

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19510197  
 研究課題名 (和文) ケモカインファミリー遺伝子の「生と死」と新規機能獲得に関する研究  
 研究課題名 (英文) Birth and Death of Chemokine Family Genes and Gain of Novel Functions  
 研究代表者  
 野見山 尚之 (NOMIYAMA HISAYUKI)  
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・講師  
 研究者番号：00156225

## 研究成果の概要：

ケモカインファミリー遺伝子は進化速度が特に早い。そのメンバーであるカニクイザル特異的 CXCL1L 遺伝子は mRNA は発現するにもかかわらず、タンパク質はほとんど合成しない。その翻訳抑制機構を解析し、ケモカイン遺伝子進化との関係において考察した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム進化・再編

## 1. 研究開始当初の背景

ケモカインはサイトカインの一種で、白血球やリンパ球などの細胞を炎症の際に組織へ遊走させる約 100 アミノ酸残基からなる分泌タンパク質である。ヒトでは少なくとも 44 種類の遺伝子が存在し、大部分が遺伝子クラスターを形成している。これらケモカイン遺伝子は重複によって形成されているが、どのようにして重複によって形成された遺伝子が新規機能を獲得していくのか、その詳細なプロセスは不明のままである。とくにケモカインファミリーは進化の早い生体防御に関与する遺伝子の中でも特に早いスピードで進化していることが示されており、その進化機構に興味もたれていた。

## 2. 研究の目的

カニクイザルの CXCL1L 遺伝子は CXCL1 遺伝子と共に重複により形成され、CXCL1 遺伝子はカニクイザルやヒトでは機能遺伝子として働いているが、CXCL1L 遺伝子はヒトでは偽遺伝子となっている(図 1A)。カニクイザルの CXCL1L は第 3 イントロン後の挿入により長くなり、また第 4 エクソンでは本来の終止コドンが置換され CXCL1 より長くなっている。また、CXCL1L には選択的スプライシングによって 3 つあるいは 4 つのエクソンからなる mRNA があり、それぞれ および と名付けられている(図 1B)。カニクイザルでは、脾臓や脳において CXCL1L

mRNA の発現は明らかだが、CXCL1L mRNA はわずかにしか発現されず、それらによるタンパク質発現量についての解析はまだ成されていない(図 1C)。CXCL1 と CXCL1L のアミノ酸配列の相同性は約 80% で、第 4 エクソンの部分は CXCL1 では 4 個の、CXCL1L では 50 個のアミノ酸をコードしている。以前、カニクイザル固有の CXCL1L (CXCL1L ) 遺伝子の機能を調べるために蚕でタンパク質の調製を試みたが、発現タンパク質を得ることが出来なかったため、その原因を解析する。それにより、この遺伝子が一部の種でのみ存在する理由を探ることを目的とする。

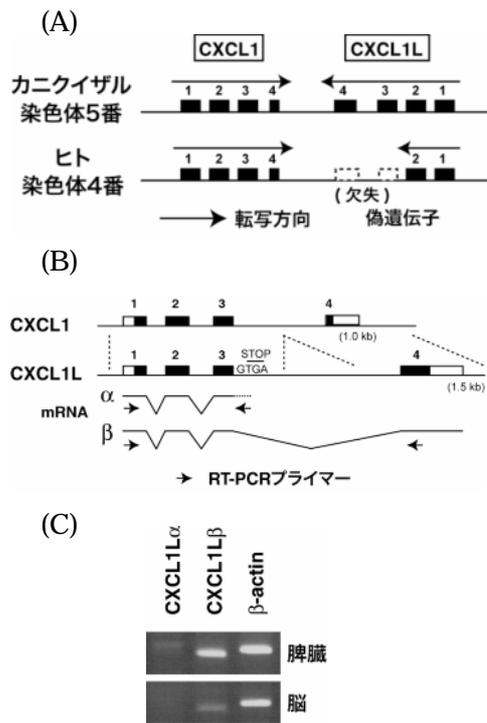


図1 CXCL1およびCXCL1L遺伝子の構造と発現

(A) ヒトおよびカニクイザルのゲノム構造, (B) カニクイザルの遺伝子構造, (C) CXCL1L 及び のRT-PCR解析結果

### 3. 研究の方法

#### (1) トランスフェクション実験

目的とする遺伝子配列を PCR により増幅し、発現ベクターに組み込んだ。また、手足口病ウイルス 2A 塩基配列は合成調製し、内部リボソーム導入部位(IRES)を挿入したベクターは市販のプラスミド (pIRES2-DsRed2) を用いて作製した。部位特異的変異導入には KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡) を用いた。それらを HEK293 (ヒト細胞株) に遺伝子導入試薬 Lipo Trust EX Gene (北海道システム・サイエンス) を用いてトランスフェクションし、total RNA や培養上清、細胞抽出液を調製した。

nsフェクションし、total RNA や培養上清、細胞抽出液を調製した。

#### (2) ウェスタンおよびノーザンブロッティング法

ウェスタンでは、一次抗体として抗 His-Tag 抗体や抗 GFP 抗体、抗 DsRed2 抗体を用いて検出した。ノーザンでは、ジゴキシゲニンで標識した CXCL1 や DsRed2、GAPDH (コントロール) RNA プローブを用いた。ウェスタンおよびノーザンでの検出試薬は、ECL Plus (アマーシャム) および CDP-Star (ロッシュ) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) CXCL1L のタンパク質発現を抑制する領域の同定

CXCL1L および 遺伝子を HEK293 にトランスフェクションし、解析したところ、mRNA からはタンパク質が翻訳発現されたが、mRNA からのタンパク質は検出することが出来なかった。

別の遺伝子 CXCL1 の 3' 端にエクソン 4 コード領域 (Ex4 CDS) を結合させると、CXCL1 と比較して Ex4 CDS が存在するとタンパク質はわずかにしか合成されなかった。しかし、終止コドン後の非翻訳領域に Ex4 CDS を挿入すると、タンパク質は検出された。一方、Ex4 CDS が存在すると mRNA 量も低下しているが、mRNA の低下以上にタンパク質の発現量が減少していることから、Ex4 CDS にはタンパク質発現を抑制する配列が存在すると考えられた。ここで、タンパク質発現抑制に mRNA 発現量の多少がどの程度関与しているかを調べるために、mRNA を不安定にする AU リッチ (ARE) 配列を挿入した。すると、この場合 mRNA 量は減少しているが、タンパク質量がそれほど低下しないことから、Ex4 CDS には確かにタンパク質発現を抑制する配列が存在すると考えられた(図 2A)。

次に、分泌タンパク質である CXCL1 の代わりに、サンゴの蛍光タンパク質で細胞質に局在する DsRed2 を用いて同様に解析した。その結果、Ex4 CDS が存在するとタンパク質発現はやはり観察されなかった。この場合、不思議なことに mRNA 量が増加したにも関わらずタンパク質は発現されなかった。また、Ex4 CDS を N 末端に挿入してもタンパク質発現は観察されなかった。一方、終止コドン後の非翻訳領域に Ex4 CDS を挿入すると、タンパク質は発現された(図 2B)。

以上の結果より、Ex4 CDS 配列を結合させるとそれ自身のタンパク質発現が抑制されることが明らかになった。

#### (2) タンパク質発現抑制機構

翻訳の段階でリボソームが mRNA に結合

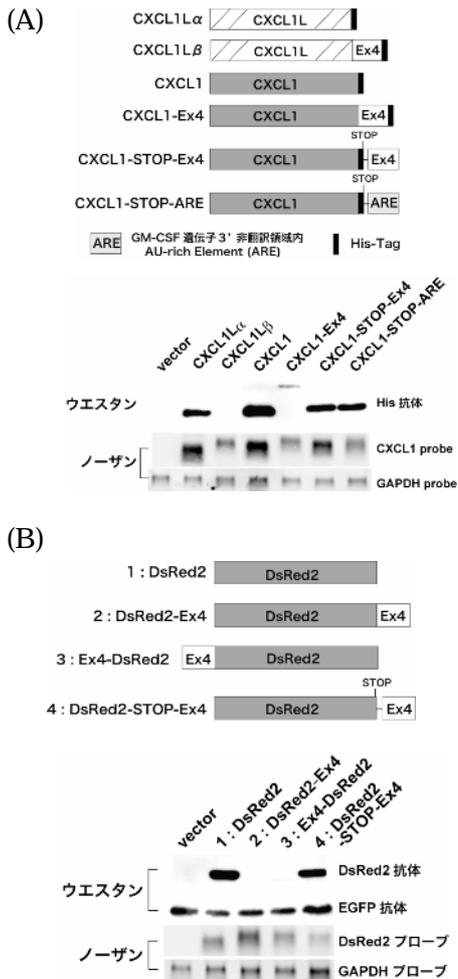


図 2 Ex4 CDS の自分自身のタンパク質発現抑制  
 CXCL1-Ex4 (A), 蛍光タンパク質 DsRed2-Ex4 (B) コンストラクトを用いた解析

する際に必要な 5' Cap 構造がこの抑制に関わっているかを調べるために、内部リボソーム導入部位である IRES をクラゲの蛍光タンパク質である EGFP と DsRed2 の間に挿入したベクター、およびそれに Ex4 CDS 配列を結合させたものを作製し解析した。その結果、タンパク質発現抑制に 5' Cap 構造は関与しないこと、また Ex4 CDS 配列が結合したそれ自身のタンパク質発現のみを抑制することが明らかになった(図 3A)。

さらに、翻訳開始以前あるいは以降のどのステップで抑制されているかを特定するために、タンパク質合成中にリボソームをある一定の割合で mRNA から離脱させる 2A 配列を EGFP と DsRed2 の間に挿入したベクター、それに Ex4 CDS 配列を結合させたものを作成し、それぞれのタンパク質発現量を調べた。その結果、Ex4 CDS の存在により翻訳開始以降で抑制が起こっていることが明らか

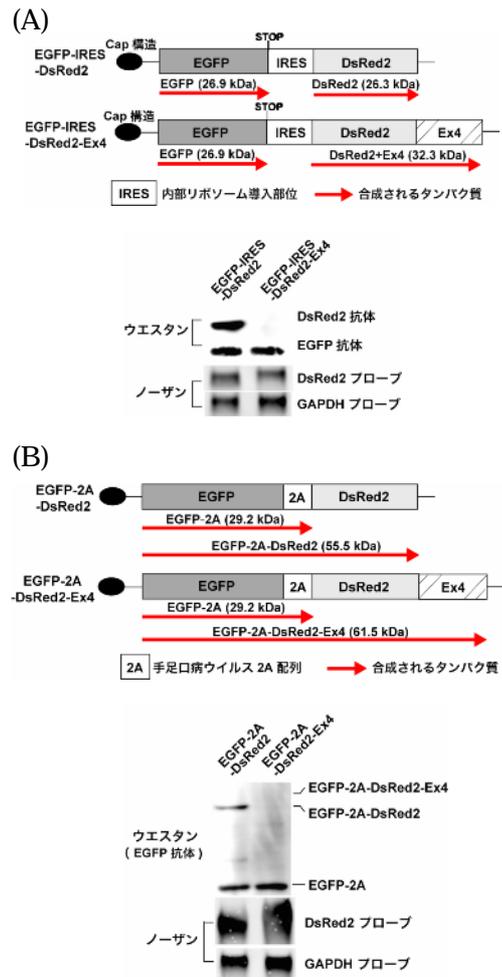


図 3 Ex4 CDS によるタンパク質発現抑制機構  
 (A) 5' Cap 構造の関与, (B) 翻訳開始以降のステップでの抑制

なった(図 3B)。

### (3) タンパク質発現抑制に関するアミノ酸の同定

Ex4 CDS の C 端側から数アミノ酸ずつ欠失させた変異体を作製し、タンパク質発現量を解析した。その結果、C 末端部分の 5 アミノ酸残基の欠失でタンパク質が少し発現し、さらに 6 アミノ酸残基を欠失させると発現量はかなり回復した。また mRNA 量は CXCL1 に Ex4 CDS を挿入するとやはり減少したが、C 末端側からの欠失アミノ酸残基数が多くなるに従い、少しずつ回復するという不思議な結果が得られた。以上から、Ex4 CDS の C 端側から 11 アミノ酸残基が重要な抑制効果をもつことが示唆された(図 4A)。

Ex4 の様々な位置に終止コドンを入れたものについて、タンパク質発現量を解析した。その結果、Ex4 CDS の 124 番から 133 番ま

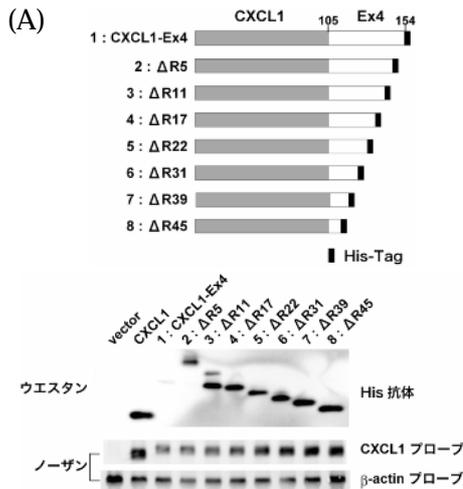


図4 Ex4 CDS 内の抑制領域の同定  
 (A) C 末端側欠失変異体を用いた解析,  
 (B) Stop コドン挿入配列を用いた解析

での領域と144番からC末端までの領域が抑制に重要であると考えられた。また, DsRed2 に Ex4 CDS を結合させると DsRed2 の mRNA 量は図2Bと同様に増加したが, 終止コドンを配列の途中に挿入すると減少し, その挿入位置がC末端側になるほど mRNA 量は増加した(図4B)。

これらの結果より, Ex4 CDS の中にはタンパク質発現抑制に重要な配列が少なくとも2ヶ所存在することが明らかになった。

次に, これらの抑制に重要であると考えられた2ヶ所のうち, 今回は144番から154番までのそれぞれのアミノ酸残基を部位特異的変異導入法によりアラニンに置換し, どのアミノ酸が抑制に重要であるかを解析した。その結果, Val149変異体とPhe150変異体でタンパク質発現量の回復が見られたので, 特にこれら2つのアミノ酸残基がタンパク質発現抑制に重要であることが示唆さ

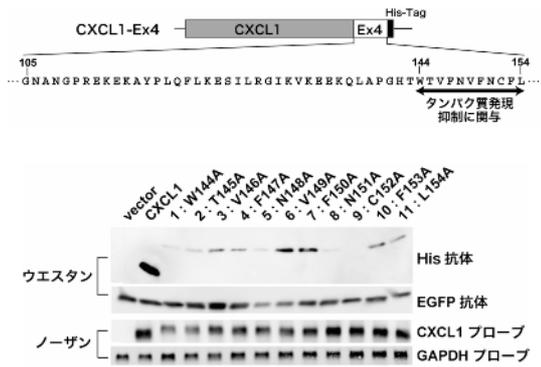


図5 部位特異的変異体を用いた解析

れた(図5)。

#### (4) 考察

以上の結果から, カニクイザルの CXCL1L は Ex4 CDS が翻訳されることでタンパク質発現が抑制されることが明らかになった。また, Ex4 CDS の C 末端領域が抑制に特に重要であると考えられた。よく似た例として, 人工的に停止コドンが除かれた nonSTOP mRNA が報告されている。この場合, ポリ(A)鎖まで翻訳されてしまうため, 合成中のポリ(A)鎖に由来するポリリジン配列が原因で翻訳が停止すると考えられている。これとは異なって CXCL1L の場合, Ex4 CDS の 124 番から 133 番までの領域にリジンのような塩基性残基は多数含まれていない。また C 端側領域の重要な 11 アミノ酸残基にも塩基性残基が含まれていないが, その領域が翻訳されることにより翻訳が停止すると考えられる。ここで合成された Ex4 CDS 領域を持つ CXCL1L タンパク質が, 異常タンパク質としてプロテアソーム分解系で分解されている可能性も考えられるが, プロテアソーム阻害剤を用いた予備発現実験では阻害剤の影響が見られなかったことから, 合成されたタンパク質が急速に分解されるために検出できないという可能性は低いと考えられる。

遺伝子進化の観点から捉えると, CXCL1L のタンパク質発現が抑制されることの結果として, ヒトでは進化の過程で偽遺伝子としてのみ存続するように変化した可能性が考えられる(図6A)。同様にカニクイザルでも, 今後進化の過程で大きな領域の欠失により偽遺伝子になる可能性も考えられる(図6B)。一方, CXCL 遺伝子クラスタには, エクソン数が4つのものだけでなく3つからなる機能遺伝子が存在することから, CXCL1L 遺伝子も3つのエクソンからなる種特異的なケモカイン遺伝子として存続し続けるのかもしれない(図6B,C)。また, CXCL1L 遺伝子

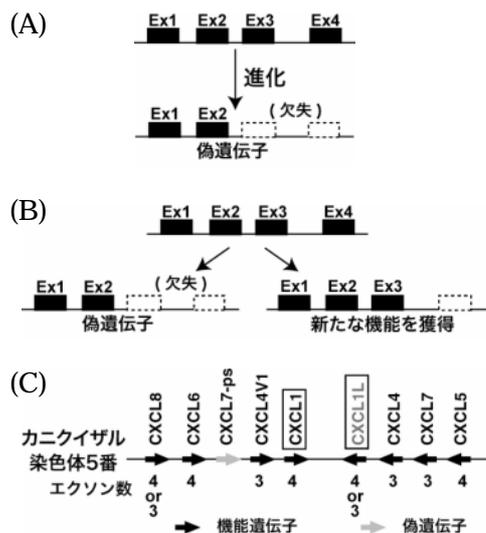


図 6 ヒトおよびカニクイザルでの CXCL1L の進化  
 (A) ヒトおよび (B) カニクイザル (推測) での進化, (C) カニクイザル・ケモカイン遺伝子のエクソン数

の Ex4 CDS の機能を詳細に解析することによって、翻訳阻害が遺伝子進化に及ぼす影響や役割について解明できるかもしれない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- ・ Nomiyama H, Yoshie O. CCR9 (chemokine (C-C motif) receptor 9). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol (electronic). 査読有 March 2009
- ・ Nomiyama H, Hieshima K, Osada N, Kato-Unoki Y, Otsuka-Ono K, Takegawa S, Izawa T, Yoshizawa A, Kikuchi Y, Tanase S, Miura R, Kusuda J, Nakao M, Yoshie O. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. BMC Genomics (electronic). 査読有 2008 9, 222

[学会発表](計 2 件)

- ・ 野見山尚之, 長田直樹, 楠田潤, 義江修. 系統特異的重複および欠失によるケモカイン遺伝子ファミリーの急速な進化. 日本分子生物学会 H20.12.9.

兵庫県神戸市 神戸ポートピアホテル  
 野見山尚之, 長田直樹, 義江修, 楠田潤,  
 マカク属特異的な新規ケモカイン遺伝子 CXCL1L. 日本分子生物学会  
 H19.12.11. 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

[その他]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野見山 尚之 (NOMIYAMA HISAYUKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・講師

研究者番号: 00156225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

瀬戸山 千秋 (SETOYAMA CHIAKI) (平成 19 年度は分担者)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号: 60040250

長田 直樹 (OSADA NAOKI) (平成 19 年度は分担者)

独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部・研究員

研究者番号: 70416270