

■原 著■ 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

サルエビ卵黄形成抑制ホルモンの精製および構造決定

花塚真史¹ 梶 圭祐¹ 吉田幸宏¹ 筒井直昭² 大平 剛^{1,3}

Purification and Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone-Family Peptides with Vitellogenesis-Inhibiting Activity from the Southern Rough Shrimp *Trachysalambria curvirostris*

Masafumi Hanazuka¹, Keisuke Kaji¹, Yukihiro Yoshida¹, Naoaki Tsutsui² and Tsuyoshi Ohira^{1,3}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Ushimado Marine Institute, Faculty of Science, Okayama University, Setouchi City, Okayama 701-4303, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) in Crustacea belongs to the crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-family. In order to characterize multiple VIH molecules in the southern rough shrimp *Trachysalambria curvirostris*, two CHH-family peptides were purified by reversed-phase HPLC and identified by N-terminal amino acid sequencing. The vitellogenesis-inhibiting activities of the CHH-family peptides were examined using ex vivo incubation of ovarian fragments of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. The two CHH-family peptides reduced vitellogenin mRNA levels in the ovarian fragments. The two CHH-family peptides did not show any hyperglycemic activity based on an *in vivo* injection assay. From these results, the two CHH-family peptides were designated as Trc-VIH-I and -II, respectively. Two cDNAs encoding Trc-VIH-I and -II precursors were cloned by RT-PCR coupled with 5'- and 3'-RACE. The mature Trc-VIH-I and -II were found to consist of 72 amino acid residues containing six conserved cysteine residues and possess an amidated C-terminus, respectively. The mature Trc-VIH-I and -II exhibited the highest sequence similarity with a CHH-family peptide showing vitellogenesis-inhibiting activity in a penaeid shrimp species, *Litopenaeus vannamei* VIH (Liv-SGP-G), by tBLASTn analysis. The mature Trc-VIH-I and -II shared amino acid identities of 63.0 and 74.3% with Liv-SGP-G, respectively. These results indicate that Trc-VIH-I and -II regulate vitellogenesis in *T. curvirostris*.

Keywords: crustacea, crustacean hyperglycemic hormone-family peptide, vitellogenesis-inhibiting hormone, sinus gland, southern rough shrimp, *Trachysalambria curvirostris*

序論

甲殻類の複眼を支える部分を眼柄と呼ぶ。組織形態学的研究から、眼柄の基部にはX器官と呼ばれる神経分泌細胞群と、そこから伸びる軸索の末端で形成される神経血液器官であるサイナス腺が存在することが示された¹⁾。眼柄由来の神経ペプチドはX器官で合成された後、サイナス腺に貯蔵され血液中に放出されることが明らかとなったため、これらはサイナス腺ホルモンと呼ばれるようになった。

た。これまでに、血糖上昇ホルモン (Crustacean hyperglycemic hormone, CHH)、卵黄形成抑制ホルモン (Vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH)、脱皮抑制ホルモン (Molt-inhibiting hormone, MIH)、大顎器官抑制ホルモン (Mandibular organ-inhibiting hormone, MOIH)、色素拡散ホルモン (Pigment dispersing hormone, PDH)、赤色素凝集ホルモン (Red pigment-concentrating hormone,

RPCH) がサイナス腺ホルモンとして同定されている²⁾。CHH、VIH、MIH、MOIH の 4 種類は互いに類似したアミノ酸配列を持つため、CHH 族ペプチドとよばれる 1 つのペプチドファミリーを形成している³⁾。CHH 族ペプチドは 6 個のシステイン残基が完全に保存されており、それらは 3 対のジスルフィド結合を形成している。

甲殻類の卵成熟は VIH による抑制的な調節を受けている。1987 年、*in vivo* の生物検定において卵成熟の進行を抑制する活性を指標として、アメリカンロブスター (*Homarus americanus*) のサイナス腺から VIH が精製、単離され⁴⁾、その後、1991 年に一次構造が決定された⁵⁾。1995~1999 年にかけて、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) から 7 種類の CHH 族ペプチド (Maj-SGP-I~VII) が単離・構造決定された⁶⁻⁸⁾。これら 7 種類の CHH 族ペプチドのうち Maj-SGP-IV を除く 6 種類は CHH 活性および VIH 活性を有することから、これら 6 種類の CHH 族ペプチドのどれかが成熟を制御していると考えられている。

VIH は、種苗生産や養殖への応用が期待されることから多くの人々に関心を持たれてきた。しかし、現在までに同定された VIH は数例しかなく、研究は進んでいない。これまでに、VIH の研究が行われてきたエビ類は、アメリカンロブスターやクルマエビのような高い商業的価値を持つ種である。甲殻類の成熟制御機構を解明するためには、新たな種の甲殻類を使って VIH の研究を進める必要がある。本研究で実験対象としたサルエビ (*Trachysalambria curvirostris*) は養殖対象種ではないが、東海地方から西日本にかけて広く漁獲されている。そのため、活きた状態で購入することが可能である。また、短期間であれば飼育をすることもできる。これらの理由から、サルエビは新たな実験動物として有望と考えられる。そこで本研究では、サルエビの VIH を精製・単離し、それらの構造を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験動物

2016 年 7 月、2017 年 7 月に岡山県瀬戸内市で漁獲されたサルエビ (平均体重 15 g) と、2017 年 5 月に愛知県西尾市で漁獲されたサルエビ (平均体重 5 g) を実験で用いた。

サルエビ CHH 族ペプチドの精製

サルエビのサイナス腺を実体顕微鏡下でピンセットとマイクロ剪刀を用いて外科的に摘出した。サイナ

ス腺抽出物は Yang らの方法に従って調製した⁹⁾。次に、抽出物を Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters) に通して、10% アセトニトリル (MeCN) / 0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) で洗浄した後、60% MeCN/0.05% TFA でサルエビの CHH 族ペプチドを含む画分を溶出した。遠心濃縮機を用いて MeCN を蒸発させた後、逆相 HPLC に供した。カラムは Shodex Asahipak ODP-50 4E (4.6 x 250 mm, 昭和電工) を用い、20% MeCN/0.05% TFA から 60% MeCN/0.05% TFA までの 40 分間のリニアグラジェントで分画した。流速は 1 ml/分、検出は 225 nm の波長で行い、溶出パターンを見ながらマニュアルでピーク産物を分取した。

質量分析および N 末端アミノ酸配列

逆相 HPLC で精製したピーク産物を減圧濃縮した後、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) 型質量分析機 (AXIMA®-CFR, 島津製作所) を用いて各ピーク産物の質量を測定した。また、アミノ酸配列自動分析機 (model 491HT protein sequencer, Applied Biosystems) で各ピーク産物の N 末端アミノ酸配列を分析した。

血糖上昇活性の測定

2017 年 7 月に岡山県瀬戸内市で漁獲されたサルエビを血糖上昇活性の測定に用いた。*in vivo* の投与実験は Yang らの方法に従って行った⁹⁾。精製した 2 種類のサルエビ VIH (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) を 1 µg ずつ注射した。ネガティブコントロールはクルマエビ生理食塩水のみを注射した。

卵黄形成抑制活性の測定

2017 年 10 月に徳島県鳴門市の養殖業者から購入した未成熟な雌クルマエビ (平均体重 25 g) を卵黄形成抑制活性の測定に用いた。卵巣の培養は Tsutsui らの方法に従って行った¹⁰⁾。精製した Trc-VIH-I と Trc-VIH-II を 1 µg ずつ培養液に添加し、クルマエビの卵巣片を培養した。ネガティブコントロールは培養液のみで卵巣片を培養した。

RT-PCR

サルエビ眼柄の全 RNA は Ribozol (AMRESCO) を用いて抽出した。サルエビ眼柄の first strand cDNA は ReverTra Ace® (TOYOBO) を用いて合成し、RT-PCR と 3' RACE の鋳型 cDNA として使用した。図 1 のピーク 17 (Trc-VIH-I) とピーク 19 (Trc-VIH-II) の N 末端アミノ酸配列解析の結果を基に、縮重オリ

ゴヌクレオチドプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-F と VIH-I-R、Trc-VIH-II は VIH-II-F と VIH-II-R) を設計し、合成を外注した (表 1)。PCR には Gotaq Green Master Mix (Promega) を 10 μ L と、鋳型 cDNA 溶液を 0.5 μ L、超純水を 7.5 μ L、100 μ M のプライマー F と R (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-F と VIH-I-R、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-F と VIH-II-R) をそれぞれ 1.0 μ L ずつを含む合計 20 μ L の溶液を使用した。反応は 94°C で 3 秒間保温の後、94°C で 30 秒間、53°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間のサイクル 35 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分間の伸長反応を行った。

3'RACE

RT-PCR で増幅した Trc-VIH-I および Trc-VIH-II をコードする cDNA 断片の塩基配列を基に 3 種類ずつのフォワードプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-3F、VIH-I-3NF、VIH-I-3NNF、Trc-VIH-II は VIH-II-3F、VIH-II-3NF、VIH-II-3NNF) を設計し、合成を外注した (表 1)。また 3 種類のリバースプライマー (RTG、RTGN、RTG-NN) を使用した (表 1)。1 段階目の PCR ではプライマー 3F (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3F、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3F) と RTG を使用して、PCR 反応は 94°C で 3 分間保温の後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C で 3 分間の伸長反応を行った。次に 1 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型として、プライマー 3NF (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3NF、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3NF) と RTGN を使用して 1 段階目と同様の条件で 2 段階目の PCR を行った。さらに 2 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型として、プライマー 3NNF (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-3NNF、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-3NNF) と RTGNN を使用して 1 段階目と同様の条件で 3 段階目の PCR を行った。

5'RACE

鋳型として用いるサルエビ眼柄の first-strand DNA の合成を SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて行った。次に RT-PCR と 3' RACE で増幅した Trc-VIH-I および Trc-VIH-II をコードする cDNA 断片の塩基配列を基に 4 種類のリバースプライマー (Trc-VIH-I は VIH-I-5R と VIH-I-5NR、Trc-VIH-II は VIH-II-5R と VIH-II-5NR) を設計し、合成を外注した (表 1)。また、SMART RACE cDNA Amplification Kit に添付されている 2 種類のフォワードプライマー (UPM、NUP) を使

用した。PCR には TaKaRa LA PCR kit (TaKaRa) を用いて、10x LA PCR Buffer を 2 μ L、2.5 mM dNTP を 2 μ L、5' RACE 用の鋳型 cDNA 溶液を 0.5 μ L、LA taq HS ver. を 0.1 μ L、超純水を 13.4 μ L フォワードプライマーとリバースプライマー (10 μ M) をそれぞれ 1 μ L を含む合計 20 μ L の溶液を使用した。1 回目の PCR ではプライマー 5R (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-5R、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-5R) と UPM を使用して、反応は 94°C で 3 分間保温の後、94°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 5 回繰り返し、94°C で 30 秒間、70°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 5 回繰り返し、94°C で 30 秒間、68°C で 30 秒間、72°C で 3 分間のサイクルを 27 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間の伸長反応を行った。次に 1 回目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型とし、プライマー 5NR (Trc-VIH-I の場合は VIH-I-5NR、Trc-VIH-II の場合は VIH-II-5NR) と NUP を用いて、1 段階目と同様の条件で 2 段階目の PCR 反応を行った。

表 1. Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の cDNA クローニングに使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')
RTG	AACTGGAAGAATTCGCGGCCG
RTGN	TGGAAGAATTCGCGGCCGAG
RTGNN	AAGAATTCGCGGCCGAGGAA
VIH-I-F	TTCGACACNTGTGYACNGG
VIH-I-R	TAYTCCATRCAYTGDATAA
VIH-II-F	ACTTCTTGYACNGGNGTNTT
VIH-II-R	ATGCACTGDATRAANACNGG
VIH-I-3F	GTCTGCGAGGACTGCTACAA
VIH-I-3NF	GAGGACTGCTACAATGTCTT
VIH-II-3F	GTCTGCGAGGACTGCTACAA
VIH-II-3NF	TGCGAGGACTGCTACAATGT
VIH-II-3NNF	GAGGACTGCTACAATGTCTT
VIH-I-5R	CGCAGACGCGGTTGAGACGCCGAGGA
VIH-I-5NR	CCCGACCAGTTGACAGTGGGCGCGGTA
VIH-II-5R	GTCCAGTCCCACGTCCAGGTGGTGGG
VIH-II-5NR	CGAGGAGTTCACGTCCCACGTCCAGGTG

塩基配列の決定

PCR 産物は pGEM®-T Easy ベクター (Promega) にサブクローニングした。挿入したインサート DNA の塩基配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、DNA シークエンサー ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

結果

サルエビ CHH 族ペプチドの精製

サルエビのサイナス腺抽出物 (186 個相当量) を逆相 HPLC で分画した結果、多数のピークが観察され

た (図 1)。これらのピーク産物のマスペクトルを MALDI-TOF MS を用いて測定した結果、ピーク 17 に m/z 8402.91 (M+H)⁺ のイオンピークが (図 1)、ピーク 19 に m/z 8443.65 (M+H)⁺ のイオンピークが観察された。これまでの研究から、VIH を含む CHH 族ペプチドはサイナス腺中の主要なペプチドであることと、分子量は 8,000~9,500 であることが明らかとなっている。これらの条件を満たしているピーク 17 と 19 は、サルエビの CHH 族ペプチドである可能性が高いと考え、N 末端アミノ酸配列解析に供した。

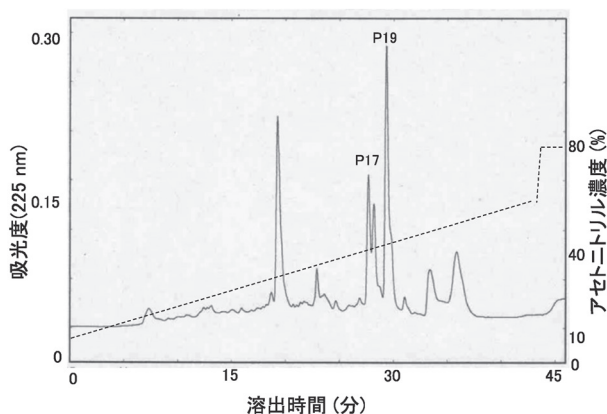


図 1. 逆相 HPLC を用いたサルエビのサイナス腺抽出物 (186 個相当量) の分離. 点線はアセトニトリル濃度を示す。

サルエビ CHH 族ペプチドの N 末端アミノ酸配列解析

ピーク 17 と 19 の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、いずれも十脚類の CHH 族ペプチドと類似したアミノ酸配列を有していた (図 2)。

	10	20	30	40
P17	SLFDP?CTGV	FNRGLLGRLN	RVCDDCYNVF	REPHV?TECR
P19	SLFDTSCTGV	FNRDLLGRLN	RVCEDCYNVF	REPKVATFCR
	50	60		
P17	SNCFLNPSFI	Q		
P19	SNCYLNPVFI	QCMEYLLPEE		

図 2. サルエビ CHH 族ペプチドの N 末端アミノ酸配列. ? は同定できなかったアミノ酸を示す。

サルエビ CHH 族ペプチドの生物活性の測定

まず、ピーク 17 と 19 の血糖上昇活性を測定した。ピーク 17 と 19 をサルエビ 1 尾あたり 1 μ g ずつ投与した。その結果、血糖値はそれぞれ 18 ± 5.7 、 9 ± 5.8 μ g/ml ずつ減少した。この結果より、ピーク 17 と 19 はサルエビの血糖上昇ホルモンではないと考えられた。

次いで、ピーク 17 と 19 の卵黄形成抑制活性を測定した。ピーク 17 と 19 を 1 μ g ずつ培地に添加したところ、Vg mRNA 量は $63 \pm 15\%$ および $51 \pm 8\%$

に減少した (図 3)。これらの値はコントロール群と比べて有意ではなかったが、ピーク 17 と 19 に Vg 遺伝子の発現を抑制する傾向が観察された。これらの結果より、本研究ではピーク 17 と 19 をサルエビの卵黄形成抑制ホルモン I と II (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) と名付けた。

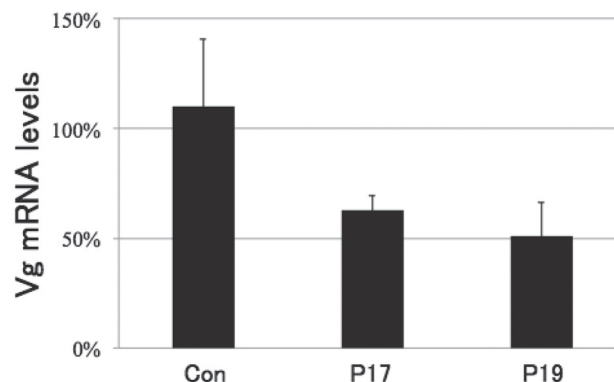


図 3. サルエビ CHH 族ペプチドの卵黄形成抑制活性. エラーバーは標準誤差を示す. Con は培地のみで卵巣を培養したコントロール群を示す。

Trc-VIH-II をコードする cDNA のクローニング

Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をコードする cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した (図 4 と 5)。Trc-VIH-I の cDNA は 648 bp からなり、330 bp の Open reading frame (ORF) を持ち、110 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-I の前駆体をコードしていた (図 4)。Trc-VIH-I の前駆体は N 末端側から順に、19 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、15 残基からなる CHH precursor-related peptide (CPRP) と呼ばれる機能不明のペプチド、2 残基の塩基性アミノ酸残基 (Lys-Arg) からなるプロセシングシグナル、72 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-I、および 2 アミノ酸残基 (Gly-Lys) からなるアミド化シグナルにより構成されていた (図 4)。

Trc-VIH-II の cDNA は 646 bp からなり、351 bp の ORF を持ち、117 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-II の前駆体をコードしていた (図 5)。Trc-VIH-II の前駆体は N 末端側から順に、26 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド、15 残基からなる CPRP、2 残基の塩基性アミノ酸残基 (Arg-Arg) からなるプロセシングシグナル、72 アミノ酸残基からなる Trc-VIH-II、および 2 アミノ酸残基 (Gly-Lys) からなるアミド化シグナルにより構成されていた (図 5)。

成熟型の Trc-VIH-I および Trc-VIH-II は C 末端がアミド化された、3 対のジスルフィド結合を含む 72 アミノ酸残基からなるものと推定された (図 6)。成熟 Trc-VIH-I および Trc-VIH-II はバナメイの VIH

```

1 ACGCGGGGAGCAACCGGGTCTTCGCCTCCAGAGTCGACTTTCACCTTTGCTCCAGCGTT
61 TTCAGTATGATCGCCTTTCGGCTGGTGAAGTACCCCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGG
  M I A F R L V Q V T L L V L V S S E
121 GCGCTCTCCTCCCGCTGCCCTCCCTCGGGGAGCACCACCTGGCCAGAGGCTCTCTC
  A L S S P A A S P R G E H H L L A [K R] S L
181 TTCGACCCCTCTCGACGGGCGCTTCAACCGGGGGCTCTCGGGCGTCTCAACCGCGTC
  F--D--P--S--C--T--G--V--F--N--R--G--H--L--G--R--L--N--R--V
241 TGCGACGACTGCTACAATGTCTTCAGGGAGCCTCATGTGCTACTGAGTGCAGGAACAAC
  C--D--D--C--Y--N--V--F--R--E--P--H--V--A--T--E--C--R--N--N
301 TGCTTCTGAACCCGCTCTTCAATGCAATGCTGGAGTACATCATTCGCGAGGACCTTAC
  C--F--L--N--P--S--E--I--Q--C--H--E--Y--I--I--P--E--D--L--H
361 GAGGAATACCGCGCCACGTCGCAACTGGTCGGGAAGTAGACAACCTCAGCGGAAAGAAA
  E--E--Y--R--A--H--V--Q--L--V [G K] *
421 CTCAGAAAGGAAAAACACAGATTTTTTTTTCTGATATTCTGTGATATTTTTCTTTGAA
481 TCCTACCTTTGATTTGATTTTTCAGGCAATGGTTTGGCATTGCTGATATGAAATGATGG
594 AAATAATAAAGGATATGTGAATAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 4. Trc-VIH-I 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列. 太字はシグナルペプチドを, 下線は CPRP を, 白のボックスはプロセシングシグナルを, 点線の下線は Trc-VIH-I を, グレーのボックスはアミド化シグナルを示す.

```

1 ACGCGGGGAGCAACCGGGTCTTCGCCTCCAGAGTCGACTTTCACCTTTGCTCCAGCGTT
61 GCGATGATCAGTCCCAGATCGTGTTCCTTGGCCCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
  M I S P Q I V F V A L V V L L A A S S S
121 TGGCTCGCACCGTGGACGGCTCTCTTCCCGCGGGCTCCCGAGGGGCGACACCGCC
  V P R T V D C L S S P A A S P R G D H R
181 CTCTGAGGCGCTCCCTCTTCGACAGCTTCGACGGGGTCTTCAATCGGACCTCTCTC
  L V [R R] S L F D T S C T G V F N R P H L
241 GGGAGGCTCAACCGCGTCTCGCAGGACTGCTACAATGTCTTCAGGGAGCCCAAGTCCGC
  G R L N B V C E D C Y N V F R E P K V A
301 ACTGAGTGCAGGAGCACTGCTACCTGAACCCGCTTTCATCCAGTGCATGGAGTACCTG
  T E C B S N C Y L N P V F I G C M E Y I
361 TCGCAGAGGAGCTCCAGGAGTTCAGTCCAGCTCCAGGTTGGGAAGGAAAGTACGACT
  L P E E L H E E F Q S H V Q V V [G K] *
421 CGGGGACGGATCAGCAGACGACGATTTGGGGAACGGAACTTTTGGAACTTTGGGTC
481 TTGAGGCATTTTGTCTGAATATTTACGTCGCTGTGTTGCTCTTTTGTTCATCAGTAGT
541 AAGGAAATCTGCTTTACAATTTATACAAAATTCAGACAGTCTTCCAGGAATAATGCATA
594 GAGCGGTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

```

図 5. Trc-VIH-II 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列. 太字はシグナルペプチドを, 下線は CPRP を, 白のボックスはプロセシングシグナルを, 点線の下線は Trc-VIH-II を, グレーのボックスはアミド化シグナルを示す.

```

Trc-VIH-I : SLFDLSCTGVFNRLLELRINRVGDDCYNVFRERVATECR : 40
Trc-VIH-II : SLFDLSCTGVFNRLLELRINRVGDDCYNVFRERVATECR : 40
Liv-SGP-G : ANFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRERVATECR : 40
Maj-SGP-VI : AAFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRERVATECR : 40
Maj-SGP-II : SLFDLSCTGVYDRELLERLSRLGDDCYNVFRERVATECR : 40

Trc-VIH-I : NNCFLNPSFIQCLEYIIPEDLHEVRAHVQLV : 72
Trc-VIH-II : SNCYNVVFVQCMYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Liv-SGP-G : SNCFNVPVQCMYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Maj-SGP-VI : SNCFNVPVQCMYLLPEELHBEVQSHVQV : 72
Maj-SGP-II : RNCFNVPVQCMYLLPEELHBEVQSHVQV : 72

```

図 6. Trc-VIH-I および Trc-VIH-II と既知 VIH のアミノ酸配列のアライメント. Liv-SGP-G はバナメイ VIH を (Accession no. AB744717), Maj-SGP-VII はクルマエビ CHH/VIH を (Accession no. O15982), Mej-SGP-II はシバエビ VIH を示す (Accession no. AB622205). 3 種類以上の分子で保存されているアミノ酸残基を黒のボックスで示した.

(Liv-SGP-G) と 63.0% と 74.3%、クルマエビの CHH/VIH (Maj-SGP-VII) と 59.3% と 72.9%、シバエビの VIH (Mej-SGP-II) と 58.6% と 66.7% の相同性を示した (図 6)。

討論

サルエビから 2 種類の CHH 族ペプチド (Trc-VIH-I と Trc-VIH-II) を精製・単離し、その構造を明らかにした。Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はいずれもシステイン 6 残基が保存されており、既知の CHH 族ペ

チドの特徴を有していた。Trc-VIH-I と Trc-VIH-II は既知の CHH と似た配列を有していたことから、最初は Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はサルエビの CHH ではないかと考えた。しかし、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をサルエビに注射しても血糖上昇活性は観察されなかった。本論文では結果を示さないが、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II をクルマエビとヨシエビに注射しても血糖上昇活性は観察されなかった。これらの結果から、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II はサルエビの CHH ではないと考えた。

クルマエビでは、Pej-SGP-IV を除く 6 種類の CHH 族ペプチドに血糖上昇活性に加えて、卵黄形成抑制活性が観察されている²⁾。そこで、クルマエビの卵巣培養系を用いて Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の卵黄形成抑制活性を測定してみた。その結果、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II には有意に Vg mRNA の発現を抑制する活性は観察されなかったが、抑制する傾向は観察された。このため、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の卵黄形成抑制活性は非常に弱いと考えられた。これは、サルエビではなくクルマエビの卵巣培養系を使用したことが原因かもしれない。将来的に、Trc-VIH-I と Trc-VIH-II の生物活性を明らかにするために、サルエビの卵巣培養系を確立して調べる必要がある。

謝辞

本研究は 2017 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS201711) を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

- Hanström B (1937) Inkretorische organe und Hormonfunktionen bei den Wirbellosen. *Ergebn. boil.* 14: 143-224.
- Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* 6: 49-90.
- Webster SG, Keller R and Dirksen H (2012) The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175: 217-233.
- Soyez D, Van Deijnen JE and Martin M (1987) Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Zool.* 244: 479-484.
- Soyez D, Le Caer JP, Noel PY and Rossier J (1991) Primary structure of two isoforms of the vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides* 20: 25-32.
- Yang WJ, Aida K, Terauchi A, Sonobe H and Nagasawa H (1996) Amino acid sequence of a peptide

- with molt-inhibiting activity from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Peptides* **17**: 197-202.
- 7) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H (1997) Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides* **18**: 479-485.
 - 8) Nagasawa H, Yang WJ, Aida K and Sonobe H (1999) Chemical and biological characterization of neuropeptides in the sinus glands of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. In: *Peptide Science-Present and Future*. Shimonishi Y. ed., Kluwer Academic Publishers, Great Britain. pp.453-454.
 - 9) Yang WJ, Aida K and Nagasawa H (1995) Amino acid sequences of a hyperglycaemic hormone and its related peptides from the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* **135**: 205-212.
 - 10) Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN and Aida K (2005) The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **144**: 232-239.