

■原 著■

ホワイトレグシュリンプの脱皮抑制ホルモンの探索

大平 剛^{1,5} 豊田賢治² Nguyen Thi Van Anh³ 高塚由美子⁴ 原富次郎⁴

Transcriptomic Characterization of Molt-inhibiting Hormones from the
Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Tsuyoshi Ohira^{1,5}, Kenji Toyota², Nguyen Thi Van Anh³, Yumiko Takatsuka⁴
and Tomijiro Hara⁴

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

² Marine Biological Station, Sado Center for Ecological Sustainability, Niigata University, Sado City, Niigata 952-2135, Japan

³ Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

⁴ Environmental Microbiology Research Section, Laboratory for Complex Energy Processes, Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Kyoto City, Kyoto 611-0011, Japan

⁵ To whom correspondence should be addressed. E-mail: ohirat-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Molt-inhibiting hormone (MIH) is produced in the X-organ/sinus gland complex of the eyestalk. MIH negatively regulates molting hormone (ecdysteroids) synthesis in the Y-organ. Therefore, MIH is considered to be one of the most important molecules for growth regulation in crustaceans. In order to discover new MIH molecules from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, RNA-seq analysis was conducted in this study. Total RNAs were extracted from the eyestalk, brain, thoracic ganglia, and abdominal ganglia, and were used for library preparation. Pair-end sequencing of the constructed cDNA libraries was performed (3.0 Mb for each library). As a result, five new MIH molecules were identified and one of them was expressed in all nerve tissues. This characteristic gene expression pattern was similar to that of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* MIH-B, so this molecule from *L. vannamei* was designated as Liv-MIH-B. Amino acid sequence comparison of Liv-MIH-B and known MIHs indicated that Liv-MIH-B must be a non-eyestalk type molecule. However, the expression level of Liv-MIH-B in the eyestalk was very high. Therefore, Liv-MIH-B was considered to be a unique MIH molecule that has never been reported.

Keywords: crustacea, eyestalk hormone, whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, molt-inhibiting hormone

序論

エビやカニなどの甲殻類は硬い外骨格を持つ。外骨格は主にキチンと炭酸カルシウムからなり、硬いだけでなく、しなやかで丈夫である。甲殻類が成長するためには、古い外骨格を脱ぎ捨てる必要があり、その現象を脱皮と呼ぶ。脱皮から脱皮までの期間は、外骨格の構造変化により脱皮前期、脱皮間期、脱皮期、脱皮後期に分けることができる。甲殻類の脱皮は、頭胸部に存在する Y 器官で合成される脱皮ホルモン（エクジステロイド）により制御されている^{1,2)}。

多くの甲殻類で、血中のエクジステロイドが脱皮前期に上昇することで脱皮が誘導される。

エクジステロイドによる脱皮の誘導が明らかにされるよりも遥か昔、甲殻類の眼柄を切除すると脱皮が早まることが示されていた³⁾。この現象から、眼柄の中には甲殻類の脱皮を抑制する因子が存在すると推測された。眼柄内には X 器官と呼ばれるホルモンを合成する神経分泌細胞群と、合成されたホルモンを一時的に貯蔵するサイナス腺が存在していた。

1990 年、初めてアメリカンロブスターのサイナス腺から脱皮抑制ホルモン (molt-inhibiting hormone, MIH) が単離され、アミノ酸配列が決定された⁴⁾。アメリカンロブスターの MIH は、Y 器官でのエクジステロイド合成を抑制する活性を有していた。アメリカンロブスターの MIH は、1989 年に単離・構造決定されていたミドリガニの甲殻類血糖上昇ホルモン (crustacean hyperglycemic hormone, CHH) と類似していた⁵⁾。さらに、アメリカンロブスターの卵黄形成抑制ホルモン (vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH) のアミノ酸配列も決定され、VIH も MIH や CHH と類似のアミノ酸配列を有していた⁶⁾。これらの眼柄ホルモンは生理活性が異なっているにもかかわらず、類似するアミノ酸配列を有していることから、1 つのペプチドファミリー (CHH 族) を形成していることが明らかとなった。

MIH は脱皮を制御することで、甲殻類の成長を制御している。そのため、MIH に関する情報は甲殻類の成長を理解する上で重要と考えられるようになり、世界中で盛んに養殖が行われているクルマエビ科のエビ類の MIH が次々と同定された。1996 年にクルマエビのサイナス腺から MIH が精製・単離され⁷⁾、2005 年には新たに MIH とよく似た分子 (MIH-B) が同定された⁸⁾。クルマエビ MIH-B は MIH よりも活性は低いものの、有意にエクジステロイドの合成を抑制した。2002 年、ウシエビにも MIH が 2 種類存在することが cDNA クローニングにより示された⁹⁾。それら 2 つの MIH は僅か 2 アミノ酸しか異なっておらず、一次構造がよく類似していた (同一率 97.4%)。しかし、それら 2 つの遺伝子が 1 個体由来のゲノム DNA に別々に存在していたことから、個体差による違いではないことが明らかとなった。その後も複数のクルマエビ科のエビ類で研究がすすめられ、MIH が同一種に複数存在することが示された¹⁰⁾。

ホワイトレグシュリンブ (*Litopenaeus vannamei*) は世界で最も盛んに養殖されているクルマエビ科のエビ類である。そのため、MIH の研究も進んでいる。現在までに、ホワイトレグシュリンブから MIH1、MIH2、MIH like protein、MIH-1、MIH-2 の 5 種類をコードする cDNA が単離され、報告されている¹¹⁻¹³⁾。近年、ホワイトレグシュリンブのゲノム配列が解析され、前述の 5 種類に加えてさらに多くの MIH が存在する可能性が示された¹⁴⁾。そこで本研究では、ホワイトレグシュリンブの神経組織 (眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節) の RNA シークエンス解析を行い、遺伝子発現している新規の MIH を探索することを目的とした。

材料と方法

ホワイトレグシュリンブ

奈良県の養殖業者が飼育していたホワイトレグシュリンブの成体エビを実験で使用した。神経ホルモンの産生器官である眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節を実体顕微鏡下で摘出した。摘出した 4 つの器官は別々に RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) の入った 1.5 mL チューブ中に入れ -80 度で保存した。

Total RNA の抽出

眼柄は total RNA を抽出する前に解凍し、RNAlater™ Stabilization Solution 中で殻と網膜を除去して眼柄神経節のみを外科的に切り出した。眼柄神経節、脳、胸部神経節、腹部神経節の 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 (雌雄それぞれ n=1)。Total RNA の濃度はナノドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

RNA-seq 解析

抽出した total RNA を Gene Nex 社に送付し、RNA シークエンス解析を行った。ライブラリーは Eukaryotic Transcriptome Library を用いて作製された。RNA-seq は 101 bp の paired-end で実施し、各サンプル約 3.0 G bp のシーケンスを得た。シーケンスの品質チェックは FastQC プログラム (version 0.11.2) で実施した。ホワイトレグシュリンブは公共データベースからゲノムとトランスクリプトームデータが利用可能である (<http://www.shrimpbaseset.net/lva/download.html>)。リードカウントには salmon (version 1.4.0) を用いた。

結果

ホワイトレグシュリンブの神経組織で発現している MIH

今回の解析により、5 種類の MIH mRNA が神経組織で発現していた。それら 5 種類の MIH のアミノ酸配列は、ホワイトレグシュリンブのゲノム配列から推測された MIH や MIH 様分子のアミノ酸配列と完全に一致していた (アクセッション番号 ROT81026, ROT81028.1, XP_027237983, XP_027237684.1, XP_027223582.1)。それらのうち、XP_027223582.1 のみが特徴的な遺伝子発現をしていた。XP_027223582.1 は今回調べた全ての神経組織で発現していたが (図 1)、他の 4 種類は眼柄のみでしか発現していなかった (データ省略)。また、

XP_027223582.1 は眼柄、脳、胸部神経節で高発現していたが、腹部神経節の発現量は低かった (図 1)。この発現パターンは、クルマエビの MIH-B と類似していた⁸⁾。そのため本研究では、この特徴的な分子をホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B) と名付けた。

Liv-MIH-B

Liv-MIH-B の前駆体は 141 アミノ酸残基からなり、N 末端側から 25 アミノ酸残基のシグナルペプチド、41 アミノ酸残基の前駆ペプチド、2 アミノ酸残基のプロセシングシグナル、73 アミノ酸残基の Liv-MIH-B で構成されていた (図 2)。Liv-MIH-B と既知のホワイトレグシュリンプ MIH のアミノ酸配列を比較した結果、Liv-MIH-B は Liv-MIH-I と最もよく類似していた¹²⁾。しかし、Liv-MIH-B と Liv-MIH-I は C 末端側の 2 アミノ酸残基が異なっていた (図 2)。クルマエビの CHH やウシエビの MIH においても、僅か 1 から 2 アミノ酸違いの分子が同一個体で発現していることが明らかにされている^{9, 15)}。これらのことから、Liv-MIH-B と Liv-MIH-I も異なる分子と考えられた。

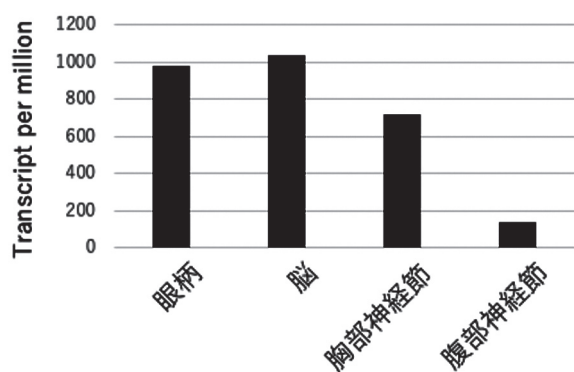


図 1. ホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B) の神経組織別の遺伝子発現。

討論

ホワイトレグシュリンプの神経組織で発現している MIH

本研究では神経組織で発現している 5 つの MIH を見出したが、それらは既知のホワイトレグシュリンプ MIH1、MIH2、MIH like protein、MIH-1、MIH-2 とはアミノ酸配列が異なっていた¹¹⁻¹³⁾。この結果より、ホワイトレグシュリンプには、未知の MIH 分子が多数存在していることが明らかとなった。また、本研究で発見した 5 つの MIH 分子は、神経組織で遺伝子発現していたことから、生体内で何かしらの機能を果たしていると考えられた。ホワイトレグシュリンプは、RNA 干渉による遺伝子ノックダウンが有効であることが報告されている¹³⁾。今後、これら 5 種類の MIH の機能を RNA 干渉による遺伝子ノックダウン実験で調べる予定である。

Liv-MIH-B

Liv-MIH-B と最も良く似ていた Liv-MIH-I にはスプライシングバリエーション (Liv-MIH-II) が存在する (図 2)。Liv-MIH-I と Liv-MIH-II は成熟ホルモンの 43 残基目のシステインまではアミノ酸配列が同一であるが、それよりも C 末端側のアミノ酸配列は異なっていた。これは、スプライシング様式の違いが原因で起きることが明らかとなっている。ミドリガニの CHH でも同様の現象が観察されており、成熟 CHH の C 末端側にアミド化シグナルが存在する分子は眼柄で発現し、アミド化シグナルが存在しない分子は囲心器官で発現していた¹⁶⁾。その後、同様の選択的スプライシングが幾つかの CHH 族ペプチドで報告され、アミド化シグナルが存在する分子は眼柄タイプ、アミド化シグナルが存在しない分子は非眼柄タイプということが分かった¹⁷⁾。Liv-MIH-B は C 末端側にアミド化シグナルが存在しないことから非眼柄タイプと考えられたが、眼柄で強く発現していた (図

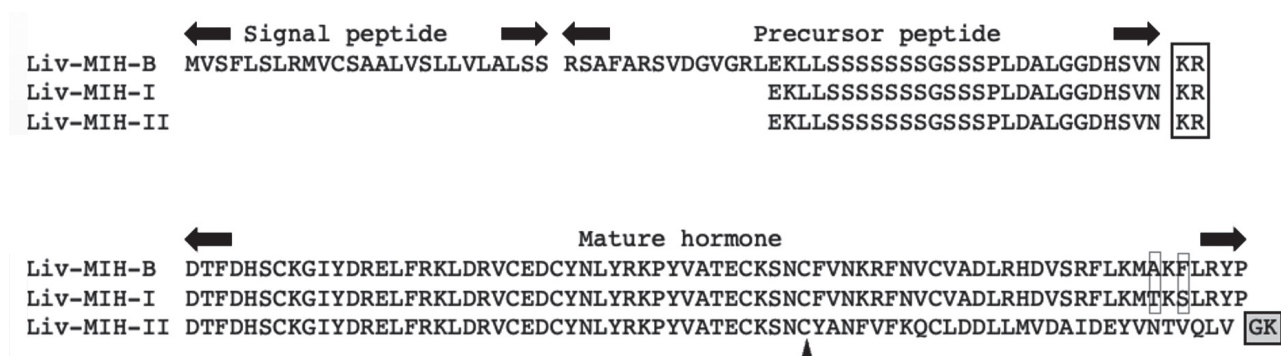


図 2. ホワイトレグシュリンプ MIH-B (Liv-MIH-B), Liv-MIH-I¹²⁾, Liv-MIH-II¹²⁾ のアミノ酸配列のアライメント。実線のボックスはプロセシングシグナルを、点線のボックスは Liv-MIH-B と Liv-MIH-I で異なっているアミノ酸を、グレーのボックスはアミド化シグナルを示す。三角は 43 残基目のシステインを示す。

1)。この様に、Liv-MIH-Bは既知の知見とは異なる特徴を有していた。そのため、Liv-MIH-Bは新たな機能を有する可能性も考えられた。Liv-MIH-Bにはスプライシングバリエーションの眼柄タイプも存在すると考えられる。今後、Liv-MIH-Bだけでなく、スプライシングバリエーションの機能を解析していくことで、Liv-MIH-Bの生体内での役割を明らかにしていく予定である。

謝辞

本研究は、京都大学エネルギー理工学研究所・ゼロエミッションエネルギー研究拠点の2022年度共同研究「*Bacillus* 属細菌胞子によるバナメイエビの成長促進機構の解明（課題番号 ZE2022B-46）」の支援を受けて行われたものです。ここに謝意を表します。

文献

- 1) 長澤寛道 (1997) 甲殻類における脱皮の内分泌機構. 月刊海洋 29: 246-250.
- 2) 園部治之, 仲辻晃明 (2002) 甲殻類の脱皮を制御する内分泌機構. 化学と生物 40:101-108.
- 3) Zeleny C (1905) Compensatory regulation. *J. Exp. Zool.* 2: 1-102.
- 4) Chang ES, Prestwich GD and Bruce MJ (1990) Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 818-826.
- 5) Kegel G, Reichwein B, Weese S, Gaus G, Peter-Katalinic J and Keller R (1989) Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas* FEES Lett. 255: 10-14.
- 6) Soye D, LeCaer 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.
- 7) 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.
- 8) Ohira T, Katayama H, Tominaga S, Takasuka T, Nakatsuji T, Sonobe H, Aida K and Nagasawa H (2005) Cloning and characterization of a molt-inhibiting hormone-like peptide from the prawn *Macrobrachium japonicum*. *Peptides* 26: 259-268.
- 9) Krungkasem C, Ohira T, Yang WJ, Abdullah R, Nagasawa H and Aida K (2002) Identification of two distinct molt-inhibiting hormone-related peptides from the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* 4: 132-140.
- 10) Nakatsuji T, Lee CY and Watson RD (2009) Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152:1 39-148.
- 11) Chen HY, Watson RD, Chen JC, Liu HF and Lee CY (2007) Molecular characterization and gene expression pattern of two putative molt-inhibiting hormones from *Litopenaeus vannamei*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151: 72-81.
- 12) Lago-Lestón A, Ponce E and Muñoz ME (2007) Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt-inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. *Aquaculture* 270: 343-357.
- 13) Zuo H, Yuan J, Niu S, Yang L, Weng S, He J and Xu X (2018) A molting-inhibiting hormone-like protein from pacific white shrimp *litopenaeus vannamei* is involved in immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 72: 544-551.
- 14) Zhang XJ, Yuan J, Sun Y, Li S, Gao Y, Yu Y, Liu C, Wang Q, Lv X, Zhang X, Ma KY, Wang X, Lin W, Wang L, Zhu X, Zhang C, Zhang J, Jin S, Yu K, Kong J, Xu P, Chen J, Zhang H, Sorgeloos P, Sagi A, Alcivar-Warren A, Liu Z, Wang L, Ruan J, Chu KH, Liu B, Li F and Xiang J (2019) Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature commun.* 10: 1-14.
- 15) Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* 6: 49-90.
- 16) Dirksen H, Böcking D, Heyn U, Mandel C, Chung JS, Baggerman G, Verhaert P, Daufeldt S, Plösch T, Jaros PP, Waelkens E, Keller R and Webster SG (2001) Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* 356: 159-170.
- 17) Webster SG, Keller R and Dirksen H (2021) The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175: 217-233.