

3 研究内容

【研究課題名】

海産甲殻類の脱皮関連遺伝子に関する研究

【研究目的】

甲殻類は外骨格を持ち、成長過程における脱皮は必要不可欠である。脱皮の過程は、Y 器官から分泌されるエクジステロイドにより誘導される。エクジステロイドは節足動物(昆虫類、甲殻類、その他の分類群)の脱皮ホルモンの総称であり、甲殻類では頭胸甲の腹面に左右一対存在する Y 器官でコレステロールから生合成される。しかし、化学物質の曝露は脱皮を阻害・遅延し、成長・成熟などに影響することが指摘されている。これまでに申請者の研究グループでは、海産甲殻類アミ (*Americamysis bahia*) をモデル生物とした生態毒性試験系を確立し、環境中存在濃度のノニルフェノール(NP)やNP異性体の曝露によってアミの脱皮が顕著に抑制され、それに伴い成長・成熟の遅延が誘起されることや、エクジステロイドの中で脱皮促進活性をもつ 20-ヒドロキシエクジソン(20E)の分泌量の減少することを明らかにした。また、最近の研究では、化学物質によるアミの脱皮抑制・阻害の作用機序を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いてアミ成熟個体の塩基配列情報を解読し、オリゴ DNA プローブを搭載したマイクロアレイを開発した。開発した DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、NP 曝露によって脱皮数の減少が確認されたアミでは、表皮を作る組織で見られ、クチクラ層の形成に関与し、昆虫等の発生や脱皮に重要な役割を果たすと考えられている **cuticle protein** 遺伝子発現の曝露濃度依存的な減少が確認され、**cuticle protein** が脱皮阻害のバイオマーカー候補遺伝子であることを明らかにした。一方、先行研究では、**cuticle protein** はオオミジンコに銅および亜鉛を曝露することや、ヨコエビに銅、亜鉛およびニッケルを曝露することによっても発現量が減少することが報告されている。これらのことから、**cuticle protein** は、NP などの内分泌攪乱物質に加え、金属類においても脱皮阻害に関わるバイオマーカー候補遺伝子になりうる可能性がある。そこで本研究では、アミをモデル生物として **cuticle protein** 遺伝子の測定系を確立し、化学物質に対する遺伝子発現応答を明らかにすることを目的とする。

【研究内容】

これまでに我々の研究グループで設計したアミ DNA マイクロアレイ用の DNA プローブ情報や次世代シーケンス解析から得られた配列情報をもとに、**cuticle protein** 遺伝子特異的プライマーの設計や測定条件の最適化などを行い、定量的リアルタイム PCR 測定系を確立した。

【研究成果】

1. cuticle protein 遺伝子特異的プライマーの設計

これまでに我々の研究グループで実施した次世代シーケンス解析から得られた塩基配列情報について、Blast 検索等によって下記 2 種類のバナメイエビ cuticle protein 7 および 19 様遺伝子と高い相同性を示した 2 種のアミ cuticle protein 遺伝子配列を選択した(表 1、アミ cuticle protein 遺伝子配列は非公開)。

表 1. アミ cuticle protein 遺伝子と高い相同性を示した遺伝子配列

| Accession number | Gene name |
|------------------|-----------------------------------------------------|
| XP_027227164.1 | cuticle protein 7-like [<i>Penaeus vannamei</i>] |
| XP_027237316.1 | cuticle protein 19-like [<i>Penaeus vannamei</i>] |

そこで、2 種のアミ cuticle protein 遺伝子をそれぞれ abCPR7 および abCPR19 とし、これらの配列について PCR 増幅産物のサイズが 100-150 bp となるように、市販のソフトウェアを用いて特異的プライマーを各 2 種ずつ設計した(表 2、配列は非公開)。

表 2. 設計したプライマー

| Gene name | Primer pair | Product size (bp) |
|--------------------------------------|-------------|-------------------|
| cuticle protein 7-like (abCPR7) | F6-R6 | 106 |
| | F7-R7 | 131 |
| cuticle protein 19-like (abCPR19) | F8-R8 | 119 |
| | F9-R9 | 115 |

2. PCR 用サンプルの調製

有明工業高等専門学校で継代飼育しているアミの成熟個体(5 個体)から雌雄それぞれ RNeasy Mini Kit(QIAGEN 社)を用いて total RNA を抽出した。その後、total RNA (1 µg)から ReverTra Ace qPCR RT Kit(東洋紡社)を用いて逆転写をおこない、遺伝子発現解析用サンプル(cDNA)を合成した。

3. 定量的リアルタイム PCR 測定系の確立

合成した cDNA を用いて定量的リアルタイム PCR(qPCR)測定系の確立をおこなった。qPCR は、Fast SYBR Green Master Mix および StepOne リアルタイム PCR システム(サーモフィッシャーサイエンティ

フィック社)用いて、95°C20秒で初期変性後、95°C3秒、60°C30秒のサイクルを40サイクル実施した。

まず、2種のCPR遺伝子に対するプライマー(表2)による増幅について検討をおこなった。なお、プライマー最終濃度はいずれも300nMとし、前述の条件でqPCRを実施した。その結果、abCPR7では、F6-R6の平均Ct値が27.70、F7-R7の平均Ct値が24.51であった。また、abCPR19では、F8-R8の平均Ct値が19.49、F9-R9の平均Ct値が20.71であった。以上のことよりabCPR7ではF7-R7、abCPR19ではF8-R8のプライマーを以下の実験に使用することとした。

次いで最適なプライマー濃度を検討した。各プライマーのフォワード(F)、リバース(R)に関して50、300及び900nMの各9パターンの組み合わせでqPCRを実施し、その増幅を検討した。なお、negative controlも9パターン実施した。その結果、F7-R7では、F/R:900/300nM、F8-R8では、F/R:300/300nMの濃度での組み合わせが最適であった。

最後に上記で設定したプライマー濃度条件で、異なる濃度のテンプレートcDNAを用いてqPCRによる検量線の作成をおこなった。その結果、テンプレートcDNA濃度依存的な増幅が確認でき、良好な検量線を得ることができた(図1)。また、各CPR遺伝子の増幅効率を算出したところ、abCPR7:88.8%、abCPR19:93.4%と良好であった。

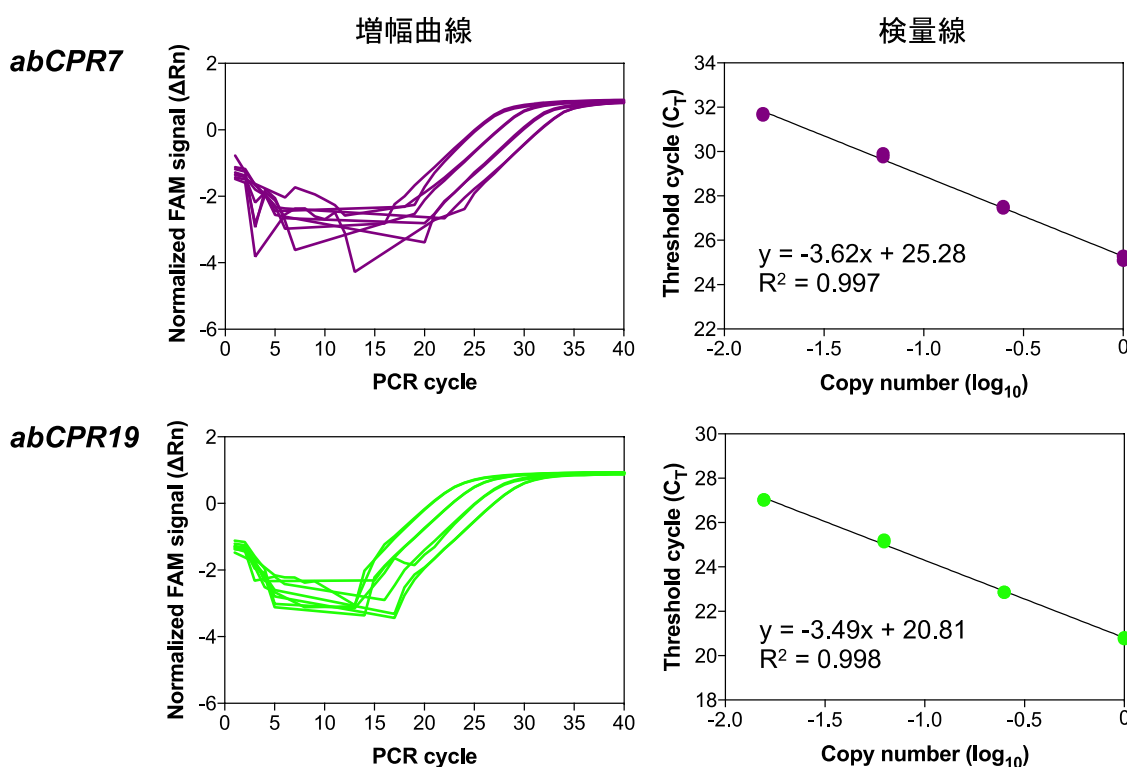


図1. アミ cuticle protein 遺伝子の増幅曲線および検量線

以上の結果から、本研究で設計したプライマーを用いて、2種のアミ cuticle protein 遺伝子の qPCR 測定系を確立できた。

4. アミ雌雄 CPR 遺伝子発現解析

本研究で確立した qPCR 測定系を用いて、アミ雌雄の CPR 遺伝子発現解析をおこなった。なお、内部標準遺伝子は actin とし、上記 CPR 遺伝子測定系の確立と同様の検討をおこない qPCR 測定系を確立した (data not shown)。その結果、CPR7 遺伝子は雌よりも雄の発現が 4.24 倍高く、一方 CPR19 遺伝子は雌雄でほとんど発現は変わらなかった(図 2)。これらのことから、本研究で初めてアミ CPR 遺伝子発現の定量に成功し、CPR7 遺伝子発現には雌雄差があることが明らかになった。

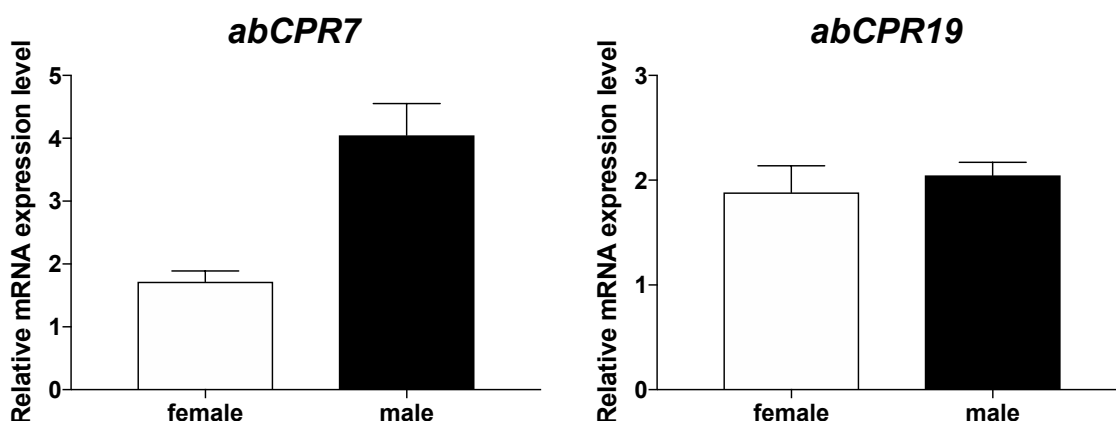


図 2. アミ雌雄における cuticle protein 遺伝子発現解析

【成果発表】

該当なし。下記【今後の問題点】を解決し、学術誌等を通じて研究成果を公表する予定である。

【今後の問題点】

最終的には cuticle protein 遺伝子の全長 cDNA クローニングやその構造解析を実施する。また、今回確立した qPCR 測定系を用いて、成長段階における cuticle protein 遺伝子発現解析や、これまで脱皮阻害が報告されている化学物質などを曝露したアミにおける cuticle protein 遺伝子発現解析を実施し、脱皮阻害に関わるバイオマーカー遺伝子としての cuticle protein の有用性を明らかにする。