

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18749

研究課題名(和文) Comprehensive Omics analysis and functional characterization of the role of nervous system in the larval settlement of barnacle cyprids

研究課題名(英文) Comprehensive Omics analysis and functional characterization of the role of nervous system in the larval settlement of barnacle cyprids

研究代表者

黄 裕謙 (Wong, Yue Him)

秋田県立大学・生物資源科学部・特任助教

研究者番号：80769547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アカフジツボは発電所や船底に付着し大きな被害をもたらす海産無脊椎動物です。プランクトン幼生期と付着生活を送る成体期を持ち、プランクトン幼生期の最後はキプリス幼生と呼ばれ、付着に特化し、付着防除研究にとって最も重要な時期です。本研究では、キプリス幼生の行動や付着の制御機構を明らかにする目的で、キプリス幼生に発現する神経ペプチドを網羅的に調べました。その結果、キプリス幼生では、神経ペプチド前駆体をコードする11種の遺伝子の発現が明らかになりました。特にC末端にSIFamideを持つ神経ペプチドは発現量が高く分布が特徴的なことから、今後付着行動との関連を詳しく調べる必要があることが判明しました。

研究成果の概要(英文)：The transcripts of 11 classes of neuropeptides, including allatostatin, tachykinin, sulfakinin, RFamide, SIFamide, insulin-like peptide, bursicon, pigment dispersal hormone, eclosion hormone, glycoprotein hormone, and calcitonin, were recovered from the *Megabalanus rosa* transcriptome and in-silico mining method. Immunostaining of three neuropeptides, SIFamide, FGLamide (A-type allatostatin) and FMRFamide, reveal the expression of these NPs in the cyprid larval nervous system. Comparative analyses reveal the conserved amino acid sequences of SIFamide, FGLamide among crustaceans, but surprisingly mutated NP sequences of the closely related parasitic barnacle clade. SIFamide was found to be highly expressed in the cyprid stage of both *M.rosa* and the parasitic barnacle *Succulina yatsui*. These results serve as the basis for the functional behavioral studies of NPs, especially SIFamide, in the cypris larvae of *M.rosa* and other barnacle species.

研究分野：海洋分子細胞生物学

キーワード：フジツボ トランスクリプトーム 神経ペプチド キプリス幼生 付着防除

1. 研究開始当初の背景

海産無脊椎動物の幼生の神経系に関する研究は数多くあります。しかし、それらの大部分は市販の神経伝達物質や神経ペプチドの抗体を用いて行われたもので、その生物において存在する神経ペプチドを同定し、その分布を調べた研究はあまりありません。また、それらの真の機能を明らかにした例も多くありません。

There have been some studies reporting the nervous system of the larval form of marine invertebrates. These studies report the distribution of neurons in the larval bodies mainly using neurotransmitter antibodies or commercially available neuropeptide (NP) antibodies. But no studies have reports the distribution of species specific NPs in the nervous system of any marine invertebrate larvae. In addition, **there has been NO study reporting the function of these NPs in the behavioral of marine invertebrate larvae.**

2. 研究の目的

フジツボは発電所や船底に付着し、大きな被害をもたらす海産付着生物です。フジツボの生活環を見ると、浮遊生活を送るノープリウス幼生、キプリス幼生期と、固着生活を送る成体期にわけることができます。付着はキプリス幼生で起こるため、キプリス幼生の探索や付着の際にどのような神経ペプチドが関与するかは付着防除の研究にとって、とても重要です。しかし、キプリス幼生の神経ペプチドがどのような機能を付着の際に果たすかについて、ほとんど知見がありません。本研究の目的は、日本における付着防除にとって重要なアカフジツボを対象として、そのキプリス幼生期における神経ペプチドの分布と機能を明らかにすることです。

Barnacles are sessile marine crustaceans. They have free swimming larval stages and the sessile adult stage. The cyprid stage is the critical larval stage to the anti-fouling research field, because cyprids are designated to permanently attach to rock surface, a process known as larval settlement. It has been known that cyprid larval settlement is mediated by a combination of external physical and chemical stimulus, and internal neuronal signals. **This study targets to reveal the distribution of specific neurons and functions of specific NPs in the cypris larvae of the barnacle *Megabalanus rosa*, a major fouling species in Japan.**

3. 研究の方法

本研究では、アカフジツボトランスクリプトームを作製し、特にキプリス幼生で高発現す

る神経ペプチド前駆体をコードする遺伝子群を網羅的に探索しました。ついで、神経ペプチドの特異的な抗体を作製しました。アカフジツボキプリス幼生の切片を作製して、蛍光免疫染色法を用いて、神経ペプチドを持つ神経または内分泌細胞の分布を調べました。

This study employs a combination of dry-lab and wet-lab techniques. Firstly, the transcriptome of *M.rosa* cypris larvae was profiled. Using an *in-silico* approach, neuropeptide genes, including the homologous one and those putative open reading frames that exhibit the hallmark of neuropeptides (dibasic cleavage sites, N-terminal signal peptides, cleavage product of repetitive short peptides), were extracted. Specific antibodies targeting these neuropeptides were then produced. Distribution of the neurons expressing these NPs were then elucidated using the NP specific antibodies and acetylated-tubulin antibody (targeting all neurons) to immunostain the cyprid larvae.

4. 研究成果

(1) トランスクリプトームを用いて神経ペプチドを探索した結果、アカフジツボのキプリス幼生には、11種類の神経ペプチド前駆体タンパク質をコードする遺伝子群が見つかりました。その中には Allatostatin, tachykinin, sulfukinin, RFamide, SIFamide, および insulin-like peptide, bursicon, pigment dispersal hormone, eclosion hormone, glycoprotein hormone, calcitonin 様ペプチドホルモンが含まれました。また、3種の新規神経ペプチドをコードする可能性のある前駆体タンパク質も見いだすことができました。

The transcripts of 11 classes of neuropeptides, including Allatostatin, tachykinin, sulfukinin, RFamide, SIFamide, three novel neuropeptide genes, and 6 families of neurohormones, including insulin-like peptide, bursicon, pigment dispersal hormone, eclosion hormone, glycoprotein hormone, calcitonin were recovered from the transcriptome and *in-silico* mining method.

(2) 少なくとも現時点で、アカフジツボ SIFamide, FGLamide (A-type allatostatin)の特異抗体と市販の FMRamide の抗体を用いた研究により、アカフジツボのキプリス幼生内の産生細胞(神経)を同定することができました。

Immunostaining of three neuropeptides, namely, SIFamide, FGLamide (A-type allatostatin) and (FM)RFamide, reveal the expression of these NPs in the cyprid larval nervous system.

(3) 寄生性フジツボを含むさまざまなフジツボのトランスクリプトームを作製し、神経ペ

プチドの配列の比較生物学的な研究を行ったところ、特に SIFamide, FGLamide はよく保存されていることが明らかになりました。ただし、寄生性フジツボでは特徴的な変異もみいだすことができました。

Comparative analyses reveal the **conserved amino acid sequences of SIFamide, FGLamide among crustaceans, but surprisingly mutated NP sequences of the closely related parasitic barnacle clade.**

(4) SIFamide においては、アカフジツボでも寄生性フジツボのヤツフクロムシでも特に大量にキプリス幼生期に発現していることが明らかになりました。

SIFamide was found to be highly expressed in the cyprid stage of both *M.rosa* and the parasitic barnacle *Suculina yatsui*.

本研究の結果から、フジツボ、特にフジツボに特徴的なキプリス幼生における行動を理解する上で重要な、神経ペプチド群を明らかにすることができました。特に SIFamide はキプリス幼生期に発現量が高く、分布がユニークであることから、今後さらに詳しく研究する必要があることが明らかになりました。

These results serve as the basis for the functional behavioral studies of NPs, especially SIFamide, in the cypris larvae of *M.rosa* and other barnacle species.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Kobayashi M, Wong YH, Oguro-Okano M, Dreyer N, Høeg JT, Yoshida R, & Okano K. (2018). Identification, characterization, and larval biology of a rhizocephalan barnacle, *Sacculina yatsui* Boschma, 1936, from northwestern Japan (Cirripedia: Sacculinidae). *Journal of Crustacean Biology*, 38(3), 329-340.

岡野桂樹, Wong YH, 村口元, 原光二郎, 小黒-岡野美枝子 (2017) 「トランスクリプトームデータから新規の機能性分泌タンパク質群を探索する」秋田県立大学ウェブジャーナル B, vol. 4, 62-67.

遠藤 健斗, Wong YH, 野方 靖行, 小黒-岡野 美枝子, 岡野 桂樹 (2017) 「フジツボのキプリス幼生と幼生セメントの生物学：アカフジツボの最近の研究から」 *Journal of the Japan Institute of Marine Engineering*, 52(1), 19-24.

[学会発表] (計 3 件)

Wong YH, Nogata Y, Yoshimura E, Oguro-Okano M, Okano K. アカフジツボの幼稚体における殻形成過程の解析. Symposium of marine sessile organism 2018, Mar 26, 2018, Tokyo, Japan.

Wong YH, Ozaki N, Sun J, Zhang WP, Yoshimura E, Nogata Y, Oguro-Okano M, Lin HC, Chan BKK, Qian PY, Okano K. Comprehensive profiling of barnacle shell proteins by an integrated transcriptomic and proteomic approach. The 14th International Symposium on Biomineralization (BIOMIN XIV), Oct 9-13, 2017, Tsukuba, Japan

Wong YH, Ozaki N, Nogata Y, Oguro-Okano M, Sun J, Zhang WP, Lin HC, Chan BKK, Qian PY, Okano K. The importance of integrating "Omics" approaches and comparative analysis in the study of novel proteins in fouling organisms: a case study on *Megabalanus rosa* shell formation. Symposium of marine sessile organism 2017, Oct 22, 2017, Tokyo, Japan.

[図書] (計 2 件)

Okano K, Wong YH, Takahashi Y, Kikuchi A, Nogata Y, and Oguro-Okano M, Chapter 5 - Larval Cementation in the Barnacles, *Megabalanus rosa*, In *Barnacles: Recent Progress in Biology and Antifouling*, edited by Ryusuke Kado, Haruo Mimura and Noriyuki Endo. Nova Science Publishers, pp99-114. Inc. March, 2018. ISBN: 978-1-53613-444-5.

Wong YH, Ozaki N., Zhang W-P, Sun J., Yoshimura E., Oguro-Okano M., Nogata Y., Lin H-C., Chan KK B., Qian P-Y., Okano K.* (2018) "Identification of barnacle shell proteins by transcriptome and proteomic approaches", in *Biomineralization - From Molecular and Nano-structural Analyses to Environmental Science*, edited by K. Endo, T. Kogure and H. Nagasawa. Springer Nature Singapore Pte Ltd. Accepted. [Conference proceeding book chapter]

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

黄 裕謙 (Wong Yue Him)
秋田県立大学 生物資源科学部 特任助教
研究者番号：80769547

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()