

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580209

研究課題名（和文）

魚類コラーゲンの架橋形成機構の解明－リジン修飾酵素の構造と機能の特性

研究課題名（英文）

Studies on mechanisms for the crosslinking formation in fish collagen
- Structural and functional characteristics of lysine-modification enzymes

研究代表者

横山 芳博 (YOKOYAMA YOSHIHIRO)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：90291814

研究成果の概要：これまで魚類コラーゲンの架橋に関する研究は少なく、その架橋形成機構は不明である。リジルオキシダーゼ(LOX)およびその関連タンパク質[リジルオキシターゼ様タンパク質：LOX-like(LOXL)、LOXL2、LOXL3 および LOXL4]は、コラーゲンのリジンおよびヒドロキシリジン残基の酸化的脱アミノ反応を触媒することにより、コラーゲン分子間架橋形成の初発反応を担うと考えられている。本研究では、トラフグを用いて、9つのLOXファミリー分子が存在することおよびそれらの一次構造を明らかにするとともに、それらの発現・機能特性を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：水産化学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：トラフグ・コラーゲン・コラーゲン修飾酵素・LOX・LOXL

1. 研究開始当初の背景

一般的に、魚肉の硬さを含めたテクスチャーはコラーゲンの含量に大きく依存するが、コラーゲン繊維そのものの物理的強度は分子間に形成される架橋構造により高められていると考えられている。コラーゲンの分子

間架橋の形成に関係する酵素の1つとしてリジルオキシダーゼ(LOX)が知られている。LOXは、第一級アミン基質を反応性の高いアルデヒドへと酸化する銅依存性アミノキシダーゼである。LOXはコラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックスタンパク質

に対して、それらのリジン残基の側鎖を脱アミノ化することによって結合組織の生合成に不可欠な翻訳後修飾に関与しており、例えばいくつかの繊維状コラーゲンの共有結合架橋およびエラスチンにおけるデスマシン・イソデスマシン架橋の構成を触媒することが報告されている。

近年、LOX と同様の触媒活性を持つが、LOX とは遺伝的に異なるホモログタンパク質である LOX-like (LOXL)、LOXL2、LOXL3 および LOXL4 が報告されている。これらの LOXL サブファミリーを含む LOX ファミリーと呼ばれる各酵素タンパク質は、銅結合サイトおよびサイトカインレセプター様ドメインを含む C 末端の高度に保存されたアミノ酸配列により特徴づけられる。これらの領域が LOX の触媒機能のために必要なもののすべてであると考えられることから、LOXL サブファミリーの各酵素タンパク質は LOX と同様のアミノキシダーゼ活性を示すであろうと考えられている。これらの報告は、魚類においても LOX ファミリーはコラーゲンなどの分子間架橋形成に関与すること、すなわち、魚肉の硬さに関与することを示唆している。しかし、本研究開始時において、魚類ではコラーゲンの分子間架橋形成の機構はほとんど明らかになっておらず、また、これらの LOX ファミリーについてほとんど研究されていなかった。魚類におけるそれら分子の構造および発現特性に関する情報は極めて限られており、さらに、架橋の形成と肉質との関連も全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、他の魚類に比べて強い歯応えがあるとともにその死後にも軟化しにくいという特異な肉質を持つこと、またゲノムデータベースが利用できるために遺伝子工学的手法を用いた実験アプローチが比較的容易であることから、トラフグ (*Takifugu rubripes*) をモデル生物として、魚類におけるコラーゲンの分子間架橋形成の機構および肉質への関与を明らかにすることを最終目的として、架橋形成の初発反応であるリジンおよびヒドロキシリジンの酸化反応を触媒する LOX ファミリーの構造およびそれらの mRNA の発現様式・各分子の機能的差異を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料: トラフグ (*Takifugu rubripes*) は、福井県立大学海洋生物資源臨海研究センターにおいて飼育した体長 40 cm 前後の成魚を用いた。また、トラフグ初期胚を同センターで人工授精した後、孵化するまで水温約 18°C で飼育し、実験に供した。

(2) 全 RNA の調製: トラフグ成魚各組織

(普通筋、頭腎、鰓、皮膚、背鰭、肝臓、脳、心臓、腸および鰾) および初期胚より、AGPC 変法によって全 RNA を調製した。

(3) cDNA クローニング: 既知の哺乳類 LOX ファミリー (LOXs および LOXLs) の配列を基に、RACE プライマーを作製した。また、トラフグ普通筋および鰾より調製した全 RNA を用いて、5' および 3'-RACE Ready cDNA を構築した。RACE プライマーおよび RACE Ready cDNA を用いて 5' および 3'-RACE PCR を行った。得られた増幅産物をプラスミドにサブクローニング後、ダイタミネーター法により塩基配列を決定した。

(4) RT-PCR による発現解析: トラフグ成魚組織および初期胚より調製した全 RNA を逆転写反応に供した。得られた一本鎖 cDNA を鋳型として得られた PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動に供し、遺伝子発現の有無を検討した。なお、再現性を確認するために、少なくともトラフグ 3 個体から得た組織より cDNA を調製し、各種 LOX ファミリー分子の発現解析を行った。

(5) Whole mount in situ hybridization (WISH) 法による発現解析: 目的遺伝子断片をインサートとして持つプラスミドベクターを線状化、精製した後、DIG 標識 RNA プロブを作製した。トラフグ初期胚をパラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (PFA) により固定した。次に、卵殻除去した初期胚を Proteinase K 処理後、プレハイブリダイゼーションした。引き続き、初期胚に DIG 標識 RNA プロブを添加してハイブリダイゼーションした。同ステージの初期胚を用いて抗体吸収を行ったアルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体を加え、抗体反応を行った。その後、初期胚を洗浄し、BM Purple アルカリホスファターゼ基質を加え、一晚反応させた。染色された初期胚を顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) トラフグ LOX ファミリー分子の cDNA クローニングおよび一次構造解析

既知の LOX ファミリー分子の一次構造を基に、トラフグゲノムデータベースに対する相同性検索、RT-PCR、5' および 3'-RACE の結果、9 分子種の LOX ファミリー cDNA (fg-LOX33、149、203、228、349、712、1010 および 1201) を得た。

fg-LOX ファミリー遺伝子の構造解析を行った。fg-LOX 33 は 9 個のエクソンを持ち、エクソン 4~7 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX149 は 13 のエクソンを持ち、エクソン 9~12 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX203 は 9 個のエクソンを持ち、エクソン 5~8 は Cu²⁺結合部位および LOX

活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX228 は 13 のエクソンを持ち、エクソン 10~13 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX349 は 9 つのエクソンを持ち、エクソン 5~8 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX712 は 7 つのエクソンを持ち、エクソン 4~7 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX1010 は 7 つのエクソンを持ち、エクソン 4~7 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。fg-LOX1201 は 8 つのエクソンを持ち、エクソン 3~7 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしていた。ヒト LOX ファミリーでは、ヒト LOX およびヒト LOXL は 7 つのエクソン、ヒト LOXL2 は 11 のエクソンを持ち、ヒト LOX およびヒト LOXL のエクソン 2~6、ヒト LOXL2 のエクソン 6~10 は Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインをコードしている事が報告されている。それぞれの遺伝子のエクソンおよびイントロンのサイズは、fg-LOX33、149、203、228、349、712、1010 および 1201 の mRNA はそれぞれ 5121bp、15692bp、4023bp、11798bp、4104bp、4595bp、2579bp および 12822bp であった。ヒト LOX mRNA は 11896bp であった。また、ヒトでは、Cu²⁺結合部位および LOX 活性部位を含む CR 様ドメインに対応する各エクソンおよびイントロンのサイズは似ているとされている。一方、fg-LOX ファミリーにおいても対応する各エクソンのサイズは似ていたが、イントロンのサイズは様々であった。

トラフグ LOX ファミリー分子、ヒト、および、2007 年に報告されたゼブラフィッシュ LOX ファミリー分子の演繹アミノ酸配列を用いて、近隣結合法による分子系統樹を作成した (Fig. 1)。アウトグループにはキョウシュウジョウバエ LOXL-1 を用いた。

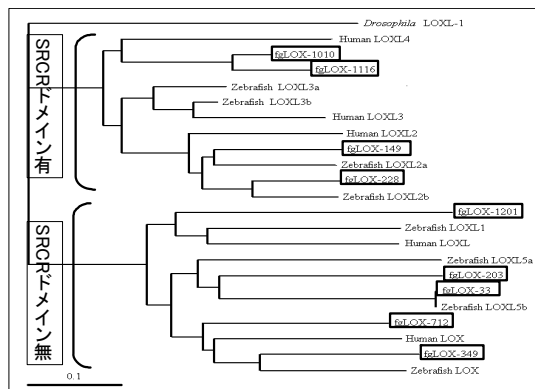


Fig. 1 LOX ファミリー分子系統樹

その結果、SRCR ドメインの有無で大きく 2 つのクラスターに分かれた (Fig. 1)。fgLOX-33、203、349、712 および 1201 はヒト LOX および LOXL、ゼブラフィッシュ LOX、LOXL1、LOXL5a および LOXL5b と同じクラスターに含まれた。fgLOX-33 および 203 はゼブラフィッシュ LOXL5b と、fgLOX-349 および 712 はゼブラフィッシュ LOX と、fgLOX-1201 はゼブラフィッシュ LOXL1 と同じクラスターに含まれた。一方、fgLOX-149、228、1010 および 1116 はヒト LOXL2、LOXL3 および LOXL4、ゼブラフィッシュ LOXL2a、LOXL2b、LOXL3a および LOXL3b と同じクラスターに含まれた (Fig. 1)。fgLOX-149 はゼブラフィッシュ LOXL2a と、fgLOX-228 はゼブラフィッシュ LOXL2b と、fgLOX-1010 および 1116 はヒト LOXL4 と同じクラスターに含まれた (Fig. 1)。LOX ファミリー分子はゼブラフィッシュにおいて 8 つ存在するのに対しトラフグでは 9 つ存在し、トラフグではゼブラフィッシュと比較し LOX 分子種が 1 つ多いことが明らかとなった。

fg-LOX ファミリー遺伝子は生物の種分化後に独立の遺伝子重複で各々のクラスターが生じた、あるいは、共通祖先の段階、つまり種分化の前の段階で遺伝子重複が起こり、種分化後に遺伝子変換が起きた結果、LOX 遺伝子およびそのホモログタンパク質を数種持つようになったと考えられる。このような哺乳類よりホモログタンパク質の種類が多いという現象は、魚類において他の遺伝子群でもみられる。例えば、転写因子をコードする Hox 遺伝子群は、哺乳類では 4 つのクラスターが存在するのに対して、ゼブラフィッシュでは 7 つ、トラフグでは 8 つのクラスターが存在する。このことから硬骨魚類が他の脊椎動物の共通祖先と分岐したのち、硬骨魚類のゲノムが倍化し、遺伝子重複が起きたと考えられる。魚類における LOX ファミリー遺伝子の更なる研究の進展は、この仮定の有力な証拠となるであろう。

(2) LOX ファミリー分子の発現解析

9 つのうちいずれのトラフグ LOX ファミリー分子が生体内において発現・機能しているかを解明するために、成魚組織および初期胚発生過程における発現解析を行った。これまで魚類においては成魚組織の LOX ファミリー分子 mRNA の発現解析を行った研究はない。また、脊椎動物初期胚発生過程における LOX ファミリー分子 mRNA の発現に関する知見は、魚類であるゼブラフィッシュの脊索における発現に関する 2007 年に報告された Gansner らによる研究のみである。従って、今回トラフグで得られた成魚組織における LOX ファミリー分子 mRNA の発現解析の

結果は魚類で全く新規の知見である。さらに、トラフグ初期胚発生過程における RT-PCR および WISH による発現解析の結果は、LOX ファミリー分子の脊椎動物胚発生過程における mRNA の発現を解析した全く新規の知見である。

① RT-PCR による発現解析

RT-PCR により、トラフグ成魚各組織（普通筋、頭腎、鰓、皮膚、背鰭、肝臓、脳、心臓、腸および鰾）におけるトラフグ LOX ファミリー9分子の mRNA 発現様式を検討した。トラフグ成魚組織において、fgLOX-33 mRNA は普通筋、心臓、腸および鰾において、fgLOX-712 mRNA は背鰭、脳、心臓、腸および鰾において、fgLOX-1010 mRNA は鰓および鰾において発現した。また、fgLOX-228 mRNA は背鰭を除く各組織において、fgLOX-203、1201 および 149 mRNA は用いたいずれの組織においても発現した。一方、fgLOX-349 および 1116 は、用いたいずれの組織においても発現を検出することができなかった。

次に、同様の手法により各初期胚発生過程 [3、24、32、48、56、72、92、116、124、140 および 164 時間胚 (hpf)] におけるトラフグ LOX ファミリー9分子の mRNA の発現様式を検討した。その結果、fgLOX-203、712、1201、228 および 149 mRNA は 3 hpf 以降で、fgLOX-1010 mRNA は 48 hpf 以降で、fgLOX-33 mRNA は 56 hpf 以降で発現した。一方、トラフグ成魚組織と同様に、fgLOX-349 および 1116 はいずれのトラフグ初期胚発生過程段階においても発現を検出することができなかった。

② Whole mount in situ hybridization (WISH) 法による発現解析

WISH 法により、それぞれのトラフグ初期胚発生過程 (48、56、72、92、100、116、124、140 および 164 hpf) におけるトラフグ LOX ファミリー分子の mRNA の分布を検討した。fgLOX-33 は 48 および 56 hpf においては脊索で、72 hpf においては脊索、体節および脊索尾部末端で顕著に発現した (Fig. 4)。また、92 hpf においても脊索および脊索尾部末端で発現したが、48 および 56 hpf ほど顕著な発現ではなく、100 hpf においては脊索尾部末端でわずかに発現する程度であった。116 hpf 以降では全く発現を検出することはできなかった。fgLOX-712 は、48 から 164 hpf において、胚全体で発現した。fgLOX-228 は 48 および 56 hpf においては全く発現を検出することができなかったが、72 hpf において、水晶体、眼の周辺細胞および間充織で顕著に発現した。92 hpf においては眼の周辺細胞および間充織で発現した。しかし、100 hpf 以

降においては発現を検出することができなかった。一方、fgLOX-203、349、1201、149、1010 および 1116 はいずれの初期胚発生過程においても発現を検出することができなかった。

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9件)

① Y. Yokoyama, H. Tsukamoto, T. Yama, Y-H. Park, J. Kobayashi, M. Manabe, S. Mizuta, R. Yoshinaka, T. Suzuki (2008) Molecular cloning of lysyl oxidase gene family from Japanese tiger puffer fish (fugu) and those expression in adult tissues and embryos. Proceeding of 5th World Fisheries Congress (WFC2008), Yokohama, Japan, 20-24 October, pp1-3. 査読無

② Y. Yokoyama (2008) Structure and expression of lysine-modification enzyme in the fugu *Takifugu rubripes*. Proceeding of The 4th International Symposium on the Marine Biotechnology and Advanced Material, Gangneung, Korea, 11-14 June 2008, pp67-71. 査読有

③ J-H. Hwang, Y. Yokoyama, S-H. Lee, R. Yoshinaka (2008): cDNA cloning and characterization of Type V/XI procollagen $\alpha 1$ chain in the skate *Raja kenosjei*. Food Chemistry, 107, 1467-1472. 査読有

④ H. Tsukamoto, Y. Yokoyama, T. Suzuki, R. Yoshinaka (2007): Molecular cloning and expression of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the fugu *Takifugu rubripes*. Comp. Biochem. Physiol. B. 148, 295-302. 査読有

⑤ H. Tsukamoto, Y. Yokoyama, T. Suzuki, R. Yoshinaka (2007): Expression and distribution of fugu TIMP-2s (fgTIMP-2a and fgTIMP-2b) mRNAs in tissues and embryos. Comp. Biochem. Physiol. B. 148, 225-230. 査読有

⑥ J-H. Hwang, S. Mizuta, Y. Yokoyama, R. Yoshinaka (2007): Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenosjei*). Food Chemistry, 100, 921-925. 査読有

⑦ H. Tsukamoto, Y. Yokoyama, T. Suzuki, S. Mizuta, R. Yoshinaka (2006): Expression of fugu TIMP-3 and -4 genes in adult tissues and embryos. Comp. Biochem. Physiol. B, 144, 395-403. 査読有

⑧ J-H. Hwang, Y. Yokoyama, S. Mizuta, R. Yoshinaka (2006): cDNA cloning and

characterization of Type II procollagen $\alpha 1$ chain in the skate *Raja kenoei*. J. Fish. Sci. Technol., 9(1), 22-29. 査読有
⑨J-H. Hwang, Y. Yokoyama, S. Mizuta, R. Yoshinaka (2006): cDNA cloning and characterization of Type I procollagen $\alpha 1$ chain in the skate *Raja kenoei*. Comp. Biochem. Physiol. B 144, 1-10. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

①Y. Yokoyama (他 8 名) (2008) Molecular cloning of lysyl oxidase gene family from Japanese tiger puffer fish (*fugu*) and those expression in adult tissues and embryos. 5th World Fisheries Congress (WFC2008), Yokohama, Japan, 20-24 October, 2008.

② Y. Yokoyama (2008) Structure and expression of lysine-modification enzyme in the *fugu Takifugu rubripes*. The 4th International Symposium on the MARINE BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS Kangnung National Univeristy, Gangneung, Korea, 11-14 June 2008.

③ Y. Yokoyama (2008) Structure and expression of collagen-modification enzyme, lysyl hydroxylase and oxidase, in the *fugu Takifugu Rubripes*. Special lecture at Chonnam University, Yeosu, Korea, 10 June 2008.

④横山芳博: 講演「養殖および天然トラフグの肉質」: 平成 19 年度第 2 回日本水産学会中部支部大会ミニシンポジウム. 福井. 2007. 11. 23

⑤J-H. Hwang, Y. Yokoyama (他 5 名) (2007) Biochemical characterization of molecular species of collagen in the skate *Raja kenoei*. 8th Asian Fisheries Forum 2007, November 20-23, 2007, Kochi, India.

⑦横山芳博 (他 5 名): 魚類のコラーゲン架橋形成機構に関する研究-IV トラフグ LOX-2 の cDNA クローニングと発現解析. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会. 函館. 2007. 9. 26

⑧塚本啓司・横山芳博 (他 3 名): 魚類のコラーゲン架橋形成機構に関する研究-III トラフグ LH2a および 2b の成魚組織および初期胚における発現. 平成 19 年度日本水産学会秋季大会. 函館. 2007. 9. 26

⑨塚本啓司・横山芳博 (他 3 名): トラフグ初期胚および成魚組織における 2 種類の TIMP-2 (TIMP-2a および 2b) の発現解析. 平成 19 年度日本水産学会春季大会. 東京. 2007. 4. 1

⑩塚本啓司・横山芳博 (他 3 名): トラフグゼラチナーゼ (MMP-2, MMP-9) の cDNA クローニングと発現解析. 平成 18 年度水産学会大

会. 高知. 2006. 4. 1

⑪塚本啓司・横山芳博 (他 3 名): トラフグリジルヒドロキシラーゼ 1 の cDNA クローニングと発現解析. 平成 18 年度水産学会大会. 高知. 2006. 4. 1

⑫横山芳博 (他 5 名): トラフグリジルオキシダーゼの cDNA クローニングと発現解析. 平成 18 年度水産学会大会. 高知. 2006. 4. 1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 芳博 (YOKOYAMA YOSHIHIRO)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号: 90291814