

2017 年度 博士論文

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

神奈川大学大学院理学研究科生物科学専攻 博士後期課程

201570159

甲高 彩華

目次

緒論	1
第1章 クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_ES) に関する研究	
1-1 序論	3
1-2 材料と方法	3
1-2-1 実験動物	3
1-2-2 全 RNA の抽出	4
1-2-3 First strand cDNA の合成	4
1-2-4 Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA のクローニング	4
1-2-5 塩基配列データの解析	6
1-2-6 RT-PCR による Maj-CFSH_ES の組織別発現解析	6
1-2-7 組織切片の作製	6
1-2-8 ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色	7
1-2-9 <i>in situ</i> hybridization	7
1-2-10 免疫組織化学染色	9
1-2-11 Maj-CFSH_ES 遺伝子発現量の定量	9
1-2-12 天然 Maj-CFSH_ES の精製	10
1-2-13 天然 Maj-CFSH_ES の稚エビへの投与	12
1-3 結果	12
1-3-1 Maj-CFSH_ES cDNA の構造と特徴	12
1-3-2 Maj-CFSH_ES の組織別発現解析	13
1-3-3 <i>in situ</i> hybridization	13
1-3-4 免疫組織化学染色	14
1-3-5 Maj-CFSH_ES 遺伝子発現量の周年変動	14
1-3-6 天然 Maj-CFSH_ES の精製	14
1-3-7 天然 Maj-CFSH_ES の稚エビへの投与	15
1-4 考察	15
図表	18

第2章 クルマエビ卵巢甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_OV) に関する研究	
2-1 序論	31
2-2 材料と方法	31
2-2-1 実験動物	31
2-2-2 全 RNA の抽出	31
2-2-3 First strand cDNA の合成	31
2-2-4 Maj-CFSH_OV 前駆体をコードする cDNA のクローニング	31
2-2-5 塩基配列データの解析	33
2-2-6 Maj-CFSH_OV の RT-PCR による組織別発現解析	33
2-2-7 組織切片の作製	33
2-2-8 HE 染色	33
2-2-9 <i>in situ</i> hybridization	33
2-2-10 免疫組織化学染色	33
2-2-11 Maj-CFSH_OV 遺伝子発現量の定量	34
2-3 結果	34
2-3-1 Maj-CFSH_OV cDNA の構造と特徴	34
2-3-2 Maj-CFSH_OV の組織別発現解析	35
2-3-3 <i>in situ</i> hybridization	35
2-3-4 免疫組織化学染色	35
2-3-5 Maj-CFSH_OV 遺伝子発現量の周年変動	36
2-4 考察	36
図表	38
総合考察	46
謝辞	48
参考文献	49

緒論

動物界最大の分類群である節足動物における性決定や性分化は、昆虫や甲殻類を用いて研究されてきた。昆虫の性決定や性分化には性ホルモンが関与しないことが知られている。その例としてキイロショウジョウバエでは性染色体と常染色体の数の比によってその個体の性が決定され、後天的に性が変わることはない（守, 2010）。一方、昆虫と同じ節足動物門に属する甲殻類の性分化は、造雄腺ホルモン（Androgenic gland hormone, AGH）と呼ばれる雄性ホルモンによる内分泌的な制御機構が働いていることが知られている（守, 2010）。AGH は雄特異的な組織である造雄腺（Androgenic gland, AG）で合成・分泌され、これが雄への分化を促すとともに、その後の雄性性徴を発達させると考えられている。陸生等脚類のオカダンゴムシ（*Armadillidium vulgare*）では、若い雌に AG を移植すると、雄に特異的な内肢が形成され、雄性化が誘導された（Katakura, 1984）。若い雌への AG 抽出物の投与も、AG 移植で観察された内肢の形成と雄性化が誘導された（Katakura and Hasegawa, 1983; Suzuki et al., 1990）。エビ類においても同様の実験が行われ、オニテナガエビ（*Macrobrachium rosenbergii*）の若い雌に AG を移植すると、機能的な性転換が誘導されると報告された（Aflalo et al., 2006）。これらの現象は AG で合成分泌される AGH の影響が原因であると考えられている（Katayama et al., 2013）。このように、甲殻類において雄性ホルモンの存在が報告されてきたが、甲殻類の雌性ホルモンについての報告は永らくなかった。しかし、2014 年に雌性ホルモンが初めてアオガニ（*Callinectes sapidus*）の雌の眼柄から精製され、甲殻類雌性ホルモン（Crustacean female sex hormone, CFSH）と名づけられた（Zmora and Chung, 2014）。cDNA クローニングによりアオガニ CFSH（Cas-CFSH）の全アミノ酸配列が明らかにされ、Cas-CFSH は 8 つのシステイン残基と一ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列を含む 167 アミノ酸残基から構成されていることが明らかとなった。そして、公共の DNA データベースに登録されているほかのどんな配列ともマッチしない新規の配列を有していた。RNA 干渉による Cas-CFSH の遺伝子サイレンシングは、雌性生殖孔や抱卵剛毛のような交尾と抱卵に必要とされる雌性外部形態の形成を抑制した。この結果から、Cas-CFSH は甲殻類において雌の二次性徴の発達を制御しているホルモンであると考えられている。その後、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により、イセエビ科の *Sagmariasus verreauxi*、ミナミザリガニ科の *Cherax quadricarinatus*、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* から CFSH ホモログが同定された（Ventura et al., 2014; Nguyen et al., 2016;

Veenstra, 2015)。アオガニでは、Cas-CFSH は眼柄で特異的に発現していた。さらに、その遺伝子発現レベルは雌で高く、雄では非常に低かった (Zmora and Chung, 2014)。 *S. verreauxi* CFSH (Sav-CFSH) も雌雄の眼柄で遺伝子発現が観察されたが、その発現レベルは雌雄でほぼ同じであった (Ventura et al., 2014)。アメリカザリガニでは3種類の CFSH ホモログ (Prc-CFSH、Prc-CFSH-like 1、Prc-CFSH-like 2) が同定された (Veenstra, 2015)。Prc-CFSH-like 1 と Prc-CFSH-like 2 は眼柄で特異的に発現していたが、Prc-CFSH は卵巣でのみ発現が観察された。 *Cherax quadricarinatus* CFSH ホモログ (Chq-CFSH-like) の遺伝子発現は、眼柄に加えて中枢神経系、触覚腺、腸でも観察された (Nguyen et al., 2016)。これらの結果は、アオガニ以外の甲殻類で同定された CFSH ホモログが雌性ホルモン以外の新たな機能を持つ可能性を示す。しかし、CFSH の生物活性に関する報告は、アオガニの Cas-CFSH の1例のみであり、CFSH ホモログの生理機能を推測するには知見が不十分である。

本研究を開始した当初、CFSH のアミノ酸配列に関する情報は Cas-CFSH とヨーロッパミドリガニ CFSH (Cam-CFSH) の2例しかなく、生理機能が調べられた報告はアオガニの1例しかなかった (Zmora and Chung, 2014)。現在までに、いくつかの十脚目で CFSH の配列が明らかとなっているがそれらは次世代シーケンサーを用いた配列解析であり、配列情報が追加されたに過ぎない。従って、CFSH のさらなる探索と生理機能についての知見の蓄積が必要であると考えられる。そこで本研究では、まだ CFSH に関する情報がない十脚目根鰓亜目に属し、日本の重要な水産養殖種であるクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) を実験生物として CFSH の探索と生理機能の解明を目的とした。第1章では、クルマエビの眼柄から CFSH 前駆体 (Maj-CFSH_ES) をコードする cDNA のクローニングを行い、CFSH 前駆体のアミノ酸配列を明らかにした。次に *in situ* hybridization と免疫組織化学染色により Maj-CFSH_ES の局在を明らかにした。さらに、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動と天然 Maj-CFSH_ES の投与実験により、その生理機能を推測した。そして第2章では、クルマエビの卵巣から新たな CFSH ホモログ (Maj-CFSH_OV) をクローニングし、その局在を明らかにした。また、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現の周年変動を解析し、その生理機能を推測した。

第1章 クルマエビ眼柄甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_ES) に関する研究

1-1 序論

甲殻類雌性ホルモン (CFSH) の研究は、2014 年に同定されたアオガニ CFSH (Cas-CFSH) の研究からスタートした。Cas-CFSH が発見されて以来、数種の甲殻類から幾つかの CFSH ホモログが同定されてきたが、CFSH の生理機能に関する報告は Cas-CFSH の 1 例のみであり、知見が少ないのが現状である。また、研究を開始した当初、エビ類の CFSH の研究は皆無であった。そこで、日本において重要な水産養殖種であるクルマエビを実験の対象として本研究をスタートさせた。クルマエビは年間を通して市場に流通していることから、季節を問わず入手できる。また、養殖生産されていることから、稚エビから親エビまでの全ての生活段階の個体を入手できる。これらの点から、クルマエビは優れた実験材料といえる。もう一点、クルマエビを実験材料に用いた理由として、クルマエビ眼柄の EST 解析が過去に行われたことがあり、それら EST クローンの配列データがデータベースに登録されていたためである (Yamano and Umuma, 2006)。それら EST クローンの塩基配列に対して相同性検索を行ったところ、Cas-CFSH と相同性を有する EST クローンが存在した (Genbank accession no. CI998432)。しかし、その EST クローンはクルマエビ眼柄 CFSH (Maj-CFSH_ES) 前駆体の全てコードしているわけではなかった。そこで、第1章では、Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする全長の cDNA のクローニングを行った。その後、この分子がクルマエビの CFSH の候補であるのか、そうでないのかを確かめるために、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現と局在を調べた。また、Maj-CFSH_ES の生理機能を明らかにするために、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動の解析と天然 Maj-CFSH_ES の投与実験を行った。

1-2 材料と方法

1-2-1 実験動物

成体の養殖クルマエビ (平均 17.95 g) を久米島物産公社 (沖縄) より購入した。雌雄のクルマエビから眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節、肝臓、腸、筋肉、精巣、輸精管、輸精管末端、卵巣を摘出し、液体窒素で凍結後、使用するまで -80°C で保存した。

天然のクルマエビは 2016 年 4 月から 2017 年 2 月まで 2 ヶ月毎に愛知県一色漁港で漁獲

された天然の個体を購入した。雌雄のクルマエビから眼柄、卵巣、精巣を摘出し、RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, USA) に入れ、使用するまで-80°C で保存した。

養殖個体と天然個体から眼柄を摘出し、殻に切れ込みを入れ 4°C で一晩ブアン固定液を用いて固定した。固定後、70%エタノールに置換し、使用するまで 4°C で保存した。

1-2-2 全 RNA の抽出

全 RNA は各組織より、RiboZol™ RNA Extraction Reagent (AMRESCO, USA) を用いて添付のプロトコールに従って抽出した。

1-2-3 First strand cDNA の合成

RT-PCR と 3'RACE 用の first strand cDNA は *Not* I dt (表 1) をクルマエビ眼柄の全 RNA (100 ng) にアニールさせ、逆転写酵素 ReverTra Ace (TOYOBO, 大阪) を用いた逆転写反応により合成した。

5'RACE 用の first strand cDNA はクルマエビ眼柄の全 RNA (100 ng) を使用し、逆転写酵素を MMLV Reverse Transcriptase (Clontech, USA) を Superscript™ II Transcriptase (Invitrogen, USA) に変更した点を除き、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) のプロトコールにしたがって合成した。

1-2-4 Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA のクローニング

・プライマーの設計

データベースに登録されていたクルマエビの CFSH 様分子の部分配列 (*M. japonicus* EST clone, Genbank accession no. CI998432) の塩基配列を基に、3'RACE と 5'RACE に用いるプライマーを設計した (表 1 と図 1-1)。また、*Not* I dt (表 1) のアダプター配列を含むように、2 種類のアダプタープライマー (RTG と RTGNN) を設計した (図 1-1)。クローニング後の塩基配列を基に Maj-CFSH_ES cDNA の ORF を増幅するための特異的なプライマー (ES-F と ES-R) を設計した (表 1 と図 1-1)。

・3'RACE

2段階のPCR反応により Maj-CFSH_ES cDNA の3'領域を増幅した。まず、1-2-3 で3'RACE用に合成した first strand cDNA を鋳型とし、ES-3F と RTG を用いて、1段階目のPCR反応を行った(図 1-1)。次いで、1段階目のPCR産物を100倍希釈したものを鋳型とし、ES-3NF と RTG-NN を用いて、2段階目のPCR反応を行った(図 1-1)。1段階目および2段階目のPCRは、94°C -30秒(1サイクル目のみ3分30秒)、55°C -30秒、72°C -3分(最終サイクルのみ5分)を1サイクルとし、これを35サイクル行うことにより Maj-CFSH_ES cDNA断片を増幅した。

・5'RACE

5'RACE用のアダプタープライマーは SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) に添付された UPM と NUP を使用した(表 1 と図 1-1)。2段階のPCR反応により Maj-CFSH_ES cDNA の5'領域を増幅した。まず、5'RACE用に合成した first strand cDNA を鋳型とし、ES-5R と UPM を用いて、1段階目のPCR反応を行った(図 1-1)。次いで、1段階目のPCR産物を100倍希釈したものを鋳型とし、ES-5NR と NUP を用いて、2段階目のPCR反応を行った(図 1-1)。1段階目および2段階目のPCRは、94°C -30秒(1サイクル目のみ3分30秒)、72°C -3分を1サイクルとし、これを5サイクル、94°C -30秒、70°C -30秒、72°C -3分を1サイクルとし、これを5サイクル、94°C -30秒、68°C -30秒、72°C -3分を1サイクルとし(最終サイクルのみ8分)、これを27サイクル行うことにより Maj-CFSH_ES をコードする cDNA断片を増幅した。

・ORFを含むcDNA断片の増幅

1-2-3 で合成した first strand cDNA を鋳型としてPCR反応を行った。特異的なプライマー(ES-F と ES-R)を用いて、94°C -30秒(1サイクル目のみ3分30秒)、55°C -30秒、72°C -30秒を1サイクルとし、これを35サイクル行うことにより Maj-CFSH_ES cDNA断片を増幅した。

・塩基配列の決定

PCR産物は Mighty TA-cloning kit(タカラバイオ, 滋賀)を用いてサブクローニングした。挿入されたインサートDNAの塩基配列は、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

(Applied Biosystems, USA) を用いてサイクルシーケンス反応を行った後、DNA シーケンサーABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) で確認した。

1-2-5 塩基配列データの解析

クルマエビの眼柄からクローニングした Maj-CFSH_ES 前駆体のシグナルペプチドの切断部位、アスパラギン結合型糖鎖の付加配列はそれぞれ SignalP 4.1 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) と NetNGlyc 1.0 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) で予測した。Maj-CFSH_ES (accession no. LC224021)、アメリカザリガニ CFSH (Prc-CFSH) (Veenstra, 2015)、アオガニ CFSH (Cas-CFSH, accession no. GU016328)、ヨーロッパミドリガニ CFSH (Cam-CFSH) (Zmora and Chung, 2014)、アメリカザリガニ CFSH-like 1 (Prc-CFSH-like 1) (Veenstra, 2015)、アメリカザリガニ CFSH-like 2 (Prc-CFSH-like 2) (Veenstra, 2015)、*Cherax quadricarinatus* CFSH-like (Chq-CFSH-like) (Nguyen et al., 2016)、*Sagmariasus verreauxi* CFSH (Sav-CFSH) (Ventura et al., 2014) のアミノ酸配列のアライメントは、標準設定の Clustal W program (Thompson et al., 1994) を使って作成した。

1-2-6 RT-PCR による Maj-CFSH_ES の組織別発現解析

雌雄のクルマエビから摘出した組織（眼柄、脳、胸部神経節、腹部神経節、肝臓、腸、筋肉、精巣、輸精管、輸精管末端、卵巣）から 1-2-2 で述べた方法で全 RNA を抽出した。次いで、1-2-3 で述べた方法で各組織の first strand cDNA を合成した。これらの first strand cDNA を鋳型 DNA とし、Maj-CFSH_ES 特異的プライマー (ES-F と ES-R) を用いて、Maj-CFSH_ES cDNA 断片を増幅した。ポジティブコントロールとして、各組織のアクチン cDNA 断片を 2 種類のプライマー (β -Actin-F と β -Actin-R) を用いて増幅した (表 1, Ohira et al., 2003)。PCR 反応は 1-2-4 の 3'RACE で述べた条件で行った。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した。

1-2-7 組織切片の作製

雌雄のクルマエビ眼柄の殻を外し、室温で一晩、ブアン固定液で固定した。固定後、70%エタノール溶液に移し、使用するまで 4°C で保存した。固定した眼柄を 90%エタノールに

30 分間、99.5%エタノールに 20 分間、無水エタノールに 20 分間ずつ 2 回浸すことで脱水し、キシレンと無水エタノールを等量ずつ混合した溶液に 20 分間、キシレンに 20 分間浸すことで透徹した。その後、組織を 50°C の低融点パラフィン (Merck, USA) に 30 分から 1 時間、60°C の高融点パラフィン (和光純薬, 大阪) に 5 分間ずつ 2 回浸し、最後に高融点パラフィン中に包埋した。パラフィンプロックから 10 μ m の連続切片を作製し、MAS コートスライドガラス (松浪硝子, 東京) に載せ、42°C で伸展させた。作製した組織切片は使用するまで遮光して 4°C で保存した。

1-2-8 ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色

組織切片をキシレンに 5 分間ずつ 2 回浸すことで脱パラフィンし、無水エタノールに 3 分間、99.5%エタノールに 3 分間、90%エタノールに 3 分間、70%エタノールに 3 分間、蒸留水に 1 分間浸すことで水和させた。そして、組織切片をマイヤーのヘマトキシリン液 (高田ら, 2006) に 1 分間浸して染色した後、30 分間水洗した。次いでエオシン液 (高田ら, 2006) に 20 秒間浸して染色した後、70%エタノール、90%エタノール、99.5%エタノールの順に数秒間くぐらせ、無水エタノールに 1 分間浸すことで脱水した。キシレンに 5 分間ずつ 2 回浸して透徹を行い、MOUNT-QUICK (大道産業, 埼玉) を用いて封入した。

1-2-9 *in situ* hybridization

センスプローブおよびアンチセンスプローブを作製するために、Maj-CFSH_ES に特異的かつ 5'側に T7 プロモーター配列を付加したフォワードプライマー (ES-ISH-F) と 5'側に T3 プロモーター配列を付加したリバープライマー (ES-ISH-R) を設計した (表 1)。これらのプライマーを用いて、Maj-CFSH_ES をコードする cDNA を挿入したプラスミドを 10,000 倍希釈したものを鋳型とした PCR 反応により Maj-CFSH_ES の 257-801 bp の cDNA 断片を増幅した。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分離後、Maj-CFSH_ES cDNA 断片のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Germany) を用いて Maj-CFSH_ES cDNA 断片を精製した。この DNA 断片を鋳型に使用し、rATP、rCTP、rGTP、rUTP を Dig RNA Labeling Mix (Roche Applied Science, Germany) に変更した点を除き、Riboprobe® Combination System-T3/T7 RNA Polymerase (Promega, USA) を用いて、添付のプロトコールに従って Maj-CFSH_ES のセンスプローブとアンチセンスプローブを合成した。その後、

RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) を用いて、添付のプロトコールに従ってプローブを精製した。プローブは使用するまで-80℃に保存した。

1-2-7で作製したクルマエビの眼柄の組織切片をキシレンに5分間ずつ2回浸すことで脱パラフィンし、無水、99.5%、90%、70%エタノールに3分間ずつ浸し、0.05% tween を含む PBS (137 mM sodium chloride, 8.10 mM disodium hydrogen phosphate, 2.68 mM potassium chloride, 1.47 mM Potassium dihydrogen phosphate) (PBST) に5分間ずつ2回浸した。次いで、10 µg/ml Protease K を含む PBST に室温で10分間浸し、PBST で5分間ずつ3回洗浄した。ISHR7 Hybridization buffer (ニッポンジーン, 東京) を切片に載せてパラフィルムで覆い、2×SSC (1×SSC; 15 mM trisodium citrate, 150 mM sodium chloride) /50%ホルムアミドで湿潤させた湿潤箱に入れて60℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。スライドガラス1枚に対して500 ng のセンスプローブ、またはアンチセンスプローブを添加して湿潤箱に入れ、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、60℃に保温しておいた4×SSC をピペットでスライドガラスにかけ、カバーしてあるパラフィルムをはがした。続いて、60℃の4×SSC で5分間ずつ2回、60℃の2×SSC/50%ホルムアミドで20分間浸漬して、cRNA プローブを洗浄した。組織切片を37℃に保温しておいたNTE buffer (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に30分間浸し、RNase (10 µg/ml) を含むNTE buffer に30分間反応させ、一本鎖RNAを分解した。組織切片を37℃のNTE buffer で10分間ずつ4回、60℃の2×SSC で15分間ずつ4回、60℃の0.2×SSC で20分間ずつ2回洗浄した。DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Applied Science) を用いて、添付のプロトコールに従って1×Maleic acid buffer、1×Blocking solution、1×Washing buffer、1×Detection buffer を調製し、Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche Applied Science) を1×Blocking buffer で2,000倍に希釈して抗体溶液を作製した。スライドガラスを1×Maleic acid buffer に3分間浸した後、1×Blocking buffer で30分間ブロッキング反応を行い、次いで抗体溶液に交換して45分間抗原抗体反応させた。スライドガラスを1×Washing buffer で10分間ずつ4回洗浄した後、1×Detection buffer に3分間浸した。NBT/BCIP Ready-to-Use Tablets (Roche Applied Science) を用いて、添付のプロトコールに従ってシグナルを検出した。最後に組織切片を蒸留水に浸した後、70%エタノールに3分間、90%エタノールに3分間、99.5%エタノールに3分間、無水エタノールに3分間浸すことで脱水し、キシレンに3分間ずつ2回浸して透徹し MOUNT-QUICK (大道産業) を用いて封入した。

1-2-10 免疫組織化学染色

Maj-CFSH_ES の 95-108 aa のペプチド断片の N 末端側に Cys 残基を付加したペプチド抗原 ($\text{NH}_2\text{-C+EKEVEDASRSEYKA-COOH}$) を化学合成し、これにキャリアー蛋白質として Keyhole limpet hemocyanin (KLH) を結合したものをウサギに免疫してポリクローナル抗体を得た。ペプチド抗原の化学合成と抗体作製はユーロフィンジェノミクス (東京) に外注した。

1-2-7 で作製したクルマエビ眼柄の組織切片をキシレンに 15 分間ずつ 2 回浸すことで脱パラフィンし、無水エタノールに 5 分間、99.5%エタノールに 2 分 30 秒間、90%エタノールに 2 分 30 秒間、70%エタノールに 2 分 30 秒間、蒸留水に 1 分間浸すことで水和させた。切片を蒸留水に浸した後、0.6% H_2O_2 を含むメタノール溶液に 30 分間浸して内因性ペルオキシダーゼを不活性化させた。蒸留水と PBS にそれぞれ 10 分間ずつ浸した後、Blocking solution (3% ヤギ正常血清を含む PBS 溶液) 中で 30 分間ブロッキング反応を行った。次いで抗体希釈液 (0.1% BSA と 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS 溶液) に抗 Maj-CFSH_ES 抗体を 1/2,000 倍量添加した一次抗体溶液を加え、4°C で一晩反応させた。切片を PBS で 10 分間ずつ 2 回洗浄した後、EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Dako, USA) を添加して室温で 1 時間反応させた。切片を PBS で 2 回洗浄した後、0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) に DAB 錠 (和光) を 0.5 mg/ml に溶かした 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) 溶液 (0.05% DAB と 0.03% H_2O_2 を含む 0.05 M Tris-HCl Buffer (pH 7.5)) を添加し、シグナルを検出した。

切片を蒸留水に漬け反応を停止させ、70%エタノールに 1 分間、90%エタノールに 1 分間、99.5%エタノールに 1 分間、無水エタノールに 2 分間浸し脱水し、キシレンに 5 分間ずつ 2 回浸して透徹を行い、MOUNT-QUICK を用いて封入した。

1-2-11 Maj-CFSH_ES 遺伝子発現量の定量

1-2-1 でサンプリングした天然クルマエビの雌雄の眼柄から顕微鏡下で殻と色素を除いた後、1-2-2 で述べた方法で全 RNA を抽出した。次に、Maj-CFSH_ES mRNA 発現量の定量を行うためのプライマーセット (ES-qPCR-F と ES-qPCR-R) と TaqMan[®] プローブ (ES-TaqMan probe) を設計した (表 1)。逆転写反応及び PCR 反応には One Step PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いた。反応はキット添付のプロトコ

ルに従い、プライマーとプローブは最終濃度が 0.1 μ M になるように添加した。反応液に 200 ng のクルマエビ眼柄全 RNA を加え、42°C で 5 分間逆転写反応を行い、その後、95°C -5 秒 (1 サイクル目のみ 15 秒)、61°C -30 秒を 1 サイクルとして 40 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。人工的に合成した Maj-CFSH_ES cRNA のセンス鎖を連続希釈したものを標準試料として、それらから得られる蛍光シグナルの測定値をもとに検量線を作成した。

・統計処理

グラフに示した各群の体長と体重は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意差は 2 標本 t 検定で解析し、*P* 値が<0.05 である群間に有意差があると判断した。

1-2-12 天然 Maj-CFSH_ES の精製

冷凍または生のクルマエビの眼柄から実体顕微鏡下でサイナス腺を摘出した。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 個のサイナス腺を摘出した後、ホモジナイザーペッスルでサイナス腺をホモジナイズし、13,500 rpm、4°C で 5 分間遠心した。分離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。サイナス腺粗抽出物を遠心エバポレータ (佐久間製作所, 東京) を用いて濃縮させた後、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、13,500 rpm、4°C で 10 分間遠心して、上清のみを別のチューブに移した。それを Senshu Pak PEGASIL C4 SP100 カラム (4.6 \times 100 mm, センシュウ科学, 東京) を用いた逆相 HPLC (NANOSPACE SI-1, 資生堂, 東京) に供した。溶出は 1 ml/min の流速で、20-60%アセトニトリル/0.05% TFA の 40 分間のリニアグラジエントで分画した。溶出した全ピーク産物を分取し、遠心エバポレータを用いて濃縮させた後、質量分析および N 末端アミノ酸配列解析、ウエスタンブロット解析に供した。

・抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いたウエスタンブロット解析

20 サイナス腺に相当するピーク産物に 2 \times 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) 1 枚を 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ティング装置上に 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 (cm²) 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 Maj-CFSH_ES 抗体を 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、ビオチン化抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Sigma, USA) 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、VECTASTAIN ABC Kit PK4000 (Standard) (Vector Laboratories, USA) と検出液 (0.009% 4-Chloro-1-naphthol と 0.003% H₂O₂ を含む TBS) を用いてシグナルを検出した。

・MALDI-TOF MS による分子量の測定

60% アセトニトリル/0.05% TFA に 5 mg/ml になるように α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) (Sigma, USA) を加えてマトリックス溶液を調製した。専用サンプルプレート上で濃縮したピーク産物とマトリックス溶液を 0.5 μ L ずつ混合し、自然乾燥させた。このプレートを MALDI-TOF MS AXIMA[®] Performance (島津製作所, 京都) に挿入し、レーザーを照射してリニアモードでイオンピークを測定した。質量校正にはウシインスリン (Sigma) と組換えクルマエビ脱皮抑制ホルモン (Ohira et al., 1999) を用いた。

・N 末端アミノ酸配列解析

ABI Procise 491 HT Procise[®] Protein Sequencer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

1-2-13 天然 Maj-CFSH_ES の稚エビへの投与

・材料

クルマエビの稚エビは三重県栽培漁業センターが種苗生産した 30 mm 程度の個体を使用した。

・雌雄判別

腹側を上にした状態で稚エビをスポンジに挟んで固定し、第一遊泳肢の形態を実体顕微鏡下で観察し雌雄を判別した (図 1-11)。

・天然 Maj-CFSH_ES の投与

内径 0.33 mm (29G) の針が付いたインスリン用シリンジマイジェクター (テルモ, 東京) をクリップスタンドに固定し、実体顕微鏡下で稚エビの第 2 腹節と第 3 腹節の間に注射針を刺した。1 尾につき 10 サイナス腺相当量の天然 Maj-CFSH_ES を含むクルマエビリンガーを 50 μ L ずつ雌雄 26 尾に投与した。投与当日を 0 日目として 14 日目に再度、同様の方法で天然 Maj-CFSH_ES を投与した。ネガティブコントロールにはクルマエビリンガーを雌雄 26 尾に投与した。28 日目に第一遊泳肢を実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラで撮影し、体長と体重を測定した。

1-3 結果

1-3-1 Maj-CFSH_ES cDNA の構造と特徴

アオガニ CFSH のアミノ酸配列をクエリーとして、公共の DNA データベースに対して tBlastX 解析を行った。その結果、*M. japonicus* EST clone (Genbank accession no. CI998432) の配列が見つかり、この EST クローンはクルマエビ CFSH 様分子の部分配列をコードしていることがわかった。この部分塩基配列を基に特異的なプライマーを設計して 5'RACE と 3'RACE を行い、Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA を増幅した。Maj-CFSH_ES cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列を図 1-2 に示す。Maj-CFSH_ES の前駆体をコードする cDNA は 1,050 bp からなり、23 bp の 5'非翻訳領域、735 bp のオープンリーディングフレーム (ORF)、292 bp の 3'非翻訳領域を含んでいた。3'非翻訳領域にはポリアデニル化シグナル (TATAAA) が存在した。N 末端側の 34 残基は SignalP 4.1 program でシグナルペプチドと予測された。また、Lys⁷⁹-Arg⁸⁰ の C 末端側はプロセシング酵素で切断されると予測された。そのため、Maj-CFSH_ES 前駆体は N 末端側から 34 残基のシグナルペプチド、43 残基の CFSH-precursor

related peptide (CPRP)、2 残基の塩基性アミノ酸 (Lys-Arg) から成るプロセッシングシグナル、164 残基の成熟 Maj-CFSH_ES の 244 アミノ酸からなると推定された。アスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) が成熟 Maj-CFSH_ES に一カ所存在したことから (Asn¹²⁵-Cys¹²⁶-Ser¹²⁷)、Asn¹²⁵ はグリコシル化されていると推測された。成熟 Maj-CFSH_ES の演繹アミノ酸配列は Prc-CFSH と 43.0%、Cas-CFSH と 38.7%、Cam-CFSH と 38.7%、Prc-CFSH-like 1 と 32.3%、Prc-CFSH like 2 と 32.3%、Chq-CFSH-like と 31.0%、Sav-CFSH と 34.7%の相同性を示した。Maj-CFSH_ES と Prc-CFSH、Cas-CFSH、Cam-CFSH では分子内に存在した 8 つのシステイン残基とアスパラギン結合型糖鎖の付加配列の位置が完全に保存されていた。一方、Prc-CFSH-like 1、Prc-CFSH like 2、Chq-CFSH-like、Sav-CFSH は N 末端側にさらに 2 つのシステイン残基を有しており、アスパラギン結合型糖鎖の付加配列は存在しなかった (図 1-3)。

1-3-2 Maj-CFSH_ES の組織別発現解析

Maj-CFSH_ES の RT-PCR 増幅産物は、雌雄の眼柄の first strand cDNA を鋳型に用いたレーン 1 でのみ検出された (図 1-4 上段)。増幅産物の分子量は、予想サイズの 545 bp と矛盾はなく、特異的に増幅されていると考えられた (図 1-4 上段)。ポジティブコントロールとして増幅したβ-アクチン (438 bp) の cDNA 断片は全ての組織で検出された (図 1-4 下段)。

1-3-3 *in situ* hybridization

クルマエビ眼柄の HE 染色と *in situ* hybridization の結果を図 1-5 に示す。クルマエビの眼柄内には終髄 (MT)、内髄 (MI)、外髄 (ME) と呼ばれる 3 つの神経節が観察された (図 1-5A)。Maj-CFSH_ES のアンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization では、終髄 X 器官 (MTGX) の腹側 (vMTGX) と背側 (dMTGX) に存在する神経分泌細胞 (図 1-5B と D)、内髄 X 器官 (MIGX) に存在する神経分泌細胞 (図 1-5B と E) で陽性のシグナルが観察された。また、X 器官以外の ME 周囲の小さな細胞でも陽性シグナルが観察された (図 1-5B と F)。一方、ネガティブコントロールの Maj-CFSH_ES のセンスプローブは全く反応しなかった (図 1-5C)。雄の眼柄を用いて同様の実験を行ったが、雌と同じ結果が得られた (結果省略)。

1-3-4 免疫組織化学染色

クルマエビ眼柄の HE 染色と免疫組織化学染色の結果を図 1-6 に示す。抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いた免疫組織化学染色では、サイナス腺に免疫陽性反応が観察された（図 1-6B と E）。一方、免疫前血清を用いた場合では、全く染色されなかった（図 1-6C と F）。この結果から、抗 Maj-CFSH_ES 抗体はサイナス腺に存在する Maj-CFSH_ES と特異的に反応していると考えられた。雄の眼柄を用いて同様の実験を行ったが、雌と同じ結果が得られた（結果省略）。

1-3-5 Maj-CFSH_ES 遺伝子発現量の周年変動

2016 年 4 月から 2017 年 2 月までの 2 ヶ月毎に漁獲された天然クルマエビの雌雄の眼柄における Maj-CFSH_ES の遺伝子発現量を Real-time RT-PCR により定量した（図 1-7）。その結果、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現量はクルマエビの繁殖期である 4 月から 8 月にかけて増加し、非繁殖期である 2 月にかけて発現量が減少していた。雌雄ともに Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動の傾向は類似していたが、雌の方が遺伝子発現量は高かった。

1-3-6 天然 Maj-CFSH_ES 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 1-8）。これらのピーク産物を抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いたウェスタンブロットに供したところ、溶出時間約 19 分のピーク産物で免疫陽性のバンドが観察された（図 1-9）。このピーク産物をプロテインシークエンサーに供し、N 末端から 10 残基のアミノ酸配列を読んだところ、成熟 Maj-CFSH_ES の配列と完全に一致していた。また、同じピーク産物を MALDI-TOF MS に供したところ、Maj-CFSH_ES の理論値である 18,168（糖鎖が付加していない場合）よりも 1,000 以上大きな 19,204、19,364、19,521 の 3 つのイオンピークが観察された（図 1-10）。アスパラギン結合型糖鎖の母核となる 2 分子の N-アセチルグルコサミンと 3 分子のマンノースにフコースが結合した場合、分子量は理論値よりも 1038.9 大きくなり、19,208.6 となる。また、糖鎖構造がハイマンノース型の場合、マンノースが順に付加していくため、分子量は 162 ずつ大きくなり、19370.8、19532.9 となる。観察された 3 つのイオンピークの値はどれも理論値と近い値であったことから、Maj-CFSH_ES にはハイマンノース型の糖鎖が付加されていると考えられた。

1-3-7 天然 Maj-CFSH_ES の稚エビへの投与

投与実験の前に実体顕微鏡下で稚エビの外部形態を観察した結果、第一遊泳肢の形態に雌雄差が観察された。雌の第一遊泳肢は丸みを帯びた形状であったが、雄の第一遊泳肢は一部がくびれた米粒のような形状をしていた（図 1-11、0 日目）。投与実験終了後の 28 日目に第一遊泳肢の形態を実体顕微鏡で観察した結果、雌雄ともにクルマエビリンガー投与群と天然 Maj-CFSH_ES 投与群との間に第一遊泳肢の形態に差は観察されなかった（図 1-11、28 日目）。一方、成長に対してクルマエビリンガー投与群と天然 Maj-CFSH_ES 投与群の間に差がみられた（図 1-12）。雌においては、天然 Maj-CFSH_ES 投与群の方がクルマエビリンガー投与群と比べて有意に体長と体重が減少していた。逆に、雄においては、天然 Maj-CFSH_ES 投与群の方がクルマエビリンガー投与群と比べて有意に体重が増加していた。

1-4 考察

Maj-CFSH_ES の前駆体は、N 末端側からシグナルペプチド、CPRP、2 残基の塩基性アミノ酸から成るプロセシングシグナル、成熟 Maj-CFSH_ES から構成されていた。この構造は、既知の CFSH 前駆体や CFSH ホモログの前駆体と共通していた（図 1-3）。Maj-CFSH_ES には既知の CFSH 前駆体や CFSH ホモログ前駆体の全てで保存されている 8 つのシステイン残基が存在したが、Prc-CFSH-like 1、Prc-CFSH like-2、Chq-CFSH-like、Sav-CFSH で保存されている N 末端側の 2 つのシステイン残基は存在しなかった（図 1-3）。また、Maj-CFSH_ES には一カ所のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列が存在した。そして、その位置は Prc-CFSH、Cas-CFSH、Cam-CFSH のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列の位置と完全に一致した（図 1-3）。システインを 10 残基有する Prc-CFSH-like 1、Prc-CFSH like-2、Chq-CFSH-like、Sav-CFSH にはアスパラギン結合型糖鎖の付加配列は存在しなかった（図 1-3）。これらの分子的特徴から CFSH は図 1-3 に示すように Type I と Type II の 2 つのサブタイプに分類できることが明らかとなった。Type I の CFSH は（1）保存された 8 つのシステイン残基、（2）保存された一カ所のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列（Asn-Xaa-Ser/Thr）を持つという特徴が存在した。一方、Type II の CFSH は N 末端側にさらに保存された 2 つのシステイン残基を有し、アスパラギン結合型糖鎖の付加配列が存在しないという共通点があった。成熟 CFSH のアミノ酸配列を比較したところ、Type I に属する Maj-CFSH_ES は

Type I の特徴を有する Prc-CFSH と 43.0%、Cas-CFSH と 38.7%、Cam-CFSH と 38.7%の相同性を示した。一方、Type II の特徴を有する Prc-CFSH-like 1 と 32.3%、Prc-CFSH like-2 と 32.3%、Chq-CFSH-like と 31.0%、Sav-CFSH と 34.7%という低い相同性しか示さなかった。このように同じタイプ間の相同性は、異なるタイプ間の相同性よりも高い。これらタイプ内およびタイプ間の相同性結果も、分子的特徴に基づいて CFSH を 2 つの Type に分類できるという考えを強く支持するものである。

in situ hybridization により、Maj-CFSH_ES mRNA は、終髄 X 器官 (MTGX) に存在する神経分泌細胞と、内髄 X 器官 (MIGX) に存在する神経分泌細胞で発現していることが示された (図 1-5)。これまでに、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) や脱皮抑制ホルモン (MIH) などの眼柄ホルモンが MTGX と MIGX 内の神経分泌細胞で合成されていることが明らかとなっている (Katayama et al., 2013; Shih et al., 1998; Shih, 1999)。また、抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いた免疫組織化学染色では、サイナス腺が特異的に染色された (図 1-6)。これらのことから、Maj-CFSH_ES はクルマエビの新たな眼柄ホルモンであり、CHH や MIH のようにサイナス腺から血リンパ中に放出されると考えられた。

Maj-CFSH_ES は Type I に属していること、眼柄特異的に発現していることなど、アオガニ CFSH (Cas-CFSH) と共通する点が多い。しかし、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現は雌に特異的ではなく、雌雄でほぼ同じであった (図 1-4)。また、眼柄内での産生細胞の局在も雌雄でほぼ一致していた。同様に、イセエビ科の *S. verreauxi* の CFSH (Sav-CFSH) でも、雌雄の眼柄で同程度の発現が観察されている (Ventura et al., 2014)。これらの結果は、眼柄で発現する CFSH は、アオガニ CFSH の様に雌性ホルモンとして機能する分子に加えて、CFSH 以外の新たな機能を果たしていることを示している。

Maj-CFSH_ES には新たな生物活性を有する可能性が示唆されたため、Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動を Real time RT-PCR で調べた。Maj-CFSH_ES は雌雄共に 4 月から 8 月に発現量が増加しており、2 月にかけて発現量が減少していた (図 1-7)。クルマエビの産卵期は生息海域により異なるが、およそ 4 月から 10 月であり (奥村・水藤, 2014)、この時期に Maj-CFSH_ES の発現量が増加していた (図 1-7)。この結果は、Maj-CFSH_ES がクルマエビの卵黄形成や精子形成の制御、雌雄の繁殖行動を制御している可能性を示唆している。これらの可能性を検証するためには、組換え Maj-CFSH_ES を作製し、それを成体のクルマエビに投与する実験が必要である。しかし、Maj-CFSH_ES は糖蛋白質ホルモンであ

ることから（後述）、大量の組換え体の作製は難しく、投与実験は現実的ではない。今後、RNA 干渉によるノックダウン実験により、Maj-CFSH_ES の生物活性が明らかにされることを期待している。

クルマエビのサイナス腺から天然 Maj-CFSH_ES を精製した（図 1-8）。天然 CFSH はアオガニでも精製されていることから（Zmora and Chung, 2014）、本研究が 2 例目である。本研究では、精製した天然 Maj-CFSH_ES を用いて 2 つの実験を行った。1 つ目は Maj-CFSH_ES に付加している糖鎖構造の決定である。MALDI-TOF MS を用いた解析により、Maj-CFSH_ES にはハイマンノース型の糖鎖が付加していることを明らかにした（図 1-8）。これまでに、CFSH の糖鎖構造を決定した報告例はないことから、本研究が初の知見である。ホルモンに付加した糖鎖は生物活性に重要な場合が多い。例えば、オカダンゴムシの AGH の活性には糖鎖の付加が必須であることが示されている（Katayama et al., 2013）。Type I の CFSH では糖鎖の付加配列が保存されていることから、Maj-CFSH_ES の糖鎖も生物活性に重要である可能性が高い。今後、生物活性を有する組換え Maj-CFSH_ES を作製するための発現系を選択する上で、今回の結果は非常に重要と考えられる。

精製した天然 Maj-CFSH_ES を用いた 2 つ目の実験は稚エビへの投与実験である。アオガニでは、CFSH は雌の外部形態の形成に関与していることが示されていることから、本研究では性分化の初期の稚エビに天然 Maj-CFSH_ES を投与した。Maj-CFSH_ES がアオガニと同じ生物活性を持つのであれば、Maj-CFSH_ES を投与した雄の稚エビの外部形態が雌性化することが期待されたが、外部形態への影響は観察されなかった（図 1-11）。しかし、予想外の結果として、Maj-CFSH_ES の投与は雌の成長を抑制し、雄の成長を促進した（図 1-12）。このような結果になった理由は現段階では分からないが、少なくとも CFSH の感受性は雌雄で異なることが明らかとなった。本研究では Maj-CFSH_ES は雌雄で発現していることを示したが、これは成体のクルマエビの場合であって、稚エビの段階では雌雄で発現に差があるのかもしれない。今後、これらの可能性を調べることで、Maj-CFSH_ES の真の生物活性が明らかにされることが望まれる。

表 1 PCR で使用したプライマーとその塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>Not</i> I dt	AACTGGAGGAATTCGCGGCCGCAGGAA(T) ₁₈
RTG	AACTGGAAGAATTCGCGGCCG
RTG-NN	AAGAATTCGCGGCCGCAGGAA
ES-3F	GACATCGGCCTCAGAAGAAG
ES-3NF	TAGTGCACACGTCCCAGATG
ES-5R	TTTGGCCTCCCTCCTCCAGCGGACGCC
ES-5NR	CTCCTCCAGCGGACGCCCGGGGATGTA
ES-F	GAAGCGGCATCTGGACGACT
ES-R	GATCCAGTGGGTTGAAACGA
β-Actin-F	TGTAYGCCTCTGGYCGYACC
β-Actin-R	CVACRTCRCACCTTCATGATGS
ES-ISH-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGCGGCATCTGGACGACT
ES-ISH-R	ATTAACCCCTCACTAAAGGGAGATCCAGTGGGTTGAAACGA
ES-qPCR-F	CCAACCTCCACGAGAACCA
ES-qPCR-R	CAGTTCGGAAATGTGGATCCA
ES-TaqMan probe	(FAM)-ATTAAACCCGAGCTCCAGCTGCGC-(TAMRA)

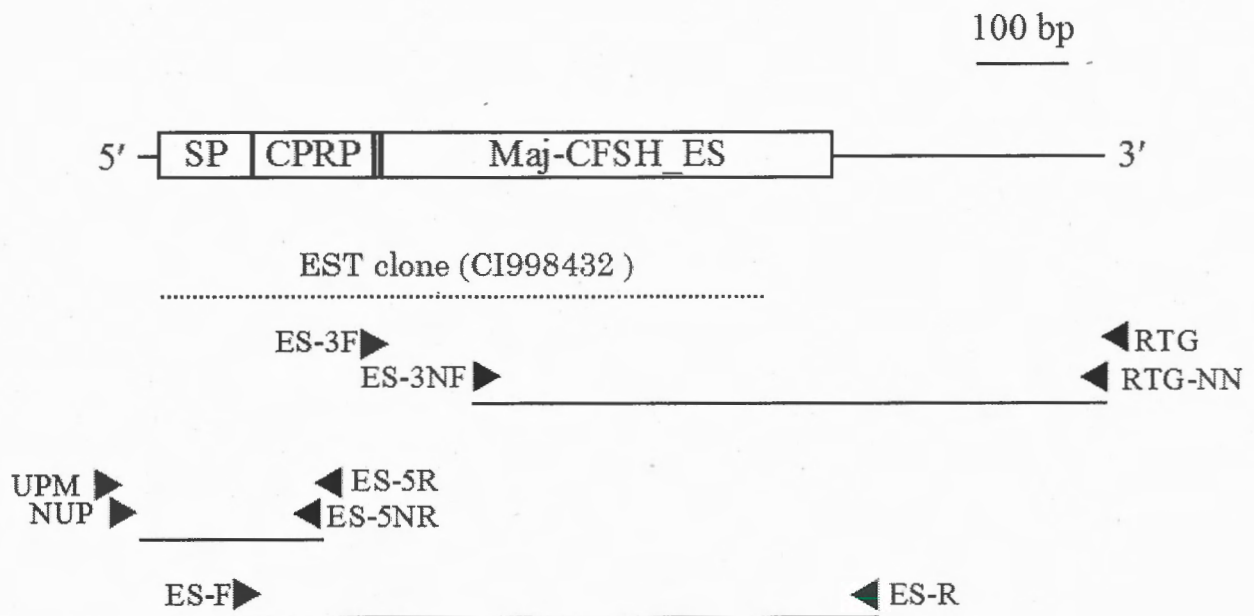


図 1-1 Maj-CFSH_ES cDNA の模式的な構造と PCR で使用したプライマーの位置

矢頭はプライマーを、矢頭の下線は増幅された cDNA 断片を表す。点線は、EST clone の位置を、ボックスは ORF を、SP はシグナルペプチドを、CPRP は CFSH-precursor related peptide を示す。

```

nt 0001  ACGCGGGGACCCACCTGTCGACC
nt 0024  ATGGCGCCACGTGCAGCTCCCGTCTCTCCCTCTGGCGGGGCCACCTCTCCTCCTCCTCTCTCCTCCTCGTGCTC
aa 0001  M A P R A A P V L S P L A A P P L L L L L L L L V L
nt 0099  GTCCCTCTCCACTCTTTCACCTCGCCCTTGAAGTGAAGTACCCGTCGCTGGGGTGGGATCTGCGCCCCCTCTCTACATC
aa 0027  V P L H S S L A L E L S Y P S L G S D L R P P L Y I
nt 0174  CCCGGGCGTCCGCTGGAGGAGGGAGGCCAAAAGCCACATGGAGGCGCCTGGTCCTACATTCGACATCGGCCTCAGAAG
aa 0053  P G R P L E E G G Q K P H G G A W S Y I R H R P Q K
nt 0249  AAGCGGCATCTGGACGACTTCATCCCTGGCCTCCTTCAGCACTACTCGGAGAAGGAGGTGGAGGACGCGTCCAGGTCC
aa 0079  K R H L D D F I P G L L Q H Y S E K E V E D A S R S
nt 0324  GAGTACAAGCCGTGCCCTCCCCATAGTGCACACGTCCAGATGCTCCACCAGGGGATCAACTGCTCGGCGCTCGCC
aa 0105  E Y K A V P S P I V H T S Q M L H Q G I N C S A L A
nt 0399  TCCAACCTCCACGAGAACCACATTAAACCCGAGCTCCAGCTGCGCCCCGACTGGATCCACATTTCCGAAGTGCATCGGA
aa 0131  S N L H E N H I K P E L Q L R P D W I H I S E L I G
nt 0474  GACTGTCCCACTACTACATCACCAGGAGCTTCCGCCCATGTACTCCCGGCGGTGGTCTGGAGGCTGTGTGCACG
aa 0157  D C P T H Y I T R E L P P M Y S P A V V L E A V C T
nt 0548  TGGCGCGGGTGCATATGTTCCAGGGATGGACACCAGTGCGTGGCGGTGACCCGCCACATCCCCGTGTGGGTCCGTCGG
aa 0182  C G G S Q C S R D G H Q C V P V T R H I P V W V R R
nt 0623  GGACCAACGTCCACGTGTAGACGTCGAGGAACACCGGTGGCGTGTGCCTGCGTCAGGAGGCCAGCGTGGGAGGG
aa 0209  G P N V H V L D V E E L T V A C A C V R R P S V G G
nt 0698  AACTTCGTCTTCAGCCCCCGCGTCCAGAGCTAA
aa 0235  N F V F S P A V Q S *
nt 0758  GAACAACGCGGCTCACAAGCGCTCGTTTCAACCCACTGGATCTCCTGCTTTGACATCTCTCGAATTCCTCAGTTAC
nt 0833  ACCGACAATGAAATTTCTGTAGCTCACTTTGTGATTGAGCATTTTCATGTGAAAGAAAATGAATATATATTTTTTTTAC
nt 0908  TGAATAGAGTTAGAGTATTTGGCAAAGCTGTATACTCATTTGCAATGCACGCATAGGTAAGCGGTTCTGAAATCTAAA
nt 0983  AAAAGAGATATATGAAATATAAAGGTTCTCAAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 1-2 Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列

シグナルペプチドは太字、CFSH-precursor related peptide (CPRP) は下線、Maj-CFSH_ES はイタリックで示した。アスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (N-X-S/T) は灰色のボックスで示し、ポリアダニル化シグナルは点線で示す。推定プロセシングシグナルはボックスで示す。アスタリスクは終止コドンを示す。

```

Maj-CFSH_ES -----HLDDFIPGLLQHYSEKEVEDASRSE-YKAVPSPIVHTSQMLHQGI-----ALASN--LHENHIKPELQLRPDWIHISELIGDPT
Prc-CFSH -----TQPYRS-----TDMETSIRENYVYVPKTIIDTSTTLHQSV-----AFRVT--HHVNTFTEELHRSPTWLSSSMIGDPT
Cas-CFSH -----SSIIIGHMNSIPYRTREQVMDGMMDT-----YVLVPRAIISSTAKLHRGV-----EYREVSKVYNGFEANYNLRPTWPHRSKTISTPT
Cam-CFSH -----SSIIIGHMNSIPYRTREQVMDGMMDT-----YVLVPRAIISSTAKLHRDV-----EYREVNKIHGNRFANFNIRPTWLRSKTISTPT
Type I

Prc-CFSH-like 1 -----SRLKSSGNRRHGRVANMIPASEVKQS-----WKNDYLSVPEALVQFSQEHSEETVCKDLSVQ-----LFRVDLSSELYLEPLWVRGTVHLGMCP
Prc-CFSH-like 2 QIESFGAKNEESAVGNPFINKLSKGSPLSGNSRRRGMANMIPASEVKQM-----WKKEYSSVPEAMVHFSQQADETVCKDLSVQ-----LFRVDLTEHHLEPLWVRDSVHLGMCP
Chq-CFSH-like -----SHLRSP-----RCHRGMTNIIIPASEVKQS-----WKKEYLSVPEALVQFSQQAEEVCKDLSVQ-----LYSVDLTEHYLEPLWVRPTVHLGMCP
Sav-CFSH -----SRVRSGEKGACVTG-----LISFTEVWQG-----WKDDYLSVPEAMVKFSQEQAGDNVCKDLSVQ-----LFSVDLREHHIEPLWVRTEVYIGMCP
Type II

Maj-CFSH_ES HYITRELPG---PMYSPAVVLEAVCIQGGSCSRDG---HCVVPVTRHIPVWVR-RGPNVHVLDEELTVACAVRRPSVGGNFVFSPAVQS
Prc-CFSH RYVKKNMN---EPIQYFPEILEAQICEDSQSDG---YRCEPLKYNMLVKKFDSFNRSFSEYEYLTVAICVARRPSSIAGSSETLGEPS
Cas-CFSH QYVERQIQGLPIQP-VTILEAKVCEGSCSQDG---SICVAVKYRLPVWIS-VDSGTYTDTVELAVACAKNPSRDGG-YIDLSENK
Cam-CFSH QYVERQIQGFFPIQP-VTILEAKVCEGSCSQDG---SICVAVKYRLPVWIR-VDSGTYTDTVELTVACAKNPSRDGG-YVDLSENK

Prc-CFSH-like 1 KLQTRHLG---ENVWPPNLVETKLCQGETSNLGGDFRCQAVR--RPIRMWVRHLDQFIPTQEMVSVGCVQVORIS-PGGNSANPSLQS
Prc-CFSH-like 2 KLQTRHLG---DKVWPSKVVEVKLCQRESNLLGGGFCQAVRRPVVMWVR--HQDSFIPTQEMVSVGCVQVORIS-PGGKYISPSLQS
Chq-CFSH-like KLQTRHLG---ENVWPPNVVEIKLCQRETISNL-----
Sav-CFSH RLQTRHLG---DNVWPPKVVEVKLCQREQSNLGGDFLCQAVRRPVTWLR--RDKTFLPSQEMLSVGCVQVORIS-TQGRYADPGLSS

```

図 1-3 単離した Maj-CFSH_ES と既知 CFSH のアミノ酸配列のアライメント

Maj-CFSH_ES はクルマエビ眼柄 CFSH を (accession no. LC224021)、Prc-CFSH はアメリカザリガニ CFSH を (Veenstra, 2015)、Cas-CFSH はアオガニ CFSH を (Zmora and Chung, 2014)、Cam-CFSH はヨーロッパミドリガニ CFSH を (Zmora and Chung, 2014)、Prc-CFSH like-1 はアメリカザリガニ CFSH-like 1 を (Veenstra, 2015)、Prc-CFSH like-2 はアメリカザリガニ CFSH-like 2 を (Veenstra, 2015)、Chq-CFSH-like は *Cherax quadricarinatus* CFSH-like を (Nguyen et al., 2016)、Sav-CFSH は *Sagmariasus verreauxi* CFSH を (Ventura et al., 2014) 示す。オープンボックスは保存されたシステイン残基を示す。黒ボックスはアスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (N-X-S/T) を表す。

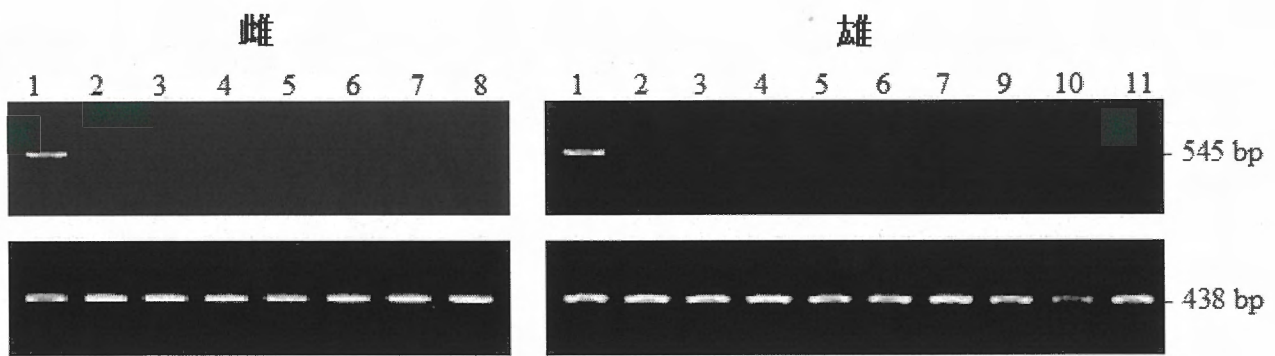


図 1-4 Maj-CFSH_ES の組織別遺伝子発現解析

レーン 1 は眼柄、レーン 2 は脳、レーン 3 は胸部神経節、レーン 4 は腹部神経節、レーン 5 は腸、レーン 6 は肝臓、レーン 7 は筋肉、レーン 8 は卵巣、レーン 9 は精巣、レーン 10 は輸精管、レーン 11 は輸精管末端の全 RNA から合成した first strand cDNA を PCR の鋳型に用いた。上の写真は Maj-CFSH_ES、下の写真は β -アクチンの PCR 産物の電気泳動像である。

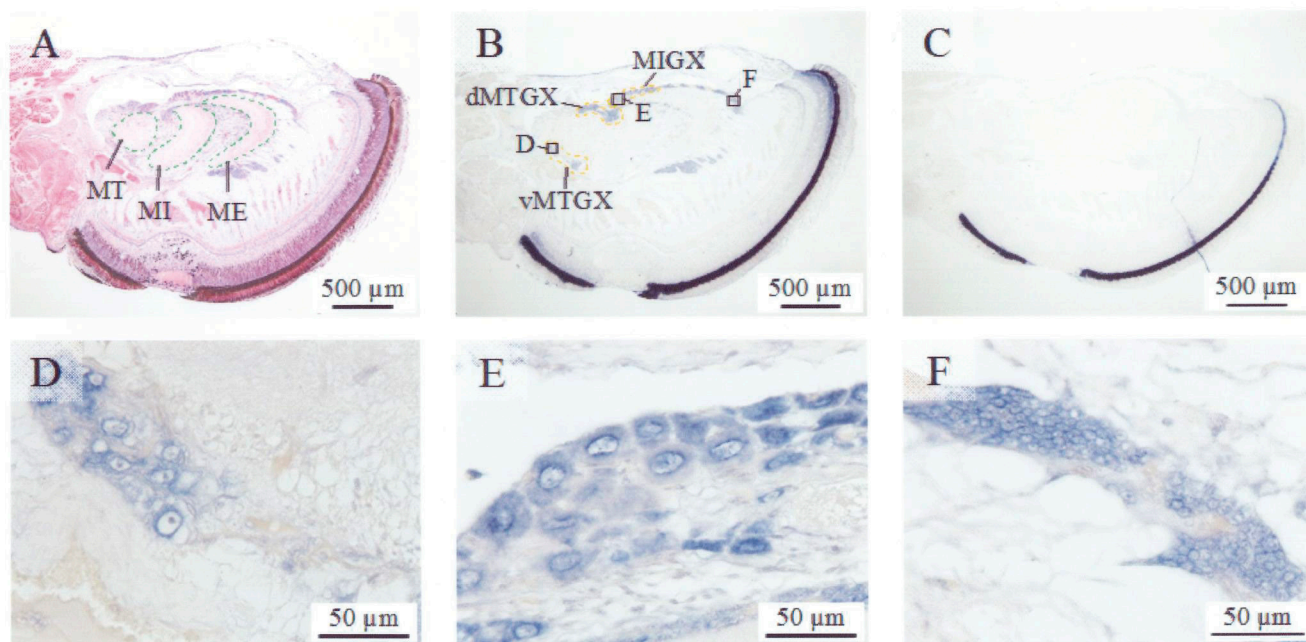


図 1-5 Maj-CFSH_ES cRNA をプローブに用いた *in situ* hybridization

雌の眼柄の縦断切片の HE 染色像 (A)、Maj-CFSH_ES のアンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (B, D, E, F)、Maj-CFSH_ES のセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (C) を示す。B の四角で囲んだ部分の拡大図がそれぞれ D、E、F である。図中の MT は終髄、MI は内髄、ME は外髄、MIGX は内髄 X 器官、dMTGX は終髄 X 器官背側、vMIGX は終髄 X 器官腹側をそれぞれ示す。

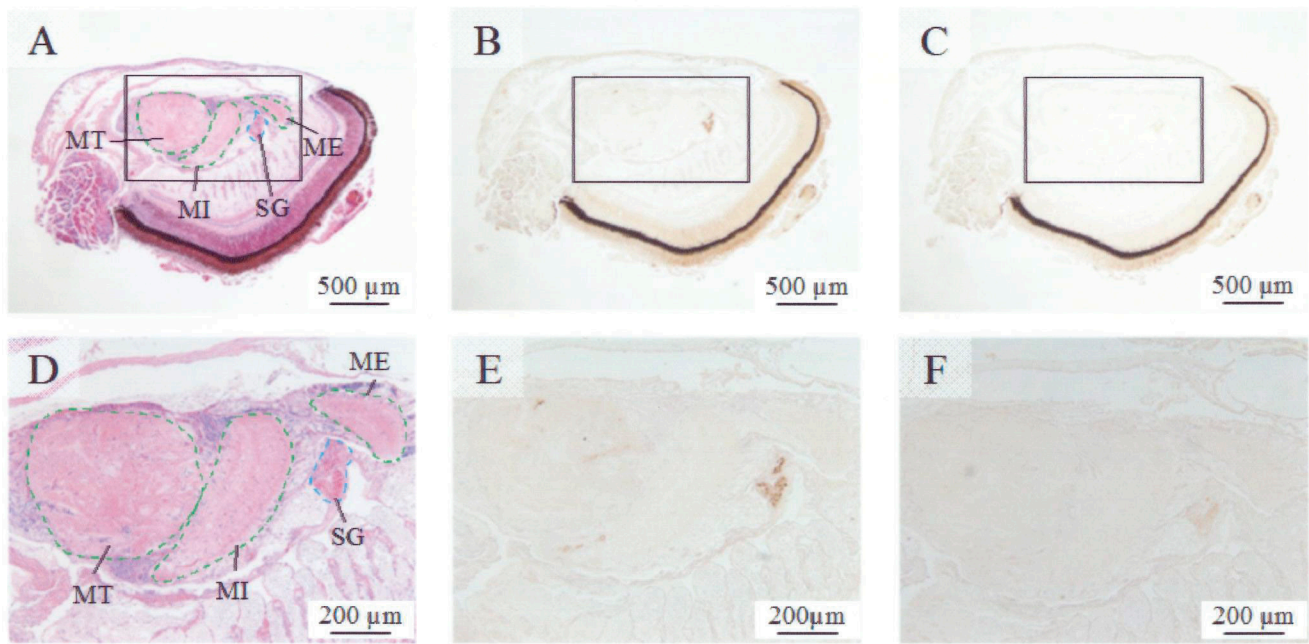


図 1-6 抗 Maj-CFSH_ES 抗体および免疫前血清を用いた免疫組織化学染色

雌の眼柄の縦断切片の HE 染色像 (A と D)、抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果 (B と E)、免疫前血清を用いた免疫組織化学染色の結果 (C と F) を示す。A、B、C の四角で囲んだ部分の拡大図がそれぞれ D、E、F である。図中の MT は終髄、MI は内髄、ME は外髄、SG はサイナス腺をそれぞれ示す。

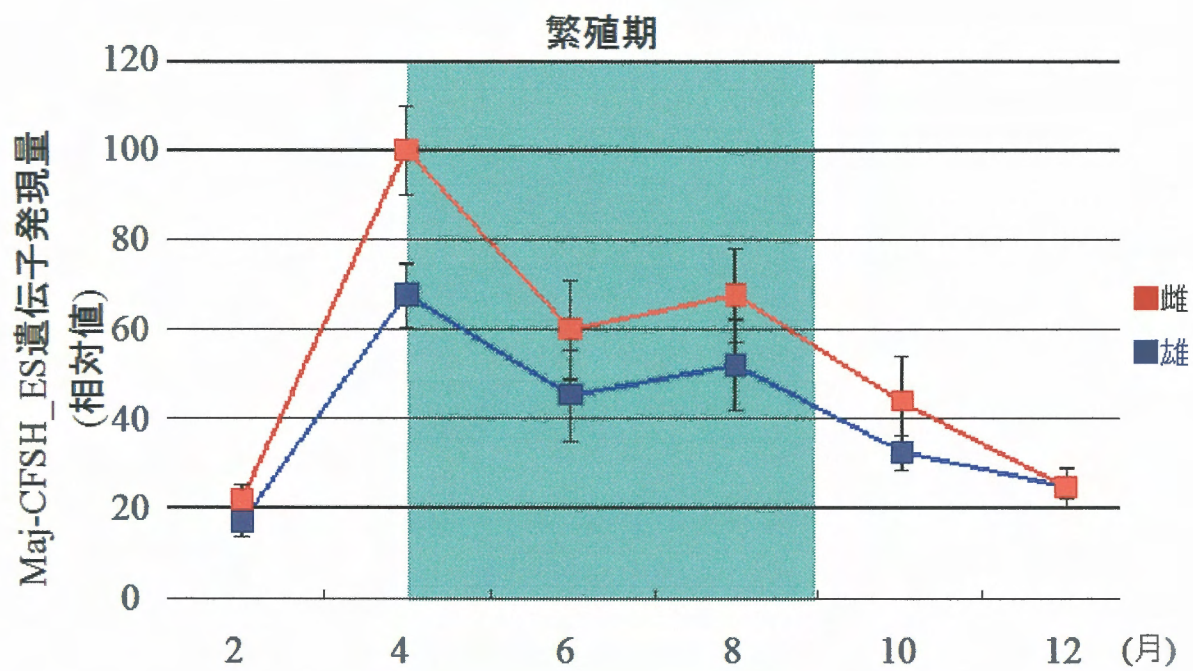


図 1-7 Maj-CFSH_ES の遺伝子発現の周年変動

赤線は雌の、青線は雄の Maj-CFSH_ES の遺伝子発現量を示す。結果は平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示す。

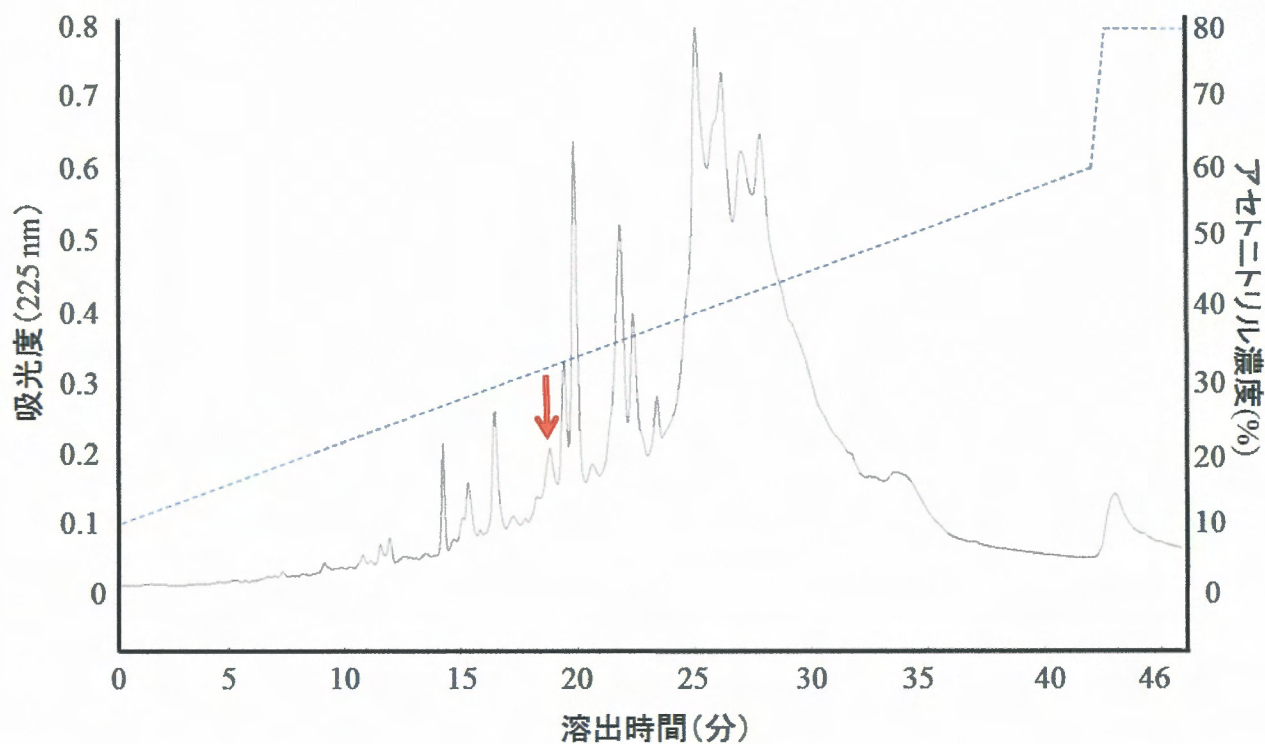


図 1-8 逆相 HPLC を用いたクルマエビサイナス腺粗抽出物の分離(サイナス腺 150 個相当量)

流速、カラム、グラジエントプログラムなどのクロマトグラフィーの条件は 1-2-12 で述べた。図中の矢印は Maj-CFSH_ES のピークを示す。

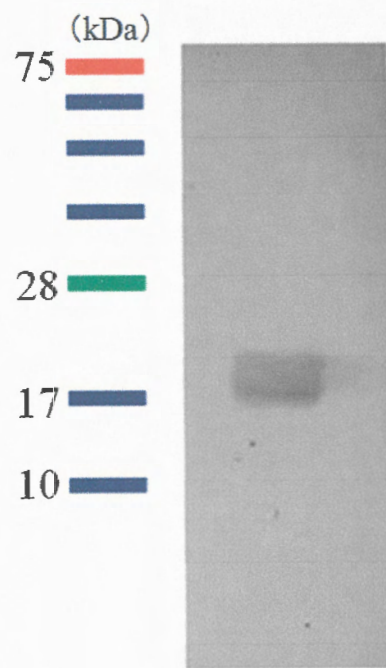


図 1-9 図 1-8 の矢印で示したピーク産物を 15% SDS-PAGE に供し、抗 Maj-CFSH_ES 抗体を用いたウエスタンブロット解析

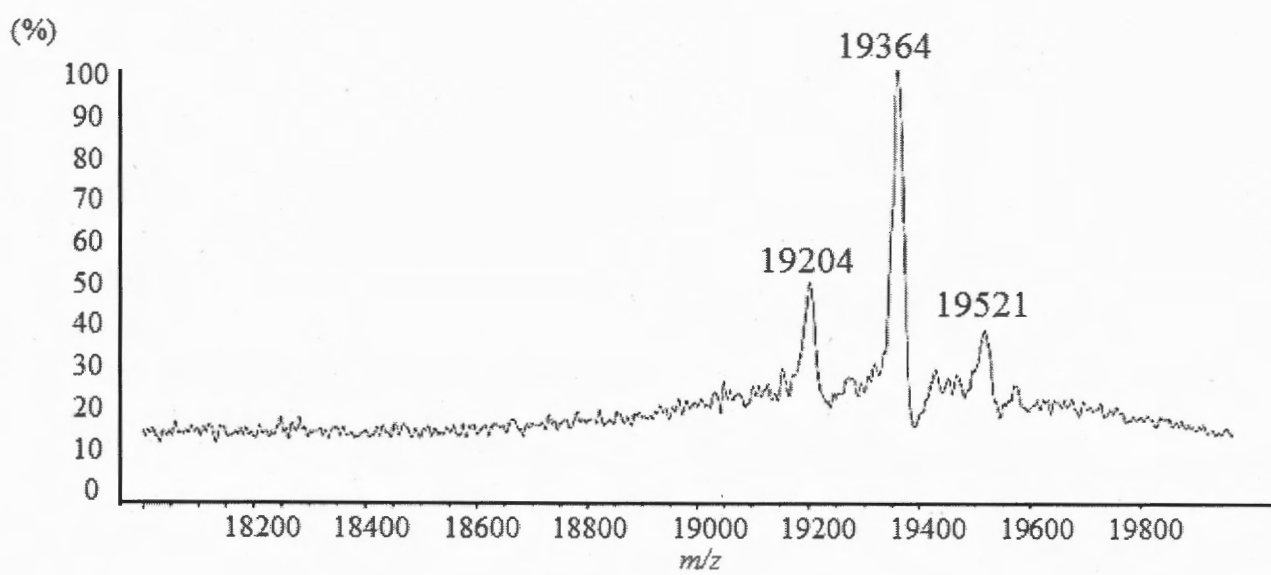
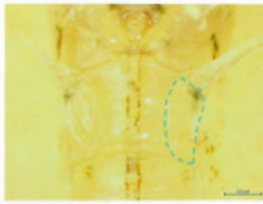


図 1-10 図 1-8 の矢印で示したピーク産物のマススペクトル

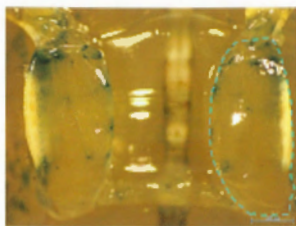
雌

雄

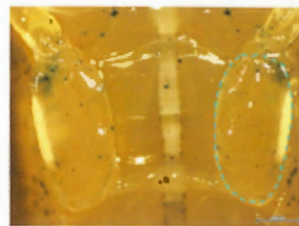
0日目



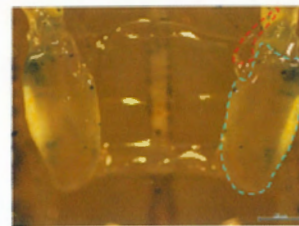
投与28日後



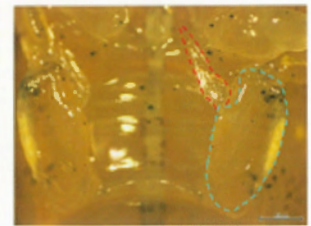
SA



CFSH



SA



CFSH

図 1-11 投与実験前（0 日目）と投与実験終了後（28 日目）のクルマエビ稚エビの第一遊泳肢の外部形態

SA はクルマエビリンガー投与群、CFSH は天然 Maj-CFSH_ES 投与群を示す。

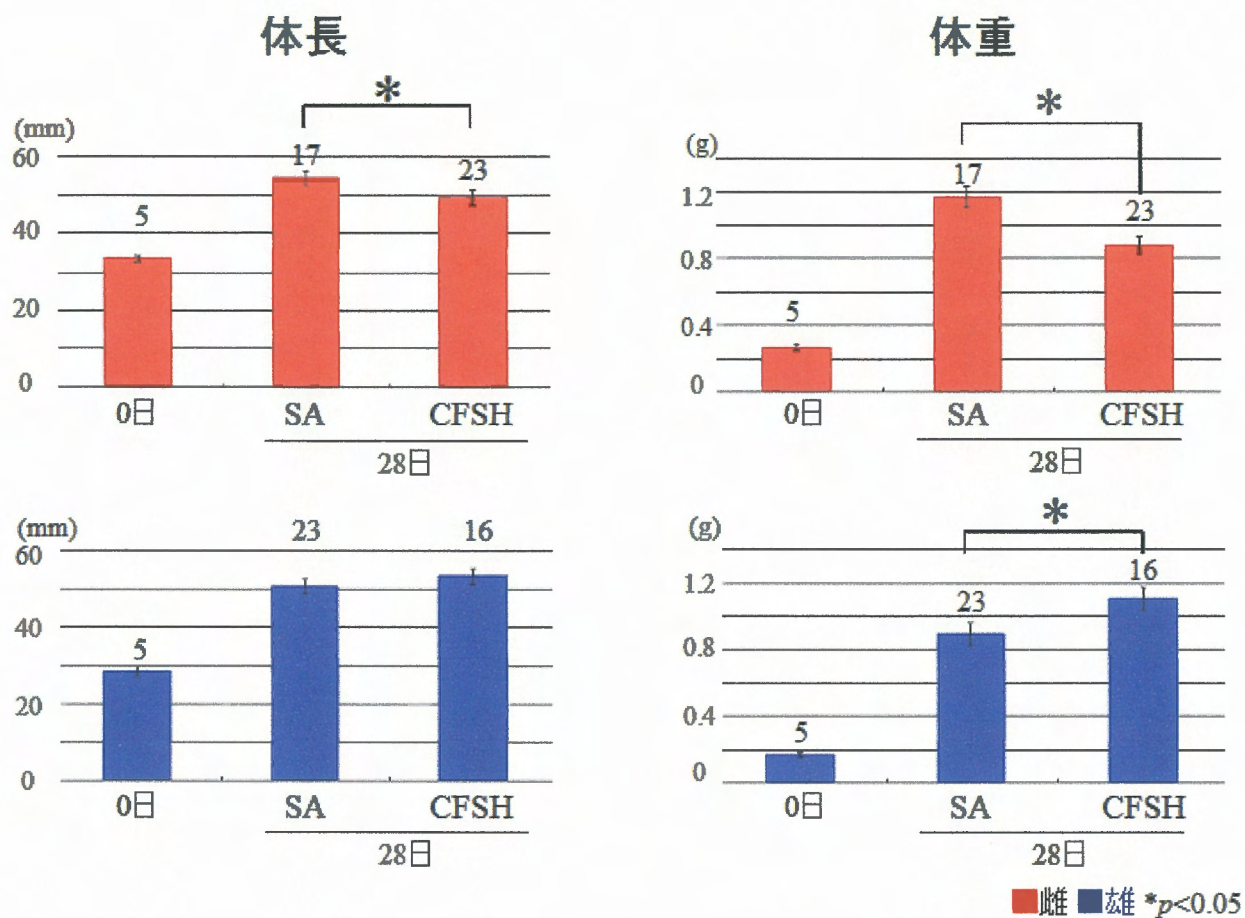


図 1-12 投与実験前（0 日目）と投与実験終了後（28 日目）のクルマエビ稚エビの体長と体重

SA はクルマエビリンガー投与群、CFSH は天然 Maj-CFSH_ES 投与群を示す。結果は平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示す。棒グラフの上の数字は個体数を示す。SA 群と比べて統計的に有意差があった CFSH 群を*で示した (* $P < 0.05$)。

第2章 クルマエビ卵巢甲殻類雌性ホルモン様分子 (Maj-CFSH_OV) に関する研究

2-1 序論

第1章では、クルマエビの眼柄から Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA のクローニングを行い、遺伝子発現を解析した。Maj-CFSH_ES は、アオガニ CFSH (Cas-CFSH) と同様に眼柄特異的に発現していたことから、クルマエビの CFSH の有力候補と考えられた。しかし、Maj-CFSH_ES は雌だけでなく雄の眼柄でも遺伝子発現していたことから、クルマエビの雌性ホルモンではなく、別の新たな機能を有すると考えられた。アメリカザリガニでは、次世代シーケンサーを用いた解析により眼柄特異的に発現する Prc-CFSH-like 1 と Prc-CFSH-like 2 のほかに、卵巢でのみ発現する Prc-CFSH が存在することが明らかとなっている (Veenstra, 2015)。そこで本研究では、クルマエビの卵巢にも CFSH が存在すると考え、クルマエビ卵巢 CFSH (Maj-CFSH_OV) の cDNA クローニングを行った。そして、Maj-CFSH_OV の雌特異的な発現を明らかにするために、遺伝子発現解析を行った。また、Maj-CFSH_OV の生理機能を明らかにするために、成熟に伴う Maj-CFSH_OV の遺伝子発現の解析と周年変動の解析を行った。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物

1-2-1 に記述したようにサンプリングした。生殖腺体重比 (Gonad somatic index; GSI) は生殖腺重量/体重 $\times 100$ の式を用いて計算した。

2-2-2 全 RNA の抽出

1-2-2 と同様の方法で行った。

2-2-3 First strand cDNA の合成

クルマエビの卵巢を用いた点を除いて 1-2-3 と同様の方法で行った。

2-2-4 Maj-CFSH_OV 前駆体をコードする cDNA のクローニング

・プライマーの設計

岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所の筒井直昭助教が行ったクルマエビ卵巣の RNA-Seq 解析の塩基配列データ（未公開）中に CFSH 様分子（Maj-CFSH_OV）の部分配列をコードしている Contig が存在した。この塩基配列を基に 5'RACE と 3'RACE に用いるプライマーを設計した（表 2 と図 2-1）。また、クローニング後の Maj-CFSH_OV cDNA の塩基配列を基に ORF を増幅するための特異的なプライマー（OV-ORF-F と OV-ORF-R）と、組織別発現解析用の特異的なプライマー（OV-F と OV-R）を設計した（表 2 と図 2-1）。

・ 3'RACE

2 段階の PCR 反応により Maj-CFSH_OV cDNA の 3'領域を増幅した。まず、2-2-3 で 3'RACE 用に合成した first strand cDNA を鋳型とし、OV-3F と RTG を用いて、1 段階目の PCR 反応を行った（図 2-1）。次いで、1 段階目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型とし、OV-3NF と RTG-NN を用いて、2 段階目の PCR 反応を行った（図 2-1）。PCR の条件は 1-2-4 で述べた 3'RACE と同様の条件で行った。

・ 5'RACE

2 段階の PCR 反応により Maj-CFSH_OV cDNA の 5'領域を増幅した。まず、5'RACE 用に合成した first strand cDNA を鋳型とし、OV-5R と UPM を用いて、1 段階目の PCR 反応を行った（図 2-1）。次いで、1 段階目の PCR 産物を 100 倍希釈したものを鋳型とし、OV-5NR と NUP を用いて、2 段階目の PCR 反応を行った（図 2-1）。PCR の条件は 1-2-4 で述べた 5'RACE と同様の条件で行った。

・ ORF を含む cDNA 断片の増幅

2-2-3 で合成した first strand cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。特異的なプライマー（OV-ORF-F と OV-ORF-R）を用いて、1-2-4 で述べた 3'RACE と同様の条件で cDNA 断片を増幅した。

・ 塩基配列の決定

1-2-4 と同様の方法で行った。

2-2-5 塩基配列データの解析

1-2-5 と同様の方法で行った。

2-2-6 Maj-CFSH_OV の RT-PCR による組織別発現解析

Maj-CFSH_OV 特異的プライマー (OV-F と OV-R) を用いた以外は 1-2-6 と同様の方法で行った。

2-2-7 組織切片の作製

未成熟なクルマエビの卵巣 (GSI 2.08) と成熟したクルマエビの卵巣 (GSI 7.33) を使用した。組織切片の作製は 1-2-7 と同様の方法で行った。

2-2-8 HE 染色

1-2-8 と同様の方法で行った。

2-2-9 *in situ* hybridization

センスプローブおよびアンチセンスプローブを作製するために、Maj-CFSH_OV に特異的かつ 5'側に T7 プロモーター配列を付加したフォワードプライマー (OV-ISH-F) と 5'側に T3 プロモーター配列を付加したリバースプライマー (OV-ISH-R) を設計した (表 2)。これらのプライマーを用いた PCR 反応により Maj-CFSH_OV の 307-604 bp の cDNA 断片を増幅した。これ以外は 1-2-9 と同様の方法で行った。

2-2-10 免疫組織化学染色

Maj-CFSH_OV の 114-132 aa のペプチド断片の N 末端側に Cys 残基を付加したペプチド抗原 ($\text{NH}_2\text{-C+EKEVEDASRSEYKA-COOH}$) を化学合成した点を除いて、1-2-10 と同様の方法で Maj-CFSH_OV に対する抗体を作製した。1 次抗体に抗 Maj-CFSH_OV 抗体を使用した点を除いて、1 次抗体の反応までは 1-2-10 と同様の方法で行った。1 次抗体の反応後、切片を PBS で 10 分間ずつ 2 回洗浄した後、ビオチン化抗ウサギ IgG ヤギ IgG (Sigma) を 1/2,000 倍量添加して室温で 1 時間反応させた。切片を PBS で 10 分間 2 回洗浄した後、あらかじめ 30 分前に混合しておいた VECTASTAIN ABC Kit PK4000 (Standard) (Vector

Laboratories) の反応液と 30 分間反応させ、切片を PBS で 10 分間洗浄した。検出液 (0.05% DAB と 0.03% H₂O₂ を含む 0.05 M Tris-HCl Buffer (pH7.5)) を添加し、シグナルを検出した。反応停止から封入までは 1-2-10 と同様の方法で行った。

2-2-11 Maj-CFSH_OV 遺伝子発現量の定量

1-2-1 でサンプリングした天然クルマエビの卵巢と精巣から 1-2-2 で述べた方法で全 RNA を抽出した。次に、Maj-CFSH_OV mRNA 発現量の定量を行うためのプライマーセット (OV-qPCR-F と OV-qPCR-R) と TaqMan[®]プローブ (OV-TaqMan probe) を設計した (表 2)。これらのプライマーとプローブに変更した以外は、1-2-11 と同様の方法で行った。

2-3 結果

2-3-1 Maj-CFSH_OV cDNA の構造と特徴

岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所の筒井直昭助教が行ったクルマエビ卵巢の RNA-Seq の in-house データベース (非公開) に対して、Maj-CFSH_ES の塩基配列をクエリーとして tBlastX 解析を行った。その結果、CFSH 様分子 (Maj-CFSH_OV) の部分配列をコードしている Contig が存在することが明らかとなった。この Contig の塩基配列を基に特異的なプライマーを設計して 5'RACE と 3'RACE を行い、Maj-CFSH_OV 前駆体をコードする cDNA を増幅した。Maj-CFSH_OV cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列を図 2-2 に示す。Maj-CFSH_OV の前駆体をコードする cDNA は 942 bp からなり、130 bp の 5'非翻訳領域、678 bp の ORF、134 bp の 3'非翻訳領域を含んでいた。3'非翻訳領域にはポリアデニル化シグナル (AATAAA) が存在した。N 末端側の 22 残基は SignalP 4.1 program でシグナルペプチドと予測された。また、Lys⁶⁰-Arg⁶¹ の C 末端側はプロセシング酵素で切断されると予測された。そのため、Maj-CFSH_OV 前駆体は N 末端側から 22 残基のシグナルペプチド、37 残基の CPRP、2 残基の塩基性アミノ酸 (Lys-Arg) から成るプロセシングシグナル、164 残基の成熟 Maj-CFSH_OV の 225 アミノ酸からなると推定された。推定されたアスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) が成熟 Maj-CFSH_OV に一カ所存在したことから (Asn⁶⁵-Phe⁶⁶-Thr⁶⁷)、Asn⁶⁵ はグリコシル化されていると推測された。Maj-CFSH_ES とは異なり、Maj-CFSH_OV のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列の位置は保存されていなかった。成熟 Maj-CFSH_OV の演繹アミノ酸配列は Maj-CFSH_ES と 67.3%、Prc-CFSH と 39.3%、

Cas-CFSH と 39.5%、Cam-CFSH と 40.1%、Prc-CFSH-like 1 と 32.5%、Prc-CFSH like 2 と 33.5%、Chq-CFSH-like と 32.2%、Sav-CFSH と 35.9%の相同性を示した。Maj-CFSH_OV と Maj-CFSH_ES、Prc-CFSH、Cas-CFSH、Cam-CFSH では分子内に存在した 8 つのシステイン残基の位置が完全に保存されていた。一方、Prc-CFSH-like 1、Prc-CFSH like 2、Chq-CFSH-like、Sav-CFSH は N 末端側にさらに 2 つのシステイン残基を有しており、アスパラギン結合型糖鎖の付加配列は存在しなかった (図 2-3)。

2-3-2 Maj-CFSH_OV の組織別発現解析

Maj-CFSH_OV の RT-PCR 増幅産物は、卵巣と精巣の first strand cDNA を鋳型に用いたレーン 8 と 9 でのみ検出された (図 2-4 上段)。増幅産物は、予想サイズの 298 bp で検出されたが (図 2-4)、精巣のバンドと比べて卵巣のバンドの方が明るかった。ポジティブコントロールとして増幅した β -アクチン (438 bp) の cDNA 断片は全ての組織で検出された (図 2-4 下段)。

2-3-3 *in situ* hybridization

クルマエビ卵巣の HE 染色と *in situ* hybridization の結果を図 2-5 に示す。未成熟なクルマエビの卵巣内にはヘマトキシリンで青色に染色される卵原細胞と未熟な卵母細胞が観察された (図 2-5A)。一方、成熟したクルマエビの卵巣内にはエオシンでピンク色に染色される成熟した卵母細胞が観察された (図 2-5D)。 *in situ* hybridization では、Maj-CFSH_OV のアンチセンスプローブは未成熟卵巣のどの細胞にも反応しなかった (図 2-5B) 一方で、成熟卵巣の卵原細胞と (図 2-5E)、未熟な卵母細胞と反応した (図 2-5G)。一方、ネガティブコントロールの Maj-CFSH_OV のセンスプローブは全く反応しなかった (図 2-5C, F, H)。

2-3-4 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色の結果を図 2-6 に示す。抗 Maj-CFSH_OV 抗体を用いた免疫組織化学染色では、未熟な卵巣には免疫陽性反応は観察されなかった (図 2-6B) 一方で、成熟卵巣の卵原細胞と (図 2-6F)、未熟な卵母細胞で免疫陽性反応が観察された (図 2-6G)。一方、免疫前血清を用いた場合では、全く染色されなかった (図 2-6C, F, H)。

2-3-5 Maj-CFSH_OV 遺伝子発現量の周年変動

2016 年 4 月から 2017 年 2 月までの 2 ヶ月毎に漁獲された天然クルマエビの卵巢と精巢における Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量を Real time RT-PCR により定量した (図 2-7)。その結果、精巢での Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量は年間を通して非常に低かった。一方、卵巢での発現量は繁殖期である 4 月から 8 月に増加し、6 月に最大となった。非繁殖期には精巢での発現量と同じレベルにまで減少していた。

2-4 考察

クルマエビ卵巢 CFSH (Maj-CFSH_OV) の前駆体は、N 末端側からシグナルペプチド、CPRP、2 残基の塩基性アミノ酸から成るプロセシングシグナル、成熟 Maj-CFSH_OV から構成されていた。この構造は、第 1 章で単離した Maj-CFSH_ES および既知の CFSH や CFSH ホモログの前駆体と共通していた (図 2-3)。Maj-CFSH_OV には保存されている 8 つのシステイン残基が存在することから Type I に属すると考えられた。しかし、Maj-CFSH_OV のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) の位置は保存されておらず、Maj-CFSH_OV のみ N 末端に近い部分に存在した。このため、Maj-CFSH_OV は既知の Type I の CFSH や Type II の CFSH とは異なる新規の CFSH と考えられた。

Maj-CFSH_OV の遺伝子発現を調べたところ、雌の卵巢と雄の精巢で発現が観察された (図 2-4)。しかし、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量は卵巢の方が圧倒的に高かった (図 2-7)。このような卵巢に特異的な遺伝子発現はアメリカザリガニの Prc-CFSH でも観察されている (Veenstra, 2015)。しかし、卵巢内での Prc-CFSH の局在は調べられていない。そこで、本研究では Maj-CFSH_OV の局在を *in situ* hybridization と免疫組織化学染色で調べた。その結果、Maj-CFSH_OV はクルマエビの成熟した卵巢の卵原細胞と未熟な卵母細胞で発現しており、成熟した卵母細胞では発現していないことが明らかとなった。また、クルマエビの未成熟な卵巢ではどの細胞でも発現していなかった (図 2-5 と図 2-6)。Maj-CFSH_OV は成熟した卵巢でのみ発現していたことから卵成熟に関わっていると考えられた。この結果を検証するために、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現の周年変動を Real time RT-PCR で調べてみた。その結果、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量は繁殖期である 4 月から 9 月に増加し、非繁殖期には減少していた (図 2-7)。この結果からも、Maj-CFSH_OV は卵成熟に関わっていると考えられた。しかし、Maj-CFSH_OV は成熟した卵母細胞では発現していなかったことから、

どのようなメカニズムで成熟に関わっているのかは現段階では不明である。今後、RNA 干渉によるノックダウン実験により、Maj-CFSH_OV の作用機序や生物活性が明らかにされることを期待している。

表 2-1 PCR で使用したプライマーとその塩基配列

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>Not</i> I dt	AACTGGAGGAATTCGCGGCCGCAGGAA(T) ₁₈
RTG	AACTGGAAGAATTCGCGGCCG
RTG-NN	AAGAATTCGCGGCCGCAGGAA
OV-3F	CTCGGAGGAGCAAGTGCAGG
OV-3NF	GCTGCACTCGGTGATGCACG
OV-5R	CACACGGCCTCCAGTACCGTCGAGGGC
OV-5NR	CTGCGACGTGTAGATGACCGGCTCAGGG
OV-ORF-F	CAACGAAGCACCATGGCTAC
OV-ORF-R	AACCTCCGTTCCCTTAGCTC
OV-F	GAAGCGGACGCGCGAGAACT
OV-R	CAGTACCGTCGAGGGCGAGT
β-Actin-F	TGTAYGCCTCTGGYCGYACC
β-Actin-R	CVACRTCRCACCTTCATGATGS
OV-ISH-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAAGCGGACGCGCGAGAACT
OV-ISH-R	ATTAAACCCTCACTAAAGGGA CAGTACCGTCGAGGGCGAGT
OV-qPCR-F	GCCACGAAGATCCAGTACAAGTC
OV-qPCR-R	AGCTCCGGCTTGATGTAGTTCTC
OV-Taq Man probe	(FAM)-AGCCGGTCATCTACACGTCGCAGGT-(TAMRA)

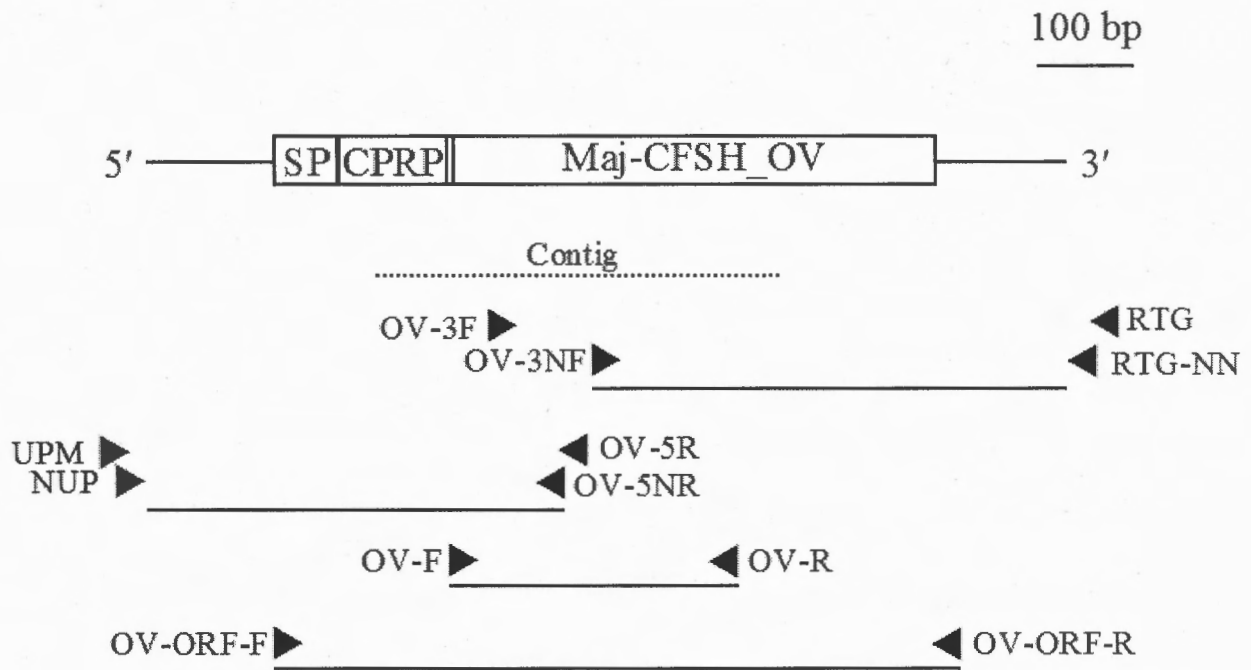


図 2-1 Maj-CFSH_OV cDNA の模式的な構造と PCR で使用したプライマーの位置

矢頭はプライマーを、矢頭の下線は増幅された cDNA 断片を表す。点線は RNA-seq 解析データ中に存在した Maj-CFSH_OV の部分配列をコードする Contig の位置を、ボックスは ORF を、SP はシグナルペプチドを、CPRP は CFSH-precursor related peptide を示す。


```

nt 0001  ACGCGGGGAGAGCGTTCTGAACCTTGGAAGTATACACACCATCTTGAAGCCTACCACGACGCCTGCGTGAAGAGACC
nt 0079  TCGTCCTTCTATATAACGCCTGATCTTCAACGGCTCAAGCAACGAAGCACC
nt 0131  ATGGCTACTCCTCGCCCTCAGCACCTGCTGTGTCTGATCTTCGGCACCCCTCGTCGTCACCGCCGCTTCGCCTGCGCG
aa 0001  M A T P R P Q H L L C L I F G T L V V T A A F A C A
nt 0209  CCGACCTCCGCCTCCGCCCGGTTCTCTCCCGGTGCGCGTTCTGTTCCGAGCGCGCGGGAAGGAGGGGCAGGAGCTA
aa 0027  P T S A S A R F S P R S P F L F R A R G K E G Q E L
nt 0287  GCGGCCCGAGGCGAGCTCTCGAAGCGGACGCGCGAGAATTTCACGGCTGACCTCGTCCAGTTCTTCTCGGAGGAGCAA
aa 0053  A A R G E L S K R T R E R F E A D L V Q F F S E E Q
nt 0365  GTGCAGGAGGCCACGAAGATCCAGTACAAGTCCATCCCTGAGCCGGTCATCTACACGTCGCAGGTCCTCCAGCAGGGC
aa 0079  V Q E A T K I Q Y K S I P E P V I Y T S Q V L Q Q G
nt 0443  GTCAGCTGCTCGACGCTGCACTCGGTGATGCACGAGAACTACATCAAGCCGGAGCTCAGACTCCGCCCCGAGTGGATC
aa 0105  V S C S T L H S V M H E N Y I K P E L R L R P E W I
nt 0521  TACGAGTCCAAGCTGATCGGCGACTGCCACGCACTACGTGACCCGCGAACTGCCCGTCCATCTACTCGCCCTCGACG
aa 0131  Y E S K L I G D C P T H Y V T R E L P S I Y S P S T
nt 0599  GTACTGGAGGCCGTGTGCGCCTGCGGGGGCTCCCAAGTGTCCAAGGACGGCCACAGTGCCTGCGCCGTGTCACGCCAC
aa 0157  V L E A V C A C G G S Q C S K D G H Q C V P V S R H
nt 0623  GTCCCGTGTGGGTGCGCAGGGGGCCCCAACCTCCACGTGCTCGACGTCGAGGAAGTACGGGTGGCGTGCCTGCGCC
aa 0182  V P V W V R R G P N L H V L D V E E L T V A C A C A
nt 0677  CAGAGGCCAGCGCGCGGGGAACCTTCATCTACAGCGCGCGGTGAGAGCTAA
aa 0209  Q R P S A G G N F I Y S A A V E S *
nt 0809  GGGAACGGAGGTTAAGCGCGGCTCAGCTTTGGCAGCTCTTTCTTTTATCGATTAAAGGAAATAAATAAATGAAAAACGA
nt 0887  GAACCACAAGACTTTAAGTGGGTTTGCTAGTTTCAAAGAAAAA

```

図 2-2 Maj-CFSH_OV 前駆体をコードする cDNA の塩基配列と演繹アミノ酸配列

シグナルペプチドは太字、CFSH-precursor related peptide (CPRP) は下線、Maj-CFSH_OV はイタリックで示した。アスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (N-X-S/T) は灰色のボックスで示し、ポリアデニル化シグナルは点線で示す。推定プロセシングシグナルはボックスで示す。アスタリスクは終止コドンを示す。

```

Maj-CFSH_OV -----TRENNADLVQFFSEEQVQEATKIQ-YKSIPEPVIYTSQVLQGGVSTLHVS--MHENYIKPELRLRPEMIYESKLIGDPT
Maj-CFSH_ES -----HLDDEIPGLLQHYSEKVEDASRSE-YKAVPSPIVHTSQMLHQGIDALASN--LHENHIKPELQLRPDNIHISELIGDPT
Prc-CFSH -----TQPYRS-----TDMETSIRENYYVVKTIIDTSTTLHQGVHRAFRVT--HHVNTFTTELHRSPTLHSSSMIGDPT
Cas-CFSH -----SSIIGMNSIPYRTREQVMGMDT-----YVLVPRAIISSTAKLHGVHREYFEVSKVYNGFEANYNLRPTWPHRSKTIISTPT
Cam-CFSH -----SSIIGMNSIPYRTREQVMGMDT-----YVLVPRAIISSTAKLHGVHREYFEVSKVYNGFEANYNLRPTWPHRSKTIISTPT

Prc-CFSH-like 1 -----SRLKSSGNRRERGVANMIPASEVKQS-----WKNDYLSVPEALVQFSQEHSEETVCKDLSVQ---LFRVDLSEDYLEPLWVRGTVHLGMCPS
Prc-CFSH-like 2 QIESFGAKNEESAVGNPFINKLSKGSPLSGNSRRRGGMNMIPIASEVKQM-----WKEEYSSVPEAMVHFSQQQADETVCKDLSVQ---LFRVDLSEHLEPLWVRDSVHLGMCPS
Chq-CFSH-like -----SHLCRSP-----RERGMNIIPIASEVKQS-----WRKEYLSVPEALVQFSQVQAEVEVCKDLSVQ---LYSVDLSEHLEPLWVRGTVHLGMCPS
Sav-CFSH -----SRVCRSGEKGAIVTG---LISFTEVWQG-----WKDDYLSVQAMVKFSQEQAGENVCKDLSVQ---LFSVDLREHIEPLWVRGTVYIGMCPS

Maj-CFSH_OV HYVTELP---SIYSPSTVLEAVCAAGGSCSKDG--HCVFVSRHVPVWVR-RGNLHVLDEELTVACAAQRPSAGGNFIYSAAVES
Maj-CFSH_ES HYITRELP---PMYSPAVVLEAVCAAGGSCSRDG--HCVFVTRHIPVWVR-RGNVHVLDEELTVACAAVRPSVGGNFVFSFAVQS
Prc-CFSH RYVKENMN--EPIQYFPEILEACIIEDSQSQDG--YRCEPLKYNMLVWKFDSFSNRSFSEYELTVACAAVRPSIAGSSETLGEP
Cas-CFSH QYVERQIQGLPIQP-VTILEAKVVEGSCSQDG--SIIVAVKYRLPVWIS-VDSGGYTDTVELAVACAAKNPSRDGG-YIDLSENK
Cam-CFSH QYVERQIQGPFPQP-VTILEAKVVEGSCSQDG--SIIVAVKYRLPVWIR-VDSGGYTDTVELAVACAAKNPSRDGG-YVDLSENK

Prc-CFSH-like 1 KLQTRHLG---ENVWPPNLVETKCLQGETCSNLGGDFRQAVR--RPIRMWVRHLDQFIPTQEMVSVGCVVQVRIS-PGGNSANPSLQS
Prc-CFSH-like 2 KLQTRHLG---DKVWPSKVVEVRKCLQRESCSNLGGDFRQAVRRPVRMWVR--HQDSFIPTQEMVSVGCVVQVRIS-PGGKYISPSLQS
Chq-CFSH-like KLQTRHLG---ENVWPPNVVEIKCLQRETCSNL-----
Sav-CFSH RLQTRHLG---DNVWPPKVVEVRKCLQRESCSNLGGDFRQAVRRPVTWLR--RDKTFPLSQEMLSVGCVVQVRIS-TQGRYADPGLSS

```

図 2-3 単離した Maj-CFSH_OV と既知 CFSH のアミノ酸配列のアライメント

Maj-CFSH_OV はクルマエビ卵巣 CFSH を (accession no. LC276841)、Maj-CFSH_ES はクルマエビ眼柄 CFSH を (accession no. LC224021)、Prc-CFSH はアメリカザリガニ CFSH を (Veenstra, 2015)、Cas-CFSH はアオガニ CFSH を (Zmora and Chung, 2014)、Cam-CFSH はヨーロッパミドリガニ CFSH を (Zmora and Chung, 2014)、Prc-CFSH like-1 はアメリカザリガニ CFSH-like 1 を (Veenstra, 2015)、Prc-CFSH like-2 はアメリカザリガニ CFSH-like 2 を (Veenstra, 2015)、Chq-CFSH-like は *Cherax quadricarinatus* CFSH-like を (Nguyen et al., 2016)、Sav-CFSH は *Sagmariasus verreauxi* CFSH を (Ventura et al., 2014) を示す。オープンボックスは保存されたシステイン残基を示す。黒ボックスはアスパラギン結合型糖鎖の付加配列 (N-X-S/T)を表す。

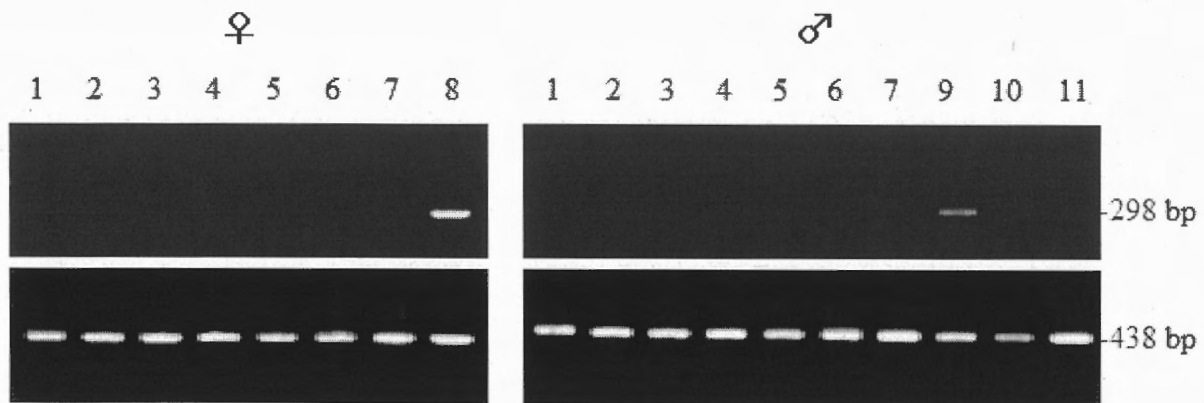


図 2-4 Maj-CFSH_OV の組織別遺伝子発現解析

レーン 1 は眼柄、レーン 2 は脳、レーン 3 は胸部神経節、レーン 4 は腹部神経節、レーン 5 は腸、レーン 6 は肝臓、レーン 7 は筋肉、レーン 8 は卵巣、レーン 9 は精巣、レーン 10 は輸精管、レーン 11 は輸精管末端の全 RNA から合成した first strand cDNA を PCR の鋳型に用いた。上の写真は Maj-CFSH_OV、下の写真は β -アクチンの PCR 産物の電気泳動像である。

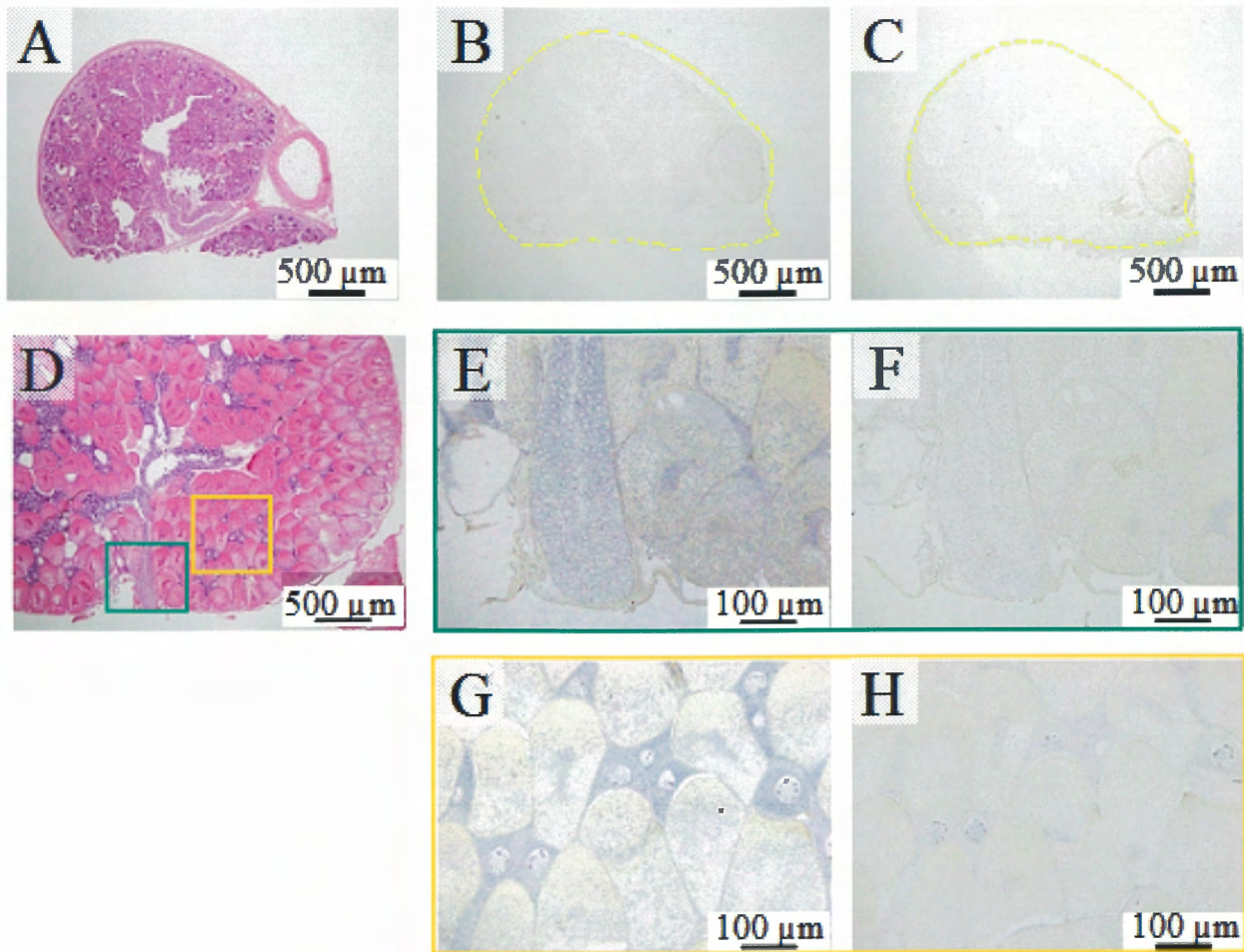


図 2-5 Maj-CFSH_OV cRNA をプローブに用いた *in situ* hybridization

未成熟な卵巣の HE 染色像 (A)、Maj-CFSH_OV のアンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (B)、Maj-CFSH_OV のセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (C) を上段に示す。成熟卵巣の HE 染色像 (D)、Maj-CFSH_OV のアンチセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (E, G)、Maj-CFSH_OV のセンスプローブを用いた *in situ* hybridization の結果 (F, H) を中段と下段に示す。D の緑色の四角で囲んだ部分の拡大図が E と F、黄色の四角で囲んだ部分の拡大図が G と H である。

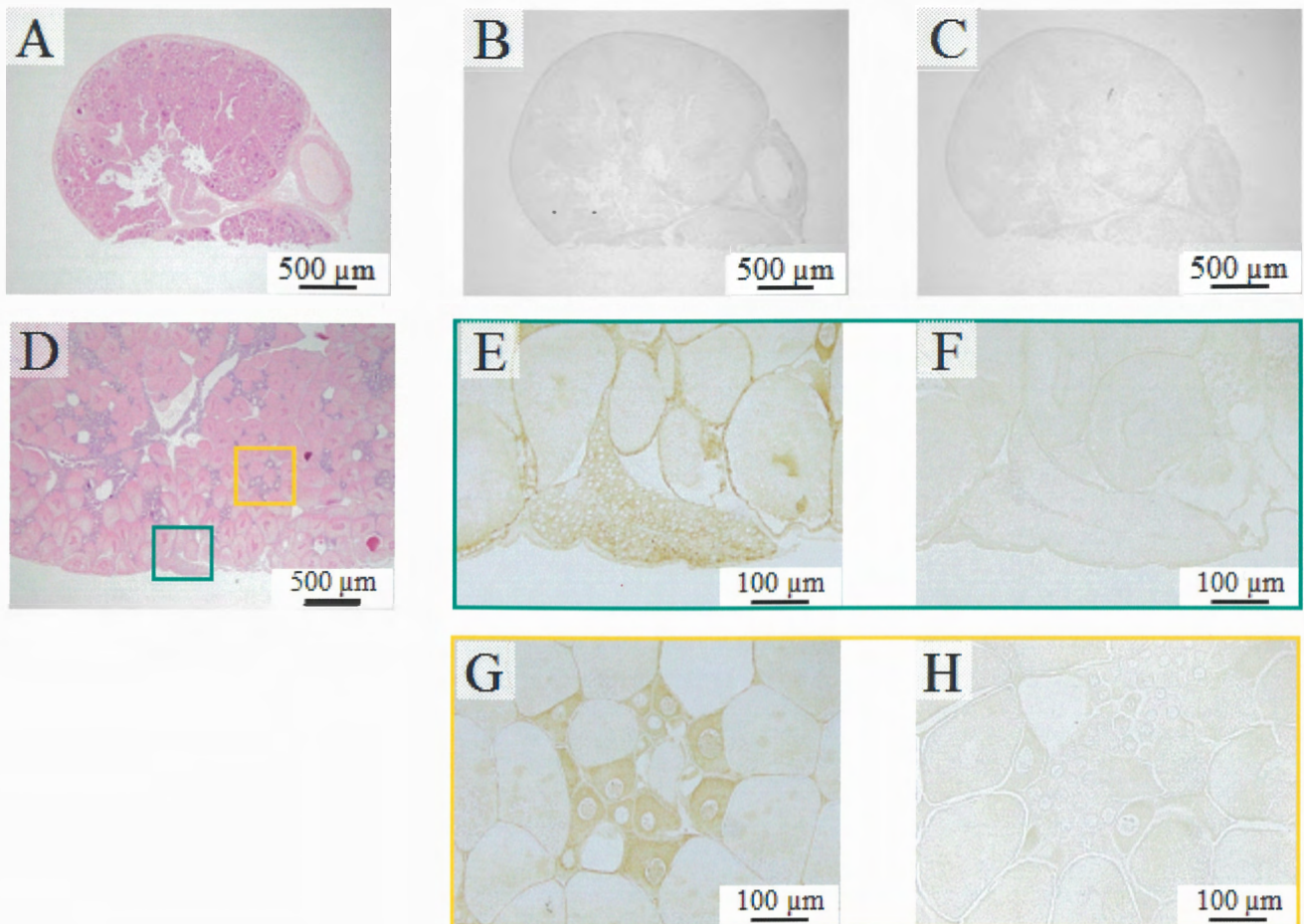


図 2-6 抗 Maj-CFSH_OV 抗体および免疫前血清を用いた免疫組織化学染色

未成熟な卵巣の HE 染色像 (A)、抗 Maj-CFSH_OV 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果 (B)、免疫前血清を用いた免疫組織化学染色の結果 (C) を上段に示す。成熟卵巣の HE 染色像 (D)、抗 Maj-CFSH_OV 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果 (E, G)、免疫前血清を用いた免疫組織化学染色の結果 (F, H) を中段と下段に示す。D の緑色の四角で囲んだ部分の拡大図が E と F、黄色の四角で囲んだ部分の拡大図が G と H である。

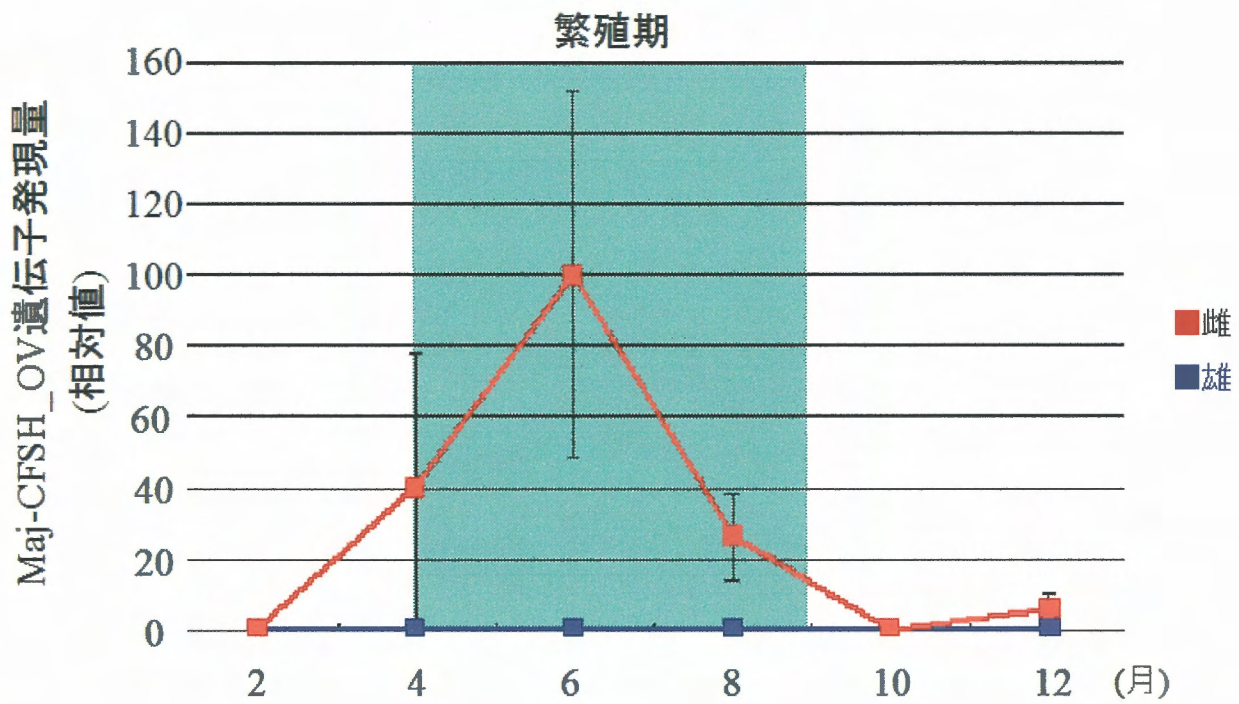


図 2-7 Maj-CFSH_OV の遺伝子発現の周年変動

赤線は雌の、青線は雄の Maj-CFSH_OV の遺伝子発現量を示す。結果は平均値で示し、エラーバーは標準誤差を示す。

総合考察

第1章ではクルマエビの眼柄から Maj-CFSH_ES 前駆体をコードする cDNA をクローニングした。そして、そのアミノ酸配列の特徴から、CFSH は2種類のサブタイプに分類できることを示した。この様に CFSH をサブタイプに分けられることを示したのは本研究が初めてである。しかし、第2章で cDNA クローニングした Maj-CFSH_OV は type I の特徴であるアスパラギン結合型糖鎖の付加配列の位置が保存されていなかった。この結果は、第1章で提唱した Type I と Type II という2種類のサブタイプよりも、さらに多くのサブタイプが存在することを示しているのかもしれない。

本研究により、クルマエビには Maj-CFSH_ES と Maj-CFSH_OV の2種類が存在することを示した。アメリカザリガニでは、卵巣で発現する Prc-CFSH、眼柄で発現する Prc-CFSH-like 1 と Prc-CFSH-like 2 の3種類の CFSH 様のホモログあることが報告されている (Veenstra, 2015)。これらの結果より、CFSH は同一種で複数種類が発現していることが明らかとなった。眼柄ホルモンの甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) や脱皮抑制ホルモン (MIH) も同一種で複数発現していることが報告されていることから (Katayama et al., 2013)、甲殻類において似たような分子が複数種類存在することは珍しいことではないのかもしれない。これまでに、クルマエビの3種類目の CFSH を探索する試みも進めてきたが、現在までのところ発見には至っていない (甲高ら, 2017)。

第1章では、天然 Maj-CFSH_ES を精製し、それを稚エビに投与して生物活性を解析した。しかし、今後、Maj-CFSH_ES や Maj-CFSH_OV の生物活性を調べていくためには、天然物を用いるのには限界がある。天然 Maj-CFSH_ES はサイナス腺中にごくわずかしき存在しないため、第1章の天然 Maj-CFSH_ES の投与実験では千尾以上のクルマエビのサイナス腺を必要とした。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。この問題を解決するためには、Maj-CFSH_ES や Maj-CFSH_OV の組換え体の作製が必須となる。Maj-CFSH_ES と Maj-CFSH_OV には一ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖の付加配列が存在し、翻訳後修飾により糖鎖が付加されると考えられる。前述した AGH の場合、バキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いてオカダンゴムシ AGH の組換え体が作製されて、生物活性には糖鎖の付加が必須であることが実験により証明されている (Okuno et al., 2002)。この結果を考慮すると、CFSH に関しても、糖鎖を付加できる発現系を用いた組換

え体の作製が望ましいと言える。今後、オカダンゴムシ AGH の組換え体の作製法を参考にしながら、組換え Maj-CFSH_ES と組換え Maj-CFSH_OV の作製法の確立を目指すべきである。

Maj-CFSH_OV の発現パターン（図 2-5）と成熟した卵巢でのみ遺伝子発現が検出されたことから、Maj-CFSH_OV は卵黄形成の制御に関与すると考えられる。クルマエビにおいて卵黄蛋白前駆物質（Vitellogenin, VG）を指標とした *ex vivo* 卵巢培養系を用いた生物検定系が確立されている（Tsutsui et al., 2005; Tsutsui et al., 2013）。クルマエビの卵黄形成抑制ホルモン（Vitellogenesis-inhibiting hormone, VIH）を培養系に添加した時、VG の遺伝子発現は有意に抑制されるのに対して、Maj-CFSH_OV の遺伝子発現は抑制されなかった（Tsutsui et al., 2018）。この結果から、Maj-CFSH_OV は VIH のシグナルを介さない別の経路で卵黄形成に関与していると考えられる。今後は、前述した糖鎖を有する Maj-CFSH_OV の組換え体を作製し、それを用いて Maj-CFSH_OV の生理機能の解析をする必要があると考えられる。

CFSH に関する研究は数年前にスタートしたばかりで、これまでの知見はごく僅かであった。また、本研究を開始した当初、エビ類の CFSH に関する研究は行われていなかった。本研究で得られた Maj-CFSH_ES と Maj-CFSH_OV に関する知見は、エビ類の CFSH 研究の新たな発展の方向性を示すものといえる。また、本研究で得られた成果は、今後発展していくと思われる甲殻類の内分泌学に大きく貢献するものである。

謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、ご懇篤なご指導を賜りました神奈川大学理学部生物科学科分子生物学的研究室第三の大平剛准教授に衷心より感謝申し上げます。

神奈川大学理学部生物科学科分子生物学的研究室第二の泉進教授には、始終一貫して懇切丁寧な指導をしていただきました。また、論文をご精読いただきました。心より感謝いたします。

神奈川大学理学部生物科学科集団生物学的研究室第一の小笠原強教授には、論文をご精読いただきました。心より感謝いたします。

東海大学工学部生命化学科の片山秀和准教授には、論文をご精読いただきました。また、審査員を引き受けていただきました。心より感謝いたします。

愛知県栽培漁業センターの水藤勝喜博士には、同センターの一部にて実験の一部を行わせていただきました。心より感謝いたします。

三重県栽培漁業センターの山根史裕技師には、同センターの一部にて実験の一部を行わせていただきました。心より感謝いたします。

岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所の筒井直昭助教には、クルマエビ卵巣の RNA-Seq 解析の塩基配列データを提供していただきました。また実験に有益なご助言をしていただきました。心より感謝いたします。

神奈川大学理学部生物科学科分子生物学的研究室第三の皆様には、日々の研究生活において多くの面でお世話になりました。

本研究で用いたクルマエビの稚エビは、三重県栽培漁業センターで種苗生産されたものを使わせていただきました。御協力いただきました山根史裕技師に心より感謝いたします。

最後になりますが、勉学に励む環境を整え、支えてくれた両親に本当に感謝します。

参考文献

- Aflalo ED, Hoang TTT, Nguyen VH, Lam Q, Nguyen DM, Trinh QS, Raviv S, Sagi A (2006) A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, **256**, 468-478.
- Katakura Y (1984) Sex differentiation and androgenic gland hormone in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. In: Sutton SL, Holdich DM (eds) *The Biology of Terrestrial Isopods*. Oxford Univ Press, Oxford, pp 127-142.
- Katakura Y, Hasegawa Y (1983) Masculinization of females of the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*, following injections of an active extract of the androgenic gland. *Gen Comp Endocrinol*, **48**, 57-62.
- Katayama H, Ohira T, Nagasawa H (2013) Crustacean peptide hormones: structure, gene expression and function. *Aqua BioSci Monogr* **6**, 49-90.
- Nguyen TV, Cummins SF, Elizur A, Ventura T (2016) Transcriptomic characterization and curation of candidate neuropeptides regulating reproduction in the eyestalk ganglia of the Australian crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Sci Rep*, doi: 10.1038/srep38658.
- Ohira T, Hasegawa Y, Tominaga S, Okuno A, Nagasawa H (2003) Molecular cloning and expression analysis of cDNAs encoding androgenic gland hormone precursors from two Porcellionidae species, *Porcellio scaber* and *P. dilatatus*. *Zool Sci*, **20**, 75-81.
- Ohira T, Nishimura T, Sonobe H, Okuno A, Watanabe T, Nagasawa H, Kawazoe I, Aida K (1999) Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1576-1581.
- Okuno A, Hasegawa Y, Nishiyama M, Ohira T, Ko R, Kurihara M, Matsumoto S, Nagasawa H (2002) Preparation of an active recombinant peptide of crustacean androgenic gland hormone. *Peptides*, **23**, 567-572.
- Shih TW (1999) Immunohistochemical studies on CHH-family peptide producing cells in the eyestalk of kuruma prawn *Penaeus japonicus*. PhD dissertation, The University of Tokyo, Tokyo
- Shih TW, Suzuki Y, Nagasawa H, Aida K (1998) Immunohistochemical identification of hyperglycemic hormone- and molt-inhibiting hormone-producing cells in the eyestalk of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool Sci*, **15**, 389-397.
- Suzuki S, Yamasaki K, Katakura Y (1990) Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the

- terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). *Gen Comp Endocrinol*, **77**, 283-291.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Tsutsui N, Nagakura-Nakamura A, Nagai C, Ohira T, Wilder MN, 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.
- Tsutsui N, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H, Wilder MN, 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.
- Tsutsui N, Kotaka S, Ohira T, Sakamoto T (2018) Characterization of distinct ovarian isoform of crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* *Comp Biochem Physiol A* **217**, 7-16.
- Veenstra JA (2015) The power of next-generation sequencing as illustrated by the neuropeptidome of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gen Comp Endocrinol*, **224**, 84-95.
- Ventura T, Cummins SF, Fitzgibbon Q, Battaglene S, Elizur A (2014) Analysis of the central nervous system transcriptome of the eastern rock lobster *Sagmariasus verreauxi* reveals its putative neuropeptidome. *PLoS One*, doi: 10.1007/journal.pone.0097323
- Yamano K, Unuma T (2006) Expressed sequence tags from eyestalk of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A* **143**, 155-161.
- Zmora N, Chung JS (2014) A novel hormone is required for the development of reproductive phenotypes in adult female crabs. *Endocrinol*, **155**, 230-239.
- 奥村卓二, 水藤勝喜編 (2014) クルマエビ類の成熟・産卵と採卵技術. 愛知県水産業振興基金, 愛知
- 甲高彩華, 城下菜那, 馬久地みゆき, 大平 剛 (2017) クルマエビの成熟制御因子の探索. *Sci. J. Kanagawa Univ.* **28**, 75-78.
- 高田邦明, 斎藤尚亮, 川上速人 (2006) 染色・バイオイメーjing実験ハンドブック 細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を観るための染色法と顕微鏡観察のすべて. 羊土社,

東京

守隆夫 (2010) 新・生命科学シリーズ 動物の性. 裳華房, 東京

§