

ガスダーミンファミリーをモデルとしたゲノム進化・遺伝子機能多様性の解析

●田村 勝

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 系統生物研究センター

<研究の目的と進め方>

全ゲノム重複、遺伝子縦列重複とその後の重複遺伝子の機能分化が生物進化にどのように寄与したかについては、これまで強い関心を集めながらもその実験的検証はあまりなされていない。Gasdermin (*Gsdm*) ファミリーは、最近我々が見出した新規遺伝子群であり、ファミリーメンバーの *Gsdma* (*Gsdma1* ~ *Gsdma3*) と *Gsdmc* (*Gsdmc1* ~ *Gsdmc4*) は、進化上ラット・マウス分岐後に、マウスにおいてのみそれぞれ別染色体上で縦列重複し、クラスターを形成している。これらマウスクラスター遺伝子群の発現は、ラットでの単一遺伝子の発現領域全体を補完する様に、クラスター内各遺伝子が組織特異的に細分化していると共に、マウス亜種間で各クラスター遺伝子数が異なる事を我々は見出した。以上のことから、*Gsdm* ファミリーは、マウスにおいて遺伝子縦列重複後の遺伝子機能・発現の多様化がまさに進行中のゲノム領域であると考えられる。

本研究は、*Gsdm* ファミリーをモデルとして遺伝子縦列重複後の遺伝子機能・発現の多様化が如何に成立するのかを解明することを目的とする。具体的には、マウス亜種由来系統とラットを対象とした *Gsdm* ファミリーの詳細な遺伝子発現解析、遺伝子発現の多様化の基盤となるシス因子の比較ゲノム解析、さらに transgenic mouse によるその検証を行なう。また、縦列重複後の遺伝子機能分化を遺伝子欠損マウスと点突然変異マウスの表現型解析により明らかにする。

<2008 年度の研究の当初計画>

1. *Gsdm* ファミリー遺伝子ゲノム解析

国立遺伝学研究所において樹立・維持されている野生マウス系統、*M. m. domesticus* 由来系統 BFM、*M. m. musculus* 由来系統 BLG2、*M. m. molossinus* 由来系統 MSM、*M. m. castaneus* 由来系統 HMI を用いて、*Gsdma* クラスター、並びに *Gsdmc* クラスター全遺伝子の cDNA 単離、詳細な発現パターンの解析、ゲノム構造の決定を行う。

2. *Gsdm* ファミリー遺伝子発現制御の解析

Gsdm ファミリー遺伝子のマウス亜種間における発現多様性の解析は、*in silico* 解析を軸に行なう。遺伝子解析予定の *M. m. molossinus* 由来系統である MSM は、特定領域「ゲノム」支援班によるゲノム配列情報解析が修了し、公開されている。この情報を元に実験用マウス系統 C57BL/6 (主に *M. m. domesticus* 由来)、*Rattus norvegicus*、ヒトゲノム情報などのゲノム配列比較により、進化的に保存されている、もしくは発現パターンの変化と連動して特異的に失ったエレメントの検出を行う。この検出を行なった後、順次このエレメントにレポーター遺伝子を連結したベクターを用いたトランスジェニックマウスを作製して検証を行う。

3. *Gsdm* ファミリー遺伝子機能の解析

Gsdm ファミリー遺伝子の機能解析を、上皮形態異常突然変異マウス *Gsdma3^{rim3}* の解析、並びに遺伝子欠損マウス作

製とその表現型解析により行う。

<2008 年度の成果>

1. *Gsdm* ファミリー遺伝子ゲノム解析

4 種類の野生由来マウス系統、BFM 系統 (*M. m. domesticus*)、BLG2 系統 (*M. m. musculus*)、MSM 系統 (*M. m. molossinus*)、HMI 系統 (*M. m. castaneus*) の *Gsdm* family 遺伝子数を Southern 法により詳細に解析した。その結果を表 1 に示す。

表 1：各系統における *Gsdma* 及び *Gsdmc* クラスター遺伝子数

	BFM	BLG2	MSM	HMI
<i>Gsdma</i>	3	3	3	5
<i>Gsdmc</i>	2	4	5	2

これらの cDNA の単離は概ね修了したが、一部未同定遺伝子が残った。またゲノム解析の結果、各 *Gsdmc* クラスター遺伝子間に head to head の形で偽遺伝子化した塩基配列を見出し、*Gsdmc* 遺伝子座は想像以上に縦列重複を繰り返していると考えられた。

2. *Gsdm* ファミリー遺伝子発現制御の解析

1) *Gsdma*、*Gsdmc* クラスター遺伝子の発現

野生由来マウス系統、BFM 系統、BLG2 系統、MSM 系統、HMI 系統を対象にして、*Gsdm* ファミリー遺伝子の発現を Northern 法により詳細に行なった。その結果、各系統においてクラスター遺伝子数は異なるが、各クラスター遺伝子の統合した発現領域は同一であった。現在、各クラスター内の個別遺伝子発現ドメインの解析を TaqMan 法などにより行なっている。

2) *Gsdm* ファミリー遺伝子発現制御の解析

・*Gsdma* クラスター遺伝子の発現調節領域

データベース解析により、ヒト、ラット、マウスにおいて保存されている *Gsdma* クラスター遺伝子の発現調節領域と思われる配列を見出した。ヒトでは、その保存配列が 1 kb 以内に集中しているが、マウス、ラットにおいては、クラスター遺伝子間で違いはあるが、概ね数キロベースの間に散在していた。これらの情報を基に、ヒト胃における *GsdmA* の発現に必要な調節領域は、エキソン 1 上流 500b である事を細胞培養系により確認した。マウスにおいては、トランスジェニックマウスの解析から、少なくとも数キロベースが発現制御に必要であることが判明した。この結果は、データベース解析で得られた結果と一致しており、現在更なる詳細な解析が、トランスジェニックマウスをベースとして進行している。

・*Gsdmc* クラスター遺伝子の発現調節領域

Gsdmc クラスター遺伝子について、各種ゲノム配列データベースを用いて解析した。しかし、我々の用いている *Gsdmc1* cDNA の 5' 端は、NCBI マウスゲノムデータベースでは、予想外にもマウス *Gsdmc1* 最終エキソンの遥か 100 キロベース下流に存在していた。これは、*Gsdmc* クラスターが重複遺伝子群であり、塩基配列アセンブリーエラーの為であると考えられる。現在 BAC ベースによる *Gsdmc* クラスター遺伝子座塩基配

列決定を検討している。

3. *Gsdm* ファミリー遺伝子の機能解析

Gsdm ファミリー遺伝子の機能解析として、*Gsdma1*、*Gsdma2*、*Gsdmd* 遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型解析を行なった。

・*Gsdmd* 欠損マウス

Gsdmd 遺伝子は、主に小腸から大腸の上皮、繊毛領域に発現する。当初 *Gsdmd* 遺伝子欠損マウスは腸上皮形成不全となり、生後直後に死亡すると予想されたので、コンディショナル遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型解析を行なった。その結果、*Gsdmd* 欠損マウスは、胚発生期から成体に至るまで致死となる事はなく、細胞組織学的にも正常な上皮が形成されていた。更に細胞増殖、細胞分化、細胞死を免疫組織学的手法により解析した結果、これらの能力においてもコントロール群と比較して違いは見出されなかった。以上の結果より *Gsdmd* は、腸上皮の発生・分化、形態形成には関与しない事が明らかとなった。これらの成果を学術論文として発表した。一方、*Gsdmd* 欠損マウスの腸上皮にダメージを与える事により、細胞増殖など幾つかのパラメーターに異常が観察される事を見出した。よって *Gsdmd* の機能は、腸上皮の発生・分化、形態形成に関与するものではないが、おそらくは恒常性の維持や損傷後の回復に関与すると考えられた。

・*Gsdma2* 欠損マウス

Gsdma2 は、胃腺上皮特異的に発現が見られる遺伝子である。*Gsdma2* 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行なった結果、*Gsdmd* 欠損マウスと同様に胎生期、成体期共に致死になる事はなく、また胃腺上皮も組織学的に正常に形成されていた。従って *Gsdma2* の機能は胃腺上皮形成には直接関与しないと考えられる。しかしながら *Gsdma2* 遺伝子欠損マウスの胃腺上皮には、高頻度かつ高度な血管浸潤が見られ、更には胃壁からの出血が観察される個体が存在していた。現在、更に詳細な表現型解析が進行中である。

・*Gsdma1* 欠損マウス

Gsdma1 は、*in situ* hybridization、並びに特異的プライマーを用いた RT-PCR の結果から、皮膚、食道、前胃領域の扁平上皮に発現すると考えられてきた。しかし、同ファミリー遺伝子の *Gsdma3* と非常に相関性が高い為に、皮膚における発現が扁平上皮特異的であるか、もしくは毛包領域にも発現しているかについて疑問が残っていた。*Gsdma1* 欠損マウスを作製するにあたり、この疑問についても回答を得る事を目的として、*Gsdma1* 遺伝子座に LacZ 遺伝子を挿入した Knock in マウスを作製した。この knock-in ヘテロマウスを用いて *Gsdma1* 遺伝子の発現を調べた結果、当該遺伝子は皮膚扁平上皮領域のみならず、毛包にも発現が見られ、即ち毛包においては *Gsdma1* と *Gsdma3* の両遺伝子が発現することが明らかとなった。次に *Gsdma1* 遺伝子座 LacZ knock-in ホモマウスを作製し、その表現型解析を行なった。その結果、当該遺伝子改変マウスにおいては、皮膚から前胃にかけての扁平上皮、並びに毛包上皮は、組織学上正常に形成されることが明らかとなり、*Gsdma1* も *Gsdma2*、*Gsdmd* 同様、上皮発生、分化機構には直接関与しないと考えられた。しかしながら、生後 3 ヶ月齢の遺伝子欠損マウスの食道領域において、分裂細胞数の有意な低下が観察された。現在、更なる詳細な表現型解析を行なっている。

<国内外での成果の位置づけ>

マウス *Gsdm* ファミリー遺伝子の機能解析として、これまでに英国、独国のグループが我々の研究グループと同様に *Gsdma3* 突然変異マウスの表現型解析を報告しているが、*Gsdma3* 以外のマウス変異体は、我々が報告した *Gsdmd* 欠損マウスが初めてである。また、遺伝子縦列重複、その後の遺伝子進化、遺伝子発現の細分化と遺伝子機能解析を統合した解析はこれまでに全く報告されておらず、この点に本研究の独自性と優位性がある。一方で、最近ヒトにおいて *Gsdm* ファミリーの機能を類推する上で興味深い報告がなされた。ヒト *Gsdm* ファミリーは、8 番染色体 (*GSDMC*、*GSDMD*)、17 番染色体 (*GSDMA*、*GSDMB*) 上の極めて癌発生と関連が深い染色体領域に存在する。国内や韓国、欧州など複数の研究グループからヒト *GSDM* ファミリーと癌化における遺伝子発現の変動、個々の遺伝子の癌抑制能の有無などが相次いで報告された。未だ *GSDM* ファミリーと癌化の決定的な証拠は得られていないが、癌化プロセスと *Gsdm* ファミリーの関係は、その遺伝子機能を明らかにする上で、大きな手掛かりになるものと予想される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- ・*Gsdma* クラスター遺伝子の内、*Gsdma1*、*Gsdma2* 遺伝子に関しては、比較的容易に遺伝子欠損マウスを作成する事が出来たが、既に、自然発症突然変異体を見出し、その表現型解析も最も進んでいる *Gsdma3* の遺伝子欠損マウスの作出に未だ成功していない。これまでに数種類のノックアウトベクターによる作出を試みた結果、幾つかの相同組換え ES 細胞を得る事が出来た。しかし、その出現頻度は非常に低く、またジャームラインを通過するものは無かった。これは遺伝子座に依存するものであると考えられ、現在これまでに使用していた ES 細胞とは別マウス系統の ES 細胞を用いて *Gsdma3* 遺伝子欠損マウスの作製を行なっている。
- ・野生由来マウス系統 *Gsdma*、*Gsdmc* クラスター遺伝子の一部 cDNA が未単離である。これは PCR を基に単離を行っていた為であり、恐らく多型による影響であると考えられる。しかし、部分断片は得られているので、RACE 法などを用いる事により対処出来ると考えている。

<今後の課題>

Gsdma3 遺伝子欠損マウス作出と *Gsdmc* 遺伝子座のゲノム構造の決定・cDNA の単離が急務である。また、ヒトにおいて *Gsdm* ファミリーと癌化の関連について、最近注目されつつあるので、遺伝子機能を明らかにする上で、マウス *Gsdm* ファミリーと癌化の関連についても今後解析を広げる事が必要であると予想される。本研究課題により作出された各種遺伝子改変マウスは、それらの解析を行なう上で強力な解析ツールと成り得ると考えられる。

<成果公表リスト>

論文/プロシーディング (査読付き)

0901151726 (論文)

Fujii T., Tamura M., Tanaka S., Kato Y., Yamamoto H., Mizushima Y. and Shiroishi T.

Gasdermin D (*Gsdmd*) is dispensable for mouse intestinal epithelium development. *Genesis*, 46: 418-423 (2008)

<班員間での共同研究等>

若菜茂晴班員と ENU 変異体をベースとした *Gsdm* ファミリー遺伝子新規変異体のスクリーニングで共同研究を推進している。