

令和4年8月4日

各報道機関文教担当記者 殿

クルマエビの殻において カルシウム沈着（石灰化）のメカニズムを解明！

金沢大学環日本海域環境研究センターの鈴木信雄教授，理工研究域生命理工学系の松原創教授，神奈川大学理学部生物科学科の大平剛教授，新潟大学佐渡自然共生科学センターの豊田賢治特任助教らを中心とする共同研究グループは，クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) (図1) の殻のカルシウムが沈着（石灰化）するメカニズムを解明しました。

すなわち，**クルマエビの殻には，カルシウムと結合するペプチド（※1）が存在して殻の石灰化に関与しており，そのペプチドを作る遺伝子の発現を抑えると，殻が正常に形成されなくなることを証明しました。**

甲殻類の外骨格は石灰化した組織であり，層状構造をとっています。外界側から，上クチクラ，外クチクラ，内クチクラ，上皮細胞の順に構成されています（図2）。

その中で石灰化に関与しているのは，外クチクラと内クチクラであり，キチン（※2）とタンパク質との複合体を作っています。この複合体に，炭酸カルシウムが沈着・石灰化することで外骨格は硬くなります。

そこで，この複合体を作っているペプチドの構造を決めて，ペプチドを大腸菌で作らせました。大腸菌で作ったペプチドは，キチン及びカルシウムと結合し，クルマエビの上皮細胞（図2）で作られることも分かりました。

さらに RNAi（※3）という技術で，ペプチドを作る遺伝子の発現を抑制すると，クルマエビの殻が委縮して，カルシウムの沈着異常を引き起こすことを証明しました（図3）。

これらの知見は，外敵からの防御だけでなく，病気になりにくくなる硬い殻を作る強いクルマエビの開発に役立ちます。さらに，この遺伝子は脱皮を制御するので，エビの成長を促進する技術にもつながり，エビの増養殖現場への貢献が期待されます。

本研究成果は，2022年6月2日にオランダの国際学術誌『Aquaculture』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

海産のクルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) を含む甲殻類の外骨格は、層状構造をとっています。外界側から、上クチクラ、外クチクラ、内クチクラ、上皮細胞の順に構成されています (図 2)。一番外側の上クチクラは石灰化されておらず、脂質とタンパク質からなっており、外界との境界面を作る役割をしています。

上クチクラの内側に位置している外クチクラと内クチクラは、キチンとタンパク質とで複合体を形成しています。この複合体に炭酸カルシウムが沈着することで外骨格は硬化します。

一方、先行研究において、淡水産のアメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) のキチン及びカルシウムと結合するペプチドが報告されました。

しかし、海産のクルマエビの殻の研究例はなく、殻がどのように石灰化するのか不明でした。そこで本研究では、商業的に重要なクルマエビの殻の形成及び石灰化に關与するペプチドの構造を決めて、そのペプチドの機能を調べました。

【研究成果の概要】

クルマエビの RNA 配列解析のデータに基づいて、クルマエビの殻の形成に關与するペプチド配列の候補を見つけました。その後、クルマエビのペプチドの全配列は、PCR 法によって決定され、キチンと結合する配列が含まれており、殻の石灰化に關与する可能性が高いことが分かりました。

そこでペプチドを大腸菌で発現させて、高速液体クロマトグラフィーという装置を用いて精製しました。精製されたペプチドは、カルシウム及びキチンと結合することが分かりました。

次に、稚エビにビニールテープを貼り付け (図 1)、脱皮したエビと脱皮していないエビに分けて、さらに細かい脱皮周期を調べました。それぞれの脱皮周期の中で、このペプチドの遺伝子が、どの時期に発現しているのかを調べた結果、脱皮の直前に発現が上昇していることが判明しました。また、脱皮直前のエビのどの部位でペプチドが発現しているのかを調べたところ、上皮細胞で発現していることが明らかになりました。

さらに RNAi を用いてペプチドを作る遺伝子の発現を抑制すると、脱皮後に形成される殻の表面に収縮した不均一な構造が現れ (図 3)、カルシウムの沈着が阻害されることが判明しました。本研究は、海産甲殻類の殻の形成・石灰化のメカニズムを証明した初めての報告になります。

【今後の展開】

本研究により、クルマエビの石灰化に關与するペプチドは、脱皮する直前に発現が急上昇することが分かりました。そこで、この時期に、このペプチドの発現を上昇させる飼育条件を調べることにより、外敵に強くかつ病気に強いクルマエビの開発につながることを期待されます。さらにこの遺伝子は脱皮を制御するので、クルマエビの成長を促進する技術にも貢献できます。将来的に、この新しい技術をクルマエビの養殖現場に取り入れていきたいと考えています。

本研究は、2020年度 笹川科学研究助成（2020-4010）、科学研究費補助金（20K06718, 21K05725, 20H04565）、金沢大学の環日本海域環境研究センターの共同研究費（20007, 20020, 20029, 20030）及び高知大学海洋コア総合研究センターの共同研究費（20A009, 20B008）の支援を受けて実施されました。



図1 クルマエビの稚エビ

クルマエビの稚エビに白のビニールテープを殻に貼り付けて、脱皮したか否かを調べる実験をした。ビニールテープは、エビの脱皮の良い指標になる。

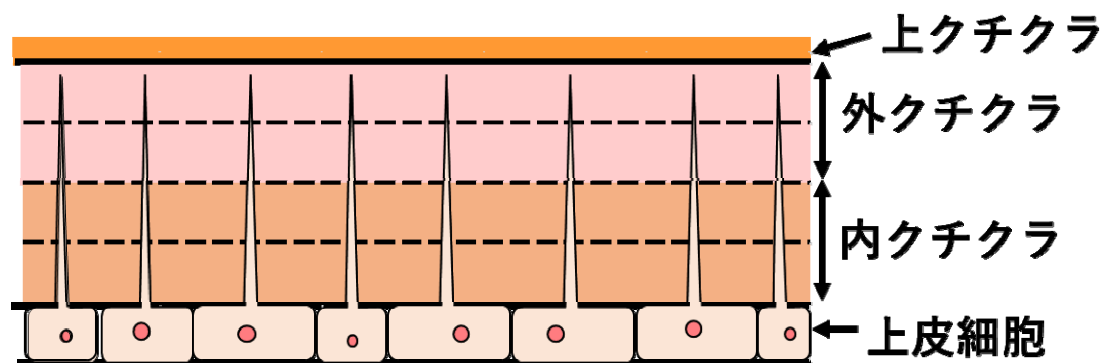
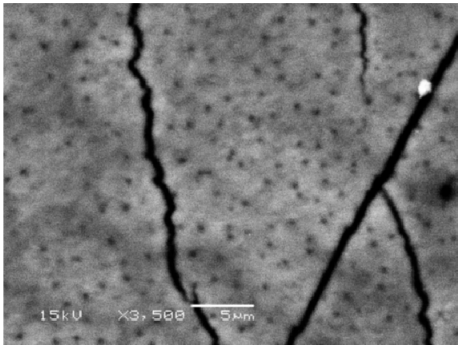


図2 クルマエビの殻の構造

石灰化に関与しているのは、外クチクラと内クチクラであり、キチンとタンパク質との複合体を作ってる。

対照群



RNAiで処理した実験群

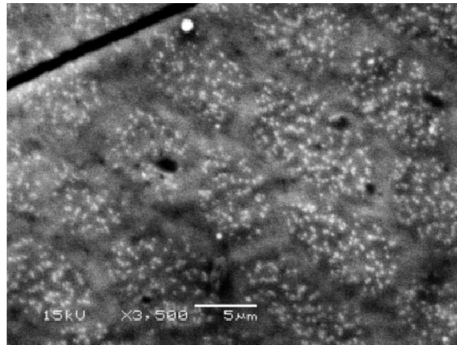


図3 殻の石灰化に関与するペプチドの RNAi

電子顕微鏡により RNAi の影響を観察した結果、ペプチドが作られなくなると殻の表面が縮んでデコボコになり、白い点（カルシウム）はまばらに沈着する。一方正常な殻の表面は、滑らかでカルシウムは均一に存在する。不均一な白点は存在しない。

【掲載論文】

雑誌名：Aquaculture

論文名：Functional analysis of a matrix peptide involved in calcification of the exoskeleton of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*

（クルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の外骨格の石灰化に関与する基質ペプチドの機能解析）

著者名：Aika Sekimoto, Tsuyoshi Ohira, Atsushi Shigematsu, Takuji Okumura, Miyuki Mekuchi, Kenji Toyota, Hiroyuki Mishima, Ryoya Kawamura, Kaito Hatano, Umi Kawago, Yoichiro Kitani, Toshio Sekiguchi, Thumronk Amornsakun, Jun Hirayama, Atsuhiko Hattori, Hajime Matsubara, and Nobuo Suzuki

（関本愛香，大平剛，重松惇志，奥村卓二，馬久地みゆき，豊田賢治，三島弘幸，川村龍矢，端野開都，河合海，木谷洋一郎，関口俊男，アモルナクンサムロンク，平山順，服部淳彦，松原創，鈴木信雄）

掲載日：2022年6月2日にオンライン版に掲載

DOI：10.1016/j.aquaculture.2022.738437

【用語解説】

※1 ペプチド

アミノ酸がペプチド結合により 100 個未満の短い鎖状につながった分子の総称。通常 100 個以上の場合をタンパク質という。本研究では、カルシウムとキチンと双方と結合するペプチドのことを示す。

※2 キチン

N-アセチルグルコサミンが直鎖状に結合したもの。多くの無脊椎動物の体表を覆うクチクラの主成分。節足動物や甲殻類の外骨格やカビ・キノコなど真菌類の細胞壁などを構成する。

※3 RNAi (RNA interference; RNA 干渉)

二本鎖 RNA と相補的な配列 (2 つの構造が互いに鍵と鍵穴の関係にあるような関係性を持つ配列) を持つ mRNA を特異的に分解する技術。本研究では、人工的に合成された二本鎖 RNA を導入し、目的の遺伝子 (クルマエビのペプチドをコードする遺伝子) 発現のみを抑制した。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学環日本海域環境研究センター教授

鈴木 信雄 (すずき のぶお)

TEL : 0768-74-1151

E-mail : nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp

■広報担当

金沢大学理工系事務部総務課総務係

米田 一宣 (よねだ かずのり)

TEL : 076-234-6826

E-mail : s-somu@adm.kanazawa-u.ac.jp