

識別番号 P 3 2010 年度完了学内共同研究
研究課題 遺伝子の多様化とタンパク質の機能進化
研究代表者 安増茂樹 (理工学部物質生命理工学科)
共同研究者 田宮徹 (理工学部物質生命理工学科)、神澤信行 (理工学部物質生命理工学科)
Summary Gene Diversification and Evolution of Protein Function

During the evolution of organisms, genes are generally considered to increase in number by duplication. Such duplicated genes were diversified to have a variety of functions. By the progress of technology of DNA sequencing, we are able to know the evolutionary pathway of genes at the DNA level. However, the research for the evolution at the protein level is attendant on some difficulty, because of complexity of proteins structure and their interaction. The group of S. Yasumasu, Laboratory of Developmental Biology, has been studying "molecular and functional evolution of fish hatching enzyme". The members of Laboratory of Biological Chemistry proceed to research "study on the function of astacin like protease of sturgeon" and "molecular and functional evolution of snake venoms". From 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 the methods for molecular biotechnology, such as the protein expression of *E. coli* expression system and the production of the transgenic animals.

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。塩基配列決定法の技術革新により、比較ゲノムや分子系統解析法の開発など分子進化の研究は著しく進歩している。しかしタンパク質機能進化の研究は、タンパク質それ自身の構造の複雑さ、生体内におけるタンパク質の反応機構の複雑さにより困難を伴い、研究の進歩は遅く、これからの研究課題である。本共同研究では、遺伝子の重複過程におけるタンパク質の機能進化に焦点を当てて、発生学研究室と生化学教室は、それぞれ、孵化酵素、チョウザメアスタシン、蛇毒タンパク質を用い進化的研究を行なっている。構成員は、タンパク質の機能的構造的な多様化の道筋を明らかにすることを目的とする。共同研究の研究成果を報告する。

2. 研究成果

○孵化酵素遺伝子の分子進化と機能進化(安増 茂樹) 孵化酵素とは孵化時に胚体より分泌されるタンパク質分解酵素である。その基質は胚を覆う卵膜で、これを分解し胚が外界に出ることが孵化である。硬骨魚類の孵化酵素遺伝子は、当研究室において分子系統樹が作成されている。これによると、カライワシ類では単一であった孵化酵素が、その後に分岐する正真骨類とニシン・骨鰐類の共通祖先で遺伝子重複・多様化がおり 2 種の酵素系 (clade I, clade II 酵素) へと進化してきたことが示された。また、ニシン・骨鰐類ではのちの進化過程で clade II 遺伝子が消失し、再び単一酵素系になったと予想される。私はこれら魚種の卵膜分解メカニズムを解明・比較して硬骨魚類における孵化酵素の卵膜分解における機能の進化を明らかとすることを目的とした。正真骨類の卵膜分解メカニズムはメダカを用いてよく調べられている (Yasumasu et al., 2010)。cladeI/HCE は卵膜を構成している ZP タンパク質の N 末端領域を細かく切断して卵膜を“膨潤”させ、cladeII/LCE は、卵膜タンパク質の 2 箇所、middle of ZP domain (mid-ZPd) と N-terminus of ZP domain (N-ZPd) を切断してこの膨潤卵膜を“可溶化”させる。特に、卵膜の骨格構造を形成している ZP ドメインの中心部に存在する mid-ZPd の切断は、大きな構造変化をもたらし、それが可溶化につながると予想される。両酵素は、それぞれの切断点に対する特異性は高く、卵膜の構造に依存的で、明確な役割分担により協同して卵膜を完全分解することが示されている。一方、ニシン・骨鰐類に属するゼブラフィッシュの孵化は clade I に属する ZHE1 の単一酵素系による卵膜分

解だった。ZHE1 は ZP タンパク質の N 末端領域を切断し卵膜を膨潤させた。この分解様式は正真骨類の clade I に属する HCE のものとよく似ていた。このことから clade I に属する酵素の卵膜分解様式はよく保存されていることが分かった。この結果から、硬骨魚類の祖先型の卵膜分解メカニズムは、単一酵素系により ZP タンパク質の N 末端領域が切断されて卵膜が膨潤することだと考えられた。カライワシ類よりも後に分岐した 2 種の酵素をもつ魚種では clade I の酵素がこの分解メカニズムを維持しており、clade II の酵素が新規機能を獲得した酵素であると考えられる。

○チョウザメアスタチンの機能の解明 (神澤 信行)

チョウザメで発見された ALSM 様タンパク質に関してその機能を考察すべく様々な実験を試みた。In vitro の発現では、全長、および protease ドメインだけの発現を試みた。活性測定は、in gel 下での zymography と溶液状態での myosin、casein 等を基質とした分解活性の両方を実施した。しかし、いずれも顕著な活性は見られなかった。酵素活性ドメインの相対性は比較的高いことから、上記の基質を切断することが期待されたが、これまでとは全く異なる基質を切断することで生理現象に貢献していることが考えられた。

また、発現時期を特定する事でその機能を特定を試みた。イカの ALSM では MAM ドメインが ALSM の局在に重要では無いかと考察されてきた。今回、同じ MAM を持つチョウザメ ALSM 様タンパク質について遺伝子レベルと、タンパク質レベルで解析をすすめた。Primitive ではあるが in situ hybridization の結果では発生中期の脳内に発現が認められるという結果がある。しかし、今回の結果からは、神経管形成期でのみ発現が確認され、以後の stage では発現が見られなかった。両結果をあわせると、神経管から脳の形成に関与する事が考えられる。神経細胞内には、MAM を持ったタンパク質の存在が知られており、MAM を介した相互作用で発生の進行に貢献している事が考えられた。以上、種を超えて共通のドメイン構造を持つアスタチン様タンパク質の解析から明らかになったことは、ドメイン構造ではその機能を規定することが出来ず、これまで機能の分化に関与と呼ばれていた C 端部位のドメイン構造が共通していても、その局在や機能が全く異なる事が明らかになった。

○蛇毒遺伝子の分子進化 (田宮 徹)

エラブウミヘビ (*Laticauda semifasciata*) 毒液中には I 型 sPLA₂ が存在するのに対し、ハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) 毒液中には、II 型 sPLA₂ が存在する。エラブウミヘビの IA 型 sPLA₂ は 2 種の異なる mRNA が同一の sPLA₂ 遺伝子上の 2 つの異なるプロモーターから転写されており、1 つは既に報告されている従来転写開始点と考えられてきた部位である 5' 上流領域のプロモーター (P1) により転写され (4 エキソン 3 イントロン構造の従来型)、もう 1 つは既報 sPLA₂ 遺伝子の、今までイントロン I と考えられていた部分の新奇プロモーター (P2) により転写されている (3 エキソン 2 イントロン構造の新奇型)。エラブウミヘビ毒腺での 2 種の mRNA 量を比較すると、従来型が圧倒的に多いのに対し、新奇型はごく微量である。これ等の毒液中の sPLA₂ とは別に、動物は普遍的に消化酵素として IB 型 sPLA₂ を持っている。これら I 型、II 型 sPLA₂ 遺伝子は共通の祖先遺伝子から進化してきたと考えられている。そこで、本研究では、ハブ毒腺で IA 型 sPLA₂ 遺伝子が発現していないかを詳細に調べた。その結果、IA 型 sPLA₂ mRNA の存在を確認した。得られた mRNA はエラブウミヘビ (*Laticauda semifasciata*) 毒腺で主に発現している従来 (P1) IA 型 sPLA₂ ではなく、微量に発現している新奇 (P2) IA 型 sPLA₂ と同様の mRNA であった。エラブウミヘビの新奇 (P2) IA 型 sPLA₂ の塩基配列と比較したところ相同性が 98 % であり、推定アミノ酸配列の相同性も 98 % であった。現在までのところ、ハブ毒腺組織からは新奇 (P2) IA 型 PLA₂ 遺伝子しか単離できないことから、エラブウミヘビとは異なり、新奇 (P2) IA 型 sPLA₂ 遺伝子の方が発現量は多いことが予想される。以上の結果から新奇 (P2) IA 型 sPLA₂ 遺伝子はコブラ科とクサリヘビ科に分岐する以前から存在していたと予想される。

学内共同研究「遺伝子の多様化とタンパク質の機能進化」の援助より 2010 年度のみで 18 件の国内・国際学会の発表が行われ、9 件の査読有論文、1 件の著書が掲載された。これらの発表・出版物の多くには教員の名前に加え、大学院生が筆頭または、共著者として名を連ねている。また、学内共同の援助により 2010 年度に博士課程の学生 (佐野) が学位を取得した。以上のことから資金は、研究に加え教育的用途に使われたとかがえている。参加 3 研究室とも「遺伝子の多様化とタンパク質の機能進化」をもとに活発に研究を行っており、以上のように進化学の分野で有意義な結果を得た。