

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05380

研究課題名（和文）鉄硫黄タンパク質へと分子進化したcFLIPの構造解析と新規生理機能の解明

研究課題名（英文）Structural analysis of cFLIP as an iron-binding protein and elucidation of a new physiological function

研究代表者

酒巻 和弘（Sakamaki, Kazuhiro）

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20271017

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：cFLIPは、分子進化の過程でプロテアーゼとしての酵素活性を失ったことから擬プロテアーゼと定義されているが、分子進化速度が早いにもかかわらず擬プロテアーゼドメイン中の特定のアミノ酸は脊椎動物種間で変わらず保存されていることから何らかの意義があると考えられた。我々の研究によって、cFLIPが鉄結合タンパク質としての新たな性質を獲得し、二価鉄イオンと過酸化水素によるFenton反応を抑制し、更にそれらによって誘起される細胞死に対しても抑制的に働くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、擬プロテアーゼと定義されたタンパク質がその後の進化によって新たな機能を獲得したことを立証した研究である。このことは、擬酵素と呼ばれながらも細胞で生成され続けるタンパク質についてその存在意義を再検証することを促す切っ掛けとなる。

研究成果の概要（英文）：cFLIP is defined as a pseudo protease because it has lost its enzyme activity as a protease in the process of molecular evolution, but although the molecular evolution speed is fast, the certain amino acids in the pseudo protease-domain are conserved in vertebrates. We thought that there is some significance because they do not change during evolution. Our study demonstrated a new property of cFLIP as an iron-binding protein, suppressing the Fenton reaction with ferrous ions and hydrogen peroxide, and also inhibiting cell death induced by these factors.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞死 擬プロテアーゼ 鉄結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスは、細胞死の様式であり生体にとって不可欠な生命現象である。アポトーシスの制御機構が一度狂うとヒトでは様々な疾患が発症する。このアポトーシスのシグナル伝達経路では、カスパーゼ (caspase) と総称された一群のシステイン-プロテアーゼがシグナル伝達分子として働く。そのうち “caspase-8 (CASP8)” は、イニシエーターカスパーゼと呼ばれてシグナル伝達経路の上流に位置し、この分子が活性型に変わることによってアポトーシスのシグナルが下流に伝わり、不可逆的な細胞死が起きる。CASP8 は、ヒトやマウスのような哺乳類だけでなくウニやサンゴを含めた無脊椎動物にも広く存在することから (Sakamaki et al., *Mol. Biol. Evol.*, 2014)、多細胞動物において普遍的に機能していると考えられている。

本研究対象の “cFLIP” は、CASP8 に特異的な制御因子として最初に同定された (Irmeler et al., *Nature*, 1997)。cFLIP が CASP8 に直接会合することで CASP8 の自己切断と活性化が抑制される。cFLIP は、CASP8 とタンパク質全体の構造は酷似しているがプロテアーゼとしての機能を喪失しており、単独ではアポトーシス誘導分子として働かない。このため現在では cFLIP は、「偽プロテアーゼ」と定義されている。cFLIP に関して、我々は、進化の過程で脊椎動物が出現した際に、祖先型の CASP8 から遺伝子重複によって派生した 4 遺伝子のうちの一つであることを見出した (Sakamaki et al., *BioEssays*, 2015)。他の 2 遺伝子 (CASP10 と CASP18) は哺乳類になると変遷し、ヒトやイヌでは CASP18 遺伝子、マウスなどの齧歯類では CASP10 と CASP18 の両遺伝子がゲノムより消失したことも分かっている。一方 cFLIP は、派生直後に偽プロテアーゼへと変異したにも拘らず哺乳類も含めた全ての脊椎動物においてその存在が認められる。cFLIP は、CASP8 の活性化を伴うアポトーシスの抑制以外にも抗酸化作用も含め多様な働きが示唆されている (Smyth et al., *FEBS J.*, 2020)。詳細な作用機序は未だ不明である。

近年、アポトーシス以外にも多様な細胞死の存在が知られつつある (Galluzzi et al., *Cell Death Differ.*, 2018)。その中の一つ、“フェロプトーシス” は、細胞内で発生した ROS (活性酸素種) の一種 H_2O_2 (過酸化水素) がフェントン反応によって HO^* (ヒドロキシラジカル) に変化し、この HO^* が細胞膜上の脂肪酸を酸化し細胞膜にダメージを与えることで細胞が崩壊する細胞死である (D.R. Green, *Cell*, 2019)。フェントン反応には Fe^{2+} イオンが関与しているため、鉄に対するキレート剤を用いれば反応が抑制され、その結果フェロプトーシスの細胞死も抑えられることが判明している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「偽プロテアーゼ」として定義された cFLIP が分子進化の過程で新たな機能を獲得したことを立証し、さらに cFLIP がアポトーシスだけでなくフェロプトーシスによる細胞死に対しても抑制因子として働くことを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) cFLIP リコンビナントタンパク質の精製並びに特性を解析する

cFLIP の特性を理解するため、大腸菌で大量に発現させたヒト cFLIP のリコンビナントタンパク質を分離・精製する。大腸菌用発現ベクターに野生型ヒト cFLIP を組み込んだプラスミド DNA を大腸菌に導入し、産生された His タグ付き cFLIP タンパク質をアフィニティー精製する。その後精製したタンパク質が鉄と結合するか否かを鉄イオンの存在・非存在下で分光光度計を使っ

で鉄結合タンパク質特有の吸収スペクトルを調べることで明らかにする。また更に cFLIP リコンビナントタンパク質が鉄と結合することが Fenton 反応による HO^* (ヒドロキシラジカル) の産生を抑制しうるか in vitro の実験系で検証する。

(2) cFLIP タンパク質発現大腸菌を解析する

先行研究において、遺伝子重複によって同時に派生した他 3 つのカスパーゼ (CASP8・CASP10・CASP18) には無く cFLIP のみに存在し、且つ脊椎動物間で保存されているシステイン残基 (C^{259}) の存在を認めている。このシステインをアラニンに置換した変異体 “cFLIP(C259A)” を作製し野生型と共に大腸菌にそれぞれ発現させた後、菌体内の鉄の変動を電子スピン共鳴装置で測定する。また IPTG 誘導系を使って、高濃度の鉄イオン環境下において菌体内への鉄の取り込みの増加の有無を菌体色の変化を指標に判定する。更に、cFLIP タンパク質が発現することで、 H_2O_2 の刺激に対して形質転換した大腸菌が耐性を示すかを調べる。

(3) cFLIP の細胞におけるフェロプトーシス抑制効果を調べる

cFLIP の新たな生理的役割として、細胞内で遊離している Fe^{2+} イオンを捕捉しその量を調節する可能性が考えられる。この働きによって、フェントン反応による HO^* の発生を未然に防ぐことが想定された。本研究ではこの仮説を検証するため、ヒト培養細胞株 HeLa 細胞を用いてフェロプトーシスを人為的に誘導した際の生き残った細胞数を測定することにより cFLIP の抑制効果を明確にする。Fenton 反応を促進する H_2O_2 と Fe^{3+} イオン (細胞内に取り込まれると Fe^{2+} イオンに変換されることが判明している) の混合物を培地に加えることにより、フェロプトーシスを人為的に誘導できる系を用いる。また、「偽プロテアーゼ」の領域を欠いた短縮型変異体 “cFLIP(DEDs)” を追加作製し、この領域が重要な役割を担うことを示す。

4 . 研究成果

(1) cFLIP リコンビナントタンパク質の解析結果

精製した野生型 cFLIP リコンビナントタンパク質は、 Fe^{2+} イオン存在下で鉄結合タンパク質特有の吸収スペクトルを示し、鉄と結合することが判明した。

また、 H_2O_2 と Fe^{2+} イオンの混合下でプラスミド DNA は分解消失するが、cFLIP リコンビナントタンパク質を加えることで DNA の分解を抑制することができた。 H_2O_2 と Fe^{2+} イオンによるフェントン反応で生じる HO^* (ヒドロキシラジカル) の産生を抑制した結果だと考えられる。

(2) cFLIP タンパク質発現大腸菌の解析結果

電子スピン共鳴装置で形質転換した菌体内の鉄の変動を調べたところ、野生型の cFLIP が発現すると鉄硫黄タンパク質特有の “2Fe-2S クラスタ” を示すスペクトルの上昇が認められ、一方変異体が発現している菌体では逆に低下していた。また培地に鉄含有液を添加すると、増殖中の菌体が茶色に変化するが、IPTG を追加して cFLIP リコンビナントタンパク質の発現量を高めると菌体色が更に濃い茶色に変化することを認めた。cFLIP タンパク質の発現によって、菌体内の鉄量が増加し、その一部は鉄硫黄タンパク質に取り込まれている状態にあると推測された。

また、cFLIP タンパク質が発現することで、 H_2O_2 刺激に対して形質転換した大腸菌が耐性を示すかを調べると、野生型が発現している大腸菌では H_2O_2 処理に対して抵抗性を示したのに比べ、変異体発現大腸菌ではネガティブコントロールと大差無く抵抗力が弱いことが明らかとなった。

(3) cFLIP の細胞におけるフェロプトーシス抑制作用

H_2O_2 と Fe^{3+} イオンの培地への添加により細胞死が誘導されて生細胞が激減する状況でも野生型の cFLIP が発現していると生細胞の数が増加していた。一方、両変異体 “ cFLIP(C259A) ” と “ cFLIP(DEDs) ” がそれぞれ発現している HeLa 細胞では親株と生存数に大差無く生細胞の数は増加しなかった。これらのことから、「偽プロテアーゼ」の領域をもつ cFLIP が発現していればフェロプトーシス誘導に対して細胞は抵抗性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、「偽プロテアーゼ」と称された cFLIP の領域は、分子進化によって鉄結合能を新たに獲得したことが判明した。また cFLIP がアポトーシスだけでなくフェロプトーシスによる細胞死に対しても抑制因子として働くことも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rhea Sarah DSouza, Yusuke Nakasone, Naoyuki Iwabe, Jin Sakamoto, Kentaro Tomii, Kazuhiro Sakamaki
2. 発表標題 A functional analysis of a pseudoenzyme protein, cFLIP
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	富井 健太郎 (Tomii Kentaro) (40357570)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・研究チーム長 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------