

平成21年6月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007年度～2008年度
課題番号：19570221
研究課題名（和文） 古代魚孵化酵素遺伝子の分子進化とその発生進化的研究
研究課題名（英文） Molecular evolution of hatching enzyme of ancient fishes
研究代表者
上智大学・理工学部・教授
安増 茂樹
研究者番号：00222357

研究成果の概要：

申請研究は、表題にある古代魚孵化腺細胞の発生進化的研究に加え、卵膜分解機構の進化研究の2題を含んでいる。前者においては、チョウザメより孵化液を調整して、孵化酵素の精製途中である。後者の卵膜分解機構の進化研究では、初期の硬骨魚類孵化酵素の卵膜分解系は、膨潤化酵素の単一酵素であったものが、進化過程で、膨潤卵膜分解酵素が出現して2つの酵素の効率良い卵膜分解系に進化したことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：分子進化、孵化酵素、卵膜分解機構、機能進化、チョウザメ

1. 研究開始当初の背景

孵化酵素研究は、1910年森脇によりサケを用いて世界で最初に行われ、その後、日本人を中心として行われてきた。また、当研究室では、30種以上の硬骨魚より孵化酵素遺伝子を単離して分子系統解析を行っている。さらに、両生類、鳥類、爬虫類より孵化酵素遺伝子を単離し、その分子進化過程を調べてきた。

このような背景の下、多くの知見が蓄積を生かしつつ、孵化酵素進化の研究を発展させる。

2. 研究の目的

研究の目的は、孵化酵素遺伝子の分子進化とタンパク質機能進化を脊椎動物を通して理解し、脊椎動物分子進化の一つのモデルケースを確立することである。研究は、以下の

2つの分野で研究を行った。①硬骨魚類から両生類への進化過程を研究する材料として古代魚を選択した。また、遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでの研究が可能となるよう、胚の入手が可能なチョウザメを中心に行うことを計画した。②硬骨魚類孵化酵素の分子系統樹を俯瞰すると、単一酵素系の孵化酵素が、2種の効率の良い卵膜分解系に進化してきたことがわかる。このような知見を基に硬骨魚類の孵化酵素タンパク質の機能進化の解明を試みる。この結果は、古代魚、両生類への孵化酵素機能進化過程の基礎データとして還元される。

3. 研究の方法

DNA のクローニング技術など分子生物学の進歩により、遺伝子レベルでの進化研究は、盛んに行われて来ている。しかしながら、タンパク質機能の進化は、タンパク質構造の煩雑さ、生物現象には複数のタンパク質が関わっている点などより、一つの機能タンパク質の進化を複数の動物種のわたって研究している例は皆無である。孵化酵素の卵膜分解機構進化は、基質と酵素、つまり、卵膜と孵化酵素という、2種のタンパク質の相互作用を追うことで可能であり、その機能は、タンパク質分解となり基質特異性の変化に還元される点より、絶好の材料といえる。それらの研究を可能とするため、孵化酵素タンパク質と卵膜が共に入手できる動物種を選択した。方法は、孵化液より孵化酵素を精製し、卵膜の切断点の決定など、卵膜分解をタンパク質レベルで解明する。その後、それら分解系を比較して進化学的考察を行う。

4. 研究成果

申請研究は、硬骨魚類から両生類への進化過程を解明する目的で、古代魚孵化腺細胞の発生進化学的研究という題名で申請している。申請研究は、それに加えて、脊椎動物孵化酵素の進化を網羅的に理解する目的で、硬骨卵膜分解機構の進化研究を含んでいる。前者においては、チョウザメ孵化酵素の精製を試みた。孵化液よりタンパク分解活性を検出し、幾つかのカラムクロマトグラフィーを行ったが、いまだ精製にいたっていない。後者においては、国際誌に4報の論文が受理され幾つかの興味深い進展を見た。硬骨魚類孵化酵素は、最初は単一酵素であったものが、進化過程で重複・多様化により複数の酵素に進化したことが分子系統解析よりわかっている。孵化酵素の機能進化を考察するため、2種の魚種より孵化酵素を精製した。ウナギは、硬骨魚類で初期に分岐するカラシワシ上目に属し、ゼブラフィッシュは、コッピョウ類に属する。それぞれは単一酵素の分解系であることが分子系統解析により示されている。両魚種では、孵化時に卵膜は軟化さ

れ、胚は自身の運動により軟化した卵膜を破いて孵化する。一方、メダカは、2種の酵素(MHCE、MLCE)により卵膜を完全分解される。ゼブラフィッシュ(ZHE1)とウナギ孵化酵素(EHE)を精製して、卵膜分解の特異性を調べると、それらは共に卵膜を軟化・膨潤させる酵素であった。ZHE1とEHEの卵膜分解様式とそれらの特異性は、メダカ孵化酵素の一つ、MHCEとよく類似しており、MLCEとは異なっていた。この結果から、ウナギ、ゼブラフィッシュの孵化時の卵膜分解機構は、硬骨魚類の原型であることが示唆された。一方、メダカは、祖先型酵素に加え、進化過程で多様化したもう一つの孵化酵素(MLCE)を獲得することでより効率のよい分解形を獲得したと推察される。卵膜の切断部位を調べると、膨潤化酵素(ZHE1, EHE, MHCE)は、卵膜タンパク質のN末端領域を切断し、MLCEは、卵膜コア構造と考えられるZPドメインの中央を切断する。このことは、硬骨魚類の進化過程で、孵化酵素遺伝子が重複・多様化した結果、新しい領域を切断する活性が出現して、膨潤卵膜を分解する新規の酵素が出現したと考えられる。今後は、卵膜構成タンパク質遺伝子のクローニングを行い分子系統解析を行い、その後、孵化酵素遺伝子と卵膜構成タンパク質遺伝子の分子共進化を考察すること。孵化酵素分子系統解析で得られている膨潤化酵素から多様化したと考えられる、もう一つの孵化酵素(グループB遺伝子)に加え、基質特異性の変化を分子レベルで解明していく予定である。

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 4 件)

①Kawaguchi M, Fujita H, Yoshizaki N, Hiroi J, Okouchi H, Nagakura Y, Noda T, Watanabe S, Katayama S, Iwamuro S, Nishida M, Iuchi I, Yasumasu S
Different hatching strategies in embryos of two species, pacific herring *Clupea pallasii* and Japanese anchovy *Engraulis japonicus*, that belong to the same order Clupeiformes, and their environmental adaptation.

J. Exp. Zoology B (2009) 312:95-107

査読あり

②Sano K, Inohaya K, Kawaguchi M,

Yoshizaki N, Iuchi I, Yasumasu S
Purification and characterization of
zebrafish hatching enzyme - an
evolutionary aspect of the mechanism of
egg envelope digestion.

FEBS J. (2008) 275:5934-5946
査読あり

③ Kawaguchi M, Nakagawa M, Noda T,
Yoshizaki N, Hiroi J, Nishida M, Iuchi
I, Yasumasu S.

Hatching enzyme of the ovoviviparous
black rockfish *Sebastes schlegelii*-
environmental adaptation of the
hatching enzyme and evolutionary
aspects of formation of the pseudogene.

FEBS J. (2008) 275:2884-2898
査読あり

④ Kawaguchi M, Yasumasu S, Hiroi J,
Naruse K, Suzuki T, Iuchi I.

Analysis of the exon-intron structures
of fish, amphibian, bird and
mammalian hatching enzyme genes,
with special reference to the intron
loss evolution of hatching enzyme
genes in Teleostei.

Gene (2007) 392:77-88
査読あり

[学会発表] (計 7件)

① 川口眞理、清水昭男、廣井準也、井内一郎、
安増茂樹、西田睦

孵化酵素 LCE の種特異的卵膜分解

日本進化学会第9回大会
(2008年9月 東京大学)

② 佐野香織 川口眞理 井内一郎 安増茂樹
ウナギ孵化酵素の卵膜分解特異性から考察
した卵膜分解機構の進化
第79回 日本動物学会

(2008年9月 福岡大)

③ 佐野香織 安増茂樹 猪早敬二 吉崎範
夫 川口眞理 井内一郎

ゼブラフィッシュの孵化酵素とその卵膜分
解機構

第13回 小型魚類研究会

(2007年9月 東京大)

④ 佐野香織、川口眞理、井内一郎、安増
茂樹

硬骨魚類孵化酵素の卵膜分解機構にお
ける機能進化

日本進化学会第9回大会

(2008年8月 東京大学)

⑤ 佐野香織 安増茂樹 吉川昌之 川口眞
理 井内一郎

ウナギ孵化酵素の精製とその卵膜分解機構

第78回 日本動物学会

(2007年9月 弘前大)

⑥ 川口眞理、安増茂樹、廣井準也、中川雅
弘、野田勉、井内一郎

卵胎生魚クロソイの孵化酵素 LCE 遺伝子
における偽遺伝子形成機過程

日本進化学会第9回大会

(2007年8月 京都大学)

⑦ 佐野香織 安増茂樹 猪早敬二 吉崎範
夫 川口眞理 井内一郎

単一酵素系としてのゼブラフィッシュ胚の
孵化酵素

第59回 日本動物学会・関東支部会

(2007年3月 首都大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上智大学・理工学部・教授

安増 茂樹

研究者番号：00222357

(2)研究分担者

上智大学・理工学部・教授

井内 一郎

研究者番号：110011694

(3)連携研究者

なし