

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06774

研究課題名(和文) 魚類孵化酵素の卵膜分解系の進化：進化過程における新システムの誕生機構の解明

研究課題名(英文) Evolution of egg envelope digestion system of fish hatching enzymes: the birth of a new system in the evolutionary process

研究代表者

安増 茂樹 (YASUMASU, Shigeki)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：00222357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真骨魚類の孵化酵素遺伝子は、進化過程の遺伝子重複により単一酵素系から2種の酵素(HCEとLCE)の効率の良い卵膜分解系に進化している。正真骨魚類で分岐の早いキュウリ目のアユでは、も一つの酵素(HE)が存在し3つの酵素系である。卵膜の分解活性を調べるとアユHCEは、他の正真骨魚類HCEと同様な活性を示すが、アユLCEまたはHEは、HCEと合わせて作用させても効率の良い卵膜分解は起きない。分子系統解析より、同一祖先の酵素遺伝子の重複の結果、LCEとHEが生じたことがわかっている。これらの結果は、重複遺伝子の一方の遺伝子が新規機能を獲得する過程は、より複雑な進化段階が存在することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重複遺伝子が、どのように新規機能を獲得してきたかを解明することは、進化学において重要な課題である。分子系統解析で同一のクレードに属する遺伝子は、同様の機能を示すとは限らず、新規機能獲得はタンパク質の機能の解析が必須である。孵化酵素の卵膜分解では、孵化酵素と卵膜構成タンパク質の相互作用という比較的簡単なシステムであるという点で絶好の材料といえる。今回の結果より、遺伝子重複後に複数の酵素遺伝子が生じた後、生物システムに対してより効率よい変異が生じた遺伝子が残り、他の重複遺伝子は、失われることが示唆された。本研究は、新規機能獲得をタンパク質の機能レベルで研究した独創的な研究といえる。

研究成果の概要(英文)：Teleost hatching enzyme genes have evolved from a single enzyme system to an efficient egg envelope digestion system of two enzymes (HCE and LCE) due to gene duplication. Ayu (sweetfish), which diverges early in euteleost evolution, is a three-enzyme system (HCE, LCE and HE). Ayu HCE shows similar activity to other teleost HCE, but Ayu LCE or HE does not efficiently digest egg envelope even when combined with HCE. Molecular phylogenetic analysis has shown that LCE and HE are the result of duplication of the same ancestral enzyme gene. These results suggest that the process by which one of the duplicated genes acquires a novel function involves more complicated evolutionary steps.

研究分野：進化発生学

キーワード：機能進化 生物システムの創生 孵化酵素 卵膜 ZPタンパク質 正真骨魚類

1. 研究開始当初の背景

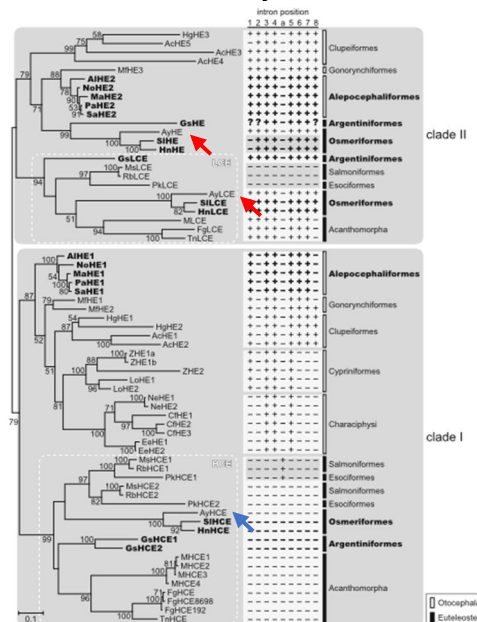
重複遺伝子が、どのように新規機能を獲得してきたかを解明することは、進化学において重要な課題である。真骨魚類の孵化酵素は、数回の遺伝子重複を経て、単一酵素の卵膜分解系から 2 種の酵素の効率の良い分解系へと進化している。系統的に分岐の早い魚(カライワシ類)では単一酵素の卵膜分解系であるのに対し、ニシン・骨鰈類と正真骨魚の共通祖先で遺伝子重複が起き、複数の酵素系に進化した。特に正真骨魚類では、2 種類の酵素 (HCE と LCE) による共同作用により効率の良い分解系を獲得している。一方、ニシン・骨鰈類では、ニシン目は、複数の酵素系であるが、骨鰈類では cladeI 酵素の単一酵素系となる(右図)。

面白いことに、キュウリウオ目のアユでは 3 つの酵素 (HCE, LCE, HE 図矢印)を持つ。分子系統解析により、まず遺伝子重複して 2 つの酵素 (cladeI/HCE と cladeII 酵素)が生じ、さらに cladeII 酵素は、重複して LCE と HE が生じたと考えられる。多くの正真骨魚は、HCE と LCE 遺伝子で HE 遺伝子をもたないことから、HE 遺伝子は、正真骨魚類の進化過程で消失したと考えられる。

以上の系統解析から推定すると、アユの 3 つの酵素の分解系は、HCE-LCE 系の成立過程で一時的に存在した分解系と予想され、新規システムが生じる移行期のものと予想される。

一方、正真骨魚類の HCE と LCE による卵膜分解系は、以下のように良く調べられている。HCE は、卵膜を部分分解により膨潤・軟化させる。LCE は、生の卵膜には作用しないが、HCE により膨潤した卵膜を効率よく分解・可溶化する。卵膜は、chgH/Hm と chgL と呼ばれる数種のタンパク質により構成されている。Chg は、ZP ドメインと呼ばれる重合モジュールをもち、それらが結合して形成される繊維状構造が卵膜の基本構造と考えられる。一方、chgH/Hm には、ZP ドメインの N 末端側に長い Pro-X-Y のリピート構造をもち、これが ZP ドメインの繊維状構造を束ねていると予想される。HCE と LCE の卵膜タンパク質切断点が解明されている。HCE は、Pro-X-Y のリピート構造を細断する。これにより、卵膜の繊維状構造がルーズになり卵膜は、膨潤すると考えられる。一方、LCE は、ZP ドメインの真ん中部分 (mid-ZPD) を切断することで、繊維状構造を崩壊させ、膨潤卵膜の可溶化させると考えられる。両酵素の切断点は、合目的に見え、それらがもたらす卵膜構造変化をよく反映しているように見える。一方、単一酵素系のカライワシ目のウナギと骨鰈類のゼブラフィッシュの孵化酵素を調べると、両酵素とも ZP ドメインの N-末端の繰り返し配列を切断し卵膜を膨潤・軟化させる。このことより、正真骨魚類の HCE は、祖先型活性を維持した酵素で、LCE が新規機能を獲得した酵素といえる。つまり、遺伝子重複後に cladeII 遺伝子が基質特異性を変化させ新たな切断部位 (mid-ZPD) を獲得し、新規機能遺伝子として LCE が生じたと考えられる。

新骨魚類孵化酵素遺伝子の分子系統樹 (カライワシ類を除く)



赤矢印は、アユの 2 つの cladeII 遺伝子  
青矢印は、アユの cladeI/HCE 遺伝子

2. 研究の目的

研究背景に記載したように、魚類孵化酵素の卵膜分解系は、遺伝子レベルからタンパク質レベルまで多くの知見があり、さらに、酵素が、卵膜タンパク質の切断点を変化させ、機能進化が起きたことがあきらかとなっている。アユの孵化酵素の 3 つの酵素の卵膜分解系を調べることで、より機能進化がどのように起きるのか、その過程を推察できるのではと考えている。一方、卵膜基質は、chg (ZP タンパク質) が重合して形成される。ZP タンパク質の 3 次元構造は、明らかとなっているが (Han et al., Cell 143, 404-415) ZP タンパク質の複合体の構造は明らかとなっていない。本研究では、孵化酵素の卵膜分解物を用いて、複合体の構造の解明を行った。3 次元構造の解明により、どのように孵化酵素が卵膜に接近・結合するかが予想できる。また、脊椎動物の卵膜は、すべて相同な ZP タンパク質より形成されており、その構造解明は、魚類だけでなく、哺乳類を含めた脊椎動物共通のデータとなりうる。この研究は、スウェーデン、カロリンスカ研究所の Luca Jovine 博士との共同研究として行っている。

### 3. 研究の方法

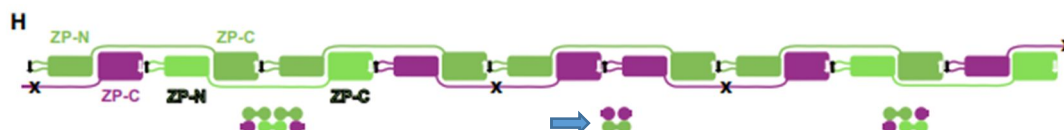
**アユ孵化酵素リコンビナントタンパク質の作成:** アユの3種の孵化酵素 (HCE, LCE, HE) それぞれの cDNA の成熟酵素部分を発現ベクター (pET3c) にクローン化して、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を作製した。リコンビナントタンパク質は、封入体として回収された。封入体を 8 M 尿素で可溶化後、8 M アルギニン溶液で透析、さらに 2.5 mM Tris・HCl (pH8.0) で透析しリフォールディングを行った。カゼインの分解活性を測定することでリフォールディング効率を調べた。得られた酵素をアユの卵膜と保温して形態変化を観察した後、分解物を SDS 電気泳動または、HPLC カラムにより分離した。精製された分解物の N-末端より 5 ~ 6 残基のアミノ酸配列を決定して、その配列をアユ chg のアミノ酸配列と対応させることで、酵素の切断点を同定した。また、孵化酵素の挿入 pET3c を用い PCR 法により変異をいれて、変異リコンビナント孵化酵素を作製した。

**孵化酵素の卵膜分解物の精製:** メダカ産卵メスより未受精卵を単離して、ホモジナイザーで破碎後に洗浄して未受精卵を単離した。それを精製 HCE と LCE と保温して卵膜の分解物を作製し、Superdex200 カラムを用いて分離した。高分子の分解物は、F1 と F2 と呼ばれる 2 つのピークとして溶出される。F2 画分をさらに同一のカラムで分画した後、透析し精製サンプルとした。高濃度の精製 F2 (20mg/ml) を共同研究者に送付した。

### 4. 研究成果

**アユの卵膜分解機構:** アユの卵膜分解系を調べるため、リコンビナント孵化酵素を作成して単離卵膜の分解実験を行った。rAyuHCE とアユ卵膜を保温すると、卵膜は軟化するものの完全可溶化されない。沈殿と上澄みに分離すると、上澄みにペプチドが検出される。上澄みを HPLC の逆相カラムで分離後に精製分解物のアミノ酸配列を決定すると、卵膜構成タンパク質の ZPB の N 末端側にある Pro-X-Y 繰り返し配列を細断していることが分かった。この切断は、他の正真骨魚類と同様な分解様式であり、AyuHCE も祖先型遺伝子として、その機能は維持されているといえる。rAyuHE と単離卵膜を保温すると卵膜の大きな形態変化はみられない。しかし、分解後の沈殿物を SDS 電気泳動すると、2 つの分解物のバンドが検出される。これら切断点の位置関係を報告されているメダカなどの LCE 切断点と比較すると、HE の切断点は、20 アミノ酸以内の近傍に位置している。結果、2 つの酵素 (HE, HCE) について切断点が明らかとなり、HE は、卵膜分解に積極的に関与していることが明らかとなった。rAyuLCE は、封入体は回収できるが、その後のリフォールディング実験でカゼイン分解活性のある酵素を得ることができなかった。成熟酵素 AyuLCE のアミノ酸配列を他の LCE と比較すると、触媒部位の N-末端側に 2 アミノ酸の欠失がある。この 2 アミノ酸欠失がリフォールディングを妨げていると考え、欠失部位に他の LCE 同様な 2 アミノ酸を付加した変異リコンビナントタンパク質 (+2rAyuLCE) を作製した。リフォールディング実験の結果、+2rAyuLCE は、カゼイン分解活性を示した。+2rAyuLCE と卵膜を保温して、分解物を電気泳動すると、高分子の分解物が検出できるが、mid-ZPD 部位は切断しない。分子系統解析では AyuLCE は、正真新骨魚類の LCE のクレードに含まれる。今回のリコンビナントを用いた実験では、アユの LCE は、本来の LCE の活性がないことがわかる。つまり、分岐の早いアユは、LCE が新規機能獲得していないと考えられる。一方、アユの第 3 の酵素 HE の分解は、卵膜構造に劇的な変化をもたらさないものの、2 つの特異的切断点が発見された。これらの結果は、正真骨魚類の効率の良い 2 つの酵素の獲得過程には、それに至る過程で不完全な分解系が存在することが示唆される。その後、LCE が、MidZPD 部位の切断活性を獲得すると、HE は不要となり、その後の進化過程で消失したと考えられる。現在、孵化液より、アユ孵化酵素の精製・特徴づけを行っている。

**卵膜タンパク質複合体の 3 次元構造解析:** 脊椎動物の卵膜は、共通して 260 アミノ酸の ZP ドメインを有する相同なタンパク質から出来上がっている。ZP ドメインのアミノ酸配列の類似性より卵膜構成タンパク質は、ZPA, ZPAX, ZPB と ZPC などのサブタイプがあり、ChgH/Hm は ZPB で chgL は ZPC に分類される。さらに ZP ドメインには、ZP-N と ZP-C と呼ばれるサブドメインが存在する。培養細胞で発現させたニワトリの ZPC タンパク質を用いて 3 次元構造が解明されている。しかし、それが、どのように卵膜を形成するか? つまり ZP タンパク質の複合体の 3D 構造は不明であった。これは、卵膜が不溶化した構造物であることより結晶解析ができないことに帰結する。一方、メダカの孵化酵素の分解物は、そのサブユニット構造は、生化学的に良く研究されている。高分子量の分解物のなかの F2 は、chgL の ZP ドメインと chgH の ZP-N と ZP-C を含む 3 量体である (下図矢印)。F2 を精製して結晶構造解析を試みた。結晶構造解析は、Jovine 博士により行われた。



その結果、2.7 の解像度で構造解析に成功した。ZP ドメインの重合は、ZPC の ZP-N と ZP-C の間の介在配列の部分に入れ子のように ZP-N と ZP-C が入り込んで繊維状構造を形成することが

明らかとなった。LCE の切断点 (mid-ZPD 図の X) は、繊維構造の表面に位置しておりアクセスが可能な部位であること、また、mid-ZPD の切断により繊維構造が崩壊するなど、卵膜分解機構において重要な知見をえた。また、この構造は、サカナ特異的なものではなく、脊椎動物全般、哺乳類卵膜にも適応できるデータである。詳細な 3 次元構造の結果は、投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yokokawa R, Watanabe K, Kanda S, Nishino Y, Yasumasu S, Sano K.	4. 巻 299(4)
2. 論文標題 Egg envelope formation of medaka <i>Oryzias latipes</i> requires ZP proteins originating from both the liver and ovary	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 104600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104600.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fu B, Wu D, Yasumasu S, Hane M, Sato C, Kitajima K.	4. 巻 10;13(1)
2. 論文標題 Critical Role of the Cortical Alveolus Protease Alveolin in Chorion Hardening In Vivo at Medaka Fertilization.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom13010146.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagasawa T, Kawaguchi M, Nishi K, Yasumasu	4. 巻 22(1):9.
2. 論文標題 Molecular evolution of hatching enzymes and their paralogous genes in vertebrates.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Ecol. Evol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12862-022-01966-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sano K, Shimada S, Mibu H, Taguchi M, Ohsawa T, Kawaguchi M, Yasumasu S.	4. 巻 23122
2. 論文標題 Lineage-specific evolution of zona pellucida genes in fish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Exp Zool B Mol Dev Evol.	6. 最初と最後の頁 181 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jez.b.23122.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi M, Okazawa Y, Imafuku A, Nakano Y, Shimizu R, Ishizuka R, Jiang T, Nagasawa T, Hiroi J, Yasumasu S	4. 巻 11(1):7230
2. 論文標題 Pactacin is a novel digestive enzyme in teleosts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86565-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Stsiapanava A, Xu C, Brunati M, Zamora-Caballero S, Schaeffer C, Bokhove M, Han L, Hebert H, Carroni M, Yasumasu S, Rampoldi L, Wu B, Jovine L.	4. 巻 39(24)
2. 論文標題 Cryo-EM structure of native human uromodulin, a zona pellucida module polymer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO J.	6. 最初と最後の頁 e106807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020106807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本田 健人 長澤 竜樹 川口 眞理 安増 茂樹
2. 発表標題 魚類孵化酵素遺伝子の遺伝子重複と新規機能遺伝子の誕生
3. 学会等名 第93回日本動物学会 早稲田大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀江万由子 川口 眞理 安増茂樹
2. 発表標題 硬化TGaseの発現領域の多様性
3. 学会等名 トランスグルタミナーゼ研究会 名古屋大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀江万友子、佐久間航大、川口眞理、安増茂樹
2. 発表標題 魚類卵膜硬化の分子機構
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江万友子、佐久間航大、堀江望由季、原田寛生、川口眞理、安増茂樹
2. 発表標題 魚類卵膜硬化の分子機構とその機能進化
3. 学会等名 トランスグルタミナーゼ研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スウェーデン	Prof. Luca Jovine Karolinska Institutet		