

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570240

研究課題名（和文）

酵素と基質の分子共進化の研究—硬骨魚の孵化の機構をモデルとして

研究課題名（英文）

Study on molecular co-evolution of enzyme and substrate

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

研究成果の概要（和文）：真骨魚類の孵化は、単一酵素系から、効率の良い2種（cladeIとII酵素）の分解系に進化したことがわかる。卵膜分解機構を調べると cladeI 酵素が祖先型活性を維持し、cladeII 酵素は、2つの新たな卵膜切断点を獲得することで新規機能酵素へと進化したことが考えられる。新規切断点の獲得は、卵膜の配列変化が強く関与していることが示唆される。本研究は、基質と酵素の分子共進化をタンパク質機能のレベルで示した一例となる。

研究成果の概要（英文）：In previous phylogenetic analysis, we suggested that fishes included in Elopomorpha, as basal teleosts, possess a single type of hatching enzyme genes, and that fishes in Otocephala and Euteleostei gain two types of hatching enzyme genes called clade I and II genes by duplication. The Elopomorph hatching enzyme and the clade I enzyme swell the egg envelope by cleaving the N-terminal regions of ZP proteins, while the clade II enzyme solubilizes the swollen envelope by cleaving the two specific sites at N-terminal of ZP domain and the middle region on the ZP domain. In the evolutionary scenario, our findings support that the clade I enzymes inherit the ancestral enzyme function, and the clade II enzymes gain a new function during evolution to Otocephala and Euteleostei. Our study also suggested that a change in the egg envelope protein during evolution strongly contributed to the acquisition of a new function of euteleostean clade II enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 進化生物学

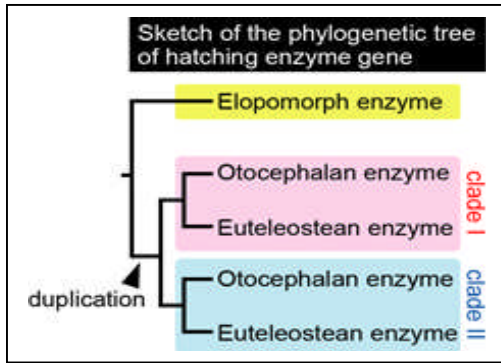
キーワード：機能進化、共進化、孵化酵素、遺伝子重複、卵膜

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類孵化酵素は、成熟酵素部分は約200アミノ酸残基で、アスタシンファミリーと呼ばれる金属プロテアーゼ群に属する。我々は、硬骨魚類孵化酵素の分子系統樹を作成した。その結果、分岐の早いカライワシ類

（Elopomorpha）の魚では、孵化酵素は、単一グループを形成するが、その後分岐した正真骨魚類（Euteleostei）とニシン・骨鰈類（Otocephala）では、孵化酵素遺伝子は、それぞれ2種のグループに分かれる。このことは、正真骨魚類とニシン・骨鰈類の共通祖先で遺

伝子重複が起こり、2種の遺伝子が生じたことが示される(図)。一方、正真骨魚類の2



種の孵化酵素タンパク質(HCE/cladeI酵素とLCE/cladeII酵素)は、良く研究されている。HCEが部分分解により卵膜を膨潤させ、LCEが膨潤卵膜を可溶化するという、2種の酵素の共同作用で孵化が行われる。一方、カライワシ類のウナギでは、単一酵素で卵膜を軟化・膨潤させ胚の運動で卵膜を破って孵化をする。このことは、硬骨魚類の祖先型の孵化は、単一酵素による卵膜の膨潤で、進化過程の遺伝子重複により、2種の酵素による卵膜の完全可溶化という、効率の良い系に進化したことが示唆される。

2. 研究の目的

DNA配列決定とその解析技術の進歩により、遺伝子レベルでの進化の研究は、盛んに行われ目覚ましい進歩を遂げている。しかし、DNA配列から得られるタンパク質の情報からは、そのタンパク質の細かい機能を推定することは困難である。一方、タンパク質構造自身とそれら相互作用の複雑さから、タンパク質機能進化の研究の進歩は遅く、研究報告も多くない。前述したように、孵化酵素は、硬骨魚類の進化過程で遺伝子が重複し、重複遺伝子が機能分化して効率の良い卵膜分解系を形成していることがタンパク質レベルの研究で明らかとされている。生物が複雑化する過程で、遺伝子重複により遺伝子数を増加してきた。これは、増幅後の遺伝子の一つが本来の機能を維持し、一方が新規機能を獲得した結果であると考えられる。孵化酵素による卵膜の分解系は、遺伝子重複と新規機能遺伝子の創生の研究の良い例となる。また、孵化酵素の基質は卵膜であり、卵膜分解機構を維持し進化している。本研究は、題名にあるように孵化酵素と卵膜分子の分子共進化機構を分子レベルで解明することを目指している。

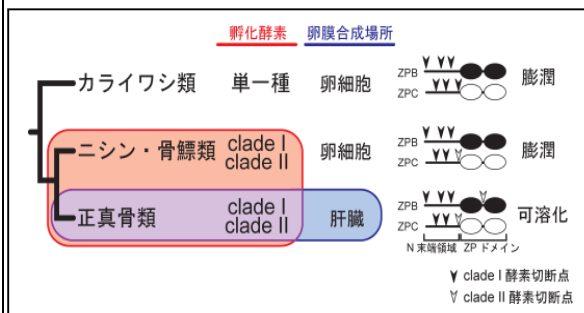
3. 研究の方法

各硬骨魚類系統で、代表的な魚種を用い、孵化酵素の精製とその卵膜分解機構を調べる。酵素の卵膜タンパク質の切断点の決定と

その結果である卵膜の形態変化を解明した。また、卵を取得できない魚種においては、大腸菌を用いてリコンビナント孵化酵素を作成して、卵膜分解機構を解明した。卵膜の分解機構を魚種間で比較し、その機能進化過程を推察した。ゼブラフィッシュ孵化酵素においては、リコンビナントタンパク質を作成し、結晶構造解析により3次元構造を解明する。孵化酵素の基質特異性を魚種で比較して、進化過程でどのように変化したか、または重複後生じた2つの孵化酵素の基質特異性を比較した。

4. 研究成果

孵化酵素の卵膜分解様式を比較すると、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(Sano et al. 2010)。2種の酵素系では卵膜が完全に可溶化し、一つ酵素(HCE/cladeI酵素)が卵膜膨潤化の活性を持ち、もう一方(LCE/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。各酵素の卵膜切断点を調べるとcladeI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cladeI酵素酵素とは異なる2箇所を切断する(Yasumasu et al. 2010)。つまり、LCE/cladeII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(図)。正真骨魚類とニシン・骨鰈類は、



ともに2種の酵素を持つ。しかしながら、ミルクフィッシュの卵膜分解系を調べると、そのcladeII酵素は、正真骨魚類のそれとは異なった卵膜分解作用を示す。つまり、新規機能を獲得したのは、正真骨魚類のLCE/cladeII酵素で、ニシン・骨鰈類cladeII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。ニシン・骨鰈類cladeII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・骨鰐類では、早くに分岐するグループ(ニシン目と骨鰐類の一部)が2種の酵素をもち、のちに分岐するグループ(分岐の遅い骨鰐類)では、clade II 酵素が失われて clade I 酵素の単一酵素系であることが分かっている。おそらく、ニシン・骨鰐類の進化過程で clade II 酵素は、正真骨魚類の LCE/ clade II 酵素と異なり新規機能(Mid-ZPd は切断)を獲得せず、その結果、失われたと推察される。孵化酵素卵膜切断点のペプチドを用い酵素の基質特異性を比較した。その結果、clade I 酵素は、その特異性が進化過程でよく保存されていることが分かった。一方、clade II 酵素も、正真骨魚類とニシン・骨鰐類間で大きな特異性の変化は見いだされなかった。

一方、ニシン・骨鰐類 ZP-タンパク質の Mid-ZPd 切断点に対応する配列を比較すると、そこにはプロリンの連続配列が保存されている。一方、正真骨魚類の Mid-ZPd には、プロリン配列は見られない。つまり、卵膜の配列変化が新たな切断点の獲得、つまり孵化酵素の新規機能に強く関与していることが示唆される。卵膜の構成タンパク質は、正真骨魚類では主に肝臓で、ニシン・骨鰐類では卵細胞で合成されることが報告されている。今回、新たにカライワシ類の魚(ウナギ)で調べると、その遺伝子は、卵細胞で発現していた(Sano et al. 2010、図)。この結果は、正真骨魚類に至る進化過程で卵膜構成タンパク質遺伝子の発現が、卵細胞から肝臓へシフトしたことが予想される。これらの結果は、孵化酵素遺伝子重複時期と前後して卵膜構成タンパク質遺伝子に大きな変化が起きたことが予想され、遺伝子の共進化という観点から興味深い。今後、卵膜構成タンパク質遺伝子の分子進化を詳細に調べる必要があるとらう。

また、大腸菌発現系を用いて作成したリコンビナント孵化酵素を用い3次元構造の解明に成功した(Okada et al. 2010)。これは、孵化酵素と卵膜の分子共進化過程をアミノ酸の変異のレベルで解析するための基礎的な情報となる。

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 12 件)

1. Kawaguchi M, Yasumasu S, Shimizu A, Sano K, Iuchi I, Nishida M. Conservation of the egg envelope digestion mechanism of hatching enzyme in euteleostean fishes. FEBS J. 査読有 2010 277: 4973-4987
2. Sano K, Kawaguchi M, Yoshikawa M,

- Iuchi I, Yasumasu S. Evolution of the teleostean zona pellucida gene inferred from the egg envelope protein genes of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. FEBS J. 査読有 2010 277: 4674-4684
3. Kawaguchi M, Hiroi J, Miya M, Nishida M, Iuchi I, Yasumasu S. Intron-loss evolution of hatching enzyme gene in Teleostei. BMC Evol Biol. 査読有 2010 27 10:260
4. Okada A, Sano K, Nagata K, Yasumasu S, Ohtsuka J, Yamamura A, Kubota K, Iuchi I, Tanokura M. Crystal structure of zebrafish hatching enzyme 1 from the zebrafish *Danio rerio*. J Mol Biol. 査読有 2010 8:402 865-878
5. Yasumasu S, Kawaguchi M, Ouchi S, Sano K, Murata K, Sugiyama H, Akema T, Iuchi I. Mechanism of egg envelope digestion by hatching enzymes, HCE and LCE in medaka, *Oryzias latipes*. J Biochem. 査読有 2010 148: 439-448.
6. Sano K, Kawaguchi M, Yoshikawa M, Kaneko T, Tanaka T, Iuchi I and Yasumasu S. Hatching enzyme of Japanese eel *Anguilla japonica* and the possible evolution of the egg envelope digestion mechanism. FEBS J. 査読有 2011 278: 3711-3723
DOI : 10.1111/j.1742-4658.2011.08289.x.

[学会発表] (計 14 件)

1. 野村健太郎・川口眞理・竹花佑介・成瀬清・安増茂樹 アユ孵化酵素遺伝子群のゲノム構造の探査第 64 回日本動物学会関東支部大会 2011 年 3 月 17 日 東邦大学習志野キャンパス
2. 佐野香織・川口眞理・井内一郎・安増茂樹 ニシン・骨鰐類の 2 種の孵化酵素の孵化酵素と卵膜の分子共進化卵膜分解機構 第 82 回日本動物学会 2011 年 9 月 22 日 旭川市大雪クリスタルホール
3. 川口眞理・西田睦・安増茂樹 孵化酵素と卵膜の分子共進化第 13 回日本進化学会 2011 年 7 月 30 日 京都大学
4. 佐野香織・川口眞理・安増茂樹 タンパク質機能の進化：魚類孵化酵素による卵膜分解メカニズム 13 回日本進化学会 2011 年 7 月 30 日 京都大学
5. Kaori Sano, Mari Kawaguchi, and Shigeki Yasumasu: Evolution of protein function: the mechanism of egg envelope digestion by fish hatching enzymes as a model. Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution 2011年7月27日 京都大学

〔図書〕（計 1 件）

1. Yasumasu S, Sano K, Kawaguchi M
Molecular evolution of teleostean hatching enzymes and their egg envelope digestion mechanism: an aspect of co-evolution of protease and substrate. In Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease and Evolution. Edited by Hiroyuki Takeda, Kiyoshi Naruse and Minoru Tanaka. Springer, chapter 24, 2011 pp361-374.

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

西田 睦 (NISIDA MUTUMI)

東京大学 海洋研究所・教授

研究者番号：90136896

永田 宏次 (NAGATA KOJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

授

研究者番号：30280788