

識別番号 P 8

2007 年度完了学内共同研究

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・発生学研究室)

共同研究者 土屋 隆英、神澤 信行、本田 みちよ (化学科・生化学教室)

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, Laboratory of Developmental Biology, 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 and using computer.

## 1. 共同研究の目的及び背景

### ○研究の目的

本協同研究で行う硬骨魚類の遺伝子構造の進化過程での変化、孵化酵素卵膜分解機構進化、イカの ALSM とチョウザメの相同遺伝子の機能研究は、ともに生物進化をあつかった研究である。つまり“生物の歴史”という大きな題材を含んでいることである。分子生物学の技術革新により、生物の進化が DNA 配列の変化として具体的に研究できる環境が整い、進化研究は盛んになってきている。両研究室の研究が、生物進化の分野に一石を投ずる研究となることをめざす。

すでにヒトを含めた数十種の生物のゲノム全配列が解読され、それを基にした進化の研究が世界中で行なわれており、我々は、ひとつのコンピューターがあれば、それを利用し解析することができる。共同研究の目的は研究の推進に加えて、“新しいタイプの研究者”を育成する事である。生物の全塩基配列の決定により生物学研究者の手法は様変わりして来ている。配列情報を利用すれば、研究者のアイデア一つで、今まで数年かかっていた研究が数日で結果を得ることが出来る。この状況のもと、実験だけでなく、公開されている遺伝子の配列情報を有効に活用できる資質を持つ研究者が必要とされている。塩基配列の処理に用いるコンピューターソフトを実際の研究に用いるアイデアを積極的に議論する。そのような研究は、経験豊富な研究者より、しばしば、頭の柔軟な学生が発案する場合があります、そのような場を提供する。

### ○研究活動

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研究した。また、発表には至っていないが、発生生物学研究室でチョウザメよりクローン化された遺伝子が、生化学教室の ALSM と深く関連することがわかった。現在、その研究は生化学教室修士学生のテーマとなっている。このように、両研究室の独立の研究過程で、情報を密に交換することで新たな共同研究に発

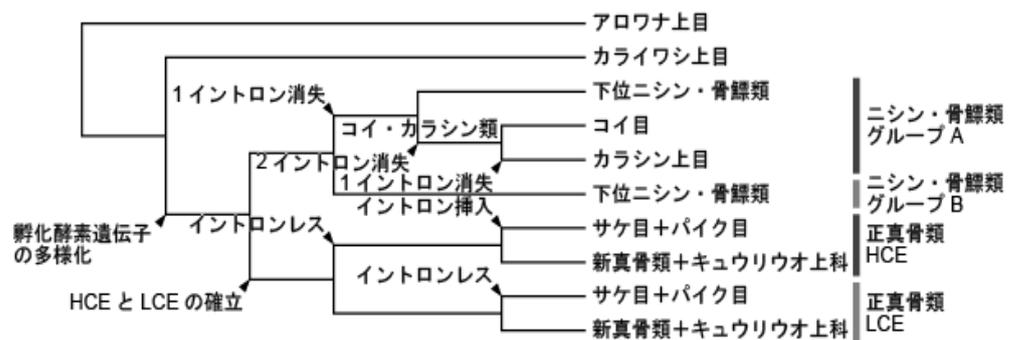
展してきている。この点は、共同研究の大きな成果の一つと考えている。以下に両研究室のそれぞれの研究成果を報告する。

## 2. 卵膜分解機構の進化（発生学研究室）

われわれは、約 30 種の魚から、孵化酵素遺伝子をクローン化して、硬骨魚類孵化酵素遺伝子の分子系統樹を作製した。その結果、真骨魚類孵化酵素遺伝子が、イントロンを失う方向へ進化しているという、他に例のない、世界で初めての現象を捉えることに成功した（図）。一方、その系統樹を俯瞰すると、あらたに興味深い側面が見えてくる。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。正真骨類の魚から一様に HCE と LCE 遺伝子がクローン化されることから、正真骨類では HCE-LCE 系が確率していると考えられる。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、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。

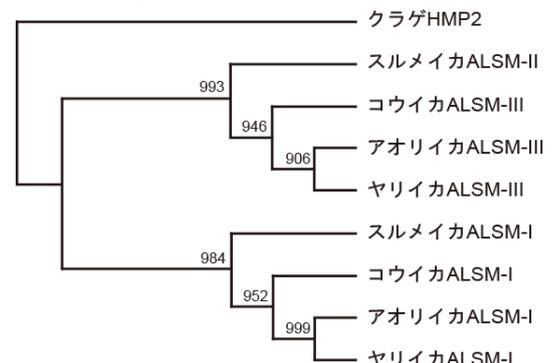


## 3. イカ類の ALSM 遺伝子の分子進化（化学科、生化学教室）

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の両方に ALSM が存在することが今回初めて明らかになったことから、ALSM はイカ目に共通に存在するタンパク質であることが考えられた。また、どのイカにも 2 種の ALSM が存在し、I 型が共通し、II 型と III 型がもう一つのグループを作っていることが明らかになった。さらに、I 型だけに着目すると、アオリイカはこれまでの一般的分類で示されているようにヤリイカと最も近縁であり、コウイカが次に近いことが明らかになった。注目すべきは、同じツツイカ目に分類されていたスルメイカはヤリイカとコウイカでつくられるクラスターの外に繋がり、遠縁に当たることが明らかになった (図)。このことは、これまでの形態を元にした一般的な分類とは異なり、新規の知見に繋がると考えている。上記の通り、本研究からは ALSM がイカ全般に存在するタンパク質であることと、その分子の遺伝情報から新規の分類体系が作りうる事が示された。一方で応用の面から考えると、ALSM は普遍的に存在しているにもかかわらず、その活性や局在はイカの種によって異なることから、ALSM の活性を調節する要因がそれぞれの種によって異なることが考えられる。



#### 4. 研究成果

本申請課題の研究で、6報の原著論文を国際誌に掲載し、大学院生がそれらの筆頭または、共著者となっている。また、動物学会で3回のシンポジウムを含め、学会で大学院生の発表の場をたくさん供給することができた。両研究室で十分な研究の成果が上がっている。それに加え、学生の論文作成法、発表法の享受という大学院生の教育面において貢献し、学位取得者1名、修士取得者5名（一名は博士課程に進学）も学内共同研究の成果といえる。