

# 比較ゲノム情報に基づくアポトーシス実行因子の普遍性と多様性の解析

●酒巻 和弘

京都大学大学院生命科学研究科

## <研究の目的と進め方>

細胞死（アポトーシス）は、“カスパーゼ”と名付けられた一群のシステイン-プロテアーゼが実行因子として関与している。このうちカスパーゼ8とカスパーゼ10は、“デスレセプター”と称する細胞表層レセプターを介するアポトーシス誘導シグナル伝達に必須な分子である。また不活性型のプロテアーゼドメインをもつcFLIPは、カスパーゼ8とカスパーゼ10に対する抑制因子として知られている。これら3分子をコードする各遺伝子は、脊椎動物に進化する過程で祖先遺伝子の重複によって派生してきたと考えられる。3分子のタンパク質構造は相同であるにもかかわらず、機能は異なっておりヒトでは三者三様の性質を示す。本研究では、3遺伝子のゲノム構造を脊椎動物間で比較することにより、1つの祖先遺伝子から派生した3遺伝子がどのように分子特異的な機能を獲得したのか、系統立てて明らかにすることを目的とする。また、脊椎動物におけるアポトーシスの普遍性と多様性の二面性について、3分子との関連性を探る。

カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIPと新規分子（カスパーゼ18）について、1)各遺伝子のゲノム構造の解析、2)タンパク質の機能解析、3)新規分子カスパーゼ18の生理的役割の解明の3点に焦点を絞り、研究を進める。ゲノム構造については、軟骨魚から哺乳類に至る脊椎動物のゲノム情報を掘り所に比較検討し、どのように各遺伝子が派生し変化したのか、また分子特異的な生理活性を進化のどの時期に獲得したのか調べる。遺伝子産物の機能については、培養細胞等を使って調べることにより、分子間の共通点や相違点を明確にし、複雑化したアポトーシスや生物の多様性との関連を調べる。またカスパーゼ18については、その存在意義について、検証する。

## <2008年度の研究の当初計画>

1. カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIPの各遺伝子の単離、ならびにゲノム構造の解析

軟骨魚のゲノム情報を基に、3つの遺伝子の有無を調べる。存在する遺伝子については、塩基配列・遺伝子座・シンテニーを解析し、硬骨魚を含めた他の脊椎動物と比較検討することにより3遺伝子の分子系統化をはかる。

(1)カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIP遺伝子の単離。ゲノム情報が開示されているヤツメウナギ・サメ・エイを対象に、カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIPの各遺伝子を検索し、存在が確認された遺伝子についてcDNAならびにゲノム遺伝子の単離を試みる。

(2)カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIP遺伝子のゲノム構造の解析。単離した各ゲノム遺伝子について、解読した塩基配列の情報を基に、エクソン-イントロン構造・遺伝子座の特定・シンテニー領域の構成についてゲノムを解析する。

2. 第4のカスパーゼ8類似遺伝子（カスパーゼ18）の系統発生的解析。

これまでの研究により、カスパーゼ10とcFLIPの他に、カスパーゼ8類似遺伝子としてカスパーゼ18遺伝子が、両生類と鳥類に存在することを見出している。本年度は、カスパーゼ18遺伝子産物の生理作用を調べるため、ヒト培養細胞に発現させることにより、この分子のアポトーシス誘導能を調べる。

## <2008年度の成果>

1. カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIPの各遺伝子の単離、ならびにゲノム構造の解析。

### (1)カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIP遺伝子の単離。

軟骨魚のエイからカスパーゼ8 cDNAを取得し、その全配列を決定した。塩基配列から予測されたアミノ酸配列についてヒトとメダカのカスパーゼ8と比較し、それぞれ38%と33%の相同性を示した。エイのカスパーゼ8は、2つのDEDドメインとプロテアーゼドメインから成り立っており、他種のカスパーゼ8と同様なタンパク質構造を有していた。

### (2)カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIP遺伝子のゲノム構造の解析。

新たに単離したゼブラフィッシュのcFLIP cDNAの塩基配列と、ゼブラフィッシュのゲノムデータベースより見出したcFLIP遺伝子の配列を比較することにより、エクソン-イントロン構造を決定した。さらに、ヒトとニワトリのcFLIP遺伝子におけるエクソン-イントロン構造との相同性を調べたところ、魚類・鳥類・哺乳類の3種間において保存されていることが明らかとなった。またヒトのカスパーゼ8とカスパーゼ10両遺伝子のエクソン-イントロン構造とも類似していることが判明した。カスパーゼ18遺伝子を含めた4遺伝子は、エクソン-イントロンに関するゲノム構造が脊椎動物間で保存されていることが示唆された。

2. 第4のカスパーゼ8類似遺伝子（カスパーゼ18）の系統発生的解析、並びに遺伝子産物の生理作用の解析。

ゲノムデータベースを検索することにより、カスパーゼ18遺伝子が哺乳類のカモノハシとオポッサムのゲノムに存在することを新たに認めた。カスパーゼ18遺伝子は、真獣類のゲノムデータベース中には見出せないことから、この遺伝子は真獣類に進化後ゲノムより欠失したことが推察された。

またニワトリのカスパーゼ18のcDNAをヒト培養細胞に発現させて遺伝子産物の生理機能を調べたところ、ヒトのカスパーゼ8と同等にアポトーシス誘導能を有していることが判明した。

以上のことから、カスパーゼ18遺伝子は、祖先型のカスパー

ゼ8遺伝子から遺伝子重複により派生した遺伝子であり、その遺伝子産物はカスパーゼ8やカスパーゼ10と同じくアポトーシス誘導能を持ったプロテアーゼとして、両生類から有袋類に至る生物において進化的に存在していることが示唆された。何故、真獣類はカスパーゼ18を必要としないのか、その手掛かりを得るために次年度の課題として取り組みたい。

#### <成果公表リスト>

なし

#### 3. カスパーゼ8遺伝子変異メダカの系統樹立.

硬骨魚のメダカのゲノムには、カスパーゼ8・カスパーゼ10・cFLIPの各遺伝子とカスパーゼ8類似遺伝子(CARD-カスパーゼ8)が存在することが、これまでの研究により判明している。1つの祖先遺伝子から派生したこれら遺伝子がどのように分子特異的な機能を獲得したのか、系統立てて明らかにするためには、魚類を調べることが重要であると考えられた。そのため、次年度の計画研究として予定していたカスパーゼ8遺伝子変異メダカの作製を今年度より開始し、魚類における3つの遺伝子産物の機能を明らかにすることを試みた。

今年度は、ゲノムライブラリーからカスパーゼ8遺伝子上に変異を起こした個体を tilling 法により同定することを試み、これまでに遺伝子変異を起こした幾つかのゲノムクローンを見つけた。その中に、終止コドンに置き換わったクローンが存在することを認めた。この変異遺伝子が読まれると、カスパーゼ8はプロテアーゼドメインを欠いた変異タンパク質として生成されることになり、酵素活性を失うことになる。現在、この遺伝子変異を有する個体より採取した精子を使って、変異メダカを作製中である。今後は、系統化を計り、表現型について解析を進めたい。

#### <国内外での成果の位置づけ>

カスパーゼ8・カスパーゼ10・カスパーゼ18・cFLIPの4遺伝子について、脊索動物のホヤと脊椎動物の硬骨魚から哺乳類のゲノム構造を解析することにより、4遺伝子が脊索動物から脊椎動物に進化する過程で遺伝子重複により派生したことを突き止めた。またカスパーゼ18遺伝子は、真獣類に進化後、カスパーゼ10遺伝子はげっ歯類に分かれた後に欠失したことを認めた。これらの発見について科学雑誌(J Fish Biol)に投稿し、現在印刷段階である。同様な見地にたった研究がオーストリアのグループから報告された(Eckhart et al, Mol Biol Evol, 2008)。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

4遺伝子(カスパーゼ8・カスパーゼ10・カスパーゼ18・cFLIP)がどのような順序で進化的に派生したのか推察するためには、軟骨魚の4遺伝子に関する情報が欠かせないが、現時点ではその情報が不十分である。今年度は、エイのカスパーゼ8遺伝子を同定したのみであり、その他の遺伝子の有無については不確かな状況である。遺伝子単離のために、ゲノムデータベースの情報を掘り所にしていたが、軟骨魚に関する情報が不完全であったために進展がみられなかった。今後は、試料を入手し独自にゲノムデータを構築することを考慮する必要がある。

#### <今後の課題>

- ・ 遺伝子重複による4遺伝子の出現過程を解明する。
- ・ 真獣類においてカスパーゼ18遺伝子が欠失した要因を探る。
- ・ カスパーゼ8遺伝子変異メダカの表現型を解析する。