

識別番号 P 1 4

研究課題 アスタシンファミリータンパク質の機能的・構造的多様化の研究

研究代表者 安増 茂樹 (生命科学研究所)

共同研究者 土屋 隆英、神澤 信行、本田 みちよ (理工学部 化学科)

Summary Study on Functional and Structural Diversification of Astacin Family Proteases

During the evolution of organisms, genes are generally considered to increase in number by duplication. Such duplicated genes, called family genes, were diversified to have a variety of functions. The group of S. Yasumasu, Life Science Institute, has been studying "fish hatching enzyme" belonging to the astacin family. The members of Laboratory of Biological Chemistry, Department of Chemistry, proceed to research "ALSM", which belongs to the same family. From structural, functional and evolutionary aspects, we discuss our results that were obtained in each laboratory and/or with some cooperative researches. The collaboration contributes to graduate students learning a method for manipulating the genome information.

1. 共同研究の目的及び背景

生物は単純な構造から複雑な構造へと進化してきた。この過程で遺伝子は重複により数を増やしてきたと考えられている。重複した遺伝子は様々な機能を持つ遺伝子へ多様化する。これらの遺伝子群をファミリーと呼ぶ。生命科学研究所・発生学研究室と化学科・生化学教室は、それぞれ、孵化酵素と ALSM というタンパク分解酵素の研究を行なっている。両者はアスタシンファミリーという同一の酵素群に属する。両研究室で研究協力し、アスタシンファミリー酵素タンパク質をモデルとして、タンパク質の機能的構造的多様化の道筋を明らかにする。共同研究は、最終年（3年目）となった。両研究室の研究成果を報告する。

2. 魚類孵化酵素の分子進化（発生学研究室）

○孵化酵素遺伝子の系統依存的イントロンの消失

多くの多細胞動物の卵は、卵膜により囲まれている。孵化酵素は、孵化時に胚体より分泌され卵膜を可溶化する酵素である。孵化酵素は、胚発生初期に、特殊に分化した孵化腺細胞で集中的に合成され、その後は合成されない特殊なタンパク質である。また、その作用は卵膜分解であり、卵膜タンパク質の孵化酵素による分解と言う比較的単純な基質-酵素系で解析できることなど、機能の進化を分子のレベルで解析できる材料である。

我々は、硬骨魚類孵化酵素遺伝子の分子進化を調べるため、真骨魚類の全域を網羅する様に、カライワシ上目とニシン・骨鰈類に属する全ての目、正真骨魚類の主な目に対応する26種の魚より孵化酵素遺伝子を単離した。その結果、孵化酵素遺伝子が系統依存的にイントロンを失っていることが明らかとなった。一般的に相同遺伝子の脊椎動物のエキソン-イントロン構造は種を超えて保存されており、これらの結果は、イントロンの消失と孵化機構に一石を投じるもので、世界で初めての報告となる。これらの研究の一部は、すでに発

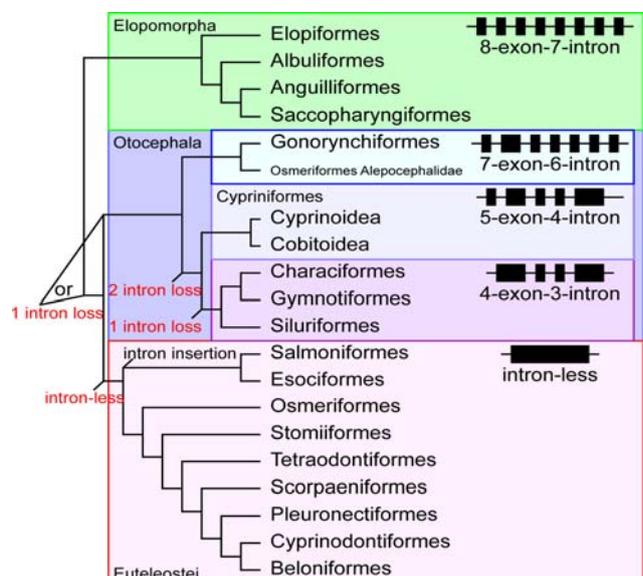


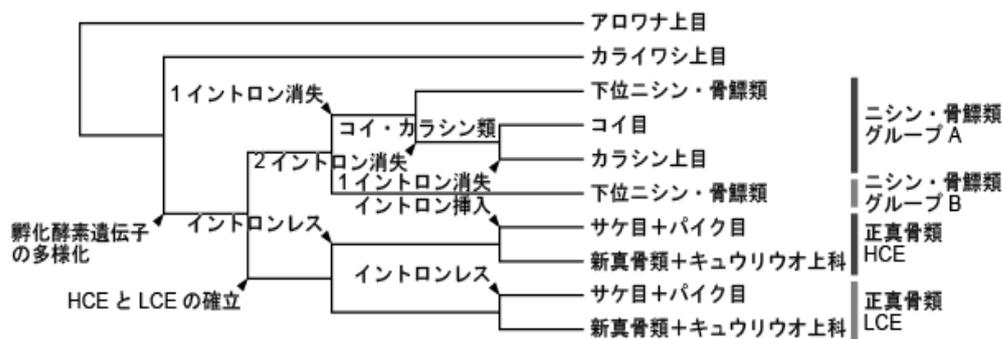
表 (2006, Dev Genes Evol, 2007, Gene) 済みである。図は、それぞれの魚種の孵化酵素遺伝子のエクソン-イントロン構造を、近年発表されたミトコンドリアゲノム配列より作成された分子系統樹 (西田・宮) に書き込んだものである。ウナギが属するカライワシ上目 (Elopomorpha) の孵化酵素遺伝子では全ての魚種で 8 つのエクソンからなる構造をしており、その後、系統が新しくなるにつれて、イントロンの数が段階的に減少していた。調べたすべての正真骨魚類 (Euteleostei) の魚種では孵化酵素 (HCE) は、イントロンのない構造をしており、ニシン・骨鰈類 (Otocephala) では、イントロン数が系統依存的に段階的になくなっていることが示された (図)。正真骨魚類とニシン・骨鰈類は早くに側系統的 (paraphyletic) に分岐していることから、この 2 つの系統に起こったイントロン消失の現象は独立に起こったものと予想される。他の脊椎動物孵化酵素のエクソン-イントロン構造もまた、ウナギのそれと類似していることから、イントロンの段階的な消失は魚類孵化酵素遺伝子特異的に起きた現象といえる。これまで報告されている遺伝子のイントロンの消失はレトロウイルスなどの逆転写酵素を介した cDNA との相同組み換えによると考えられているが、孵化酵素遺伝子に見られる系統依存的イントロン消失はこの例に含まれず、進化の過程で新たなイントロン消失のメカニズムの存在したことが示唆される (76 回動物学会、シンポジウム発表)。新たに考えられる機構として、ゲノム DNA 上で組み換えがイントロンの消失につながった可能性がある。

○卵膜分解機構の進化

硬骨魚類孵化酵素遺伝子の系統樹を俯瞰すると、あらたに興味深いものが見えてくる。進化過程で遺伝子重複と多様化により魚種あたり複数の孵化酵素遺伝子が存在し、その分子種により幾つかの系統に分けることができることを明らかとなった。それらの系統では、異なった卵膜分解系が存在することが示唆される。

孵化酵素の卵膜分解機構は、当研究室でメダカを用いて良く研究されている。メダカ孵化酵素は、2 種のタンパク質分解酵素 (HCE と LCE) の酵素系であり、2 つの酵素が共同して卵膜を分解する。HCE が卵膜を部分分解し膨潤させ、LCE が膨潤卵膜を完全分解する。しかしながら、真骨魚類の孵化酵素遺伝子分子系統樹を作成すると、HCE-LCE 系の他に、幾つか異なった機構を持つ分解系が存在することが示された。

正真骨魚類の孵化酵素遺伝子はすべて多重遺伝子である。カライワシ上目のウナギでは、アミノ酸配列の類似した複数の遺伝子が存在することから、孵化酵素は単一種であると考えられる。一方、ニシン・骨鰈類の魚種の孵化酵素は、2 つのグループ (グループ A、B) を形成することから、それぞれの魚に 2 種の孵化酵素が存在することがわかる。さらにゼブラフィッシュなどが属するコイ・カラシン類では、グループ B の遺伝子が無くなっており、単一種の酵素系であろうと考えられる。正真骨魚類の魚からは HCE と LCE の両遺伝子がクローン化されることより、メダカと同様な酵素系 (HCE-LCE system) が確立していると考えられる (図)。すなわち、カライワシ上目以降に遺伝子重複と多様化により、コイ・カラシン類では 2 種の酵素 (グループ A, B) による分解系が、正真骨魚類では HCE-LCE 系が生じたと考えられる。このように、分岐の古いウナギなどのグループの単一酵素による比較的単純な卵膜分解系



から、その後の遺伝子進化の過程で2つの酵素による卵膜分解系を確立したと考えられる。それぞれの分解系を代表する魚種を選択肢して、その分解機構をタンパク質レベルで調べることを目標とする。

本研究は、孵化酵素という特殊なタンパク質をあつかった研究である。しかしながら、進化過程でのイントロンの消失は、近年注目されている遺伝子構造の進化の分野にあたり、また本研究の主題である、また、卵膜分解機構の進化の研究は、卵膜と孵化酵素の“分子共進化”の機構の解明につながり、無類の研究分野を開拓するものである。

3. イカ類の ALSM 遺伝子の分子進化 (化学科、生化学教室)

我々は、イカの体壁筋に多量に存在するミオシンを分解する酵素として、Astacin-like squid metalloprotease (ALSM)を発見した。ALSMは金属依存性のタンパク質分解酵素であり、astacinと類似の酵素活性部位を持つことから astacin super family の一員に数えられている。当初、ALSMはスルメイカとヤリイカの体壁筋に存在するものと考えられていた。しかし、最近の我々の研究により、ALSMは主に消化器官を中心に存在し、体壁筋だけでなく多くの組織に分布していることが明らかになった。しかし、その生理的機能は不明であり、分子構造のユニークさから他の astacin family member には見られない機能があるのではと考えられている。本研究は、イカ特異的に見出された ALSM の機能を明らかにするという基礎科学としての側面と、もう一方で水産加工品へのイカの応用という応用科学の側面がある。かまぼこなどの水産加工品は古くから日本の文化として認知され、長期保存が可能な貴重なタンパク質源ともなっている。しかし、その材料となるスケトウダラの水揚げ量は年々減少しており、平成 18 年度の水産庁発表の統計では 208 千 t と、イカの総水揚げ量 284 千 t より少なくなっている。しかし、イカはその肉質のもろさから加工が難しく、コウイカを除き加工品への応用は進んでいない。イカの種類ごとの水揚げを見ると、スルメイカが 157 千 t であるのに対して、コウイカは 7 千 t である。上述の通り、ALSM はイカ体壁筋に多量に存在するミオシンを分解し、その活性を調節することで加工の際の肉質をコントロールできることがこれまでの研究で明らかになっている。また、予備実験ではコウイカとアオリイカの肝臓には ALSM 様の活性があるものの、体壁筋にはその活性が見られないことが示されている。この様に、イカの肉質変化と ALSM の活性は応用面から非常に興味深い。本研究では、スルメイカとヤリイカですで見出されていた ALSM が他のイカにも存在するのか。またその分子構造はどのようになっているのかを明らかにする目的で、コウイカおよびアオリイカについても ALSM の存在を分子レベルで検討した。

イカ類の一般的分類は、その形態等を指標として行われ、大きくコウイカ目とツツイカ目に大別される。ツツイカ目はさらにスルメイカ亜目とヤリイカ亜目に分類されている。アオリイカは、ヤリイカ亜目に分類されるが、その形態はコウイカと類似する。また、アオリイカについて遊泳法もヤリイカとは異なり、ヤリイカが口からのジェット水流によって速やかな動きをするのに対して、アオリイカはコウイカ同様にその広く広がったヒレを使い、浮遊により移動する。当初、ALSM の局在が体壁筋に存在しないという共通点から、一般的な分類とは異なりコウイカとアオリイカには類似した ALSM が存在しているのではと考えていた。しかし、実際に ALSM 遺伝子を単離し、その相同性を比較すると全く予想しなかった結果が得られた。スルメイカやヤリイカにはそれぞれ2種類の ALSM 分子種が存在する。スルメイカには ALSM-I と-II が、ヤリイカには ALSM-I と III が確認されている。遺伝子の相同性を比較した結果、コウイカとアオリイカに ALSM-I と高い相同性を示すものと、ALSM-III と高い相同性を示す2種の ALSM が存在することが明らかになった。これまで、限られたイカでしか ALSM が確認されていなかったが、ツツイカ目とコウイカ目

