

■原 著■

## クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモンの精製と生物活性の測定

安保裕子<sup>1</sup> 渡部聡美<sup>1</sup> 甲高彩華<sup>1</sup> 大平 剛<sup>1,2</sup>

Purification of Crustacean Female Sex Hormone from the Eyestalk of the Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus* and Its Biological Activity

Yuko Anbo<sup>1</sup>, Satomi Watabe<sup>1</sup>, Sayaka Kotaka<sup>1</sup> and Tsuyoshi Ohira<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** Recently, crustacean female sex hormone (CFSH) has been purified from the female eyestalk of the crab *Callinectes sapidus*. Gene knockdown of *C. sapidus* CFSH by RNA interference was shown to inhibit the appearance of female reproductive characteristics. This result suggests that CFSH controls female secondary sex characteristics. Recently, we cloned cDNA encoding the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* CFSH (Maj-CFSH). In order to examine the biological function of Maj-CFSH, we purified native Maj-CFSH and assessed its biological function. In our previous study, native Maj-CFSH was localized in the sinus gland located in the eyestalk of *M. japonicus*. Therefore, sinus glands were dissected under a stereo microscope and an extract was subsequently prepared. The sinus gland extract was subjected to reverse-phase HPLC. All peak fractions were collected and subjected to western blot analysis using anti-Maj-CFSH antibody. As a result, immunopositive band was detected only in a single peak fraction. This peak fraction was subjected to N-terminal amino acid sequence analysis and then 10 N-terminal amino acid residues were determined. This N-terminal sequence was identical to that of the mature Maj-CFSH. These results indicate that we have successfully purified native Maj-CFSH. The effect of the purified native Maj-CFSH on vitellogenin (VG) gene expression was examined using an ex vivo ovarian incubation system. Maj-CFSH had an inhibitory effect on VG gene expression, whereas the negative control (medium only) did not. Maj-SGP-VII, which is one of six vitellogenesis-inhibiting hormones (VIH) in *M. japonicus*, also had a clear inhibitory effect on VG gene expression levels in this incubation system. These results suggest that Maj-CFSH exhibits vitellogenesis-inhibiting activity in *M. japonicus*.

**Keywords:** kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, crustacean female sex hormone (CFSH), vitellogenesis-inhibiting hormones (VIH)

### 序論

通常、甲殻類の複眼は頭部から突出しており、その複眼を支えている柄の部分眼柄と呼ぶ。この眼柄を切除すると、雌の卵黄形成が早まることから、眼柄内には成熟を抑制的に制御する因子が存在すると推定されていた。また、眼柄の基部にはX器官と呼ばれる神経分泌細胞群と、そこからのびる軸索の末端で形成される神経血液器官（サイナス腺）が存在すること、およびX器官で合成された神経ペプチドがサイナス腺に貯蔵された後、血リンパ中に放出さ

れることが判明した。そして1991年に、アメリカンロブスターのサイナス腺から成熟を抑制する作用を持つ神経ペプチドが単離され、卵黄形成抑制ホルモン（vitellogenesis-inhibiting hormones, VIH）と名付けられた<sup>1)</sup>。その後、日本の水産重要種であるクルマエビのサイナス腺には、少なくとも6種類のVIHが存在することが報告され、多様なVIHにより成熟が抑制されていることが示唆された<sup>2)</sup>。その後、シバエビやクマエビなどクルマエビ科のエビ類

から次々と VIH が単離・同定されている<sup>3)</sup>。

2014年、アオガニのサイナス腺から甲殻類雌性ホルモン (crustacean female sex hormone, CFSH) が単離された<sup>4)</sup>。アオガニの CFSH は雌のサイナス腺にのみ存在し、遺伝子発現も雌特異的であった。RNA 干渉によるアオガニ CFSH の遺伝子サイレンシングを行うと、雌性生殖孔や抱卵剛毛のような交尾と抱卵に必要な雌性外部形態の形成を抑制した。このことから、CFSH は甲殻類の雌の二次性徴を制御していると考えられている。クルマエビにおいても、眼柄から CFSH (クルマエビ眼柄 CFSH) をコードする cDNA がクローニングされている<sup>5)</sup>。しかし、クルマエビ眼柄 CFSH は雌雄の眼柄で遺伝子発現しており、アオガニのような雌雄特異性は観察されなかった。そのため、クルマエビ眼柄 CFSH は雌性ホルモンではなく、別の機能を有すると考えられた。そこで本研究では、クルマエビ眼柄 CFSH をサイナス腺から精製・単離し、その生物活性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年から2017年にかけて、沖縄県久米島町と徳島県鳴門市の養殖業者から購入した雌雄のクルマエビ (15 g ~ 25 g) をサイナス腺の摘出に使用した。2018年1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 (平均体重約 25 g) を卵黄形成抑制活性の測定に用いた。

### クルマエビ眼柄 CFSH の精製

クルマ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。摘出したサイナス腺を 2 M 酢酸溶液が入っている 1.5 ml チューブに移し、氷上に置いた。チューブ 1 本あたり 100 個のサイナス腺を入れ、ホモジナイザーペッスルを用いてホモジナイズし、13,500 rpm、4°C で 5 分間遠心した。上清のみを別のチューブに移し、元のチューブに残った沈澱に再び 2 M 酢酸溶液を入れ、同じ操作を行った。2 回分の上清を合わせたものをサイナス腺粗抽出物とした。次に、遠心エバポレータ (佐久間製作所, 東京) を用いてサイナス腺抽出物を濃縮した後、0.05% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えて 1 ml となるように調製し、逆相 HPLC (NANOSPACE SI-1, 資生堂, 東京) に供した。カラムは Senshu Pak PEGASIL C4 SP100 カラム (4.6 × 100 mm, センシュー科学, 東京) を用いて、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エントで分画した。流速は

1 ml/分、検出は 225nm の波長で行い、溶出パターンを見ながらマニュアルで全てのピーク産物を分取した。

### 抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンブロット解析

10 サイナス腺に相当するピーク産物に 2 × Laemmli sample buffer (250 mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue) を等量加え、100°C で 5 分間熱処理をしたサンプルを 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルと同じ大きさに切った PVDF 膜 (アトー, 東京) を 99.5% メタノールに数秒浸した後、Blotting buffer B (25 mM Tris-base, 5% メタノール) に 30 分以上浸した。ゲルと同じ大きさに切った濾紙 2 枚を Blotting buffer A (0.3 M Tris-base, 5% メタノール) に、4 枚を Blotting buffer B に 30 分以上浸した。電気泳動後、アクリルアミドゲルを Blotting buffer B に浸した。セミドライ式ブロッキング装置上に Blotting buffer A に浸した濾紙 2 枚、Blotting buffer B に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、泳動後のアクリルアミドゲル、Blotting buffer B に浸した濾紙 3 枚を順番に重ね、ゲル面積 (cm<sup>2</sup>) の 2 倍の電流 (mA) を 40 分間流した。蛋白質が転写された PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS ; Tris buffered saline (pH7.5) ; 20 mM Tris-HCl, 150 mM sodium chloride) 中で 5 分間ずつ 2 回振盪した後、ブロッキング溶液 (0.5% スキムミルク, 0.05% tween-20 を含む TBS) 中で 30 分間振盪した。そこに抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体<sup>6)</sup> を 1/2,000 倍量入れ、37°C で一晩振盪した。PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含む TBS で 5 回洗浄した後、0.05% tween-20 を含む TBS に PVDF 膜を浸し、HRP 標識された抗ウサギ IgG ヤギ IgG 抗体 (funakoshi, 東京) を 1/2,000 倍量加えて 37°C で 1 時間振盪した。PVDF 膜を 0.05% tween-20 を含む TBS で 10 回、TBS で 5 回洗浄した後、検出液 (0.009% 4-Chloro-1-naphthol と 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む TBS) を用いてシグナルを検出した。

### N 末端アミノ酸配列

N 末端アミノ酸配列は、ABI Procise 491 HT Procise® Protein Sequencer (Applied Biosystems, USA) を用いて解析した。

### 卵黄形成抑制活性の測定

卵巣の培養は Tsutsui らの方法に従って行った<sup>7)</sup>。逆相 HPLC で精製したクルマエビ眼柄 CFSH を 1 サ

イナス腺相当量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、ポジティブコントロールはクルマエビの組換え Pej-SGP-VII (クルマエビの6種類のVIHのうちの1つ)<sup>8)</sup>を10 ng ずつ培養液に添加して卵巣片を培養した。

### 定量 PCR

培養したクルマエビの卵巣片の全 RNA は Ribozol (AMRESCO, Ireland) を用いて抽出した。定量を行うために2種類のオリゴヌクレオチドプライマー (Maj-Vg qPCR-F と Maj-Vg qPCR-R と TaqMan プローブを設計し、合成を外注した (表 1)。逆転写反応および PCR 反応は PLATINUM Quantitative RT-PCR Thermoscript One-Step System (Invitrogen) を用いて、2 X Thermoscript reaction mix を 7.5  $\mu$ L, Thermoscript Plus/Taq mix を 0.25  $\mu$ L, ROX reference dye を 0.25  $\mu$ L, 50 mM Magnesium Sulfate を 0.65  $\mu$ L, プライマー Maj-Vg qPCR-F と Maj-Vg qPCR-R (10  $\mu$ M) をそれぞれ 0.2  $\mu$ L, 10  $\mu$ M TaqMan プローブを 0.2  $\mu$ L, SDW を 10.75  $\mu$ L, 40 ng/ $\mu$ L の卵巣 total RNA 溶液を 5  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の溶液を使用した。反応は 60°C で 15 分間、95°C で 5 分間保温の後、95°C で 15 秒間、61°C で 50 秒間のサイクルを 38 回繰り返した。サーマルサイクリングと蛍光シグナルのリアルタイム測定には 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。Vg 遺伝子を適度に発現しているクルマエビの卵巣から抽出した total RNA を連続希釈したものを標準物質として、それらから得られる蛍光シグナルの測定値をもとに標準曲線を描画した。

表 1. 定量 PCR で使用したプライマーと TaqMan プローブ

Primer	Sequence (5'-3')
Maj-Vg qPCR-F	AACATCGCCCAAATCCTCTCT
Maj-Vg qPCR-R	GGCACTCAAAGCCACAAAA
TaqMan probe	(6-FAM) CCTGGCAATTTCAGACCGGCA (TAMRA)

## 結果

### クルマエビサイナス腺ペプチドの精製

クルマエビのサイナス腺抽出物 (150 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)。回収したピーク産物の全てを、抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンブロットに供した。その結果、溶出時間 19 分の P1 で免疫陽性のバンドが観察された (図 2)。この P1 を N 末端アミノ酸配列解析に供し、10 残基のアミノ酸配列を解析した (決定したアミノ酸配列: HLDDFIPGLL)。その配列は、成熟クルマエビ眼柄

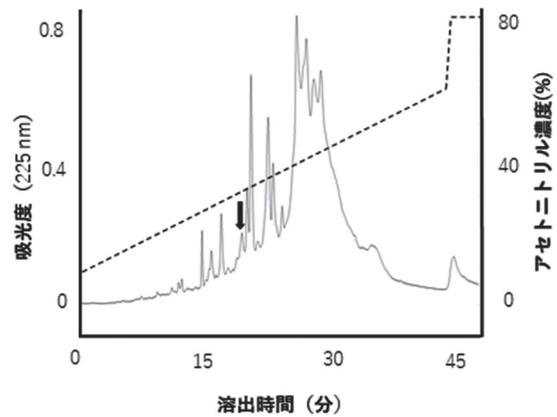


図 1. 逆相 HPLC を用いたクルマエビのサイナス腺抽出物 (150 個相当量) の分離。矢印は P1 を示し、点線はアセトニトリル濃度を示す。

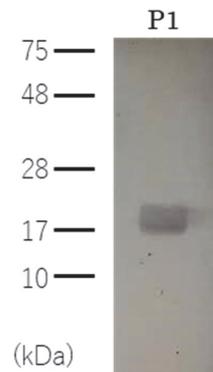


図 2. 抗クルマエビ眼柄 CFSH 抗体を用いたウエスタンブロット解析。

CFSH のアミノ酸配列と完全に一致していた<sup>5)</sup>。これらの結果より、P1 はクルマエビ眼柄 CFSH であると考えられた。

### 卵黄形成抑制活性の測定

クルマエビ眼柄 CFSH の卵黄形成抑制活性を測定した。クルマエビ眼柄 CFSH を 1 サイナス腺相当量ずつ培地に添加してクルマエビの卵巣片を培養したところ、Vg mRNA 量は  $55.8 \pm 5.7\%$  に減少した (図 3)。この値はコントロール群の  $108.8 \pm 37\%$  と比べて低かったが、統計的に有意ではなかった。ポジティブコントロールのクルマエビ VIH も Vg 遺伝子の発現を抑制したが ( $50.0 \pm 10.7\%$ )、これの統計的に有意ではなかった。本来、クルマエビ VIH は有意に Vg mRNA の発現を抑制することが知られていることから<sup>9)</sup>、今回の結果は卵巣培養に問題があった可能性がある。クルマエビ眼柄 CFSH の Vg 遺伝子発現の抑制率は、クルマエビ VIH と同程度であったことから (図 3)、クルマエビ眼柄 CFSH は卵巣における Vg 遺伝子の発現を抑制する活性をもつと考えられた。

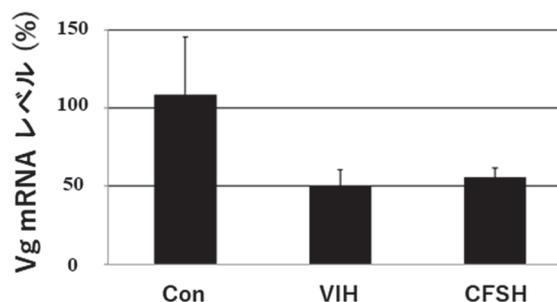


図 3. 卵黄形成抑制活性の測定. Con は培地のみ, VIH は Pej-SGP-VI を培地に添加, CFSH は 1 サイナス腺相当量を培地に添加して卵巣を培養した結果を示す. エラーバーは標準誤差を示す.

## 討論

クルマエビのサイナス腺から、眼柄 CFSH を精製・単離した。天然 CFSH を精製したのはアオガニ CFSH に続いて本研究が 2 例目である<sup>4)</sup>。サイナス腺から CFSH を精製することができるようになったことで、CFSH の機能解析が格段に進むと思われる。例えば、本研究では精製したクルマエビ眼柄 CFSH を、クルマエビの卵巣培養系に添加してみた。もし、クルマエビ眼柄 CFSH が雌性ホルモンであれば Vg 遺伝子の発現を促進するのではと予想したが、予想外にもクルマエビ眼柄 CFSH は Vg mRNA の発現を抑制した。CFSH に卵黄形成抑制活性があることを明らかにしたのは本研究が初めての例である。序論でも述べたが、クルマエビ眼柄 CFSH は雌雄の両方で遺伝子発現していることから、雌性ホルモンではないと考えられてきた<sup>5)</sup>。本研究により、クルマエビ眼柄 CFSH が成熟を制御している可能性を示すことができた。今後は、クルマエビ眼柄 CFSH が、雄においても精子形成を抑制しているかを調べる必要がある。

クルマエビ眼柄 CFSH を精製・単離できるようになったが、精製できるホルモン量は既知のサイナス腺ホルモンよりも少ない<sup>2)</sup>。例えば、本研究で使用したクルマエビの VIH (Pej-SGP-VII) は、300 サイナス腺相当量の抽出物から、測定波長 225 nm の時の吸光度が 0.5 以上の高さのピーク産物が得られている。今後、クルマエビ眼柄 CFSH の投与実験などを通して生物活性を調べていくことになるが、天然クルマエビ眼柄 CFSH を用いるのには限界がある。なぜなら、天然クルマエビ眼柄 CFSH を用いて投与実験を行うためには、数千尾のクルマエビが必要となるからである。このように、天然ホルモンの精製

には、コストもかかるうえに、時間も必要である。将来的に、この問題を解決するためには、クルマエビ眼柄 CFSH の組換え体の作製法の確立が必要である。クルマエビ眼柄 CFSH は N 結合型糖鎖の付加配列を有することから、天然 CFSH には糖鎖が付加されていると推測されている<sup>6)</sup>。そのため、組換え体の作製には哺乳類細胞や昆虫細胞を宿主に用いる発現系や、酵母発現系などを用いる必要があると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、三重大学生物資源学部の筒井直昭准教授には有益なご助言をしていただきました。ここに謝意を表します。

## 文献

- 1) 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.
- 2) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**: 49-90.
- 3) 福島 翠 (2010) クルマエビ類における成熟制御因子の探索. 修士論文, 日本大学.
- 4) Zmora N and Chung JS (2014) A novel hormone is required for the development of reproductive phenotypes in adult female crabs. *Endocrinol.* **155**: 230-239.
- 5) Kotaka S and Ohira T (2018) cDNA cloning and in situ localization of a crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Sci.* **84**: 53-60.
- 6) 甲高彩華 (2018) クルマエビの甲殻類雌性ホルモン様分子の探索および生理機能の解明. 博士論文, 神奈川大学.
- 7) 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.
- 8) Nagai C, Asazuma H, Nagata S, Ohira T and Nagasawa H (2009) A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides* **30**: 507-517.
- 9) Tsutsui N, Nagakura A, Nagai C, Ohira T and Nagasawa H (2013) The ex vivo effects of eyestalk peptides on ovarian vitellogenin gene expression in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fish. Sci.* **79**: 33-38.