

■原 著■ 2019年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明

関 友信¹ 松田 乾² 馬久地みゆき³ 鈴木道生⁴ 鈴木信雄⁵ 大平 剛^{1,6}

Transcriptomic Characterization of Exoskeletal Proteins Involved
in Fluoride Deposition from the Antarctic Krill *Euphausia superba*

Tomonobu Seki¹, Tsuyoshi Matsuda², Miyuki Mekuchi³, Michio Suzuki⁴,
Nobuo Suzuki⁵ and Tsuyoshi Ohira^{1,6}

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

² Port of Nagoya Public Aquarium, Minato-ku, Nagoya City, Aichi 455-0033, Japan

³ National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and Education Agency, Yokohama City, Kanagawa 236-8648, Japan

⁴ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

⁵ Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Division of Marine Environmental Studies, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan

⁶ To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Generally, the exoskeleton of crustaceans is mineralized with calcium carbonate. However, a high concentration of fluorapatite, which is one of the calcium phosphate crystals, is deposited in the exoskeleton of the Antarctic krill *Euphausia superba*. In order to identify exoskeletal proteins involved in fluoride deposition from *E. superba*, the tail fan and swimming legs with the epidermis inside the exoskeleton were subjected to RNA-seq analysis. We successfully predicted nine transcripts encoding exoskeletal proteins similar to calcification-associated peptide-1 (CAP-1), CAP-2, calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2), and strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, crustocalcin from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, exoskeletal proteins HACP127 and HACP188 from the American lobster *Homarus americanus*, arthrodistal cuticle protein AMP8.1 from the blue crab *Callinectes sapidus*, and cuticle protein AM/CP1114 from the crab *Cancer pagurus*. These transcriptomic data will promote further studies on the functional roles of the exoskeletal proteins involved in fluoride deposition in *E. superba*.

Keywords: iron complex, dibenzothiophene derivatives, N,C,S-tridentate ligand, quinolyl group, naphthyl group, charge transfer transition, electronic spectrum

序論

ナンキョクオキアミは南極海に分布し、巨大な群れを作って群泳する。エビ類と外見が似ているが、エビ類が属する十脚目とは異なり、オキアミ目に属する甲殻類である。ナンキョクオキアミは南極の生態系のキーストーン種であり、鯨類や鳥類などの重要な餌資源となっている。ナンキョクオキアミのバイオマスは数億トンと見積もられており、地球上で最も多いと考えられている¹⁾。ナンキョクオキアミ由来のタンパク質は、すべての必須アミノ酸を含んでおり、栄養的に優れている²⁾。これらのことから、

ナンキョクオキアミは家畜用飼料や養殖用飼料の原材料として、また人類のための食料として有望な資源と考えられている。しかし、ナンキョクオキアミの外骨格には高濃度のフッ素が含まれていることから、そのまま餌料や食料として使うことは不適である^{3,6)}。そのため、漁獲直後のナンキョクオキアミの外骨格を船上で除去する必要があり、脱殻するための機械が1970年代に開発された³⁾。しかし、脱殻機の性能が低く、ナンキョクオキアミのむき身に殻が残存することが問題となった。これらの理由から、

ナンキョクオキアミの膨大な資源は有効に利用されているとはいえない状況にある。

ナンキョクオキアミの外骨格にフッ素が高濃度で存在していることは古くから知られていた⁷⁾。しかし、外骨格に存在するフッ化物の正体は永らく不明であった。ナンキョクオキアミが脱皮した直後の外骨格のフッ化物含有量は100 ppm以下であるが、外骨格が硬化するにつれ含有量が急激に増加する⁸⁾。この結果は、フッ素の取り込みは外骨格の石灰化と連動していることを示している。そのため、ナンキョクオキアミの外骨格にはリン酸カルシウムのフルオロアパタイト結晶が存在し、外骨格の硬化に役立っているのではないかと考えられるようになった。一方、エビやカニなどの甲殻類の外骨格は、炭酸カルシウムのカルサイト結晶で構成されているため、ナンキョクオキアミの外骨格にフルオロアパタイトが本当に存在しているのかを疑問視する見方もあった。しかし、ごく最近、ナンキョクオキアミの外骨格に含まれるフッ化物の主成分はフルオロアパタイトであることが明らかにされた⁹⁾。

以上の背景から、ナンキョクオキアミのフッ素の取り込みには外骨格に存在して石灰化を制御している蛋白質が重要な役割をしていると考えられた。本研究では、ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構に関わる分子基盤を明らかにすることを目的として、ナンキョクオキアミの表皮で発現している遺伝子の網羅的な解析を行った。

材料と方法

ナンキョクオキアミ

名古屋港水族館で継代飼育されているナンキョクオキアミを実験に用いた。2018年3月14日、ナンキョクオキアミの雌6尾と雄4尾から遊泳肢と尾扇を摘出し、使用するまでRNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) 中で保存した。2018年度は、ナンキョクオキアミの脱皮周期の同定は行わなかった。2019年度は6月12日から10月22日にかけてナンキョクオキアミの雌7尾と雄8尾から遊泳肢と尾扇を摘出し、使用するまでRNAlater™ Stabilization Solution 中で保存した。2019年度は、サンプリングした15個体を個別に飼育し、脱皮間隔を観察することで脱皮周期の同定を行った。

Total RNA の抽出

ナンキョクオキアミの遊泳肢と尾扇のTotal RNAはISOGEN II (ニッポンジーン) を使用して抽出し、RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

Total RNAの濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。抽出および精製したtotal RNAが分解していないことをアガロース電気泳動で確認した。

RNA-seq 解析

ナンキョクオキアミの遊泳肢と尾扇から抽出・精製したtotal RNAからcDNAライブラリーを構築した。そして、イルミナ社のNextSeqシステムを用いてペアエンド法で各ライブラリー約1000万リードずつ解析した。得られた塩基配列をde novoアセンブルすることによりコンティグを作製した。アセンブルした塩基配列をCLC Genomics Workbench (QIAGEN) に取り込み、相同性検索 (tblastn 解析) を行った。

結果

ナンキョクオキアミの表皮で発現している遺伝子の網羅的解析

RNA-seq 解析で得られた配列の新規アセンブルにより、N50長が558 bの155,099個のコンティグが構築された。総塩基配列は約75 Mbであった。相同性検索を行った結果、アメリカザリガニ*Procambarus clarkii*のCalcification-associated peptide-1 (CAP-1)と80%、CAP-2と75%、Calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2)と92%、Strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1)と80%、クルマエビ*Marsupenaeus japonicus*のCrustocalcinと55.6%、アメリカンロブスター*Homarus americanus*のExoskeletal protein HACP127と51.2%、Exoskeletal protein HACP188と82.4%、アオガニ*Callinectes sapidus*のArthrodiol cuticle protein AMP8.1と56.6%、ヨーロッパイチョウガニ*Cancer pagurus*のCuticle protein AM/CP1114と63%の相同性を示す配列が見つかった (表1)。

討論

CAP-1

CAP-1はアメリカザリガニの外骨格から精製された基質ペプチドである¹⁰⁾。アメリカザリガニCAP-1は、炭酸カルシウムの結晶形成を抑制し、キチンとの結合活性を有していた。また、アメリカザリガニCAP-1は、外骨格の石灰化が起こる脱皮後期に、表皮で特異的に発現していた¹¹⁾。そして、大腸菌発現系を用いて組換えアメリカザリガニCAP-1が作製され、それを用いてカルシウム結合活性が調べられた¹²⁾。その結果、CAP-1のC末端領域がカルシウムとの結合に重要であることが明らかにされた。これらの研

表 1. トランスクリプトーム解析で同定したナンキョクオキアミの外骨格蛋白質遺伝子

Protein name	Identity (%)	E-value	Species	Accession numbers
Calcification-associated peptide-1 (CAP-1)	80.0	5.45118E-27	<i>Procambarus clarkia</i>	BAC81566
Calcification-associated peptide-2 (CAP-2)	75.0	1.53421E-19	<i>Procambarus clarkia</i>	BAD16776
Calcification-associated soluble protein-2 (CASP-2)	92.0	5.05631E-35	<i>Procambarus clarkia</i>	BAF73806
Strong chitin-binding protein-1 (SCBP-1)	80.0	2.11612E-36	<i>Procambarus clarkia</i>	BAM99303
Crustocalcin	55.6	6.7621E-16	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	BAB13739
Exoskeletal protein HACP127	51.2	1.17054E-07	<i>Homarus americanus</i>	Q7M499
Exoskeletal protein HACP188	82.4	2.9091E-32	<i>Homarus americanus</i>	Q7M497
Arthroal cuticle protein AMP8.1	56.6	1.35686E-26	<i>Callinectes sapidus</i>	AAV28476
Cuticle protein AM/CP1114	63.1	1.45202E-24	<i>Cancer pagurus</i>	P81575

究により、アメリカザリガニの CAP-1 は、外骨格においてキチンと結合し、カルシウムと結合することで、炭酸カルシウム結晶の核形成を誘導し、結晶成長の制御を行っていると考えられた。本研究により見出されたナンキョクオキアミの CAP-1 は、アメリカザリガニ CAP-1 と 80% という高い配列相同性を有することから、アメリカザリガニ CAP-1 と同様の活性を有すると推測される。今後、ナンキョクオキアミ CAP-1 がフッ素の取り込みに関与しているのかを明らかにしていく必要がある。

Crustocalcin

甲殻類の外骨格の石灰化は脱皮後期に特異的に起こる。Crustocalcin は脱皮後期にのみ特異的に発現している遺伝子の一つとしてクルマエビで同定された¹³⁾。クルマエビの Crustocalcin は、ショウジョウバエの Ca²⁺ 結合タンパク質であるカルフォチンと類似していた。大腸菌発現系を用いて組換えクルマエビ Crustocalcin を作製し、それを用いて Ca²⁺ 結合活性を調べたところ、実際にクルマエビ Crustocalcin は Ca²⁺ 結合活性を有していた^{13, 14)}。また、クルマエビ Crustocalcin は他の節足動物のクチクラタンパク質で保存されている Rebers & Riddiford コンセンサス配列と似た配列を有していた。そのため、クルマエビの Crustocalcin はキチンに結合する可能性が示唆された。これらの結果より、クルマエビ Crustocalcin は、アメリカザリガニ CAP-1 と同様に外骨格の石灰化に関与している分子と考えられた。本研究により見出されたナンキョクオキアミの Crustocalcin はクルマエビ Crustocalcin と 55.6% の相同性を示した。しかし、クルマエビ Crustocalcin との相同性はそれほど高くないことから、ナンキョクオキアミの Crustocalcin が同様の機能を果たしているかどうかは分からない。そのため、ナンキョクオキアミの Crustocalcin の場合は、フッ素の取

り込みとの関わりを調べるのではなく、石灰化への関与を調べる研究からスタートする必要がある。

その他の外骨格蛋白質

アメリカザリガニの CAP-2¹⁵⁾、CASP-2¹⁶⁾、SCBP-1¹⁷⁾、アメリカンロブスターの Exoskeletal protein HACP127 と HACP188¹⁸⁾、アオガニの Arthroal cuticle protein AMP8.1¹⁹⁾、ヨーロッパイチョウガニの Cuticle protein AM/CP1114 は²⁰⁾、全ての外骨格から抽出・単離され、構造決定された蛋白質である。これら外骨格蛋白質が外骨格の石灰化を直接制御しているかどうかは分かっていないが、外骨格の形成に何かしらの役割を演じている可能性が高い。本研究で見出したナンキョクオキアミの CAP-2、CASP-2、SCBP-1、Exoskeletal protein HACP127、Exoskeletal protein HACP188、Arthroal cuticle protein AMP8.1、Cuticle protein AM/CP1114 の機能について今後解析していきたいと考えている。

謝辞

本研究は 2019 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成「ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明」(RIIS201906) で行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

- 1) Nicol S and Foster J (2003) Recent trends in the fishery for Antarctic krill. *Aquat. Living Resour.* **16**: 42-45.
- 2) Chen YC, Tou JC and Jaczynski J (2009) Amino acid and mineral composition of protein and other components and their recovery yields from whole Antarctic krill (*Euphausia superba*) using isoelectric solubilization/precipitation. *J. Food Sci.* **74**: H31-H39.
- 3) Suzuki T and Shibata N (1990) The utilization of Antarctic krill for human food. *Food Rev. Int.* **6**: 119-147.
- 4) Sands M, Nicol S and McMinn A (1998) Fluoride in

- Antarctic marine crustaceans. *Mar. Biol.* **132**: 591-598.
- 5) 吉富文司, 大嶋俊一郎, 高橋正征 (2007) 海産バイオマス (ナンキョクオキアミ, *Euphausia superba* Dana) 資源の多次元利用. *黒潮圏科学* **1**: 56-71.
 - 6) Jung HR, Kim M-A, Seo Y-S, Lee Y-R, Chun B-S and Kim S-B (2013) Decreasing effect of fluoride content in Antarctic krill (*Euphausia superba*) by chemical treatments. *Int. J. Food Sci. Technol.* **48**: 1252-1259.
 - 7) Soevik T and Breakkan OR (1979) Fluoride in Antarctic krill (*Euphausia superba*) and Atlantic krill (*Meganyctiphanes norvegica*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* **36**: 1414-1416.
 - 8) Adelung D, Buchholz F, Culik B and Keck A (1987) Fluoride in tissues of krill *Euphausia superba* Dana and *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars in relation to the moult cycle. *Polar Biol.* **7**: 43-50.
 - 9) Peng Y, Ji W, Zhang D, Ji H and Liu S (2019) Composition and content analysis of fluoride in inorganic salts of the integument of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Sci. Rep.* **9**: 7853.
 - 10) Inoue H, Ozaki N and Nagasawa H (2001) Purification and structural determination of a phosphorylated peptide with anti-calcification and chitin-binding activities in the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **65**: 1840-1848.
 - 11) Inoue, H, Ohira T, Ozaki N and Nagasawa H (2003) Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish. *Comp. Biochem. Phys. B* **136**: 755-765.
 - 12) Inoue H, Ohira T and Nagasawa H (2007) Significance of the C-terminal acidic region of CAP-1, a cuticle calcification-associated peptide from the crayfish, for calcification. *Peptides* **28**: 566-573.
 - 13) Endo H, Persson P and Watanabe T (2000) Molecular cloning of the crustacean DD4 cDNA encoding a Ca²⁺-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **276**: 286-291.
 - 14) Endo H, Takagi Y, Ozaki N, Kogure T and Watanabe T (2004) A crustacean Ca²⁺-binding protein with a glutamate-rich sequence promotes CaCO₃ crystallization. *Biochem. J.* **384**: 159-167.
 - 15) Inoue H, Ohira T, Ozaki N and Nagasawa H (2004) A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **318**: 649-654.
 - 16) Inoue H, Yuasa-Hashimoto N, Suzuki M and Nagasawa H (2008) Structural determination and functional analysis of a soluble matrix protein associated with calcification of the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**: 2697-2707.
 - 17) Suzuki M, Sugisaka-Nobayashi A, Kogure T and Nagasawa H (2013) Structural and functional analyses of a strongly chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **77**: 361-368.
 - 18) Nousiainen M, Rafn K, Skou L, Roepstorff P and Andersen SO (1998) Characterization of exoskeletal proteins from the American lobster, *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **119**: 189-199.
 - 19) Wynn A and Shafer TH (2005) Four differentially expressed cDNAs in *Callinectes sapidus* containing the Rebers-Riddiford consensus sequence. *Comp. Biochem. Physiol. B* **141**: 294-306.
 - 20) Andersen SO (1998) Exoskeletal proteins from the crab, *Cancer pagurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **121**: 375-383.