

■原 著■ 2021 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発光器官制御ホルモンの探索

大平 剛^{1,5} 松田 乾² 豊田賢治³ 鈴木信雄⁴

Transcriptomic Characterization of Eyestalk Hormones Regulating Photophores from the Antarctic Krill *Euphausia superba*

Tsuyoshi Ohira^{1,5}, Tsuyoshi Matsuda², Kenji Toyota³ and Nobuo Suzuki⁴

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

⁴ Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Division of Marine Environmental Studies, Kanazawa University, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan

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

Abstract: The Antarctic krill *Euphausia superba* has ten photophores, a single pair on the eyestalks, two pairs on the thorax, and four unpaired organs on the abdomen. The bioluminescence emitted by the photophores is used for camouflage from predators below and intraspecific communication. The photophores are considered to be regulated by the nervous and endocrine systems, but hormonal molecules that control the photophores have never been identified. In this study, transcriptome analysis of the eyestalk from *E. superba*, which is the biggest ganglion in the central nervous system and most important endocrine organ in crustaceans, was conducted. As a result, a transcript encoding red pigment-concentrating hormone (RPCH) was identified. RPCH is known to be secreted from nerve endings and act as a neurotransmitter and neuromodulator. Therefore, the Antarctic krill RPCH may regulate photophores on the thorax and abdomen. Moreover, ten transcripts encode pigment-dispersing hormone (PDH). PDH regulates the light-adapting migration of pigment granules in the distal pigment cells of the compound eye. The strong association between vision and bioluminescence suggests that some PDHs identified from the Antarctic krill may regulate photophores in addition to body color change. The transcriptomic data obtained in this study will contribute to further elucidation of the endocrine regulation of photophores in the Antarctic krill.

Keywords: Antarctic krill, *Euphausia superba*, eyestalk hormone, red pigment concentrating hormone, pigment dispersing hormone

序論

南極海に生息するナンキョクオキアミは、水深 200 m よりも浅い表層にパッチ(群)を形成する。ナンキョクオキアミの形態はエビ類と酷似しているものの、エビ類を含む軟甲綱、ホンエビ上目、十脚目とは異なり、軟甲綱、ホンエビ上目、オキアミ目に属している。ナンキョクオキアミは南極海に生息する多くの大型動物の餌生物であることから、南極の生態系全体に影響を持つキーストーン種と考えられている。ナンキョクオキアミの資源量は 6,000 万トンから 1.5

億トンと推測されており、単一種としては地球上で最大の生物量と考えられている¹⁾。

ナンキョクオキアミはオキアミ属 (genus *Euphausia*) の最大種で、体長は 50~60 mm に達する²⁾。ナンキョクオキアミの体は、頭胸部と腹部からなり、腹部の先端には尾節が存在する。頭胸部には 1 対の複眼、2 対の触角、6 対の胸脚がある。一般的に、オキアミの仲間は胸脚が 8 対存在するが、ナンキョクオキアミの胸脚は後方の 2 対が退化して

いる²⁾。オキアミ類は、胸脚の剛毛を使って植物プランクトンを海水から濾過し、摂食している。ナンキョクオキアミの腹部には5対の腹脚があり、それらは遊泳のために使われる。

ナンキョクオキアミは発光器を有しており、光を放つことができる。発光器は眼柄に1対、胸脚に2対、腹脚の基部に4個の合計10個が存在する³⁾。ナンキョクオキアミの発光器は、発光細胞層と反射細胞層からなり、前面には水晶体が発達している^{4,5)}。発光器は筋肉によって回転させることができる。この様に、発光器は光受容器である眼に匹敵する高度な構造を有している。発光器による発光はオキアミの影を打ち消し、捕食者から発見されにくくするカモフラージュシステムとして機能していると考えられている⁴⁾。また、同種間のコミュニケーションに使われているという説も唱えられている⁶⁾。

発光器の発光は神経により制御されている。オキアミ類の *Meganctiphanes norvegica* では、腹部の神経に電気刺激を加えると発光器が発光することが示されている⁶⁾。また、セロトニンを注射すると発光器が発光することから、セロトニン作動性ニューロンの支配を受けていると考えられている⁷⁾。一方、サクラエビでは、眼柄を切除すると強い発光が誘導される⁸⁾。この結果より、発光器は眼柄で合成されるホルモンにより制御されていると考えられている⁸⁾。しかし、どの眼柄ホルモンが発光器を制御しているのかは明らかとなっていない。

活きたナンキョクオキアミを入手することは難しいことから、ナンキョクオキアミの眼柄ホルモンの知見は皆無であった。本研究では、ナンキョクオキアミの発光器を制御するホルモンを探索することを目的として、ナンキョクオキアミの眼柄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。2019年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尾から眼柄を摘出し、使用するまで RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific) 中で保存した。

Total RNA の抽出

RNAlater™ Stabilization Solution で保存していたナンキョクオキアミの雌雄の眼柄から眼柄神経節のみを外科的に切り出した。眼柄神経節の 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。ナンキョクオキアミは利用可能なレファレンスがないため、Trinity (version 2.9.1) を用いて de novo assembly を行なった。さらに遺伝子モデルの冗長性を排除するため evidentialgene (<https://sourceforge.net/p/evidentialgene/discussion/general/thread/a4f0e29f/>) を用いて主要な transcripts の抽出を行なった。リードカウントには salmon (version 1.4.0) を用いた。さらに類似配列を有するコンティグに起因するマッピング率低下を改善するため、発現パターンに基づいてコンティグを階層的にクラスタリングする Corset (version 1.09) を実施した。Corset から集約したコンティグの fasta ファイル (ナンキョクオキアミの de novo assembly した遺伝子モデル) を出力し、高速 Blast ツールである DIAMOND (version 0.9.22) により BlastX 解析を実施した。

```

nt 1 ACAACTGTGCTGATATGAACCCGACA
nt 27 CAACCCGCGGCGAGCAACAGGTGAAGACACTGCTCCGCGCTGCAGACAGATACAG
aa 1 M R V S I T M M S A M V V A V L A F C A
nt 87 ATGCGTGTGAGTATTACCATGATGTCTGATGGTGGCCGTGTGGCTTCTTCGCGC
aa 21 I C V S A Q L N F S P S G K R N S D D
nt 147 ATCTGTGTGCTGCGACAGCTCAACTTCTCACCAGGATGGGGCAAGCCGAATTCAGATGAC
aa 41 S M S L R P H H S I R S S S G G I N G A
nt 207 TCTATGAGCCTGCGCCCTCATATAGCATAGAAGCAGCAGTGGTGGCATCAATGGCCGC
aa 61 L P P P I R G L V D N C A D M N R V A T
nt 287 CTCTCCCCCAATCCGAGGCTTGTGCAACTGTGCTGATATGAACCGGTATGCAAC
aa 81 V M H I Y N L I K N E A A R M I Q C Q D
nt 327 GTCATGCACATCTACAACCTCATCAAGAATGAGGCTGCCCGTATGATCAGTGTCAAGAT
aa 101 E D L N *
nt 387 GAAGATCTCAACTGATTACTACCACAACATAATCATCGTGTCTCTCTCCCTAAACCAATT
nt 447 CCCTAAACCATGCAACTGCTGAACTAATATAGTGTCTTATAGTAAACAAGTGTTCGAA
nt 507 CCACTGCACAGCTCTGTGGATTGTCATCGGATAGGTTAAAGCATCGTTTCTCTCTCC
nt 567 CTAAACCATGCAACTGCTGAACTAATATAGTGTCTTATAGTAAACAAGTGTTCGAAAC
nt 627 ACTGCACAGCTCTGTGGATCTTGGCATCGGATAGGTTAAAGTATCGCATTCATCATCATT
nt 687 AAAATCATGCAACTGCTCGGAGACAATATATTTAAAATATATACCTTTTGTAAACTTTT
nt 747 GTATGTACATTATGTGTCGGTTTATAAAGAACTCATTATATATATAAATGGTGTATAT
nt 807 GATTAAGATGATCAGATATGTGATAATATATACAAATGATTTCTCTCATGTCAGTGG
nt 867 AATGTACAATTTATATAGCTTTTAAATATTCATATATATGATATACATCAATGATATATATA
nt 927 TGTATACATATATATA

```

図1. ナンキョクオキアミの赤色素凝集ホルモン(RPCH)をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列。下線はシグナルペプチドを、太字は RPCH を、ボックスはアミド化シグナルを、斜体は RPCH precursor-related peptide を示す。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
<i>Pandalus boreali</i>	N	S	G	M	I	N	S	I	L	G	I	P	-	-	-	-	-	R	V	M	T	E	A	amide	α-type	
<i>Pandalus jordani</i>	N	S	G	M	I	N	S	I	L	G	I	P	-	-	-	-	-	K	V	M	A	D	A	amide		
<i>Uca pugilator</i>	N	S	E	L	I	N	S	I	L	G	L	P	-	-	-	-	-	K	V	M	N	D	A	amide	β-type	
<i>Callinectes sapidus</i> II	N	S	E	L	I	N	S	L	L	G	I	S	-	-	-	-	-	A	L	M	N	E	A	amide		
<i>Romalea microptera</i>	N	S	E	I	I	N	S	L	L	G	L	P	-	-	-	-	-	K	L	L	N	D	A	amide		
<i>Marsupenaeus japonicus</i> I	N	S	E	L	I	N	S	L	L	G	I	P	-	-	-	-	-	K	V	M	T	D	A	amide		
<i>Marsupenaeus japonicus</i> II	N	S	E	L	I	N	S	L	L	G	L	P	-	-	-	-	-	K	F	M	I	D	A	amide		
<i>Euphausia superba</i> I	N	S	E	T	I	N	A	M	L	G	L	P	Q	T	L	R	V	Q	K	L	M	S	K	L	amide	γ-type
<i>Euphausia superba</i> II	N	S	E	T	I	N	A	M	L	G	L	P	Q	T	L	R	A	Q	K	L	M	A	K	L	amide	
<i>Euphausia superba</i> III	N	A	E	T	I	N	A	M	L	G	L	P	Q	T	L	R	A	Q	Q	L	M	A	K	L	amide	

図2. ナンキョクオキアミの色素拡散ホルモン (PDH) と既知 PDH のアミノ酸配列のアライメント. 実線のボックスは全てのタイプで保存されているアミノ酸を, 斜線のボックスはαタイプに特徴的なアミノ酸を, グレーのボックスはγタイプに特徴的なアミノ酸を示す. *P. borealis* 13), *P. jordani* 14), *U. pugilator* 15), *C. sapidus* 16), *R. microptera* 17), *M. japonicus* 19).

結果

ナンキョクオキアミの眼柄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, 39,611 個のコンティグが構築された。そのうち BlastX により 19,031 遺伝子にアノテーションが付与された。

ナンキョクオキアミの赤色色素凝集ホルモン (RPCH)

ナンキョクオキアミ RPCH cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列を図1に示す。ナンキョクオキアミ RPCH の cDNA は 942 bp からなり, 312 bp の Open reading frame (ORF) を持ち, 104 アミノ酸残基からなるナンキョクオキアミ RPCH の前駆体をコードしていた (図1)。ナンキョクオキアミ RPCH の前駆体は N 末端側から, 25 アミノ酸残基からなるシグナルペプチド, 8 アミノ酸残基からなるナンキョクオキアミ RPCH, 3 アミノ酸残基 (Gly-Lys-Arg) からなるアミド化シグナル, 68 アミノ酸残基からなる RPCH precursor-related peptide と呼ばれる機能不明のペプチドにより構成されていた (図1)。ナンキョクオキアミ RPCH の N 末端の Gln はピログルタミル化され pGlu に, C 末端の Trp はアミド化されると推測されたことから, 成熟型のナンキョクオキアミ RPCH の一次構造は「pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂」と推定された。

ナンキョクオキアミの色素拡散ホルモン (PDH)

今回の解析で得られたコンティグの中には 10 個のナンキョクオキアミ PDH 前駆体と推測される配列が存在した。それらの塩基配列から推測した成熟型のナンキョクオキアミ PDH は 3 種類であった (図2)。それらをナンキョクオキアミ PDH-I から PDH-

III と名付けた。3 種類のナンキョクオキアミ PDH はいずれも 24 アミノ酸残基からなり, C 末端の Leu はアミド化されると推測された。3 種類のナンキョクオキアミ PDH は, N 末端側 12 残基目までのアミノ酸配列は既知の PDH と良く似ていたが, 13 残基目以降の配列には相同性は見られなかった。3 種類のナンキョクオキアミ PDH には, 既知の PDH には存在しない特徴的な 6 アミノ酸残基が挿入されていた (図2)。

討論

ナンキョクオキアミ RPCH

RPCH は甲殻類の赤色色素胞内の色素顆粒を凝集させる作用を持ち, 体色調節に関わっていると考えられている⁹⁾。また, 神経終末から分泌され神経伝達物質や¹⁰⁾、神経調節物質としても働く¹¹⁾。これらのことから, RPCH は発光器を制御している可能性があると考えた。本研究により明らかにしたナンキョクオキアミ RPCH のアミノ酸配列は, 既知の RPCH と完全に一致していた (図1)。この結果とナンキョクオキアミにも赤色色素胞が体表に存在することを考慮すると, 眼柄で発現するナンキョクオキアミ RPCH は既知の甲殻類と同様に体色調節に関わっていると考えられた。一方, RPCH は眼柄以外の神経組織でも発現していることが明らかとなっている。ホワイトレグシュリンプの RPCH は眼柄に加えて, 脳, 胸部神経節, 腹部神経節でも遺伝子発現が観察された¹²⁾。ナンキョクオキアミでも RPCH が胸部神経節や腹部神経節で発現しているのなら, 胸脚や腹脚基部に存在する発光器を制御している可能性も考えられる。今後, ナンキョクオキアミ RPCH の組織別遺伝子発現を調べることからスタートする必要がある。

ナンキョクオキアミ PDH

PDH は甲殻類の色素胞内の色素顆粒を拡散させる作用を持ち、RPCH と同様に体色調節に関わっていると考えられている⁹⁾。また、複眼に存在する遠位色素細胞に含まれる色素顆粒の移動も制御している⁹⁾。発光器は周囲の光環境の影響を受けていることから、光受容に関わる遠位色素細胞を制御している PDH は発光器を制御している可能性があると考えた。本研究により明らかにしたナンキョクオキアミ PDH のアミノ酸配列は、既知の PDH とは異なり特徴的なアミノ酸配列を有していた (図 2)。ナンキョクオキアミの PDH には 6 アミノ酸残基が挿入されており、これまでに明らかにされている PDH の 2 つのサブグループ (α タイプと β タイプ) とは明らかに異なっていた。そのため、本研究で明らかにしたナンキョクオキアミの PDH は 3 つめのサブグループ (γ タイプ) を形成すると考えられた。この結果より、ナンキョクオキアミの PDH は、既知の PDH とは異なる新規の生物活性を持つ可能性が考えられた。3 種類のナンキョクオキアミ PDH は化学合成が可能なサイズのため、今後、合成ナンキョクオキアミ PDH を用いて発光器の発光を誘導するかどうかを試みる予定である。

謝辞

本研究は 2021 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発光器官制御ホルモンの探索」(RIIS202107) で行われたものです。RNA-seq のデータ解析は基礎生物学研究所の生物情報解析システムを用いて行いました。ここに謝意を表します。

文献

- Nicol S and Foster J (2003) Recent trends in the fishery for Antarctic krill. *Aquat. Living Resour.* **16**: 42-45.
- 国立極地研究所 (1983) *南極の科学 (7) 生物*. 古今書院, 東京.
- Grinnell AD, Narins PM, Awbrey FT, Hamner WM and Hamner PP (1988) Eye/photophore coordination and light following in krill *Euphausia superba*. *J. Exp. Biol.* **134**: 61-77.
- Herring PJ (1985) Bioluminescence in the Crustacea. *J. Crustac. Biol.* **5**: 557-573.
- Michael L (1995) Physiological mechanisms in the control of bioluminescent countershading in a midwater shrimp. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* **26**: 207-218.
- Fregin T and Wiese K (2002) The photophores of *Meganectiphanes norvegica* (M. Sars) (Euphausiacea): mode of operation. *Helgol. Mar. Res.* **56**: 112-124.
- Herring PJ and Locket NA (1978) The luminescence and photophores of euphausiid crustaceans. *J. Zool.* **186**: 431-462.
- Omori M, Latz MI, Fukami H and Wada M (1996) New observations on the bioluminescence of the pelagic shrimp, *Sergia lucens* (Hansen, 1922). In: *Zooplankton: sensory ecology and physiology*. Lenz PH, Hartline DK, Purcell JE and Macmillan DL, eds., Gordon and Breach publishers, Amsterdam. pp.175-184.
- Katayama H, Ohira T and Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua. BioSci. Monogr.* **6**: 49-90.
- Sarojini R, Nagabhushanam R and Fingerman M (1995) A neurotransmitter role for red-pigment-concentrating hormone in ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* **198**: 1253-1257.
- Sherff CM and Mulloney B (1991) Red pigment concentrating hormone is a modulator of the crayfish swimmeret system. *J. Exp. Biol.* **155**: 21-35.
- Chen HY, Kang BJ, Sultana Z and Wilde MN (2018) Molecular cloning of red pigment-concentrating hormone (RPCH) from eyestalks of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Evaluation of the effects of the hormone on ovarian growth and the influence of serotonin (5-HT) on its expression. *Aquaculture* **495**: 232-240.
- Fernlund P (1976) Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*. *Biochem. Biophys. Acta* **439**: 17-25.
- Rao KR and Riehm JP (1993) *Ann. NY Acad. Sci.* **680**: 78-88.
- Rao KR, Riehm JP, Zahnow CA, Kleinholz LH, Tarr GE, Johnson L, Norton S, Landau M, Semmes OJ, Sattelberg RM, Jorenby WH and Hintz MF (1985) Characterization of a pigment-dispersing hormone in the eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5319-5322.
- Klein JM, Mohrherr CJ, Sleutels F, Riehm JP and Rao RK (1994) Molecular cloning of two pigment dispersing hormone (PDH) precursors in the blue crab, *Callinectes sapidus* reveals a novel member of the PDH neuropeptide family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**: 410-416.
- Rao KR, Mohrherr CJ, Riehm JP, Zahnow CA, Norton S, Johnson L and Tarr GE (1987) Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grass-hopper *Romalea microptera*. *J. Biol. Chem.* **262**: 2672-2675.
- Rao KR, Mohrherr CJ, Riehm JP, Zahnow CA, Norton S, Johnson L and Tarr GE (1987) Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grass-hopper *Romalea microptera*. *J. Biol. Chem.* **262**: 2672-2675.
- Yang WJ, Aida K and Nagasawa H. (1999) Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **114**: 415-424.