

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770230

研究課題名(和文) 進化過程における新規機能遺伝子の誕生～真骨魚類孵化酵素をモデルとして

研究課題名(英文) Neofunctionalization of a duplicate hatching enzyme gene during the evolution of teleost fishes

研究代表者

佐野 香織 (Sano, Kaori)

城西大学・理学部・助手

研究者番号：70612092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：真骨魚類の孵化酵素遺伝子は、遺伝子の重複・多様化進化過程で、重複遺伝子の一方が新規機能を獲得して、効率の良い卵膜の分解系が生じたことが分かっている。メダカの機能維持遺伝子(HCE)に変異を入れた変異リコンビナントタンパク質を大腸菌の系を用いて作成し、新規機能活性を持つ酵素(LCE)の作成を試みた。HCEのアミノ酸のうち5残基をLCE様に変化させた孵化酵素を作成したところ、LCEの特異的な切断点のペプチドを分解する活性が得られることができた。本研究は、進化過程でのどのようなアミノ酸変異が、新規機能獲得遺伝子を生じるかを解明する手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：In teleosts, hatching enzyme gene diversification has occurred in the common ancestor of Otocephala and Euteleostei, such that members of these subdivisions possess two types of hatching enzyme genes, belonging to clade I and clade II. Our previous study suggested that the clade I enzyme maintained the ancestral function, while the clade II enzyme gained new function (neofunctionalization). Medaka *Oryzias latipes*, belonging to Euteleostei, hatch by cooperative action of clade I and II enzymes, and the substrate specificities of them are completely different. To elucidate the amino acid substitutions important for change of substrate specificity, the recombinant clade I enzyme which was substituted nine of the two hundreds amino acids to clade II enzyme type (clade I mut9) was generated by *E. coli* expression system. The clade I mut9 changed the substrate specificity to be similar to that of clade II enzyme, and cleaved the peptides designed from clade II enzyme specific cleavage sites.

研究分野：機能進化学

キーワード：新規機能獲得遺伝子 孵化酵素

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 孵化酵素は孵化時に卵膜を分解する酵素である。進化過程において、真骨魚類の孵化遺伝子は、遺伝子重複・多様化によって1種から2種へ増えたことが知られている。そのため、進化的に初期に誕生したカライワシ類は単一種の孵化酵素遺伝子を持ち、後期に分岐したニシン・骨鰈類や正真骨類は、分子系統解析においてclade I, clade IIという別々のクレードに分類される2つの孵化酵素遺伝子をもつ。

(2) いくつかの魚種の卵膜分解作用から、2種の酵素による分解系は、clade I酵素が単一種の酵素と同様に卵膜を膨潤させる機能を持つ祖先型酵素であり、clade II酵素が卵膜を可溶化する新規機能酵素であることが明らかとなった。祖先型酵素と新規機能酵素の間の配列は55%程度の相同性があり、それぞれの結晶構造解析の結果、非常によく似た骨格構造をしていることが明らかになっている。

#### 2. 研究の目的

clade Iとclade II酵素の2つの孵化酵素による卵膜分解では、各酵素の基質特異性が異なるため卵膜タンパク質の別々の部位を切断する。遺伝子重複後のどのようなアミノ酸変異により祖先型酵素から新規機能の特異性に变化したのかを明らかとし、進化過程における新規機能獲得過程を実験室で再現することを目指した。

#### 3. 研究の方法

メダカのclade I酵素 (MHCE) の様々な領域にアミノ酸変異が入るように作成した変異入りリコンビナント MHCE を大腸菌を用いた発現系で作成した。卵膜及びペプチド基質を用いて、clade II 酵素 (MLCE) 様の特異性に变化する変異サイトの特定を目指した。

#### 4. 研究成果

(1) ニシン・骨鰈類に属するニシン目ニシンおよびカタクチイワシの ZP 遺伝子をクローニングし、系統解析を行った。ニシン目の魚種は卵巣で発現する ZP 遺伝子と肝臓で発現する ZP 遺伝子を持つことが明らかとなった。

(2) ニシン・骨鰈類、ネズミギス目に属するミルクフィッシュの卵膜分解メカニズムを解明し、ニシン・骨鰈類に属する魚種の2種類の孵化酵素(clade I, clade II)による卵膜分解メカニズムが初めて明らかとなった。

(3) 正真骨類メダカの clade I 酵素、MHCE のアミノ酸のうち9残基を clade II 様に変化させた変異入りリコンビナント MHCE を作成し、基質特異性を比較したところ、wild MHCE とは異なるペプチド分解特異性を示し、メダカ clade II 酵素、MLCE の特異的な切断点のペプチドを分解する活性が得られることがわかった。

#### 5. 主な発表論文等

( [雑誌論文] (計5件)

Kaori Sano, Mari Kawaguchi, Satoshi Watanabe, Shigeki Yasumasu. Neofunctionalization of a duplicate hatching enzyme gene during the evolution of teleost fishes. BMC Evolutionary Biology. 査読あり vol. 14 2014, pp. 221-235.

DOI: 10.1186/s12862-014-0221-0

Mari Kawaguchi, Kenji Tomita, Kaori Sano, Toyoji Kaneko. Molecular events in adaptive evolution of the hatching strategy of ovoviviparous fishes. Journal of Experimental Zoology Part B, 査読あり

り、vo. 324, 2014, pp. 41-50.

DOI: 10.1002/jez.b.22601.

Mari Kawaguchi, Kaori Sano, Norio Yoshizaki, Daisuke Shimizu, Yuichiro Fujinami, Tsutomu Noda, Shigeki Yasumasu. Comparison of hatching mode in pelagic and demersal eggs of two closely related species in the order

Pleuronectiformes. *Zoological Science*, 査読あり、vol. 31, 2014, pp. 709-715.

DOI: 10.2108/zs140018.

Kaori Sano, Mari Kawaguchi, Satoshi Watanabe, Nagakura Y, Takashi Hiraki, Shigeki Yasumasu. Inferring the Evolution of Teleostean *zp* Genes Based on Their Sites of Expression. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)*, 査読あり、vol. 320, 2013, pp. 332-343.

DOI: 10.1002/jez.b.22507.

Mari Kawaguchi, Shigeki Yasumasu, Akio Shimizu, Norio Kudo, Kaori Sano, Ichiro Iuchi, Mutsumi Nishida. Adaptive evolution of fish hatching enzyme one amino acid substitution results in differential salt dependency of the enzyme. *Journal of Experimental Biology*, vol. 216, 2013, pp. 1609-1615.

DOI: 10.1242/jeb.069716.

〔学会発表〕(計9件)

佐野香織、カライワシ類ハモとアマナゴの卵膜遺伝子の発現解析、日本動物学会第85回仙台大会、2014年9月11~13日、東北大学川内北キャンパス

佐野香織、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、日本進化学会第16回大会、2014年8月21~24日、高槻現代劇場

佐野香織、卵膜タンパク質の進化と合致した孵化酵素だけが獲得した卵膜分解メカニズ

ム、日本進化学会第15回筑波大会、2013年8月28~31日、筑波大学

佐野香織、ニシンの卵膜の2層構造~卵巣由来と肝臓由来の卵膜~、日本動物学会第84回岡山大会、2013年9月26~28日、岡山大学

長澤竜樹、アカハライモリ慰撫域胃部域プロテアーゼのクローニング、日本動物学会第84回岡山大会、2013年9月26~28日、岡山大学

Kaori Sano, 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) November 12-16, 2012, Nagoya, Japan

佐野香織、魚類の卵膜構成タンパク質とその遺伝子の進化、日本進化学会第14回東京大会、2012年08月21~24日、首都大学東京

佐野香織、生殖細胞の増殖と維持における *fgf24* の役割、日本動物学会第83回大阪大会、2012年09月13~15日、大阪大学

長澤 竜樹、アカハライモリ成体胃部域アスパラギン酸プロテアーゼの精製と発現時期の解析、日本動物学会第83回大阪大会、2012年09月13~15日、大阪大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 香織 (SANO, Kaori)

城西大学理学部化学科・助手

研究者番号: 70612092

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし