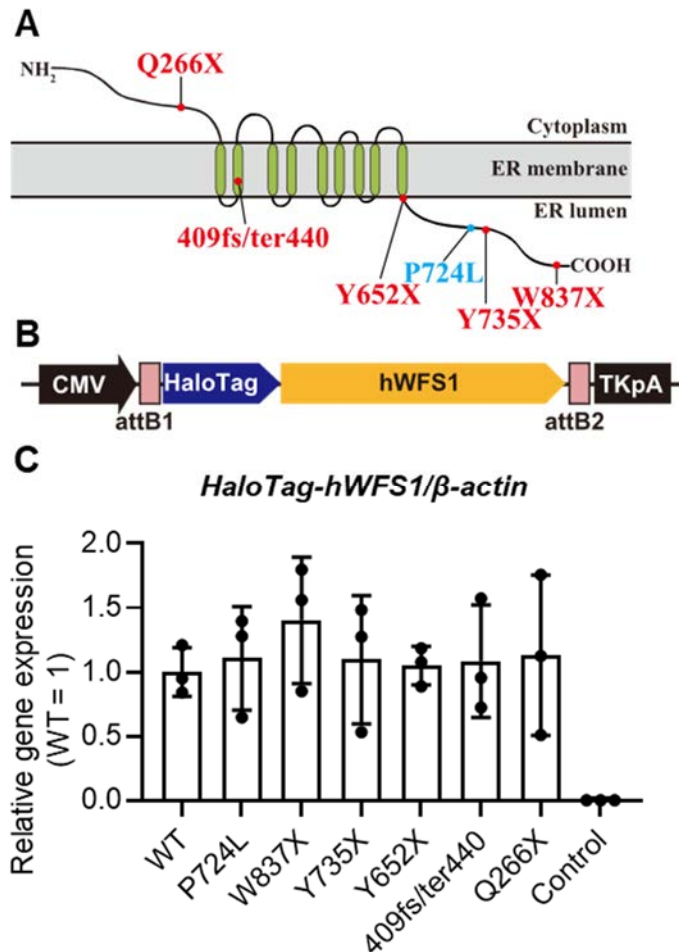
そこで、今後はヒト iPS 細胞において内在の *WFS1* の発現を保ちつつゲノム編集を行い、人為的に内在の *WFS1* の発現を抑制できるシステムを導入する必要があると考えている。最も単純な手法として Tet-ON 誘導性のヒト *WFS1* に対する shRNA を発現する iPS 細胞を樹立する方法があげられる。しかし、この方法は Doxycycline 添加により shRNA の発現を誘導し *WFS1* mRNA を減少させても Doxycycline 添加前に産出された *WFS1* タンパク質が分解されるのを待たなければならない。また、後述するが *WFS1* タンパク質の安定性は細胞種に依存する可能性もあるため、ヒト iPS 細胞や分化細胞に Tet-On システム下で *WFS1* に対する shRNA を発現させても実際に *WFS1* タンパク質の発現が Doxycycline 添加後、どの程度で減少するかはその都度解析する必要がある。これは Cre-loxP システムを用いた Conditional knockout モデルを作製する場合も同様である。

shRNA を用いた遺伝子発現抑制や Cre-loxP システムによる Conditional Knockout を用いる場合は、遺伝子の発現抑制や遺伝子破壊の開始とタンパク質レベルで抑制されるには時間差が存在してしまう。この時間差を解決する手段の 1 つとしてプロテインノックダウン法 (Naito *et al.*, 2019) があげられる。プロテインノックダウン法とは標的タンパク質と特定の E3 Ubiquitin ligase と複合体を形成する化合物を添加することで標的タンパク質にユビキチン化し、ユビキチン-プロテアソーム系による分解に導く手法の総称である。プロテインノックダウンシステムを用いて *WFS1* タンパク質量を減少させることでヒト iPS 細胞あるいは膵 β 細胞への分化において *WFS1* は必須の遺伝子なのかを知ることができるのではないかと期待している。

4. 変異型 WFS1 タンパク質の安定性の解析

4-1 C末端が欠損した hWFS1 は MIN6 細胞において不安定である

WFS1 は 890 aa からなる 9 回膜貫通型タンパク質で 200 以上の変異が Wolfram 症候群患者で報告されている。報告されている変異は、1 アミノ酸置換や C 末端欠損がほとんどである。中でも C 末端側のアミノ酸が欠損するタンパク質を発現する WFS1 変異を持つ患者は重篤な糖尿病を発症している。そこで、報告されている中でも 10 歳未満で糖尿病を発症する患者の WFS1 の C 末端欠損する 5 つの変異 (Q266X, 409fs/ter440, Y652X, Y735X, W837X) と 10 歳以降に糖尿病を発症する 1 つの変異 (P724L) に着目した (図 8A)。そこで、WFS1 の N 末端に HaloTag を付加したアデノウイルスベクター (図 8B) を作製した。HaloTag とは様々な蛍光リガンドと 1 対 1 で共有結合を形成するタグである (Los *et al.*, 2008)。HaloTag-hWFS1 を強制発現するアデノウイルスをマウス膵 β 細胞株 MIN6 細胞へ感染させ、HaloTag-hWFS1 の強制発現を試みた。強制発現できているかを RT-quantitative PCR によって確認したところ、各変異体で発現量の差は見られなかった (図 8C)。次に western blotting によりタンパク質の発現を確認した。その結果、アミノ酸配列から予測される大きさのタンパク質の発現を確認できた。しかし、WFS1 wild-type (以下、WT) や P724L 変異体といった完全長のタンパク質に比べ、C 末端が 53 aa だけ欠損した W837X をはじめとしたすべての C 末端欠損変異体はタンパク質の発現量が著しく低かった (図 8D)。また、HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞を緑色蛍光リガンドで 16 時間処理し、HaloTag と緑色蛍光の R110 Ligand を結合させた。その結果、wild-type に比べ、すべての変異体で蛍光強度が有意に低かった (図 8E,F)。



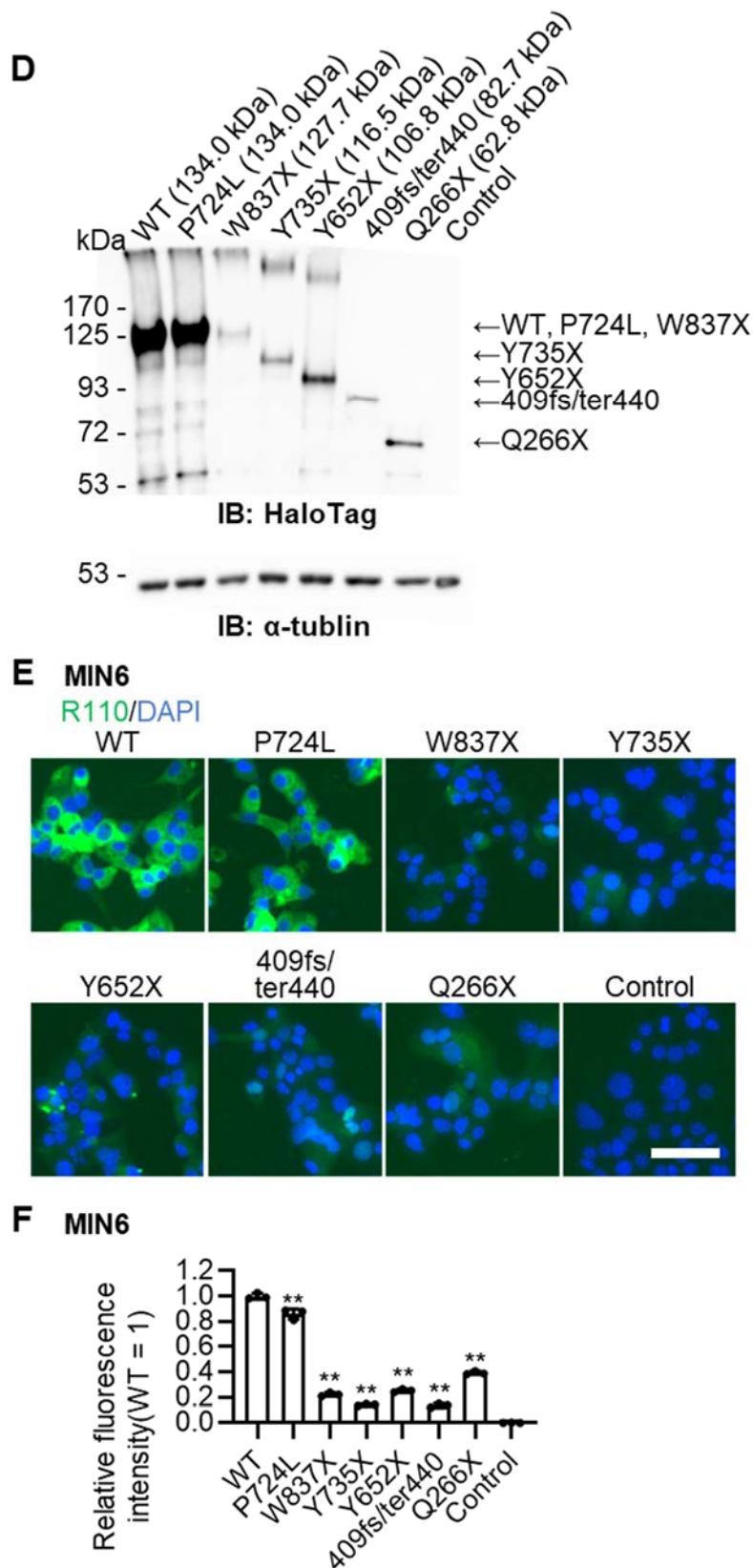


図 8 MIN6 細胞において C 末端が欠損した WFS1 タンパク質は不安定である
 (A) WFS1 タンパク質の概略。10 歳未満で糖尿病を発症し C 末端が欠損する患者由来の変異は赤色、10 歳以降で糖尿病を発症する患者由来の 1 アミノ酸置換変異は青色で示した。(B) HaloTag-hWFS1 を発現するアデノウイルスベクターの概略。
 (C) HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞の RT-quantitative PCR。
 (D) HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞の HaloTag 抗体を用いた western blotting による解析。
 (E) 緑色蛍光 R110 Ligand で処理した HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞。青: DAPI, 緑: R110。(F) (E) の蛍光強度の解析。統計的解析は ONE-ANOVA と Dunnett multiple comparisons test を用いた。** $p < 0.01$ 。Control: アデノウイルスを感染させていない MIN6 細胞。Scale bar = 50 μm 。N = 3。

4-2 MIN6 細胞において変異型 hWFS1 タンパク質を強制発現させても内在の WFS1 タンパク質に影響はない

MIN6細胞では本研究で使用した hWFS1 変異体の中でも最も長い W837X でも安定性に違いがみられた。このことから、W837X、ER 膜内ドメインが欠損している Y652X、1 アミノ酸変異体である P724L に変異体を絞り解析を進めた。MIN6 細胞に HaloTag-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y652X) を強制発現させた。次に、内在性の mouse WFS1 タンパク質と強制発現させた HaloTag-hWFS1 タンパク質を同時に検出するため、Anti-WFS1 抗体を用いた western blotting を行った。その結果、HaloTag-hWFS1 (WT, P724L) のタンパク質の量はおよそ内在性の mouse WFS1 の量と同じであった。また、HaloTag-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y652X) の強制発現は内在性の mouse WFS1 タンパク質の量に影響を与えていなかった (図 9)。



図 9 MIN6 細胞において変異型 WFS1 タンパク質を強制発現は内在の WFS1 タンパク質に影響を与えない

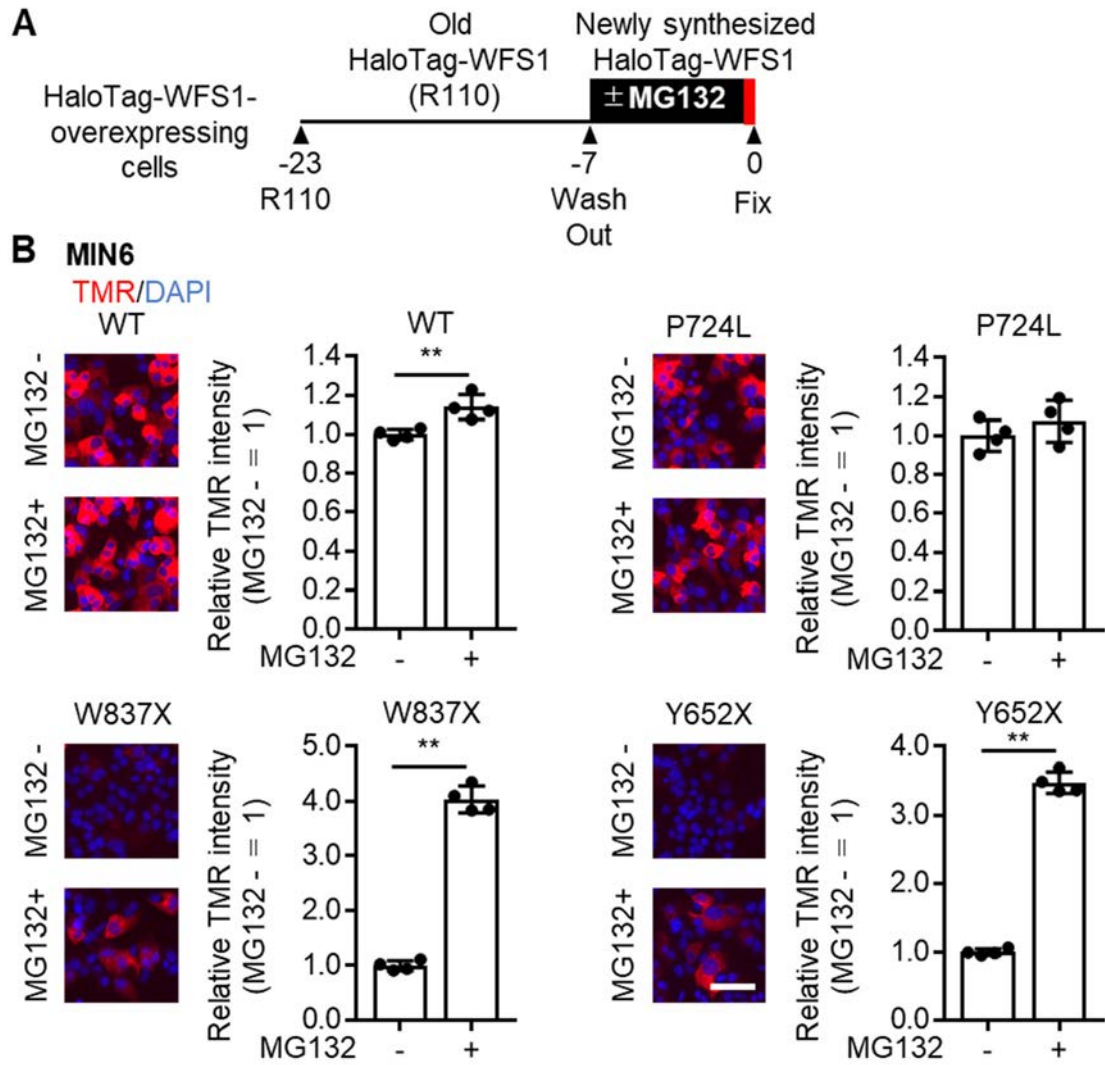
HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞の WFS1 抗体を用いた western blot 解析

4-3 MIN6 細胞では C 末端が欠損した変異型 hWFS1 タンパク質はプロテアソームにより分解される

C 末端が欠損した変異型 hWFS1 タンパク質が MIN6 細胞において不安定である理由の 1 つとして合成された変異型 hWFS1 タンパク質が Proteasome により分解される可能性がある。そこで、hWFS1 の変異型タンパク質ごとの安定性の違いについて解析する必要があるが、変異型タンパク質は分解速度が速いために通常の強制発現実験を行っても図 8 に示すようにタンパク質量を詳しく比較することはできなかった。そこで Proteasome 阻害剤である MG132 を用いて、細胞内に強制発現させた正常型および変異型 WFS1 タンパク質量を増やしたのちに Pulse-chase 実験を行うことにした。MG132 は可逆性の Proteasome 阻害剤である。HaloTag-hWFS1 を強制発現するアデノウイルスを MIN6 細胞に感染させて、32 時間培養した。次に、R110 ligand で 16 時間処理した。R110 ligand の添加によって、この時点で細胞内に存在している HaloTag-hWFS1 タンパク質はすべて R110 ligand と共有結合を形成しており、以降に添加する ligand と結合をさせないようにした。次に培地中に MG132 を添加し 7 時間培養した。7 時間後に、赤色蛍光リガンドである TMR ligand を培地中に添加し、MG132 を添加した 7 時間に産出された HaloTag-hWFS1 タンパク質をすべて赤色で標識した。そして、細胞を固定し蛍光強度を解析した (図 10A)。

図 10B に R110 ligand で処理後、MG132 非存在下あるいは存在下の 7 時間で産出されたタンパク質を赤色蛍光リガンドである TMR ligand によって標識した結果を示す。MIN6 細胞において、WT 及び P724L 変異型タンパク質は MG132 の添加によるタンパク質の蓄積が 1.1 倍増加した。一方、C 末端が欠損した W837X 及び Y652X 変異型タンパク質は MG132 の添加によるタンパク質の蓄積がそれぞれ、4.0 倍、3.5 倍と有意な増加がみられた。

次に MG132 存在下で産出され、赤色蛍光の TMR Ligand で標識された HaloTag-hWFS1 の分解を MG132 非存在下で 0、8、16、24 時間後に細胞ごとに解析した (図 10C)。その結果、完全長のタンパク質である WT 及び P724L 変異型タンパク質は 24 時間で 30% 分解された。一方、C 末端が欠損している W837X は 50%、Y652X 変異型タンパク質は 24 時間後で 60% 分解された。また、16 時間時点では W837X の分解速度は WT あるいは P724L と比較して有意に速く、24 時間時点では Y652X の分解速度は WT あるいは P724L と比較して有意に速かった (図 10D, E)。



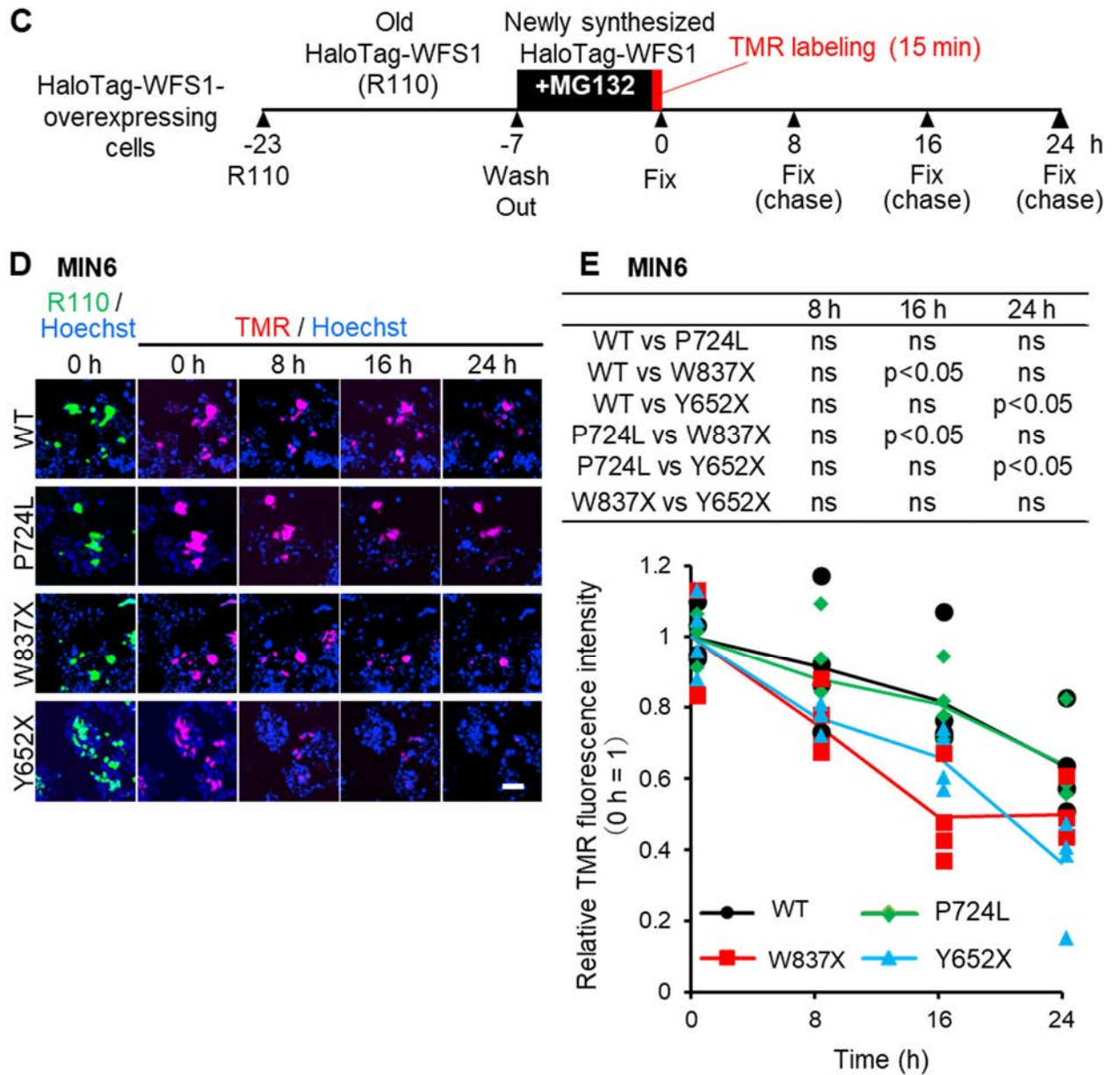


図 10 MIN6 細胞において C 末端が欠損した変異型 WFS1 タンパク質プロテアソームにより分解される

(A) HaloTag システムと MG132 を用いた Pulse 実験の概略。(B) HaloTag-hWFS1 を強制発現した MIN6 細胞を MG132 の存在下あるいは非存在下で 7 時間培養した。7 時間の間に生産されたタンパク質は、赤色蛍光の TMR ligand によって標識した。グラフはそれぞれのタンパク質の MG132 非存在下での蛍光強度の平均を 1 とした相対値。Student's t-test による統計学的解析。** $p < 0.01$ 。(C) HaloTag システムと MG132 を用いた Pulse-chase 実験の概略。(D) MG132 の存在下で産出された HaloTag-hWFS1 タンパク質を TMR Ligand で標識 (0 時間) し、MG132 非存在下で 8、16、24 時間後に TMR ligand の蛍光強度を細胞ごとに解析した。(E) (D) のそれぞれのタンパク質の 0 時間における蛍光強度を 1 として各時間の相対値を計算したもの。上の表は各時間の相対値を Mann-Whitney's U-test を用いて統計学的に解析したもの。ns: not significant, Scale bar = 50 μm , N = 4。

4-4 変異型 hWFS1 タンパク質の分解様式は MIN6 細胞と HEK293T 細胞で異なる

4-4 で行った同様の実験を HEK293T 細胞でも行った。MG132 存在下で産出され、赤色蛍光の TMR Ligand で標識された HaloTag-hWFS1 の分解を MG132 非存在下で 0、8、16、24 時間後に細胞ごとに解析した。その結果、WT、P724L、W837X は 24 時間で 40% の HaloTag-hWFS1 が分解された。Y652X は 10% の HaloTag-hWFS1 が分解され、WT や P724L に比べ有意に分解速度が遅かった (図 11 A, B)。

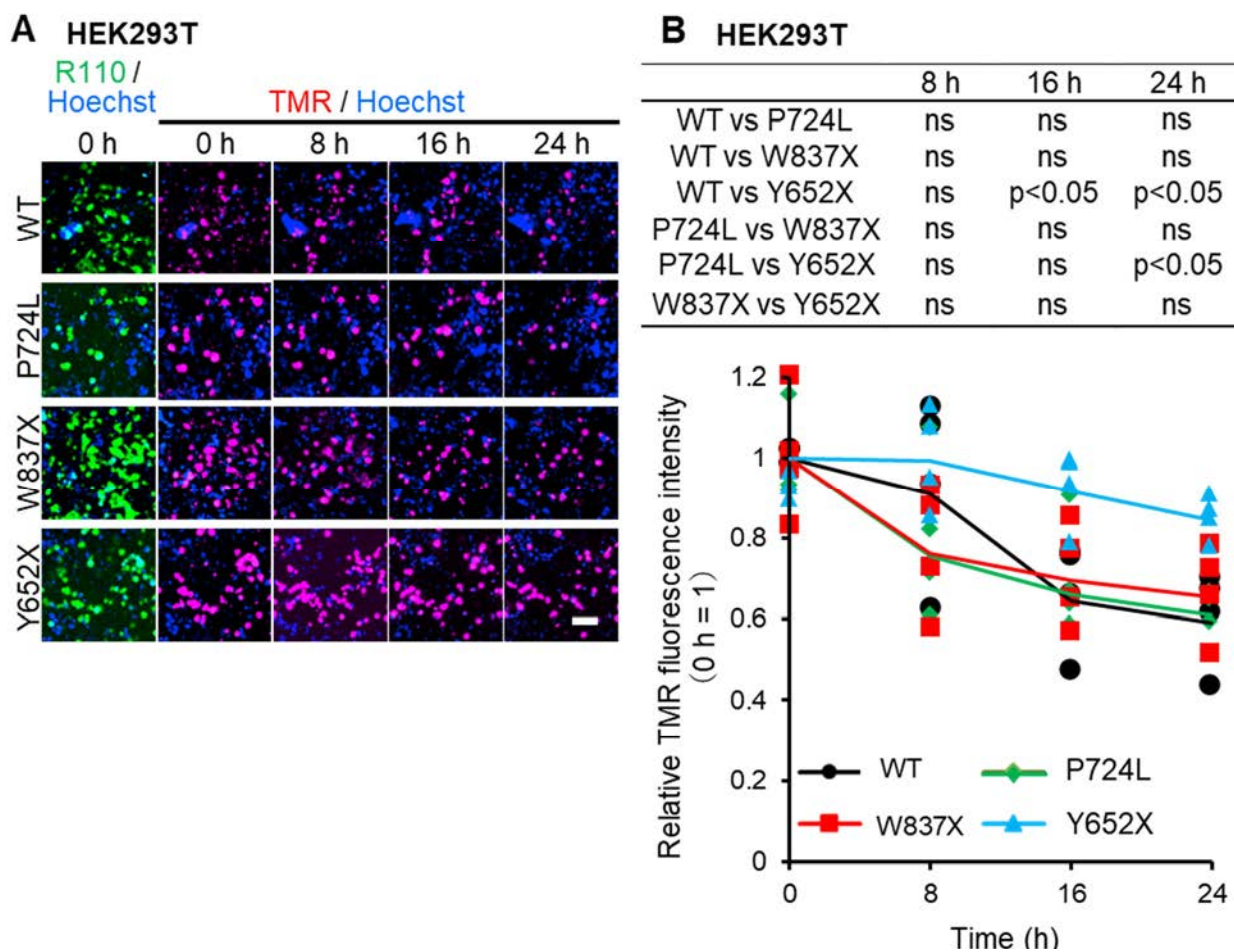


図 11 HEK293T 細胞において hWFS1 Y652X タンパク質は分解されにくい

(A) MG132 の存在下で産出された HaloTag-hWFS1 タンパク質を TMR Ligand で標識 (0 時間) し、MG132 非存在下で 8、16、24 時間後に細胞ごとに TMR ligand の蛍光強度を解析した。(B) (A) のそれぞれのタンパク質の 0 時間における蛍光強度を 1 とし、各時間の相対値を計算したもの。上の表は各時間の相対値を Mann-Whitney's U-test を用いて統計学的に解析したもの。ns: not significant, Scale bar = 50 μ m, N = 4。

4-5 変異型 hWFS1 タンパク質の分解様式は MIN6 細胞と COS7 細胞で異なる

4-3 で行ったものと同様の実験を COS7 細胞でも行った。その結果、MG132 存在下で産出され、赤色蛍光の TMR Ligand で標識された HaloTag-hWFS1 の分解を MG132 非存在下で 0、8、16、24 時間後に細胞ごとに解析した。その結果、24 時間の時点で WT と W837X あるいは Y652X の分解速度に有意な差が認められなかった。(図 12 A, B)。

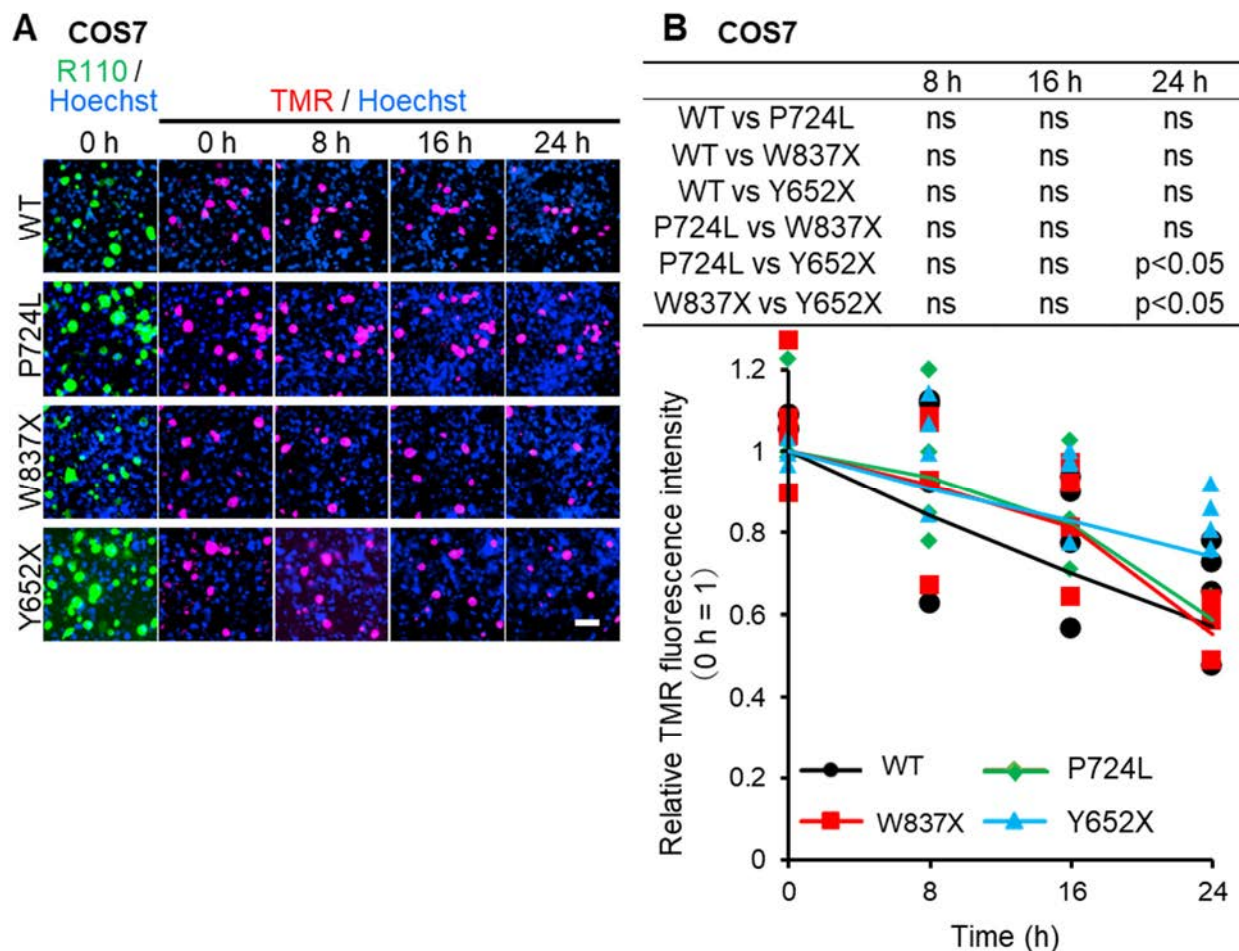


図 12 COS7 細胞において野生型 WFS1 タンパク質と変異型タンパク質の分解速度に差は見られない

(A) MG132 の存在下で産出された HaloTag-hWFS1 タンパク質を TMR Ligand で標識 (0 時間) し、MG132 非存在下で 8、16、24 時間後に TMR ligand の蛍光強度を解析した。(B) (A) のそれぞれのタンパク質の 0 時間における蛍光強度を 1 として各時間の相対値を計算したもの。上の表は各時間の相対値を Mann-Whitney's U-test を用いて統計学的に解析したもの。ns: not significant, Scale bar = 50 μ m, N = 4。

4-6 考察

WFS1 は 890 アミノ酸から成り主に小胞体に存在する 9 回膜貫通型タンパク質である。Strom らの報告 (Strom *et al.*, 1998) や Cell atlas によると WFS1 遺伝子は脳、心臓、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、膵臓で発現しており、ほとんどすべての細胞株でも発現している。しかし、*Wfs1* ノックアウトマウスでも正常に膵臓が発生する。そして、生後に主に非肥満の糖尿病を発症し、ほかの主な疾患は検出されていない (Ishihara *et al.*, 2004)。また、Wolfram 症候群患者の主症状も糖尿病であることから変異型 WFS1 タンパク質の性状を解析するには膵 β 細胞系譜の細胞株を用いることが有効であると考えている。

本研究ではマウス膵 β 細胞株である MIN6 細胞において、小胞体膜外側のペプチドにみられるアミノ酸変異 (Q266X) とより C 末端側でタンパク質合成が停止する (W837X) の 5 つの変異型 WFS1 タンパク質の全てで野生型 WFS1 タンパク質より速いユビキチン-プロテアソームによるタンパク質分解を検出した (図 8 E,F)。一方、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞ではどの変異型 WFS1 タンパク質も野生型 WFS1 タンパク質より速いタンパク質の分解を検出することができなかった (図 11)。また、アフリカミドリザル腎由来細胞株 COS7 細胞株では野生型 WFS1 タンパク質と変異型 WFS1 タンパク質の分解速度に有意な差は認められなかった (図 12)。以上のことから膵 β 細胞では野生型 WFS1 タンパク質と C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質を見分けて、C 末端欠損変異型 WFS1 タンパク質をより速く分解するのではないかと推察している (図 13)。また、マウスの組織単位でも全体的なタンパク質の安定性は異なるとの報告 (McClatchy *et al.*, 2020) もあり、どの細胞でタンパク質の安定性を解析するかも重要な因子の 1 つであると考えている。

これまでにヒト変異型 WFS1 タンパク質の分解は主に 2 つの報告がなされている (Hofmann and Bauer, 2006; Guo *et al.*, 2011)。Hofmann らには COS7 細胞を用いて 35S-メチオニンによる放射性標識を用いた Pulse-chase 実験と western blotting 法により C 末端の 883~890aa の 8 aa が欠損した F883X 変異型タンパク質が野生型 WFS1 タンパク質より不安定であることを示した。一方、HaloTag システムを用いた本研究においては野生型 WFS1 タンパク質と変異型 WFS1 タンパク質の分解速度の有意な差は認められなかった (図 12)。この要因の 1 つとして用いた変異型 WFS1 タンパク質が F883X ではなく、W837X や Y652X であった可能性を考えている。一方、Guo らはタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を用いて HEK293T 細胞で変異型 WFS1 タンパク質の Pulse-chase 実験を行った。その結果、野生型 WFS1 タンパク質よりも Q667X の方が安定であり、W700X 以降の C 末端欠損変異型タンパク質は野生型 WFS1 タンパク質と安定性に差は見られなかった。この結果から、Guo らは WFS1 タンパク質の 667~700 aa が E3 ubiquitin ligase の 1 つである SMRUF1 によりユビキチン化され不安定化すると報告している。そこで、本研究でも HEK293T 細胞を用いて HaloTag システムによる Pulse-chase 実験を行った。その結果、野生型 WFS1 タンパク質よりも Y652X の方が安定であり、W837X は野生型 WFS1 タンパク質と安定性に差は見られなかった (図 11)。この結果は Guo らの結果と一致している。以上より MIN6 細胞での WFS1 タンパク質の安定性の制御は HEK293T 細胞とは異なるものであると考えている。

これら 2 つの先行報告からも変異型 WFS1 タンパク質は細胞株によっても異なる可能性が示唆される。また、本研究で MIN6 細胞において変異型 WFS1 タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系による分解であった。そこで、プロテアソーム阻害剤を nonsense や frameshift 変異を持つ Wolfram 症候群患者に投与して変異型 WFS1 タンパク

質の分解を止めることが治療法の1つとして考えられる。実際、プロテアソーム阻害剤である Bortezomib は多発性骨髄腫の治療薬として承認、使用されている。しかし、*in vitro* で膵β細胞をプロテアソーム阻害剤存在下で培養するとインスリン分泌が阻害されるとの報告 (Kawaguchi *et al.*, 2006) もあり、非特異的なユビキチン-プロテアソーム阻害は Wolfram 症候群の治療にはならないと考えている。そこで、HEK293T 細胞では発現量が低く、膵β細胞で変異型 WFS1 タンパク質をユビキチン化し分解に導く E3 Ubiquitin ligase (図 13 Factor X) が治療標的の1つとして考えられる。

では、この膵β細胞で特異的に発現量が高く、C末端欠損変異型 WFS1 タンパク質を分解に導く Factor X として考えられる E3 ubiquitin ligase とは何があるだろうか。現在、WFS1 の分解に関わる E3 ubiquitin ligase は HEK293T 細胞を用いた実験で SMURF1 しか報告されていないが、SMURF1 はヒト WFS1 の 667~700 aa をユビキチン化し、野生型 WFS1 タンパク質を分解する (Guio *et al.*, 2011)。これは野生型 WFS1 タンパク質の方が変異型 WFS1 タンパク質よりも安定であるとした本研究とは異なる。このようなことから膵β細胞では変異型 WFS1 タンパク質の分解を担う E3 Ubiquitin ligase (Factor X) は SMURF1 でない可能性を考えている。

そこで、これまでにすでに報告されている共免疫沈降・質量分析の報告をまとめたタンパク質相互作用データベースである Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) を用いて WFS1 と相互作用しうる E3 Ubiquitin ligase を探索したところ、SMURF1 のほかに EDEM1, HRD1 が候補として見つかった。

EDEM1 は小胞体内腔局在し異常タンパク質の糖鎖を特異的に認識し、小胞体関連分解に導く酵素の1つである (D Isaacson, J L Mueller and Article, 2006)。EDEM1 の発現は RT-quantitative PCR レベルで膵β細胞での発現は確認されている (Laybutt *et al.*, 2007) が、ほかの臓器や細胞株間での比較した報告はない。一方、野生型 WFS1 タンパク質の糖鎖修飾も報告 (Hofmann *et al.*, 2003) されており、EDEM1 が変異型 WFS1 タンパク質の分解を担う可能性はある。

HRD1 は小胞体関連分解における E3 ubiquitin ligase である。WFS1 は HRD1 を介して ATF6 と複合体を形成し、ATF6 を分解することで小胞体ストレスを抑制しているとの報告もある。また、マウスの膵臓組織の免疫組織化学では膵β細胞で特異的に発現している (Fonseca *et al.*, 2010)。HRD1 は WFS1 と結合しており、膵β細胞での特異的な発現が報告されていることから Factor X の条件を満たしている。しかし、HRD1 が WFS1 タンパク質をユビキチン化しているとの報告はないためさらなる研究が必要であると考えられる。

また、FactorX という1つのタンパク質の存在を仮定すると、HEK293T 細胞と MIN6 細胞における変異型 WFS1 タンパク質の安定性の違いは説明できる。しかし、COS7 細胞は MIN6 細胞に比べ野生型 WFS1 タンパク質が速いという現象は説明できないため、今後は近接依存性標識法を用いて膵β細胞における変異型 WFS1 タンパク質の分解を促進する仕組みを同定していきたいと考えている。

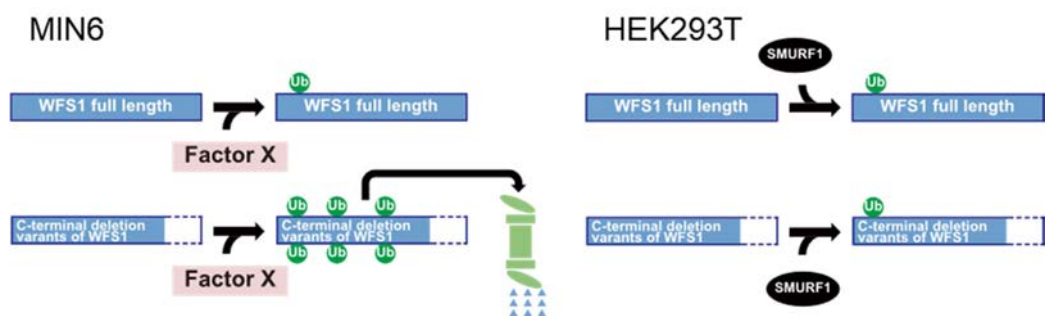


図 13 本研究から推測される変異型 WFS1 タンパク質の分解モデル

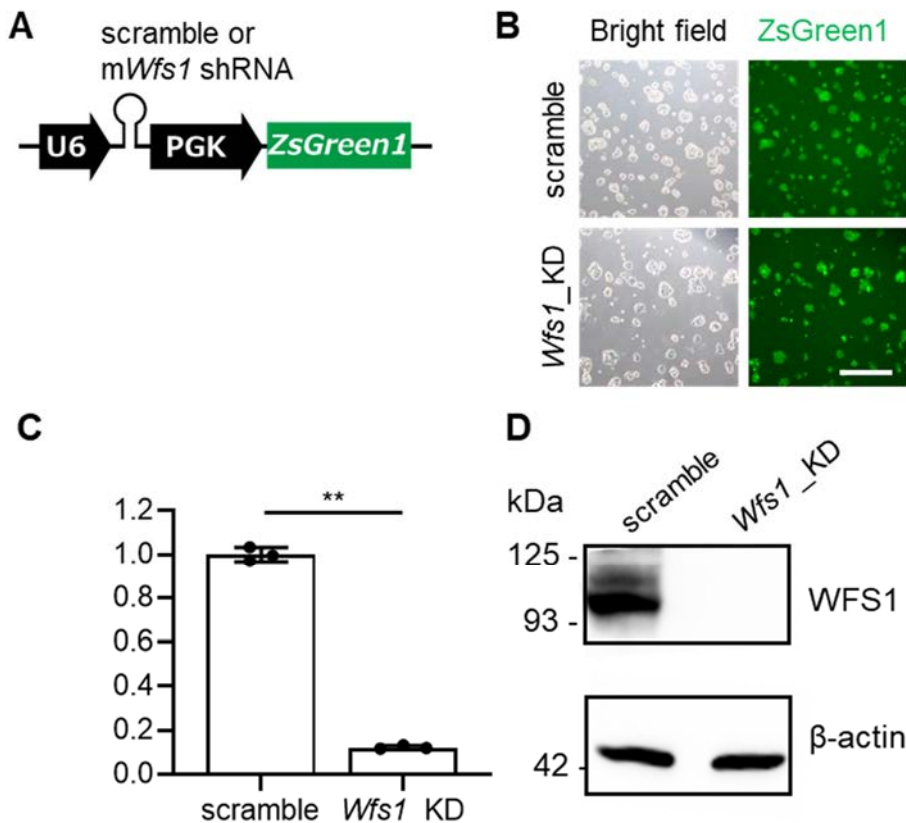
MIN6 では野生型 WFS1 タンパク質と C 末端が欠損した変異型 WFS1 タンパク質を識別して分解する。一方、COS7 細胞ではその識別能力が低い。

HEK293T 細胞では分解自体が起こりにくい。この現象を担うタンパク質を Factor X と表記した。

5. WFS1 がインスリン分泌に与える影響に関する解析

5-1 MIN6細胞における mouse *Wfs1* のノックダウン

変異型 WFS1 タンパク質がインスリン分泌に与える影響を解析する際、MIN6 細胞は *Wfs1* を発現しているため、内在性の *Wfs1* 遺伝子の発現を抑制が重要と考えた。そこで、Control としてどの遺伝子も標的としない scramble shRNA あるいは mouse *Wfs1* に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを作製した。また、セレクションマーカーとして PGK promoter 下で緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を発現するように設計した (図 14A)。次に HEK293FT 細胞を用いてレンチウイルスを作製し MIN6 細胞に感染させた。ZsGreen1 を発現する MIN6 細胞を cell sorter を用いて単一細胞として単離し、培養した。取得した細胞をそれぞれ scramble MIN6 細胞、*Wfs1*_KD MIN6 細胞と命名した。取得した細胞すべてで ZsGreen タンパク質を発現していることを確認した (図 14B)。次に *Wfs1* の発現が抑制されているかを確認するために、RT-quantitative PCR を行った。その結果、*Wfs1* の発現が 88% 抑制されていることを確認した (図 14C)。また、western blotting でも scramble MIN6 細胞では WFS1 の発現は確認できたが、*Wfs1*_KD MIN6 細胞ではできなかった (図 14D)。また、Thapsigargin (TG) を用いて小胞体ストレスを 24 時間誘導した。その結果、小胞体ストレスマーカーの 1 つである ATF4 の発現上昇と ATF6 α の核移行の上昇を確認した (図 14E)。以上より *Wfs1*_KD MIN6 細胞の樹立に成功したと考えた。



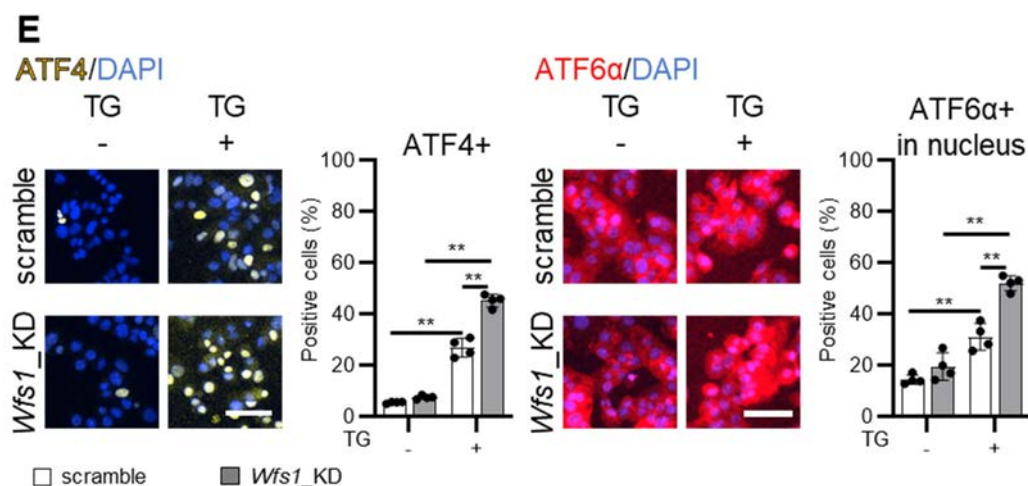


図 14 *Wfs1_KD* MIN6 細胞の樹立

(A) scramble あるいは *Wfs1* に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクター。
 (B) scramble MIN6 細胞と *Wfs1_KD* MIN6 細胞の倒立顕微鏡下での観察。Scale bar = 100 μ m. (C) RT-quantitative PCR による scramble MIN6 細胞と *Wfs1_KD* MIN6 細胞の *Wfs1* の発現量比較。Student's t-test による統計学的解析。** $p < 0.01$, N = 3。
 (D) Western blot による scramble MIN6 細胞と *Wfs1_KD* MIN6 細胞の WFS1 の発現比較。(C,D)ともに内部標準として β -actin を使用した。(E) 100 nM Thapsigargin (TG) 下で24時間培養した後の ATF6 α 及び ATF4 の免疫細胞化学。黄色: ATF4、赤: ATF6 α 、青: DAPI。統計学的解析は ONE-ANOVA と Dunnett multiple comparisons test を用いた。** $p < 0.01$, N = 4, Scale bar = 50 μ m。

5-2 MIN6 細胞において *Wfs1* 遺伝子発現の抑制はインスリン分泌を低下させる

樹立した scramble_MIN6 細胞に mCherry のみを強制発現するアデノウイルス (以下 mCherry) を感染させた。また、*Wfs1_KD* MIN6 細胞に mCherry あるいは 3 \times FLAG-hWFS1 (WT) と mCherry を強制発現させるアデノウイルスを感染させた(図 15A,B)。FLAG 抗体を用いた western blotting によって、3 \times FLAG-WFS1 (WT) が正しく発現していることを確認した(図 15C)。次に 2.5 mM glucose/KRB から 20.0 mM glucose/KRB に連続的に培地交換を行い、それぞれの上清を回収し、各濃度におけるインスリン分泌能を ELISA 法により調べた。ここではインスリンと 1 対 1 で分泌される C-peptide を測定した。その結果、*Wfs1_KD*_MIN6 細胞は scramble_MIN6 細胞に比べ、20.0 mM glucose/KRB 下のインスリン分泌能が低下した。一方でこの作用は、hWFS1 (WT) の強制発現により回復した(図 15D)。このような高グルコース下でのインスリン分泌能の低下は Wolfram 症候群患者でも観察されているため、本細胞株を WFS1 タンパク質がインスリン分泌過程で担う役割を解明する病態モデルとして利用できると思った。

また、*Wfs1* のノックダウンによる高グルコース下でのインスリン分泌の低下の 1 つの原因として WFS1 欠失による ATP 産出能の低下が報告されている (Angebault *et al.*, 2018b; Zatyka *et al.*, 2015)。そこで、*Wfs1_KD*_MIN6 細胞を用いて Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌能の解析を行った。Tolbutamide 刺激への影響を評価した理由としては、WFS1 欠損が、グルコースの取り込みによる ATP の産生、および ATP 依存性カリウムチャネル以降のインスリン分泌へ与える影響を解析したいためである。その結果、*Wfs1_KD* MIN6 細胞では scramble MIN6 細胞に比べ、トルブタミド刺激による

インスリン分泌が低下した。また、この現象は hWFS1 (WT) の強制発現により回復した (図 15E)。

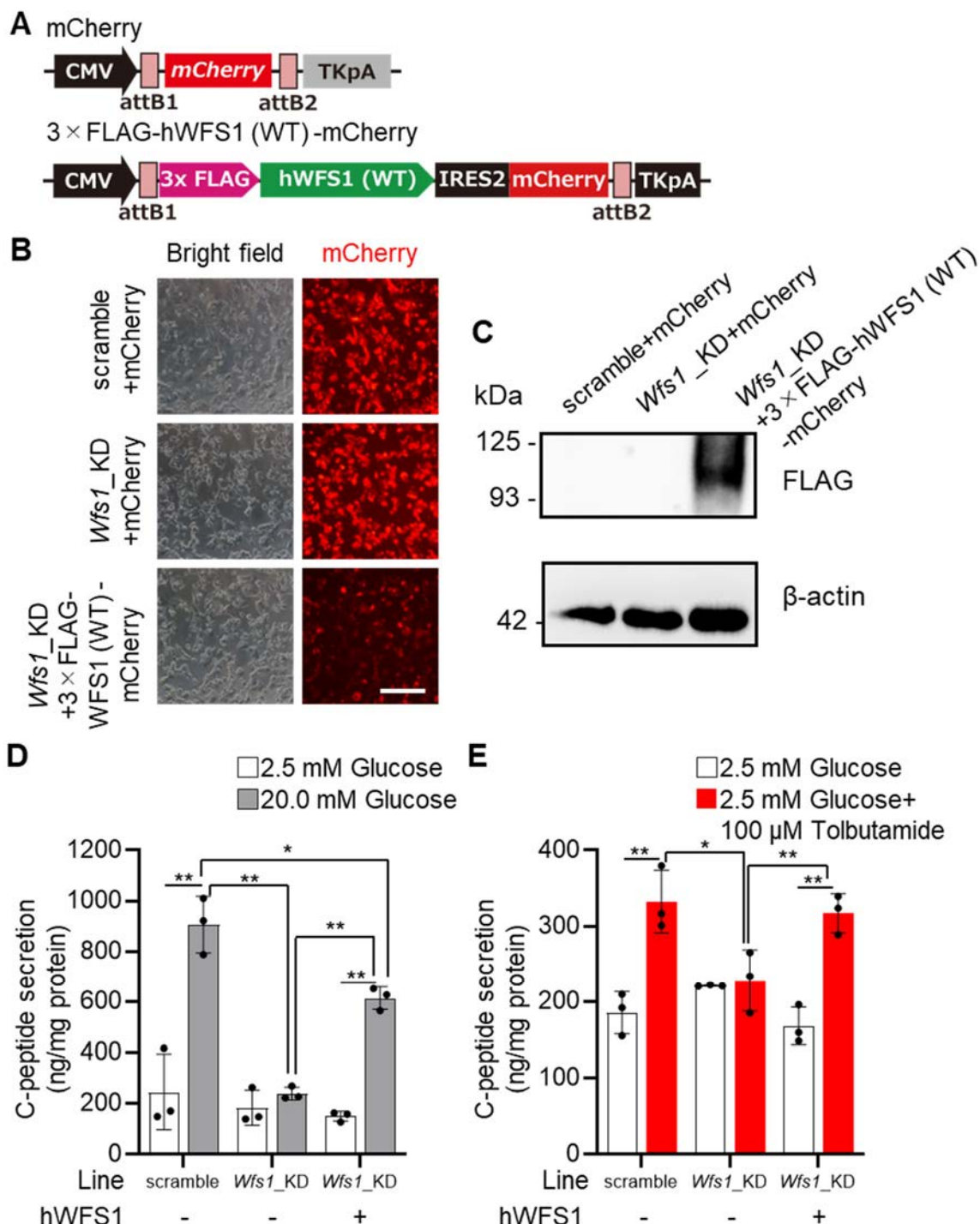


図 15 *Wfs1* 遺伝子の発現抑制はインスリン分泌を低下させる

(A) mCherry あるいは 3×FLAG-WFS1(WT) と mCherry を強制発現用のアデノウイルスベクター。(B) アデノウイルスを感染させた scramble MIN6 細胞と *Wfs1*_KD MIN6 細胞の倒立顕微鏡下での観察。Scale bar = 100 μm. (C) western blotting による 3×FLAG-WFS1 (WT) の発現の確認。(D, E) グルコース濃度に応じた (D) 及び Tolbutamide 刺激に応じた (E) インスリン分泌能の解析。グラフは Mean ± S.D. を表す。統計学的解析は ONE-way ANOVA と Dunnett multiple comparisons test を用いた。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, N = 3。

5-3 MIN6細胞において hWFS1 (WT) の一部は細胞膜またはその近傍に存在する

Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌と WFS1 の関連が示唆された。このことから WFS1 は K_{ATP} channel の開閉、脱分極、電位依存性カルシウムチャネル、カルシウムイオンの流入によるインスリン分泌と細胞膜近傍で起こる現象に関わると考えた。

そこで、WFS1 が細胞膜近傍にも存在するのではないかと考えて、MIN6 細胞に 3×FLAG-WFS1 (WT) 及び mCherry に小胞体局在化タグをつけた mCherry-ER をアデノウイルスを用いて強制発現した。そして、細胞膜のマーカースとして $Na^+ K^+$ ATPase 抗体、Anti-FLAG 抗体、Anti-RFP 抗体を用いた免疫細胞化学により細胞内局在を解析した。その結果、3×FLAG-WFS1 (WT) は小胞体に局在していた (図 16A)。また、一部の 3×FLAG-WFS1 (WT) は細胞膜あるいは細胞膜近傍に局在していた (図 16B)。

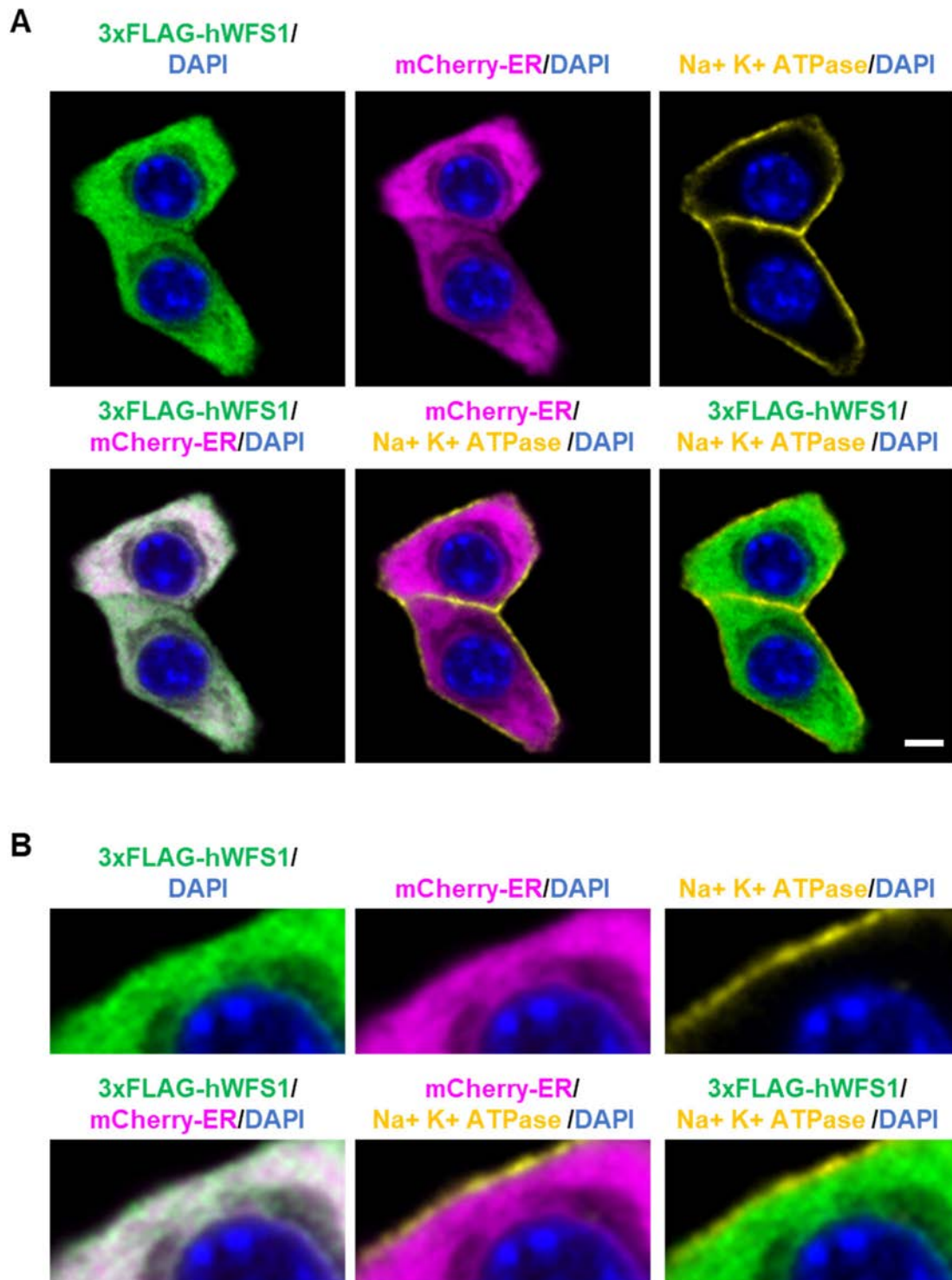


図 16 hWFS1 (WT) は細胞膜あるいは膜近傍にも存在する

(A, B) 共焦点倒立顕微鏡下での免疫細胞化学による hWFS1 (WT) の細胞内局在の解析。緑: 3×FLAG-hWFS1 (WT), 赤: mCherry-ER, 黄色: Na⁺ K⁺ ATPase。(A) Scale Bar = 5 μm。(B) (A)の拡大図。3×FLAG-hWFS1 が細胞膜あるいはその近傍に局在している。Scale bar = 1 μm。

5-4 hWFS1 は Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの流入を制御する

WFS1はカルシウムイオンの流入によるインスリン分泌にも作用する(1-4-3 Wolfram 症候群における糖尿病発症のメカニズム)ことから *Wfs1*_KD_MIN6 細胞において Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌もこの影響を受けているのではないかと考えた。そこで、Tolbutamide 刺激によるインスリン分泌においてその一つ上流の反応であるカルシウムイオンの動態を試みた。

細胞内カルシウムイオンの動態を解析するために、赤色蛍光カルシウムセンサタンパク質である R-GECO を使用した。R-GECO はカルシウムイオンと結合することで赤色蛍光強度が増加するカルシウムイオンセンサーである。

最初に scramble_MIN6 細胞及び *Wfs1*_KD_MIN6 細胞に lacZ (Control)、3×FLAG-hWFS1 (WT, P724L, W837X, Y652X) のいずれを発現するアデノウイルスと R-GECO を発現するアデノウイルスを導入し、Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオン動態の解析を試みた。

その結果、Control である lacZ を感染させた scramble_MIN6 細胞に比べ、*Wfs1*_KD_MIN6 細胞の Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオンの流入が減少していた。また、この現象は 3×FLAG-WFS1 (WT) の強制発現により回復していた。3×FLAG-WFS1 (P724L) も同様に回復しており、機能的な差は見られなかった。一方、3×FLAG-WFS1 (W837X, Y652X) では回復は見られなかった(図 17A~D)。

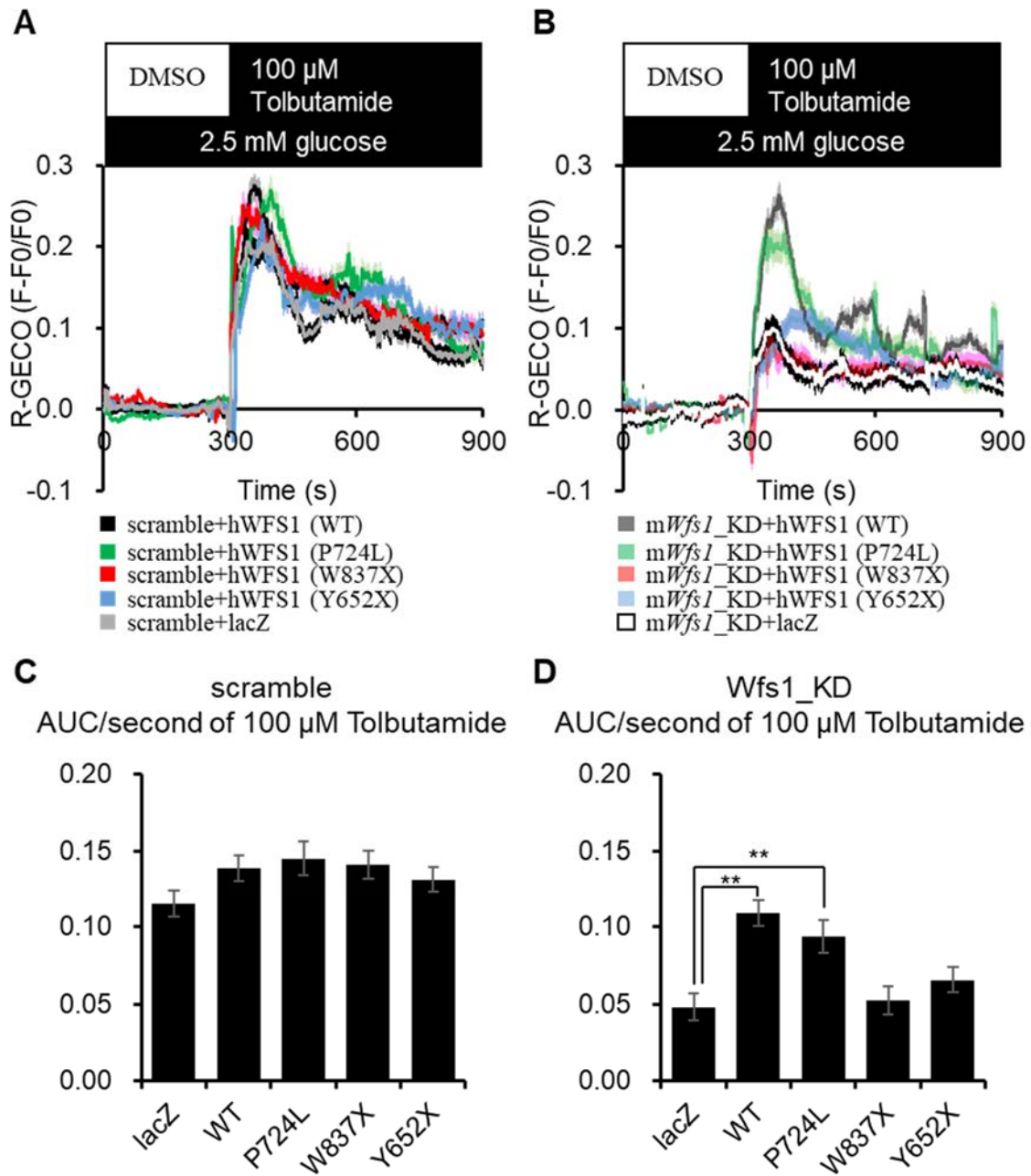


図 17 hWFS1 は Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオン動態に関わる

(A, B) scramble MIN6 細胞 (A) あるいは *Wfs1_KD* 細胞 (B) における Tolbutamide 刺激によるカルシウムイオン動態の解析。各時間の輝度値を F として、刺激前の平均輝度値を F₀ として、各時間における輝度値の変化の相対値 (F-F₀)/F₀ を計算したもの。(C, D) (A, B) の Tolbutamide 刺激中の 1 秒当たりの Area Under Curve (AUC)。mean±S.E. 統計学的解析は ONE-way ANOVA と Dunnett multiple comparisons test を用いた。***p* < 0.01, **p* < 0.05。

5-5 考察

本研究では WFS1 欠失によるインスリン分泌不全に着目した。樹立した *Wfs1*_KD MIN6 細胞 (図 14A~D) は小胞体ストレス誘導により小胞体ストレスマーカーである ATF4 の発現上昇と ATF6 α の核移行が確認できた (図 14E)。これは Morikawa ら (Morikawa *et al.*, 2022) や Fronseca ら (Fonseca *et al.*, 2010) の報告とも一致していた。

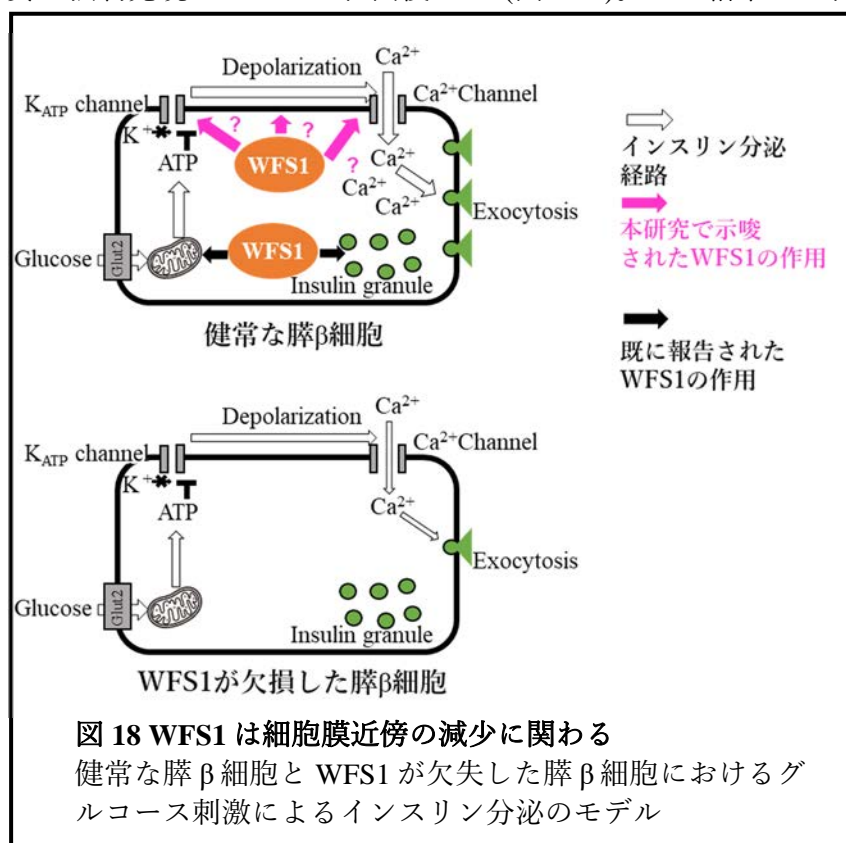
また、*Wfs1*_KD_MIN6 細胞においてグルコース刺激に応じたインスリン分泌能を解析したところ 20.0 mM glucose 下でのインスリン分泌能が低下していた。20.0 mM glucose 下でのインスリン分泌の低下は野生型 hWFS1 タンパク質を強制発現したところ、回復した (図 16E)。このような高グルコース下でのインスリン分泌能の低下は Wolfram 症候群患者でも観察されているため、本細胞株を WFS1 タンパク質がインスリン分泌過程で担う役割を解明する病態モデルとして利用できると考え研究を進めた。膵 β 細胞ではグルコースを取り込むと ATP が産出され、ATP 依存性カリウムチャンネルが閉口し細胞膜が脱分極する。次に電位依存性カルシウムチャンネルが開くことでカルシウムイオンの流入が促進され、インスリンが分泌される。WFS1 を欠失させるとグルコース刺激による ATP の産出能が減少し、インスリン分泌が低下するとの報告がある (Nguyen *et al.*, 2020; Zatyka *et al.*, 2015)。

一方、HEK293T 細胞で WFS1 を欠失させると細胞内のカルシウム濃度が変化すると報告もある (Takei *et al.*, 2006)。そこで、WFS1 欠失によるグルコース刺激によるインスリン分泌能の低下は ATP の産出能の低下だけではないと考えた。

そこで、グルコースの取り込みによる ATP の産出に関係なく、ATP 依存性カリウムチャンネルを阻害し、インスリン分泌を促進する Tolbutamide を用いたインスリン分泌能を解析した。その結果、Tolbutamide 刺激下でのインスリン分泌能が低下していたが野生型 WFS1 タンパク質を強制発現したところ、回復した (図 16F)。この結果から、

WFS1 タンパク質はカリウムチャンネルの閉口、脱分極、カルシウムチャンネルの開口とそれに伴うインスリン分泌という細胞膜近傍で起こる現象に関わることが示唆された。しかし、本研究ではグルコース刺激による ATP 産出の変化をとらえることができなかった。

次に、WFS1 が膜近傍の現象に関わると示唆されたため、免疫細胞化学を用いて野生型 WFS1 タンパク質の



局在を解析した(図 16)。その結果、野生型 hWFS1 タンパク質の一部が細胞膜近傍に位置していた。最近では Wang らも WFS1 は細胞膜近傍にも位置していると報告している(Wang *et al.*, 2021)。

しかし、先行研究も本研究でも小胞体が細胞膜に近接して野生型 hWFS1 タンパク質が細胞膜近傍にも局在しているように観察されたのか野生型 hWFS1 タンパク質そのものが細胞膜に位置しているかは結論をつけることはできなかった。今後は細胞膜上に存在するタンパク質をビオチン化し、質量分析法で解析する手法を用いて WFS1 タンパク質が細胞膜に局在するのか小胞体と細胞膜の近接に伴い WFS1 タンパク質が細胞膜に近接しているのか解明していきたいと考えている。

次に *Wfs1*_KD_MIN6 細胞において Tolbutamide 刺激によるカルシウム動態の解析(図 17)を行った。その結果、*Wfs1* の抑制により Tolbutamide 刺激下でのカルシウムイオンの流入は低下していたが、野生型 hWFS1 タンパク質を強制発現したところ、回復した。また、1 アミノ酸置換変異である P724L は野生型と同じ動態を示したことからインスリン分泌において P724L と野生型の機能に差はないと考えている。

そして、P724L 変異を持つ患者の Wolfram 症候群の発症時期は nonsense 変異や frameshift 変異を持つ患者よりも発症時期が遅い(Matsunaga *et al.*, 2014)。また、P724L 変異型 WFS1 タンパク質は野生型 WFS1 タンパク質に比べ、小胞体ストレスを抑えることができないとも報告がある(Fonseca *et al.*, 2010)。本研究の結果と合わせると、P724L 変異を持つ Wolfram 症候群患者は小胞体ストレスによる膵β細胞数の減少が主原因であり、インスリン分泌能の低下はあまり見られないと考えられ、比較的発症時期が遅いことにも説明がつく。

一方、C 末端が欠損した変異型 WFS1 の強制発現では野生型 WFS1 のような改善は見られなかった(図 17)。これは変異型 WFS1 タンパク質が野生型 WFS1 タンパク質に比べユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けており、野生型 WFS1 タンパク質に比べ強制発現できたタンパク質の量が少ないためのだと考えている。また、カリウムチャネルイオンの阻害に伴う脱分極、電位依存性カルシウムチャネルの開口といったカルシウムイオンを流入させるプロセスにも WFS1 タンパク質が関与していることが示唆された。

小胞体は細胞内のカルシウムの貯蔵庫であるが、膵β細胞において小胞体が細胞外からカルシウムイオンの流入に関与する報告が何件かなされている。例えば、TMEM24 は小胞体膜状に局在するタンパク質であるが、小胞体と細胞膜を結合させ、細胞外からのカルシウムイオンの流入を促進し、インスリン分泌を促す(Lees *et al.*, 2017)。

また、小胞体膜状の STIM1 は小胞体内のカルシウムイオン濃度の低下を感知し、細胞膜の Orai1 と結合し、カルシウムイオンを細胞外から流入させる。これはストア作動性カルシウム流入(Stored-Operated Calcium Entry:SOCE)と呼ばれ、細胞内のカルシウムイオン濃度調整機構の 1 つである。そして、STIM1 の欠失や SOCE の阻害はグルコース刺激に応じたインスリン分泌を低下させる(Gilon *et al.*, 2018)。さらに、HEK293T 細胞において WFS1 が SOCE に関わるとの報告(Takei *et al.*, 2006)もある。これらの報告からも、細胞膜近傍に存在する WFS1 がカルシウムイオンの流入に関わる可能性は十分にあると考えている。

6. 結語

近年の次シーケンス技術の発達により数日でヒトゲノムを解析することが可能である。Wolfram 症候群などの原因遺伝子が同定されている遺伝性疾患は発症していない段階でも将来的に発症するかどうか、自分の子どもが発症するかどうかも予測できる。したがって、ゲノム情報をもとに将来罹患しうる疾病を予想し、発症する前や症状が軽度のうちに治療することも実践されつつある。

WFS1 遺伝子変異に起因する Wolfram 症候群の研究は WFS1 遺伝子欠失モデルを用いて進められてきた。その結果、WFS1 遺伝子欠失モデルでは小胞体ストレスの上昇による膵 β 細胞数の減少や ATP の産出能の低下によるインスリン分泌能の低下が観察され、Wolfram 症候群患者でも同様の現象が起こっていると考えられている。この知見をもとにすでに糖尿病を発症した Wolfram 症候群患者に対する治験や治療が試みられている。例えば、小胞体ストレスを軽減するための薬剤や 2 型糖尿病の治療の際に使用する GLP-1 受容体作動薬が用いられ、Wolfram 症候群患者の治療が試みられている。この 2 つの治療法は WFS1 遺伝子欠失モデルから考えられたものである (Abreu and Urano, 2019; Kondo *et al.*, 2018)。

一方、Wolfram 症候群患者は変異型 WFS1 タンパク質を発現している。そして、WFS1 タンパク質の nonsense と frameshift 変異を持つ患者は missense 変異に比べ、より若年で糖尿病を発症することからより個々の変異に着目した治療法が必要であると考えている。

このような重篤な症状を示しうる変異を持つ Wolfram 症候群患者に対してアデノ随伴ウイルスを介した CRISPR/Cas9 システムによるゲノム修復も有効な治療手段の 1 つとなりうる (Maxwell *et al.*, 2020)。しかし、CRISPR/Cas9 システムの特異性は guide RNA の配列に依存することや癌抑制遺伝子である p53 が不活性化した細胞を増やしてしまう可能性 (Enache *et al.*, 2020) もあり、患者への応用へのハードルは高い。また、アデノ随伴ウイルスにより患者に野生型ヒト WFS1 を強制発現させる治療も有効である可能性は高い (Abreu and Urano, 2019; Shang *et al.*, 2014)。しかし、現在実施されているアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子治療薬は 1 億円以上 (<https://www.nikkei.com/article/DGXMZO56057480W0A220C2MM0000/>) する場合もあり、Wolfram 症候群の治療に対しても既存の方法とは異なる治療法の開発が必要である。

そこで、本研究では変異型 WFS1 タンパク質の安定性を膵 β 細胞株と腎臓由来の細胞株で解析した。その結果、膵 β 細胞株では nonsense や frameshift 変異型 WFS1 タンパク質は野生型 WFS1 タンパク質や missense 変異型 WFS1 タンパク質のものに比べ特異的にユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることが分かった。

一方、腎臓由来の細胞では膵 β 細胞に比べ、変異型 WFS1 タンパク質は野生型 WFS1 タンパク質や missense 変異型 WFS1 タンパク質のものを見分けて分解する能力が低かった。以上の点から nonsense や frameshift 変異を持つ Wolfram 症候群患者の膵 β 細胞では生後から健常者よりも WFS1 タンパク質量が少ないため、幼少期に糖尿病を発症すると考えられる。そこで、膵 β 細胞において変異型 WFS1 タンパク質を分解する機構を同定し、その機構を特異的に阻害することで WFS1 タンパク質量を正常に保ち Wolfram 症候群の発症を遅らせることが期待される (図 19)。

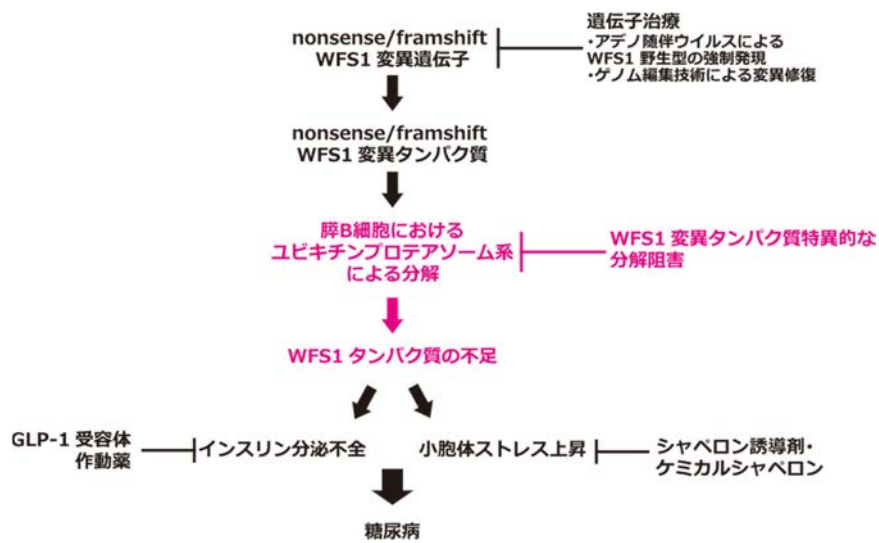


図 19 本研究から提案される今後のWolfram 症候群治療
 黒:先行研究、マゼンダ: 本研究より提案できる新たな創薬標的

学位の骨格となる関連論文及びその他論文リスト

学位の骨格となる関連論文

Tokuma, H., Sakano, D., Tanabe, K., Tanizawa, Y., Shiraki, N., Kume, S. (2023). Selective proteasome degradation of C-terminally-truncated human WFS1 in pancreatic beta cells. *FEBS Open Bio*, *in press*.

その他論文リスト

Sakano, D., Uefune, F., **Tokuma, H.**, Sonoda, Y., Matsuura, K., Takeda, N., Nakagata, N., Kume, K., Shiraki, N., and Kume, S. (2020). Vmat2 safeguards b-cells against dopamine cytotoxicity under high-fat diet-induced stress. *Diabetes* 69, 2377–2391.

Asawa, Y., Nishida, K., Kawai, K., Domae, K., Ban, H.S., Kitazaki, A., Asami, H., Kohno, J.Y., Okada, S., **Tokuma, H.**, Sakano, D., Kume, S., Tanaka, M., Nakamura, H. (2021). Carborane as an Alternative Efficient Hydrophobic Tag for Protein Degradation. *Bioconjug. Chem.* 32, 2377–2385.

学会発表リスト

○徳間 啓、坂野 大介、糸 昭苑、WFS1 の発現低下とインスリン分泌の関連性の解明、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年 12 月 2 日、横浜

謝辞

本研究の実施にあたり、終始有益な御助言ならびにご指導を賜りました東京工業生命理工学院の糸昭苑 教授、白木伸明 准教授、坂野大介 助教に心から感謝いたします。また、カルシウムイメージングを指導、Matlab のプログラムを提供してくださった上船史弥博士に深く感謝いたします。そして、研究を遂行する上で助言ならびにサポートしていただきました糸・白木研究室の皆様には深く御礼申し上げます。

Wolfram 症候群に関して貴重なご助言をくださり、Rabbit anti-mouse WFS1 抗体を供与してくださった山口大学医学系研究科応用医工学専攻谷澤 幸生教授、田部 勝也講師に深くお礼申し上げます。

ゲノム編集法に関して貴重なご助言をくださった広島大学分子遺伝学研究室の山本 卓教授、佐久間 哲史講師に深くお礼申し上げます。

pCAGGS-Cre を供与してくださった熊本大学生命資源研究・支援センター 疾患モデル分野 荒木喜美 教授に深く感謝いたします。

HaloTag Vector を供与してくださった東京工業生命理工学院の近藤 科江教授、門之園 哲哉テニユアトラック助教に深く感謝いたします。

HEK293T 細胞を供与してくださった東京工業大学生命理工学院の木村 宏教授に深く感謝いたします。

DNA シーケンス解析を行っていただいた東京工業大学オープンファシオリティセンターバイオ部門 廣田 順二教授、職員の方々に深くお礼申し上げます。

免疫細胞化学画像取得にあたり東京工業大学生命理工学院ライフサイエンス推進機器共同利用室の皆様にお世話になりました。深く感謝いたします。

最後に、経済的・精神的援助をしてくださり、生活を支えてくださった両親・兄弟に深く感謝いたします。

参考文献

- Abreu, D., Asada, R., Revilla, J.M.P., Lavagnino, Z., Kries, K., Piston, D.W. and Urano, F. 2020. Wolfram syndrome 1 gene regulates pathways maintaining beta-cell health and survival. *Lab. Investig.*, **100**: 849–862.
- Abreu, D. and Urano, F. 2019. Current Landscape of Treatments for Wolfram Syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**: 711–714.
- Adams, C.J., Kopp, M.C., Larburu, N., Nowak, P.R. and Ali, M.M.U. 2019. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.*, **6**: 1–12.
- Alkan, F., Wenzel, A., Anthon, C., Havgaard, J.H. and Gorodkin, J. 2018. CRISPR-Cas9 off-targeting assessment with nucleic acid duplex energy parameters. *Genome Biol.*, **19**: 1–13.
- Angebault, C., Fauconnier, J., Patergnani, S., Rieusset, J., Danese, A., Affortit, C.A., Jagodzinska, J., Mégy, C., Quiles, M., Cazevielle, C., Korchagina, J., Bonnet-Wersinger, D., Milea, D., Hamel, C., Pinton, P., Thiry, M., Lacampagne, A., Delprat, B. and Delettre, C. 2018a. ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca²⁺ sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci. Signal.*, **11**: eaaq1380.
- Angebault, C., Fauconnier, J., Patergnani, S., Rieusset, J., Danese, A., Affortit, C.A., Jagodzinska, J., Mégy, C., Quiles, M., Cazevielle, C., Korchagina, J., Bonnet-Wersinger, D., Milea, D., Hamel, C., Pinton, P., Thiry, M., Lacampagne, A., Delprat, B. and Delettre, C. 2018b. ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca²⁺ sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci. Signal.*, **11**.
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J.I. and Vassalli, P. 1995. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**: 160–164.
- Asada, A., Hayakawa, H., Yanase, N., Abe, K., Sakurai, F., Mizuguchi, H. and Urata, Y. 2018. A flow cytometry-based method to determine the titer of adenoviruses expressing an extraneous gene. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**: 1615–1619.
- Balboa, D., Saarimäki-Vire, J., Borshagovski, D., Survila, M., Lindholm, P., Galli, E., Euroala, S., Ustinov, J., Grym, H., Huopio, H., Partanen, J., Wartiovaara, K. and Otonkoski, T. 2018. Insulin mutations impair beta-cell development in a patient-derived iPSC model of neonatal diabetes. *Elife*, **7**: 1–35.
- Bisnett, B.J., Condon, B.M., Lamb, C.H., Georgiou, G.R. and Boyce, M. 2021. Export Control: Post-transcriptional Regulation of the COPII Trafficking Pathway. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**.

D Isaacson, J L Mueller, J.C.N. and S.S. and Article, R. 2006. 基因的改变 NIH Public Access.

Bone, **23**: 1–7.

De Franco, E., Flanagan, S.E., Yagi, T., Abreu, D., Mahadevan, J., Johnson, M.B., Jones, G., Acosta, F., Mulaudzi, M., Lek, N., Oh, V., Petz, O., Caswell, R., Ellard, S., Urano, F. and Hattersley, A.T. 2017. Dominant ER stress-inducing WFS1 mutations underlie a genetic syndrome of neonatal/infancy-onset diabetes, congenital sensorineural deafness, and congenital cataracts. *Diabetes*, **66**: 2044–2053.

DeKolver, R.C., Choi, V.M., Moehle, E.A., Paschon, D.E., Hockemeyer, D., Meijsing, S.H., Sancak, Y., Cui, X., Steine, E.J., Miller, J.C., Tam, P., Bartsevich, V. V., Meng, X., Rupniewski, I., Gopalan, S.M., Sun, H.C., Pitz, K.J., Rock, J.M., Zhang, L., *et al.* 2010. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.*, **20**: 1133–1142.

Delprat, B., Maurice, T. and Delettre, C. 2018. Wolfram syndrome: MAMs' connection? review-article. *Cell Death Dis.*, **9**.

Enache, O.M., Rendo, V., Abdusamad, M., Lam, D., Davison, D., Pal, S., Currimjee, N., Hess, J., Pantel, S., Nag, A., Thorner, A.R., Doench, J.G., Vazquez, F., Beroukhim, R., Golub, T.R. and Ben-David, U. 2020. Cas9 activates the p53 pathway and selects for p53-inactivating mutations. *Nat. Genet.*, **52**: 662–668.

Estalella, I., Garcia-Gimeno, M.A., Marina, A., Castaño, L. and Sanz, P. 2008. Biochemical characterization of novel glucokinase mutations isolated from Spanish maturity-onset diabetes of the young (MODY2) patients. *J. Hum. Genet.*, **53**: 460–466.

Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Lu, S., Lipson, K.L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M.A. and Urano, F. 2010. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J. Clin. Invest.*, **120**: 744–755.

Gao, X., He, J., Zhu, A., Xie, K., Yan, K., Jiang, X., Xu, Y., Li, Q., Xu, A., Ye, D. and Guo, J. 2021. Modelling gestational diabetes mellitus: large animals hold great promise. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **22**: 407–420.

Gilon, P., Roe, M.W., Evans-Molina, C., Kono, T., Tong, X., Taleb, S., Bone, R.N., Iida, H., Lee, C.C. and Sohn, P. 2018. Impaired store-operated calcium entry and STIM1 loss lead to reduced insulin secretion and increased endoplasmic reticulum stress in the diabetic B-cell. *Diabetes*, **67**: 2293–2304.

- González, F., Zhu, Z., Shi, Z.D., Lelli, K., Verma, N., Li, Q. V. and Huangfu, D. 2014. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **15**: 215–226.
- Guo, X., Shen, S., Song, S., He, S., Cui, Y., Xing, G., Wang, J., Yin, Y., Fan, L., He, F. and Zhang, L. 2011. The E3 ligase Smurf1 regulates Wolfram syndrome protein stability at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **286**: 18037–18047.
- Hatanaka, M., Tanabe, K., Yanai, A., Ohta, Y., Kondo, M., Akiyama, M., Shinoda, K., Oka, Y. and Tanizawa, Y. 2011a. Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells. *Hum. Mol. Genet.*, **20**: 1274–1284.
- Hatanaka, M., Tanabe, K., Yanai, A., Ohta, Y., Kondo, M., Akiyama, M., Shinoda, K., Oka, Y. and Tanizawa, Y. 2011b. Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic β -cells. *Hum. Mol. Genet.*, **20**: 1274–1284.
- Hitoshi, N., Ken-ichi, Y. and Jun-ichi, M. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, **108**: 193–199.
- Hofmann, S. and Bauer, M.F. 2006. Wolfram syndrome-associated mutations lead to instability and proteasomal degradation of wolframin. *FEBS Lett.*, **580**: 4000–4004.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K.D. and Bauer, M.F. 2003. Wolfram syndrome: Structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum. Mol. Genet.*, **12**: 2003–2012.
- Hogrebe, N.J., Augsornworawat, P., Maxwell, K.G., Velazco-Cruz, L. and Millman, J.R. 2020. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.*, **38**: 460–470.
- Inoue, Hiroshi, Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y. and Permutt, M.A. 1998. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). **20**: 143–148.
- Inoue, H, Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y. and Permutt, M.A. 1998. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.*, **20**: 143–8.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y. and Oka, Y. 2004. Disruption of the WFS1

- gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus - Secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.*, **13**: 1159–1170.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Tanizawa, Y. and Oka, Y. 2004. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus – secretion coupling in insulin secretion. **13**: 1159–1170.
- Kalko, E.K. V, Dukas, R., Ratcliffe, J.M., Teeling, E.C., Haven, N., Fattu, J.M., Bates, M.E., Simmons, J. a, Riquimaroux, H., Surlykke, a, Bouffard, F.H., Lee, D.N., Dear, S.P., Horiuchi, T.K., Krishnaprasad, P.S., Moss, C.F., Schuller, G., Brudzynski, S.M., Syme, D. a, *et al.* 2011. An Expanded Palette of Genetically. *Cell*, **557**: 1888–1891.
- Kawaguchi, M., Minami, K., Nagashima, K. and Seino, S. 2006. Essential Role of Ubiquitin-Proteasome System in Normal Regulation of Insulin Secretion *. *J. Biol. Chem.*, **281**: 13015–13020.
- Kitamura, R.A., Maxwell, K.G., Ye, W., Kries, K., Brown, C.M., Augsornworawat, P., Hirsch, Y., Johansson, M.M., Weiden, T., Ekstein, J., Cohen, J., Klee, J., Leslie, K., Simeonov, A., Henderson, M.J., Millman, J.R. and Urano, F. 2022. Multidimensional analysis and therapeutic development using patient iPSC–derived disease models of Wolfram syndrome. *JCI Insight*, **7**.
- Kondo, M., Tanabe, K., Amo-shiinoki, K., Hatanaka, M. and Morii, T. 2018. Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. 2189–2201.
- Kondo, M., Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Morii, T., Takahashi, H., Seino, S., Yamada, Y. and Tanizawa, Y. 2018. Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia*, **61**: 2189–2201.
- Laemmli, U.K. 1970. 227680a0. *Nature*, **227**: 680–685.
- Laybutt, D.R., Preston, A.M. and Åkerfeldt, M.C. 2007. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. 752–763.
- Leavens, K., Jobaliya, C., Stanescu, D. and Ortiz-gonzalez, X. 2020. in HNF1A. **25**: 273–289.
- Lees, J.A., Messa, M., Sun, E.W., Wheeler, H., Torta, F., Wenk, M.R., De Camilli, P. and Reinisch, K.M. 2017. Lipid transport by TMEM24 at ER-plasma membrane contacts regulates pulsatile insulin secretion. *Science (80-.)*, **355**.
- Li, D.Q., Jing, X., Salehi, A., Collins, S.C., Hoppa, M.B., Rosengren, A.H., Zhang, E., Lundquist, I., Olofsson, C.S., Mörgelin, M., Eliasson, L., Rorsman, P. and Renström, E. 2009. Suppression of Sulfonylurea- and Glucose-Induced Insulin Secretion In Vitro and In Vivo in Mice Lacking the Chloride Transport Protein CIC-3. *Cell Metab.*, **10**: 309–315.

- Li, Z., Wu, F., Zhang, X., Chai, Y., Chen, D., Yang, Y., Xu, K., Yin, J., Li, R., Shi, H., Wang, Z., Li, X., Xiao, J. and Zhang, H. 2017. Valproate attenuates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells via the AKT/GSK3 β signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**.
- Los, G. V, Encell, L.P., Mcdougall, M.G., Hartzell, D.D., Karassina, N., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G. and Zhu, J. 2008. A RTICLE. **3**: 373–382.
- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J.F. and Vasar, E. 2008. Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J. Comp. Neurol.*, **509**: 642–660.
- Ma, S., Viola, R., Sui, L., Cherubini, V., Barbetti, F. and Egli, D. 2018. β Cell Replacement after Gene Editing of a Neonatal Diabetes-Causing Mutation at the Insulin Locus. *Stem Cell Reports*, **11**: 1407–1415.
- Matsunaga, K., Tanabe, K., Inoue, H., Okuya, S. and Ohta, Y. 2014. Wolfram Syndrome in the Japanese Population ; Molecular Analysis of WFS1 Gene and Characterization of Clinical Features. **9**.
- Matsunaga, K., Tanabe, K., Inoue, H., Okuya, S., Ohta, Y., Akiyama, M., Taguchi, A., Kora, Y., Okayama, N., Yamada, Y., Wada, Y., Amemiya, S., Sugihara, S., Nakao, Y., Oka, Y. and Tanizawa, Y. 2014. Wolfram syndrome in the japanese population; molecular analysis of wfs1 gene and characterization of clinical features. *PLoS One*, **9**.
- Maxwell, K.G., Augsornworawat, P., Velazco-Cruz, L., Kim, M.H., Asada, R., Hoglebe, N.J., Morikawa, S., Urano, F. and Millman, J.R. 2020. Gene-edited human stem cell–derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci. Transl. Med.*, **12**.
- McClatchy, D.B., Martínez-Bartolomé, S., Gao, Y., Lavallée-Adam, M. and Yates, J.R. 2020. Quantitative analysis of global protein stability rates in tissues. *Sci. Rep.*, **10**: 1–12.
- Morikawa, S., Blacher, L., Onwumere, C. and Urano, F. 2022. Loss of Function of WFS1 Causes ER Stress-Mediated Inflammation in Pancreatic Beta-Cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **13**: 1–12.
- Nair, G.G., Liu, J.S., Russ, H.A., Tran, S., Saxton, M.S., Chen, R., Juang, C., Li, M. Ian, Nguyen, V.Q., Giacometti, S., Puri, S., Xing, Y., Wang, Y., Szot, G.L., Oberholzer, J., Bhushan, A. and Hebrok, M. 2019. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. *Nat. Cell Biol.*, **21**: 263–274.
- Naito, M., Ohoka, N., Shibata, N. and Tsukumo, Y. 2019. Targeted Protein Degradation by Chimeric Small Molecules , PROTACs and SNIPERs. **7**: 1–5.

- Najjar, S.S., Saikaly, M.G., Zaytoun, G.M. and Abdelnoor, A. 1985. Association of diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness the Wolfram or DIDMOAD syndrome. *Arch. Dis. Child.*, **60**: 823–828.
- Nguyen, L.D., Fischer, T.T., Abreu, D., Arroyo, A., Urano, F. and Ehrlich, B.E. 2020. Calpain inhibitor and ibudilast rescue β cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**: 17389–17398.
- Ohana, R.F., Encell, L.P., Zhao, K., Simpson, D., Slater, M.R., Urh, M. and Wood, K. V. 2009. HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expr. Purif.*, **68**: 110–120.
- Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., Jagomäe, T., Toots, M., Koppel, T., Vallisoo, T., Nigul, M., Heinla, I., Meier, R., Kaasik, A., Andres, P., Hickey, M.A., Terasmaa, A. and Vasar, E. 2017. Wfs1- deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome : insulin-dependent diabetes , optic nerve atrophy and medullary degeneration. 1–16.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. and Zhang, F. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, **154**: 1380–1389.
- Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., Araki, K., Mao, D., Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O., Stainier, D., Endo, F., Kume, K., Uesugi, M. and Kume, S. 2014. VMAT2 identified as a regulator of late-stage β -cell differentiation. *Nat. Chem. Biol.*, **10**: 141–148.
- Shahjalal, H.M., Shiraki, N., Sakano, D., Kikawa, K., Ogaki, S., Baba, H., Kume, K. and Kume, S. 2014. Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J. Mol. Cell Biol.*, **6**.
- Shang, L., Hua, H., Foo, K., Martinez, H., Watanabe, K., Zimmer, M. and Kahler, D.J. 2014. β -Cell Dysfunction Due to Increased ER Stress in a Stem Cell Model of Wolfram Syndrome. **63**: 923–933.
- Sim, E.Z., Enomoto, T., Shiraki, N., Furuta, N., Kashio, S., Kambe, T., Tsuyama, T., Arakawa, A., Ozawa, H., Yokoyama, M., Miura, M. and Kume, S. 2022. Methionine metabolism regulates pluripotent stem cell pluripotency and differentiation through zinc mobilization. *Cell Rep.*, **40**: 111120.
- Soria, B., Roche, E., Berná, G., León-quinto, T., Reig, J.A. and Martín, F. n.d. Rapid Publication. **1**: 1–6.
- Stoffel, M. and Duncan, S.A. 1997. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 13209–13214.

- Støy, J., De Franco, E., Ye, H., Park, S.Y., Bell, G.I. and Hattersley, A.T. 2021. In celebration of a century with insulin – Update of insulin gene mutations in diabetes. *Mol. Metab.*, **52**: 101280.
- Strom, T.M., Hörtnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K.D. and Meitinger, T. 1998. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum. Mol. Genet.*, **7**: 2021–2028.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K. and Oka, Y. 2001. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product : predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. **10**: 477–484.
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y. and Oka, Y. 2006. WFS1 protein modulates the free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.*, **580**: 5635–5640.
- Toppings, N.B., McMillan, J.M., Au, P.Y.B., Suchowersky, O. and Donovan, L.E. 2018. Wolfram Syndrome: A Case Report and Review of Clinical Manifestations, Genetics Pathophysiology, and Potential Therapies. *Case Rep. Endocrinol.*, **2018**: 1–8.
- Tsuchiya, Y., Saito, M. and Kohno, K. 2016. Pathogenic mechanism of diabetes development due to dysfunction of unfolded protein response. *Yakugaku Zasshi*, **136**: 817–825.
- Velazco-Cruz, L., Song, J., Maxwell, K.G., Goedegebuure, M.M., Augsornworawat, P., Hogrebe, N.J. and Millman, J.R. 2019. Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports*, **12**: 351–365.
- Wang, L., Liu, H., Zhang, X., Song, E., Wang, Y., Xu, T. and Li, Z. 2021. WFS1 functions in ER export of vesicular cargo proteins in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.*, **12**: 1–13.
- Wolfram D.J and Wagener H.P. 1938. Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin. Proc.*, **13**: 715–718.
- Xu, R., Xia, B., Geng, J., Shi, J., Shi, H., Yuan, L. and De, W. 2009. Expression and localization of Wolfram syndrome 1 gene in the developing rat pancreas. *World J. Gastroenterol.*, **15**: 5425–5431.
- Yamagata, K., Yang, Q., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Miyagawa, J.I., Okita, K., Yoshiuchi, I., Miyazaki, J.I., Noguchi, T., Nakajima, H., Namba, M., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. 1998. Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1 α is dominant negative. *Diabetes*, **47**: 1231–1235.
- Zatyka, M., Da Silva Xavier, G., Bellomo, E.A., Leadbeater, W., Astuti, D., Smith, J., Michelangeli, F., Rutter, G.A. and Barrett, T.G. 2015. Sarco(endo)plasmic reticulum

atpase is a molecular partner of wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Hum. Mol. Genet.*, **24**: 814–827.

Zeng, H., Guo, M., Zhou, T., Tan, L., Chong, C.N., Zhang, T., Dong, X., Xiang, J.Z., Yu, A.S., Yue, L., Qi, Q., Evans, T., Graumann, J. and Chen, S. 2016. An Isogenic Human ESC Platform for Functional Evaluation of Genome-wide-Association-Study-Identified Diabetes Genes and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*, **19**: 326–340.

Zhu, Z., Li, Q. V., Lee, K., Rosen, B.P., González, F., Soh, C.L. and Huangfu, D. 2016. Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes. *Cell Stem Cell*, **18**: 755–768.