

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏 名 佐藤 行人
指導教員名 西田 睦

論文題目 Evolution of genes duplicated through fish-specific genome doubling
(魚類特異的ゲノム倍化によって重複した遺伝子の進化)

新規の遺伝子やタンパク質がどのような過程で進化して、新しい機能や特性を獲得してきたのかを探究することは、生物進化を理解するうえで本質的な課題である。新しい遺伝子は、主に遺伝子重複を通じて生じると考えられる。重複した遺伝子の新しい機能の進化(新機能獲得)は、有益な変異によってもたらされると考えられるが、有益な変異が起こることは概して稀である。このことから、遺伝子機能を部分的に損なう変異がもたらず重複遺伝子間の機能の分割(機能分化)が、新機能獲得の前段階として重要だと考えられてきた。この機能分化を経ることで、重複した遺伝子は偽遺伝子化せずに存続するようになり、新機能を獲得する機会が増加する。しかしながら、実際に機能分化を経た遺伝子の進化の実態を解明した知見は乏しい。そこで本研究では、機能分化を経た遺伝子において新しい特性が進化してきた過程を詳細に解析し、その背後にある分子進化メカニズムを探求することを目的とした。こうした研究を進めるための枠組みとして、信頼性の高い系統関係が推定されており、魚類特異的ゲノム倍化(fish-specific genome doubling, FSGD)を経験している魚類に着目した。

FSGD によって重複した遺伝子は、現在の魚類ゲノム中に多く存続していると期待されるが、詳細はよくわかっていない。そこで全ゲノム配列が決定された魚類 4 種(ゼブラフィッシュ, メダカ, イトヨ, ミドリフグ)に着目し、それらのゲノムの遺伝子レポーターを、FSGD を経ていない四足類ゲノムの遺伝子レポーターと比較検討することで、FSGD によって重複した遺伝子群が、その後どのような欠失または存続過程を経て、現在の魚類ゲノムにどの程度維持されているのか、また、維持されてきた重複遺伝子が機能分化を経てきたのかを検討した。次に、FSGD に由来すると考えられる重複遺伝子 *Pgi* に着目し、それらがコードするタンパク質 (phosphoglucose isomerase, EC 5.3.1.9) の新しい特性、とくに電荷が進化してきた過程を、魚類の系統樹に立脚して詳細に解析した。さらに、*Pgi* の解析から明らかになった分子進化様式の普遍性を検討するために、脊椎動物に特異的な重複遺伝子 *Ald* を解析した。これらの結果を比較検討し、新しいタンパク質特性が進化する際の分子進化様式と選択圧の強さとの関連を議論した。

1. 魚類特異的ゲノム倍化に由来する重複遺伝子の存続と進化

FSGD によって重複し、その後現在まで魚類ゲノム中に存続してきた遺伝子の割合を推定するために、記憶と学習、環境情報処理および基礎代謝に関わる遺伝子群に着目し、それらから、シナプス伝達の長期増強、味覚伝達、嗅覚伝達、クエン酸回路に関与する 130 個のヒト遺伝子を解析の立脚点とした。これらに相同な遺伝子を、ゼブラフィッシュ, メダカ, イトヨ, ミドリフグ, ニワトリ, ネットアイツメガエル, カタユウレイボヤ, キイロシヨウジョウバエの全ゲノム配列から探索した。

得られたデータをもとに、最尤法による厳密な分子系統解析を個々の遺伝子ファミリーについて行った結果、130 個のヒト遺伝子のうち 14 個はヒトもしくは四足類に特異的であったが、残りの 116 個で魚類の相同遺伝子が同定された。同定された相同遺伝子群の系統関係から、FSGD による重複イベントが 45 個検出された。魚類の推定分岐年代と併せて検討すると、FSGD が起きてから上記の魚類の共通祖先が登場するまでの約 3 千万年の間に、重複遺伝子の 61.2% (71/116) が失われてきた一方で、この共通祖先ゲノムに残っていた重複遺伝子の平均 61.1% (27.5/45) が、その後約 3 億年間存続して現在の魚類ゲノムに含まれていることがわかった。このことは、FSGD の直後は重複遺伝子が急速に失われる一方で、残った重複遺伝子は比較的長期間、ゲノムに維持されてきたことを示唆する。

FSGD で重複した後に長期間維持されてきた遺伝子群がどのような特性をもつものであるのかを、コードするタンパク質に着目して解析したところ、タンパク質のサイズ、および相互作用パートナー数が、FSGD の直後に失われた重複遺伝子群と比べて有意に高い値を示した(前者: 大・中・小 3 群間の χ^2 test, $P=0.0052$; 後者: Welch's t test, $P=0.0288$)。タンパク質のサイズ(大きなタンパク質ほど多くのドメインやモチーフをもつと期待される)、および相互作用パートナー数は、遺伝子の多機能性を反映していると考えられる。このことから、あらかじめ多くの機能をもっていた遺伝子が、FSGD によって重複した後により高い確率で機能分化を経た結果、長期間維持されてきたものと考えら

れた。この結果は、重複遺伝子が進化的に存続する一次過程として、機能分化が重要な役割を果たすことを示す新たな証拠を提供する。FSGD で重複し、機能分化を経て維持されてきた遺伝子が、その後、系統特異的に新機能を獲得することで魚類間の遺伝的差異をもたらし、魚類が示す多様性にさまざまな形で関与してきたことが推察される。

2. 魚類特異的な重複遺伝子 *Pgi* における新しいタンパク質特性の進化

次に、新しいタンパク質特性が進化してきた過程を解析するために、魚類特異的な重複遺伝子 *Pgi* に着目した。まず *Pgi* が FSGD によって重複したのかどうかを検討するために、コチョウザメやヨーロッパウナギなど 7 種の魚類の *Pgi* の塩基配列を決定し、既存のデータと併せて分子系統解析を行うとともに、魚類の *Pgi* についてシステマティック解析を行った。その結果、*Pgi* が FSGD によって重複したことが確認された。次に、重複 *Pgi* 間の機能分化の有無を明らかにするために RT-PCR による発現解析を行った。その結果、四足類などがもつ重複していない *Pgi* が全身で発現する一方で、魚類の *Pgi-1* は内臓系器官、*Pgi-2* は骨格筋で強く発現しており、このことから魚類の *Pgi* は、重複後に発現組織を違えるという形で機能分化したことが明らかになった。

魚類で重複している PGI-1 および PGI-2 の間では、酵素の活性中心を構成するアミノ酸残基が全て保存されている一方で、酵素の熱安定性や耐塩性、至適 pH に影響し、活性中心とは独立に機能を左右する特性である電荷が異なっていた（等電点推定値；前者：6.21–6.36；後者：6.75–7.36；*U* test, $P=0.0040$ ）。このことから PGI-1 と PGI-2 は、発現組織の機能分化に起因する外環境の違いに応じて、電荷が異なる方向へ進化したものと考えられた。この電荷の差異をもたらしてきたプロセスは、新しいタンパク質特性の進化様式を知るうえで興味深い。そこで魚類 6 種の PGI のアミノ酸配列を比較したところ、PGI-1 と PGI-2 の電荷の差異は合計 76 個のアミノ酸サイトに担われていたが、PGI-1 あるいは PGI-2 のみに共通して保有される荷電アミノ酸サイトは 1 つしかなかった。

上のようなアミノ酸配列の状態が、どのような分子進化過程を経て生じてきたのかを検討するために、魚類の系統樹に立脚し、系統分岐点の間でそれぞれ起きてきたアミノ酸置換を最尤推定した。その結果、PGI-1 と PGI-2 の電荷の違いは、上述の魚類 6 系統の間で独立して平行的に進化してきたことが示唆された。平行進化の結果、PGI-1 と PGI-2 がそれぞれ類似の電荷を獲得したにも関わらず、上述のようにアミノ酸配列上の荷電アミノ酸サイトの位置が互いに一致しないということは、電荷の違いをもたらしてきた選択圧が少数の特定のアミノ酸サイトに強く作用してきたのではなく、PGI の電荷を構成する多数のアミノ酸サイトに対して、個々には比較的緩やかに作用してきたことを示唆している。一次配列レベルでのこうした選択様式が、結果として、タンパク質全体の電荷に対する着実な方向性選択をもたらしてきたものと考えられる。

3. 分子レベルでの適応進化様式と選択圧の強さとの関連

上で明らかになった分子進化様式は、PGI 以外の多くのタンパク質進化にも当ては

まる可能性がある。そこでその普遍性を検討するために、脊椎動物の ALD (fructose-1,6-biphosphate aldolase, EC 4.1.2.13) の電荷の進化を解析した。脊椎動物で重複している ALDa と ALDc の電荷の違いは 95 個のアミノ酸サイトに担われていたが、ALDa または ALDc に特異的な荷電アミノ酸残基は 1 つしかなく、電荷の違いが PGI と類似の様式で進化してきたことが確認された。このことから、多くのアミノ酸サイトに対する個々には比較的緩やかな自然選択が、タンパク質の新しい特性の進化において重要な役割を果たしていることが、PGI と ALD という複数のタンパク質の証拠から明らかになった。このような分子進化様式は、現行の分子進化解析法、例えばあるタンパク質グループに特異的なアミノ酸残基や非同義置換速度を検討する方法からは、認識されてこなかったものであった。

本研究は、FSGD で重複したタンパク質の進化過程の解析を通じて、多くのアミノ酸サイトに対する比較的緩やかな自然選択という分子進化様式の存在を明らかにし、タンパク質進化に対する見方を広めることに貢献した。本研究の成果は、新規遺伝子やタンパク質の進化について理解を深めるだけでなく、魚類のゲノム進化への理解にも貢献し、魚類資源の適切な保全・管理などを考えるうえで重要な情報を提供するものであると期待される。