

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570250

研究課題名(和文) 卵膜タンパク質と孵化酵素遺伝子の分子共進化

研究課題名(英文) Molecular co-evolution of the fish hatching enzymes and the egg envelope proteins

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：硬骨魚類のZP遺伝子は、進化過程で発現領域が変化している。早くに分岐したカライワシ類では、卵巣で合成される。その後、正真骨魚類とニシン・骨鰾類の共通祖先で発現場所が変化して、正真骨魚類では肝臓で、ニシン目では、ZP遺伝子cDNAが両方の組織からクローン化されるが、骨鰾上目の魚では、ZP遺伝子の発現は卵巣が主になる。一方、孵化酵素は、ニシン・骨鰾類の共通祖先で遺伝子重複により2種の遺伝子が生じ、正真骨魚は、2つの遺伝子を保持している。一方、ニシン・骨鰾類では、骨鰾類に至る過程で、1つの遺伝子が失われている。つまり、卵膜遺伝子発現場所の進化過程の変化は、孵化酵素遺伝子の重複・喪失の時期と一致する。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized the evolution of teleostean zp genes, focusing on the organ expressing zp gene. In the early stage of teleostean evolution, the ancestral zp genes expressed in ovary acquired the ability to express in the liver. Later, one of the two expressions sites became dominant. The liver-expressed zp genes are component proteins of the egg envelope in the Euteleostei. In Otocephala, Clupeiformes possess both ovary- and liver-expressed genes that presumably participate in egg envelope formation, whereas the Gonorynchiformes and Cypriniformes have primarily preserved ovary expressed zp genes. It was known that duplication and subsequent neofunctionalization of the teleostean hatching enzyme gene occurred in the common ancestor of Euteleostei and Otocephala, and one of two hatching enzyme genes was lost in Otocephalan lineage. Therefore, evolutionary change of the hatching gene is well correspond to the evolution of teleostean zp genes in terms of the organ expressing zp gene.

研究分野：分子進化学、発生生物学

キーワード：分子共進化 孵化酵素 卵膜

1. 研究開始当初の背景

魚類の孵化酵素は進化過程で重複して、2種の酵素へと多様化したことが分子系統解析より明らかである (Kawaguchi et al. 2010)。孵化酵素の卵膜分解様式を調べると、真骨魚類の孵化は、もともとは、単一酵素で行われ、その後、効率の良い2種の分解系に進化したことがわかる。単一酵素系の孵化は、卵膜の軟化・膨潤である。2種の酵素系では卵膜が完全に可溶化し、一つ酵素 (cladeI 酵素) が卵膜膨潤の活性を持ち、もう一方 (cladeII 酵素) は、その膨潤卵膜を可溶化する。このことより、cladeI 酵素が祖先型活性を維持し、cladeII 酵素は、新規機能を獲得した酵素と考えられる (Sano et al. 2008, 2011)。卵膜の孵化酵素の基質である卵膜は、数種類の ZP タンパク質と呼ばれる糖タンパク質より構成されており、ZP タンパク質は、共通に数百アミノ酸の N-末端領域と ZP ドメイン (260 アミノ酸) と呼ばれる領域をもつ。各酵素の卵膜切断点を調べると clade I 酵素は、N-末端領域を細かく切断する一方、cladeII 酵素は、ZP ドメインの N-末端側 (N-ZPd) と ZP ドメインの真中 (Mid-ZPd) という clade I 酵素酵素とは異なる 2箇所を切断する (Yasumasu et al. 2010)。つまり、clade 酵素は、祖先型の活性 (N-末端領域の切断活性) という本来の活性を失い、新たに2つの切断点を獲得することで、卵膜可溶化という新機能を獲得したと考えられる。魚類系統樹より、孵化酵素の遺伝子重複は、正真骨魚類とニシン・骨鰾類の分岐に先立って起きたことがわかっており、両魚種は、ともに2種の酵素を持つ。しかしながら、新規機能を獲得したのは、正真骨魚類の clade 酵素で、ニシン・骨鰾類 clade 酵素は、卵膜を膨潤化する酵素で、cladeI 酵素と同様の N-末端領域の切断活性をもち、2つの切断点のうち1つ (N-ZPd) のみ切断する。ZP タンパク質の N-末端領域のアミノ酸配列を比較すると、正真骨魚類またはニシン・骨鰾類内では類似性を示すが、2つの分類群間では、まったく似ていない。このことは、正真骨魚類で N-末端領域のアミノ酸配列が進化過程で大きく変化したことが、新規機能獲得の一つの要素である祖先型活性の喪失につながったことが示唆される。また、ニシン・骨鰾類 clade 酵素では、卵膜可溶化のキーサイトである Mid-ZPd は切断しない。ニシン・骨鰾類 ZP-タンパク質の切断点に対応する配列を見ると、そこにはプロリンの連続配列が存在する。正真骨魚類の Mid-ZPd には、プロリン配列は見られないことから、卵膜の配列変化が新たな切断点 (Mid-ZPd) の獲得に大きく関与していることが示唆された。以上のことから、正真骨魚類の clade 酵素が、新規機能を獲得したのは、正真骨魚類への進化

過程で卵膜遺伝子が大きく変異したことが一つの要因であると思われる。一方、多くの正真骨魚類の卵膜タンパク質は、主に肝臓で合成され、ニシン・骨鰾類のそれは、卵細胞であることが知られている (Sano et al. 2010)。正真骨魚類とニシン・骨鰾類の共通祖先から分岐したカライワシ類の魚では、卵膜タンパク質は卵細胞が合成する。このことは、正真骨魚類に至る過程で発現場所の変化を含む大きな卵膜遺伝子の変化が起きたことが予想される。正真骨魚類でのみ2種の酵素の効率の良い分解系が進化しており、その関連は興味深い。切断点 (Mid-ZPd) の獲得に大きく関与していることが示唆された。以上のことから、正真骨魚類の clade 酵素が、新規機能を獲得したのは、正真骨魚類への進化過程で卵膜遺伝子が大きく変異したことが一つの要因であると思われる。一方、多くの正真骨魚類の卵膜タンパク質は、主に肝臓で合成され、ニシン・骨鰾類のそれは、卵細胞であることが知られている (Sano et al. 2010)。このことは、正真骨魚類に至る過程で発現場所の変化を含む大きな卵膜遺伝子の変化が起きたことが予想される。正真骨魚類でのみ2種の酵素の効率の良い分解系が進化しており、その関連は興味深い。

2. 研究の目的

孵化酵素と卵膜構成タンパク質 (卵膜タンパク質) は、卵膜の分解を維持しつつ共進化している。申請者は、魚類孵化酵素の卵膜の分解機構の進化について研究してきた。その過程で、卵膜構成タンパク質遺伝子の進化過程での変化が卵膜分解機構に深く関与している結果を得た。本申請では、硬骨魚類の孵化酵素と卵膜遺伝子の共進化過程を、卵膜遺伝子の進化に焦点を当てて行うものである。

3. 研究の方法

いままでに複数種の魚から卵膜遺伝子がクローン化されているが、それら魚種は、系統的に偏っている。そこで、いまだクローン化されていないニシン目、骨鰾類の魚種を用いて卵膜タンパク質遺伝子を単離し、硬骨魚類全体を網羅した分子系統樹を作成する。その過程で、遺伝子の発現部位に注目して、発現領域の転換が進化過程のどの時点で起きたかを推察する。また、遺伝子重複過程で生じたと考えられる卵膜タンパク質様遺伝子の機能解析を行う。それらの情報をもとに、孵化酵素と卵膜タンパク質の卵膜分解機構における共進化過程を推察する。

4. 研究成果

1. ニシン目、骨鰾類の卵膜タンパク質 cDNA のクローン化と系統解析

ニシン目からニシンとカタクチイワシ、骨鰾類からミルクフィッシュを用いて cDNA のクローン化した。卵膜タンパク質遺伝子

は、脊椎動物において保存されており、ZPドメインという260アミノ酸の相同領域が存在し、ZPA、ZPB、ZPC、ZPD、ZPXのサブタイプが存在することが知られている。魚類では、多くの魚より、ZPBとZPCが存在することが分かっている。3種の魚から、それぞれ、ZPBとZPCをクローン化された。ミルクフィッシュにおいては、両遺伝子とも卵巣で発現していた。ゼブラフィッシュ、キンギョなどの骨鰾類では、卵巣でZP遺伝子が発現していることが報告されていることと合わせると、骨鰾上目の魚は、卵巣で卵膜タンパク質を合成していると考えられる。一方、ニシン目のニシンとカタクチイワシでは、肝臓と卵巣から異なったZPBとZPC遺伝子がクローン化される。系統解析の結果、卵巣発現のZP遺伝子と肝臓発現のZP遺伝子は、別のグループを形成することから、ニシン目の魚は、卵巣発現のZP遺伝子と肝臓発現のZP遺伝子の両方を持つことが示唆された。発現量を比較すると、ZPBとZPC遺伝子ともに、肝臓発現のZP遺伝子が、卵巣のそれらに比べ強く発現している(Sano et al. 2103)。また、ニシンの肝臓発現のZP遺伝子ZPBaのN-末端領域に、正真骨魚類のZPB遺伝子に見られるPro-X-Yの繰り返し配列が存在する。このことは、肝臓発現ZP遺伝子が、ニシン・骨鰾類と正真骨魚類の共通祖先で存在していたことを示している。また、このPro-X-Y配列は、正真骨魚類のcladeI酵素の切断部位であることから、cladeI酵素の切断特性が正真骨魚類とニシン目で類似していることが示唆される。

2. ニシンZPタンパク質の局在

ニシンの肝臓発現ZP遺伝子(ZPBa、ZPCa)と卵巣発現ZP遺伝子(ZPBb、ZPCb)のペプチド抗体を作成して卵膜での局在を調べた。ニシン卵膜は、顕微鏡で観察すると、構造の良く似た2つの層より形成されている。免疫組織化学により、内側の層は、主にZPBaにより形成されており、外側の層は、ZPBaとZPCaにより形成されていることが示唆された。卵巣発現ZP遺伝子のZPBbとZPCbの抗体では、卵膜は染色されない。このことは、ニシンの卵膜は、主に肝臓由来のZPタンパク質より形成されていることが示唆された。カタクチイワシの卵膜も主に肝臓由来のZPタンパク質よりできていることがタンパク質化学的実験より示されている。ニシン目の魚は、卵巣と肝臓由来の両方のZP遺伝子を持っているが、それらの卵膜は、肝臓由来のZPタンパク質が主な構成成分になっていると考えられる。

3. 硬骨魚類卵膜の厚さの測定

肝臓で卵膜タンパク質を合成する正真骨魚類の魚は、ニシン・骨鰾類の魚と比較して、厚い強固な卵膜を持つ魚が多くみられる。また、ニシン目のニシンは、例外的に

厚い卵膜を持つ。卵膜の厚さは産卵場所にも影響し、水中に生み出され浮遊する浮性卵は、一般的に薄い卵膜を持ち、水底や藻場に産み付けられる沈性卵の卵膜は、厚いとされている。50種ほどの魚卵の卵膜の厚さをレーザー顕微鏡を用いて測定したところ正真骨魚類のそれは、ニシン・骨鰾類に比べて明らかに厚く、浮性卵内で比較しても厚い傾向があった。さらに、孵化までの積算温度と卵膜厚を比較すると、厚い卵膜を持つ魚ほど孵化までの時間が長い傾向があった。孵化までの時間が長いと胚は、より成熟した状態で孵化すると考えられ、その後の生存に有利となると考えられる。このことは、肝臓への合成場所の転換と2種の効率の良い酵素系の成立が、正真骨魚類の魚で(特に沈性卵を産む魚において)種の生存・維持に有利に働いたことが予想される。

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 7件)

(1) Mari Kawaguchi, Kaori Sano, Norio Yoshizaki, Daisuke Shimizu, Yuichiro Fujinami, Tsutomu Noda, and Shigeki Yasumasu, 2014. Comparison of hatching mode in pelagic and demersal eggs of two closely related species in the order Pleuronectiformes. *Zoological Science*, 31: 709-715. DOI: 10.2108/zs140018
査読有り

(2) Kaori Sano, Mari Kawaguchi, Satoshi Watanabe, and Shigeki Yasumasu, 2014. Neofunctionalization of a duplicate hatching enzyme gene during the evolution of teleost fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 14:221. DOI: 10.1186/s12862-014-0221-0
査読有り

(3) Mari Kawaguchi, Koji Inoue, Ichiro Iuchi, Mutsumi Nishida, and Shigeki Yasumasu, 2013. Molecular co-evolution of a protease and its substrate elucidated by analysis of the activity of predicted ancestral hatching enzyme. *BMC Evolutionary Biology*, 13:231. DOI: 10.1186/1471-2148-13-231
査読有り

(4) Kaori Sano, Mari Kawaguchi, Satoshi Watanabe, Yoshitomo Nagakura, Takashi Hiraki, and Shigeki Yasumasu, 2013. Inferring the evolution of teleostean zp genes based on their sites of expression. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320: 332-343.

DOI: 10.1002/jez.b.22507 査読有り

(5) Mari Kawaguchi, Hiroshi Takahashi, Yusuke Takehana, Kiyoshi Naruse, Mutsumi Nishida, and Shigeki Yasumasu, 2013. Sub-functionalization of duplicated Genes in the evolution of nine-spined stickleback hatching enzyme. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320: 140-150. DOI: 10.1002/jez.b.22490 査読有り

(6) Mari Kawaguchi, Shigeki Yasumasu, Akio Shimizu, Norio Kudo, Kaori Sano, Ichiro Iuchi, and Mutsumi Nishida, 2013. Adaptive evolution of fish hatching enzyme: One amino acid substitution results in differential salt dependency of the enzyme. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 1609-1615. DOI: 10.1242/jeb.069716 査読有り

(7) Mari Kawaguchi, Sébastien Lavoué, Junya Hiroi, Hirofumi Hayano, Ichiro Iuchi, Shigeki Yasumasu, and Mutsumi Nishida, 2012. Remarkable consistency of exon-intron structure of hatching enzyme genes and molecular phylogenetic relationships of teleostean fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 94: 567-676. DOI: 10.1007/s10641-011-9920-1 査読有り

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) 高村早智・長澤竜樹・川口眞理・安増茂樹 「ニジマスの孵化酵素の精製とその卵膜分解作用」 第 67 回日本動物学会関東支部大会、早稲田大学(東京)、2015 年 3 月(ポスター発表)

(2) 佐藤ひかり・中島大輝・長澤竜樹・川口眞理・安増茂樹 「ニジマスの TGase の遺伝子発現とそのタンパク質の局在」 第 67 回日本動物学会関東支部大会、早稲田大学(東京)、2015 年 3 月(ポスター発表)

(3) 川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「多重コピー遺伝子の多様性～メダカ属の孵化酵

素の至適塩濃度～」第 85 回日本動物学会、東北大学(仙台)、2014 年 9 月(口頭発表)

(4) 長澤竜樹・川口眞理・安増茂樹 「チョウザメ孵化酵素の精製と卵膜の分解機構」 第 85 回日本動物学会、東北大学(仙台)、2014 年 9 月(口頭発表)

(5) 西尾祥郎・川口眞理・安増茂樹 「メダカ卵巣で合成される ZP タンパク質の局在」 第 85 回日本動物学会、東北大学(仙台)、2014 年 9 月(口頭発表)

(6) 佐野香織・川口眞理・壬生秀樹・大澤崇純・安増茂樹 「カライワシ類ハモとマアナゴの卵膜遺伝子の発現解析」 第 85 回日本動物学会、東北大学(仙台)、2014 年 9 月(口頭発表)

(7) 佐野香織・壬生秀樹・川口眞理・大澤崇純・安増茂樹 「真骨魚類における卵膜遺伝子と孵化酵素遺伝子の共進化」 第 16 回日本進化学会、高槻市・大阪、2014 年 8 月(ポスター発表)

(8) 長澤竜樹・川口眞理・矢野十織・岡部正隆・安増茂樹 「古代魚を用いた孵化腺細胞の発生進化的解析」 第 16 回日本進化学会、高槻市・大阪、2014 年 8 月(口頭発表)

(9) 川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「メダカ属の孵化酵素 HCE の至適塩濃度」 第 66 回日本動物学会関東支部大会、東京大学柏キャンパス(千葉)、2014 年 3 月(ポスター発表)

(10) 川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「メダカ孵化酵素 HCE の 2 つのアイソザイムの至適塩濃度」 第 84 回日本動物学会、岡山大学(岡山)、2013 年 9 月(口頭発表)

(11) 佐野香織・川口眞理・富田憲司・安増茂樹 「ニシンの卵膜の 2 層構造～卵巣由来と肝臓由来の卵膜～」 第 84 回日本動物学会、岡山大学(岡山)、2013 年 9 月(口頭発表)

(12) 川口眞理・安増茂樹 「卵胎生魚の孵化酵素遺伝子」 第 15 回日本進化学会、筑波大学(つくば)、2013 年 8 月(口頭発表)

(13) 佐野香織・川口眞理・渡部諭史・安増茂樹 「魚類の 2 つの進化系統において異なった運命をたどった孵化酵素の重複遺伝子」 第 15 回日本進化学会、筑波大学(つくば)、2013 年 8 月(口頭発表)

(14) 川口眞理・高橋洋・西田睦・安増茂樹
「トゲウオ類における孵化酵素の遺伝子重複による機能分化」第 83 回日本動物学会、大阪大学(大阪)、2012 年 9 月(口頭発表)

(15) 川口眞理・高橋洋・西田睦・安増茂樹
「トミヨ孵化酵素 LCE の卵膜分解における機能分化」第 14 回日本進化学会、首都大学東京(東京)、2012 年 8 月(ポスター発表)

(16) 佐野香織・川口眞理・安増茂樹 「魚類の卵膜構成タンパク質とその遺伝子の進化」第 14 回日本進化学会、首都大学東京(東京)、2012 年 8 月(ポスター発表)

(17) Kaori Sano, Mari Kawaguchi, and Shigeki Yasumasu. "Inferring the evolution of teleostean zp genes based on the site of expression." International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authenticating Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting (MCBEEC), Nagoya, Japan, 2012 November.

(18) Mari Kawaguchi, Hiroshi Takahashi, and Shigeki Yasumasu. "Sub-functionalization of duplicated genes during evolution." Stickleback 2012 7th International Conference on Stickleback Behavior and Evolution, Seattle, USA, 2012 July.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安増 茂樹(上智大学・理工学部・教授)
研究者番号：00222357

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

佐野 香織(城西大学・理工学部・助教)
研究者番号：70612092

川口 眞理(上智大学・理工学部・助教)
研究者番号：00612095