

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570275

研究課題名(和文)細胞内品質管理機構とケモカインCXCL1L遺伝子の進化

研究課題名(英文)Cellular protein quality control mechanism and the evolution of chemokine CXCL1L gene

研究代表者

野見山 尚之(Nomiyama, Hisayuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：00156225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルには重複で形成されたケモカイン遺伝子CXCL1とCXCL1Lが存在するが、ヒトなどの他のほ乳類ではCXCL1しか持たず、CXCL1Lは偽遺伝子となっている。しかし、カニクイザルのCXCL1LはmRNAには転写されるが、タンパク質はほとんど合成されない。そこでこのタンパク質発現抑制機構を解明するために、細胞内で合成されたタンパク質の品質管理機構が関与している可能性を調べた。その結果、CXCL1 mRNAと比べてCXCL1L mRNAには結合しているリボソーム数が少ないことが分かったが、品質管理機構は関与していないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cynomolgus monkeys have chemokine genes CXCL1 and CXCL1L generated recently by gene duplication, whereas other mammals such as humans have only CXCL1, and the CXCL1L is inactivated in those species. However, the CXCL1L of cynomolgus monkeys is transcribed but the mRNA is scarcely translated into a secreted protein. To elucidate the mechanism of the suppression of the CXCL1L protein expression in cynomolgus monkeys, we therefore investigated the possibility of an involvement of cellular protein quality control mechanism in the suppression of the protein expression. Although we found that the number of ribosomes bound to the CXCL1L mRNA is reduced compared to the CXCL1 mRNA, the results show that the protein quality control mechanism is not involved in the suppression of protein expression.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ケモカイン 遺伝子進化 アカゲザル タンパク質発現 翻訳 タンパク質発現抑制

## 1. 研究開始当初の背景

ケモカインは分泌型サイトカインの一群で、生体における白血球細胞の組織内移動や局在を制御する。ヒトやマウスはそれぞれ 44 および 38 個以上のケモカイン遺伝子を持ち、しかもオーソログ関係が曖昧な遺伝子が存在することから、ケモカインは進化の早い生体防御に關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と考えられる。

われわれは以前にカニクイザル EST から、ケモカイン CXCL1 とアミノ酸レベルで約 80% 相同の新規遺伝子 CXCL1-like (CXCL1L) を見出した。この CXCL1L 遺伝子は、霊長類でのみ CXCL1 遺伝子の重複により形成されている。ヒト科では CXCL1L 遺伝子は第 3 および第 4 最終エクソンの欠失、オランウータン科では第 3 エクソン内のナンセンス変異により偽遺伝子となっているが、カニクイザルが属するオナガザル科では、構造的には機能遺伝子として存在している。

われわれは、このカニクイザル特異的 CXCL1L の機能を調べるために、カイコを用いてタンパク質産生を試みた。しかし、CXCL1 は発現されるものの、CXCL1L はほとんど発現されなかった。同様にヒト細胞株 HEK293 を用いて発現を試みたが、mRNA は検出されるのに対し、培養上清中にはタンパク質はほとんど検出されなかった。そこでその原因の解析を始めた。以下に現在までの結果をまとめると、

(a) CXCL1L 遺伝子は、4 個のエクソンに由来する mRNA (CXCL1L) の他に、カニクイザル脳組織では、選択的スプライシングにより最初の 3 個のエクソンからなる mRNA (CXCL1L) もわずかに発現される。しかし、同じプロモーターを用いてトランスフェクションした培養細胞では、mRNA 量は mRNA 量の約 1/2 であるが、タンパク質は培養上清中にはほとんど検出されない。

(b) 次に、細胞質ゾル中のタンパク質量を

調べてみると、タンパク質はタンパク質に比べ約 1/2 の量が検出された。しかし、培養上清中でタンパク質が特異的に分解されている可能性は否定された。したがって、分泌以前の段階でタンパク質発現が阻害されていると考えられた。

(c) 遺伝子の第 4 最終エクソン翻訳領域 (Ex4, 50 aa) を CXCL1 の C-末に融合すると、mRNA およびタンパク質発現量は mRNA と同様に減少した。

(d) しかし、Ex4 を CXCL1 遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入しても、mRNA やタンパク質発現量の減少は見られなかった。したがって、Ex4 が翻訳されて初めて、mRNA 発現阻害(転写阻害あるいは mRNA 分解) やタンパク質発現阻害(翻訳阻害あるいはタンパク質分解) が起こると考えられた。

(e) ケモカインは分泌タンパク質であるところから、小胞体ストレスの関与を調べた。小胞体ストレス応答が起こると、転写因子 XBP1 が細胞質スプライシングによって活性化を受ける。RT-PCR 法で調べた結果、タンパク質発現により XBP1 が活性化されていた。(f) 次に、阻害剤を用いた実験から、プロテアソームによりタンパク質が分解されることが分かった。

以上などから、Ex4 を含むタンパク質が翻訳されると、おそらくミスフォールディングにより小胞体ストレス応答が誘導され、翻訳抑制やプロテアソームによる分解が引き起こされる可能性が考えられた。しかし、小胞体ストレス以外の品質管理機構も働いている可能性は否定できない。特に、mRNA 量も減少することから、異常な mRNA の翻訳を抑制し、選択的に分解する mRNA 品質管理機構が働いて、翻訳抑制や mRNA 分解が起こるのかもしれない。

its inactivation in hominid. J Interferon Cytokine Res 27:32-37.

## 2. 研究の目的

以上から、本研究では Ex4 による特異なタンパク質発現抑制機構の解析を続けるとともに、遺伝子重複によって形成された遺伝子で、一方の遺伝子が伸長した例をデータベースから選出し、同様に解析する。一般に、偽遺伝子は突然変異の蓄積によって機能を失ったものであると考えられているが、小胞体ストレスなどを介した偽遺伝子化は知られていない。本研究ではこの特異な機構を解析することによって、遺伝子進化における新しい機構を提案したい。

遺伝子重複は進化の重要な動力源であり、重複した遺伝子の一部は新規機能を獲得するが、多くの場合、一方の遺伝子は不活化されるか、ゲノムから除去される。CXCL1-CXCL1L 遺伝子の場合、重複は霊長類進化初期に起きているが、オランウータンでは、ヒトとは異なってナンセンス変異により CXCL1L が偽遺伝子化している。したがって、CXCL1L 遺伝子では、欠失や塩基置換が進化的に最近、それぞれの種で独自に起こったと考えられる。このようにケモカインファミリーは頻繁に重複など遺伝子再編成を起こしている(文献 2)ことから、CXCL1L は今まさに偽遺伝子に変換、あるいは逆に新規機能を獲得しようとしている遺伝子と考えられる。本研究をさらに発展させれば、遺伝子進化の新たな機構が明らかになってくるであろう。

2. Nomiya et al. 2010. The evolution of mammalian chemokine genes. Cytokine Growth Factor Rev 21:253-262.

## 3. 研究の方法

CXCL1L 遺伝子が小胞体ストレスによってタンパク質発現抑制を受けている事をダイレクトに確認するために、siRNA を用いた解析を行う。また タンパク質の翻訳抑制が起

こっている直接的な証拠はないので、ポリソーム解析や特別に構築したベクターや無細胞翻訳系を用いた解析を行う。これらの実験から、小胞体ストレス以外の機構が確かに働いているのかも明らかになると考える。次に、mRNA 発現やタンパク質発現抑制領域を、欠失や置換ミュータントを用いて同定する。また重複した遺伝子で、一方の翻訳領域が伸長した例をデータベースから抽出し、CXCL1L 遺伝子と同様に解析して、遺伝子重複後の一方の遺伝子の偽遺伝子化についてその機構を考察する。

これまでの解析から、小胞体ストレスによる翻訳の抑制以外に、mRNA 品質管理機構とよく似た機構による翻訳抑制や mRNA 分解も働いていると考えられる。この可能性を念頭に解析を行う。

(A) siRNA を用いた小胞体ストレス応答の確認

以前、破骨前駆細胞の膜タンパク質が、多核破骨細胞形成のための細胞融合に関与していることを証明するために、siRNA を調製し実験に使用したが、今回は XBP1 に対する siRNA を購入して用いる。XBP1 は小胞体ストレス応答の一環として細胞質スプライシングによって活性化され、小胞体シャペロン遺伝子群の誘導やタンパク質分解に関与する転写因子として知られる。

(B) Ex4 による他遺伝子の発現抑制の確認

Ex4 はよく似た CXCL1 遺伝子のタンパク質発現を抑制することは確認しているが、全く関係のない遺伝子についてはまだデータを持たない。以前に蛍光タンパク質 DsRed2 の C- 端に Ex4 を結合し、解析したところ、融合タンパクは核に移行してアポトーシスを引き起こした。このような人為的結果を引き起こさないために、今回はルシフェラーゼタンパク質の C-端に Ex4 を結合させたものを作製し、ノーザンやウエスタン解析を行い、蛍光顕微鏡で観察する。

(C) ポリソーム解析を用いた翻訳抑制の確認

以前、CXCL1L と CXCL1 を細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液を調製して、しょ糖密度勾配遠心法により、ポリソーム解析を行った。その結果、mRNA 一分子に結合するリボソーム数に顕著な変化は見られなかった。翻訳領域が短かったためと考えられる。

そこで、ルシフェラーゼの C-端に第 4 エクソンを結合させたコンストラクトを細胞にトランスフェクションし、その細胞から細胞質抽出液を調製し、しょ糖密度勾配遠心法によりポリソーム画分を分離する。それにより、ルシフェラーゼ mRNA やルシフェラーゼ + Ex4 mRNA に結合しているリボソーム数を調べ、翻訳抑制が起こっているのかどうかを明らかにする。

(D) Ex4 による翻訳停止の検証

翻訳抑制の機構として翻訳伸長が途中で停止している可能性を調べるために、まず 2 つの遺伝子(CXCL1 と DsRed2) の間に FMDV ウイルス由来 2A 配列を挿入する。2A 配列が存在するとリボソーム上で新生ポリペプチド鎖の一部(CXCL1 と 2A の融合配列) が一定の割合で tRNA から解離することを利用して、CXCL1-2A-DsRed2 と CXCL1-2A-DsRed2-Ex4 mRNA の翻訳効率をウエスタンを用いて比較する。

この場合、C- 末の Ex4 の有無に関わらず、翻訳が同効率で開始されれば、遊離した CXCL1-2A ペプチド量に変化は見られないはずである。しかし、Ex4 翻訳中に翻訳が停止すれば、CXCL1-2A-DsRed2-Ex4 融合タンパク質のレベルは、Ex4 が融合していないタンパク質のレベルより極端に低下すると予想される。

(E) 無細胞翻訳系を用いた解析

Cap 構造および poly(A) 鎖をもつ タンパク質および タンパク質 mRNA を調製し、ウサギ網状赤血球ライセートを用いてタン

パク質を *in vitro* で合成する。この系ではプロテアソームによる分解の影響は排除されると考えられるので、Ex4 による翻訳抑制を *in vitro* の系で確認する。

(F) 翻訳および転写抑制に関わる Ex4 配列中の領域の同定

Ex4 の C-端や N-端からの欠失ミュータントを作成し、ウエスタンやノーザンにより翻訳および転写抑制に関わる領域を同定する。同定された領域についてはさらに部位特異的変異誘発法を用いて阻害活性に重要な残基を同定する。

(G) アカゲザルの Ex4 との比較

アカゲザルの Ex4 配列はカニクイザルの Ex4 配列と 1 アミノ酸残基異なるだけである。そこで、カニクイザル Ex4 配列を部位特異的変異誘発法を用いてアカゲザルと同じ配列にし、比較する。

#### 4. 研究成果

カニクイザル特異的ケモカイン遺伝子 CXCL1L は mRNA は存在してもタンパク質発現は抑制される。その機構を明らかにすることを目的に、23 年度は以下の実験を行った。

(A) siRNA を用いた小胞体ストレス応答の確認

小胞体ストレスに關与する転写因子 XBP1 に対する siRNA を用いて解析した結果、XBP1 mRNA は分解されたが、細胞質中の CXCL1L タンパク質は増加せず、また培養上清中にタンパク質はほとんど検出されなかった。したがって、CXCL1L タンパク質発現抑制への小胞体ストレスの關与は否定された。

(B) Ex4 による他遺伝子の発現抑制の確認  
ケモカインとは関係のない遺伝子、即ちルシフェラーゼの C-端に Ex4 を結合し、その発現を調べた。その結果、ルシフェラーゼ・タンパク質発現の抑制をウエスタンによって確認した。

(C) ポリソーム解析を用いた翻訳抑制の

確認

ルシフェラーゼの C-端に第 4 エクソンを結合させたコンストラクトを細胞にトランスフェクションし、ポリソーム解析を行った。その結果、明らかに mRNA 一分子当たりのリボソーム結合数の減少が観察された。

(D) Ex4 による翻訳停止の検証

CXCL1-2A-DsRed2 と CXCL1-2A-DsRed2-Ex4 を作製したが、DsRed2 との融合タンパク質は核に移行してアポトーシスを引き起こしたので、結論を得ることは出来なかった。

(E) 無細胞翻訳系を用いた解析

ウサギ網状赤血球ライセートを用いて、in vitro でタンパク合成を行い、ウエスタンで解析した。その結果、CXCL1 単独に比べ、第 4 エクソンを結合させた CXCL1 はタンパク質合成量が減少していた。よってタンパク質発現抑制を in vitro で再現することができ、また翻訳段階で抑制されていることが判明した。

(F) 翻訳および転写抑制に関わる Ex4 配列中の領域の同定

以前 CXCL1L を用いた欠失ミュータントを作成し、ウエスタンを用いて解析している。ルシフェラーゼ遺伝子を用いたポリソーム解析がうまくいったので、第 4 エクソン配列のどの領域が抑制しているのかをポリソーム解析を用いて調べ、ウエスタン解析結果と比較するために、様々な欠失ミュータントを作成した。

その CXCL1L 遺伝子第 4 エクソンの欠失ミュータント 3 種類を用いてポリソーム解析を行ったが、明確な結果は得られなかった。これはウエストンの結果とも一致し、欠失ミュータントでは第 4 エクソンのどの領域がタンパク質発現抑制に必須であるか同定できなかった。原因は今のところ不明である。

(G) アカゲザルの Ex4 との比較

アカゲザルの CXCL1L 遺伝子の第 4 エクソン配列と同じ配列になるようにカニクイザ

ルの CXCL1L 遺伝子の第 4 エクソン配列を改変し、トランスフェクション後ウエスタンで解析した。その結果、カニクイザルの第 4 エクソンも翻訳抑制作用を持っていた。

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 12 件)

1. Takano T, Li YJ, Kukita A, Yamaza T, Ayukawa Y, Moriyama K, Uehara N, Nomiyama H, Koyano K and Kukita T (2014) Mesenchymal stem cells markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. *Lab Invest* 94:286-296. 査読有
2. Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O and Zlotnik A (2014) International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol Rev* 66:1-79. 査読有
3. Nomiyama H, Osada N and Yoshie O (2013) Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes Cells* 18:1-16. 査読有
4. Shibata K, Nomiyama H, Yoshie O and Tanase S (2013) Genome diversification mechanism of rodent and lagomorpha chemokine genes. *BioMed research international* 2013:856265. 査読有

5. Takahashi A, Kukita A, Li YJ, Zhang JQ, Nomiyama H, Yamaza T, Ayukawa Y, Koyano K and Kukita T (2013) Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. J Cell Biochem 114:1238-1247. 査読有
6. 野見山尚之, 棚瀬純男 . (2012) CXCL5 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 287-291. 査読無
7. 野見山尚之, 瀬戸山千秋 . (2012) CXCL15 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 336-339. 査読無
8. 野見山尚之, 瀬戸山千秋 . (2012) CCL12 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 406-410. 査読無
9. 野見山尚之, 棚瀬純男 . (2012) CCL14 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 414-419. 査読無
10. 野見山尚之, 棚瀬純男 . (2012) CCL15 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 420-425. 査読無
11. 野見山尚之, 棚瀬純男 . (2012) CCL16 . 臨床免疫・アレルギー科 , 57 ( Suppl. 21 ) 426-431. 査読無
12. Nomiyama H, Osada N and Yoshie O (2011) A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. Dev Comp Immunol 35:705-715. 査読有

[学会発表](計 2件)

1. 柴田佳菜子、野見山尚之、棚瀬純男( Shibata K, Nomiyama H and Yoshi O) . 齧歯類および重歯類ケモカインのゲノム多様化機構 ( Diversification Mechanism of Rodent and Lagomorpha Chemokine Genes ) 日本分子生物学会 平成24年12月13日 福岡市 福岡国際会議場
2. 野見山尚之、長田直樹、義江修( Nomiyama

H, Osada N and Yoshie O) . 脊椎動物ケモカインシステムの進化における変遷 ( Evolutionary history of the vertebrate chemokine system ) 日本分子生物学会 平成23年12月13日 横浜市 横浜国際会議場

[図書](計 0件)

[産業財産権] 出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

野見山尚之 ( NOMIYAMA, Hisayuki )

所属部局名：大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：00156225

##### (2)研究分担者 無

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者 無

( )

研究者番号：