

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06221

研究課題名(和文) 甲殻類の免疫反応と遷移金属元素の関係

研究課題名(英文) The contribution of transient metals on the immunological reaction in crustacean.

研究代表者

増田 太郎 (Masuda, Taro)

摂南大学・農学部・准教授

研究者番号：40395653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イセエビ (*Panulirus japonicus*) の体液より調製したヘモシアニン試料を用いて結晶化を行い、1.58 Å分解能での立体構造解析に成功した。甲殻類由来のヘモシアニンについては、サブユニット組成の複雑さからこれまで低分解能の解析にとどまっていたが、本研究により活性中心付近の詳細な立体構造と、類縁タンパク質であるフェノールオキシダーゼとの構造比較が可能となった。また、ヘモシアニン、フェノールオキシダーゼの活性中心に銅を誘導し、正しい活性中心の形成を可能とする因子を酵母 Two-hybrid systemを用いて探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲殻類のヘモシアニンとフェノールオキシダーゼは、ともにタイプ3銅タンパク質に分類される類縁タンパク質である。これらのタンパク質は、甲殻類にとって生理的に極めて重要な役割(酸素運搬、生体防御)を担っているだけでなく、黒変などポストハーベットの品質劣化反応にも深く関わっている。したがって、これらのタンパク質の機能について、構造生物学的な基盤から研究する意義は大きく、成果は農学・水産学分野の重要な知見となり得る。これらのタンパク質の活性中心には銅が含まれるが、分子内部に埋没した活性中心に銅をもたらす未知の因子が存在する可能性が考えられる。このようなメタロシャペロンを明らかにした研究例は稀有である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we crystallized hemocyanin which was purified from the hemolymph of Japanese spiny lobster, and obtained the X-ray diffraction data up to 1.58 Å. Although crystallization and structural analysis of crustacean hemocyanin have been done, high resolution data has not ever obtained due to the complexity of subunit composition of this protein. The high-resolution data enables detailed comparison of active site structure between hemocyanin and prophenoloxidase which we solved previously. Another attempt, we sought the factor which functions as a metallochaperone for the type 3 copper proteins such as hemocyanin and phenoloxidase using yeast two hybrid system. We obtained up to 100 positive colonies and are investigating the function of these proteins.

研究分野：水産化学

キーワード：生体防御 タイプ3銅タンパク質 ヘモシアニン フェノールオキシダーゼ 甲殻類

## 1. 研究開始当初の背景

エビ類は日本人にとって非常になじみ深い食材である。現在、本邦は世界のエビの総輸入量のうち、約三分の一を消費するエビ消費大国である。エビ類の安定的な供給には、今や養殖による生産が欠かせない。2012年には、養殖生産がエビ類の全生産量の過半を占めるようになった。このように、エビ類の養殖は近年更に重要度を高めているが、養殖現場における魚病の蔓延はしばしばエビ類養殖に甚大な被害を与える。

エビ、カニなど甲殻類(節足動物)は、脊椎動物に見られるような獲得免疫機構を持たず、その生体防御は「自然免疫」に依存している。節足動物における自然免疫の主体として、フェノールオキシダーゼ(PO)システムが挙げられる。POは活性中心に二核の銅原子を含む酸化還元酵素であり、メラニン形成反応の鍵酵素である。生成物のメラニンは病原菌の抱合、創傷治癒に機能すると考えられる。メラニン形成は、ポストハーベストにおける黒変反応として忌避されており、POはその原因酵素でもある。このPOは不活性なプロ体(proPO)として合成され、その活性化はプロテアーゼによるプロセッシングにて厳密に制御されている。申請者はクルマエビより、体液におけるPO活性の主体を担う新規型PO(PO $\beta$ )を見出し、その詳細な立体構造を明らかにした。

一方、甲殻類体液中には酸素運搬タンパク質であるヘモシアニン(Hc)が極端な高濃度で存在している。HcもPOと同様、二核銅中心を有するタイプ3銅タンパク質であり、その成熟には銅原子のタンパク質骨格への組み入れが必須である。近年、Hcについても抗菌活性があるとの報告がなされており、本来酸素運搬タンパク質であるHcも、甲殻類の自然免疫による生体防御に深く関与する分子であると考えられる。また、HcとPOの活性中心の構造は極めて類似していると考えられ、Hcが特定の条件でPO活性を持ち得るとの研究例がある。食用甲殻類におけるHcとPOの活性と生理的な機能を明らかにするためには、甲殻類Hcの詳細な立体構造解析が不可欠である。また、これらの知見により、ポストハーベストにおける黒変反応の主因となる因子を特定できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、甲殻類の生体防御反応とポストハーベストにおける黒変反応の分子機構を明らかにするため、甲殻類体液に含まれる2つのタイプ3銅タンパク質であるPOとHcに着目し、

- ・詳細な高次構造の比較による構造活性相関解析
- ・銅を含む活性中心の形成
- ・ポストハーベストにおける黒変反応の主因について

を明らかにするため研究を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 甲殻類ヘモシアニンのX線結晶構造解析

ヘモシアニン(Hc)は酸素運搬タンパク質として甲殻類体液中に大量に存在している。複数種の甲殻類体液よりヘモシアニンを精製し、比較検討した結果、本研究では、イセエビ(*Panulirus japonicus*)体液より調製したHcを結晶化に用いることとした。体液より硫酸アンモニウムによる塩析と陰イオン交換クロマトグラフィーによって調製したHcは二種類のサブユニットからなる多量体複合タンパク質であった。精製したHcの構成サブユニットのアミノ酸配列を明らかにするため、Hc試料をSDS-PAGEで分離したのち、エドマン法によるN-末端のアミノ酸配列決定と、トリプシン消化を行い、液体クロマトグラフ質量分析計による配列解析をおこなった。得られた部分配列をイセエビ肝臓mRNAから調製したcDNAライブラリと照合し、構成サブユニットのアミノ酸配列を得た。

精製したヘモシアニンを10mg/ml以上に濃縮し、市販の結晶化条件スクリーニングキットで結晶化条件の検索を行った。母液として0.1 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.5, 20% w/v Polyethyleneglycol 1000, 10 mM MgCl<sub>2</sub>、タンパク質濃度15 mg/mlを用いた蒸気拡散法で最適な結晶を得た。

回折データの収集はSPRING-8 BL38B1にて行った。凍結保護剤としてエチレングリコール、グリセロールなどを用いた条件では、2.4 Å分解能程度であったが、5%ポリビニルアルコール(PVA4500)と10%エチレングリコールを用いたHAG(humid air and glue-coating)法により到達分解能が大幅に向上し、構造の精密化に1.58 Åまでのデータを用いた。

### 3-2. 酵母Two-hybrid systemによるタイプ3銅タンパク質の活性中心形成因子の探索

申請者はこれまで、クルマエビ体液から体液型のフェノールオキシダーゼ(proPO $\beta$ )を見出した。このproPO $\beta$ とヘモシアニンの遺伝子はともに肝臓で発現するため、クルマエビ肝臓のcDNAライブラリを作製しプレベクターにクローニング、ヘモシアニンとproPO $\beta$  cDNAをベクトルにクローニングし、相互作用解析を行った。Two-hybrid systemは、Matchmaker

Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech)を用いた。得られた陽性クローンのシーケンスを決定し、相互作用候補タンパク質のリストを作成した。

### 3-3. 甲殻類体液における黒変反応の主因に関する検討

申請者が見出した体液型フェノールオキシダーゼは分子量約 75 kDa の六量体構造をとることから、分子量のみからタンパク質としてヘモシアニンと分離するのは困難である。ここでは、クルマエビ体液を実験対象とし、両者を分離するため、従来用いられてきた超遠心分離とゲル濾過クロマトグラフィーのほか、硫酸アンモニウムによる塩析、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる分離を試みた。分離後の Hc と proPOβ について、L-DOPA を基質としたフェノールオキシダーゼ (PO) 活性の評価を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. イセエビヘモシアニンの立体構造

イセエビ Hc は溶液中で安定な六量体を形成しており、六量体のアッセムブリについては、既報の甲殻類 Hc と同様であった。これは、申請者が明らかにしたクルマエビ由来体液型 proPOβ のアッセムブリ様式とは明確に異なっていた (図 1)。活性中心の詳細な構造についてイセエビヘモシアニンとフェノールオキシダーゼを比較すると、これも両者の間で非常に類似していた (図 2)。唯一の違いは、活性中心の周辺に位置するアミノ酸残基で、ヘモシアニンではフェニルアラニン、フェノールオキシダーゼではバリンとなっている (図 2c の点線内)<sup>(1)</sup>。節足動物のタイプ 3 銅タンパク質の一次構造を比較すると、この部分は甲殻類ヘモシアニンではフェニルアラニン、鋏角類ヘモシアニンと甲殻類フェノールオキシダーゼでは、他のアミノ酸に置換されている。

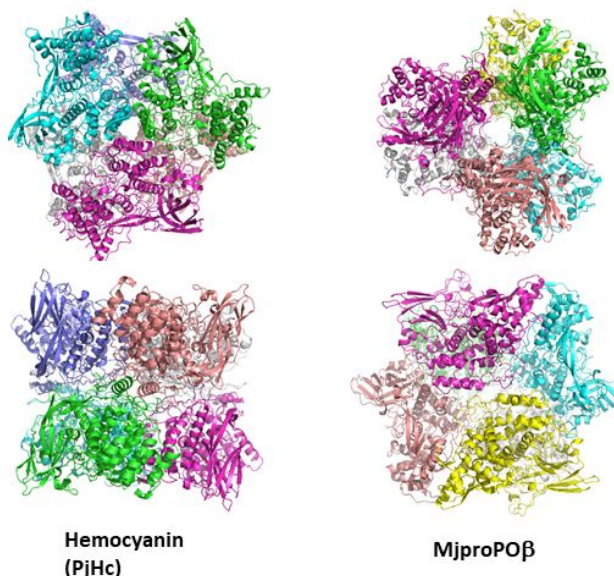


図1 イセエビヘモシアニン(PDB ID: 6L8S) (左) とクルマエビ体液型フェノールオキシダーゼ(3wky) (右) の多量体構造。各サブユニットを色分けして表示。上段は多量体の3回対称軸、下段は2回対称軸からの視点。

### 4-2. Yeast two-hybrid system によるタイプ 3 銅タンパク質との相互作用タンパク質の探索

ヘモシアニンとの相互作用タンパク質候補として--、フェノールオキシダーゼとの相互作用タンパク質として-のクローンが得られた。これらのうち、24 コロニーについて、プラスミドのレスキューと大腸菌へのクローニングと DNA シーケンスを行った。シーケンス結果から、各種プロテアーゼなどが得られ、現在候補遺伝子の発現様式、成熟タンパク質の機能について検討している。

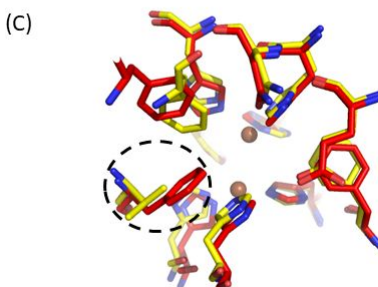
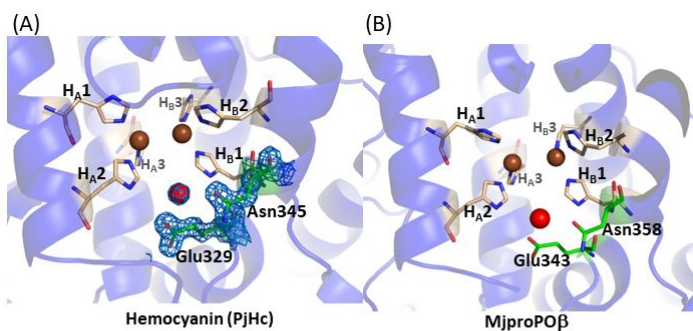


図2 活性中心の詳細な立体構造 (A)イセエビヘモシアニン (6L8S), (B)クルマエビ体液型フェノールオキシダーゼ P0β (3wky) (C)両者の重ね合わせ (赤: イセエビヘモシアニン、黄: クルマエビP0β)

### 4-3. 甲殻類体液のフェノールオキシダーゼ活性本体について

従来一般的に用いられてきたヘモシアニンの精製方法は、超遠心分離による沈殿と再溶解、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分離であった。この従来法はヘモシアニンの多量体構造をもとにした分離方法である。近年見出された体液型フェノールオキシダーゼ (POβ) もヘモシアニンと同様六量体を形成することから、従来法による両者の分離は困難で、従来法

での精製ヘモシアニン画分に P0β の P0 活性が混入する可能性がある。

従来法で精製した Hc 試料を P0β に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットングで解析したところ、この Hc 試料に P0β が混入していた。

より純度の高い Hc 試料を得るため、新たに精製法の検討を行った。体液抽出後に硫酸アンモニウムによる塩析とイオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーによる分離を行うことで、ヘモシアニンから P0 活性が認められなくなり、クルマエビ体液のヘモシアニンとフェノールオキシダーゼを明確に分離することができたと考えられる。ここで得られた精製ヘモシアニン(フェノールオキシダーゼを含まない試料)では、フェノールオキシダーゼ活性が確認されなかった(図 3A, Butyl) (2)。したがって、従来のヘモシアニン精製法である

超遠心分離とゲルろ過クロマトグラフィーのみでは、クルマエビ体液のヘモシアニンと体液型フェノールオキシダーゼを分離することができず、ヘモシアニン画分に認められてきた P0 活性は、ヘモシアニン試料への体液型フェノールオキシダーゼの混在が原因であると考えられる。クルマエビ体液のフェノールオキシダーゼ活性は、ヘモシアニンではなく体液型フェノールオキシダーゼによるものであると結論した。

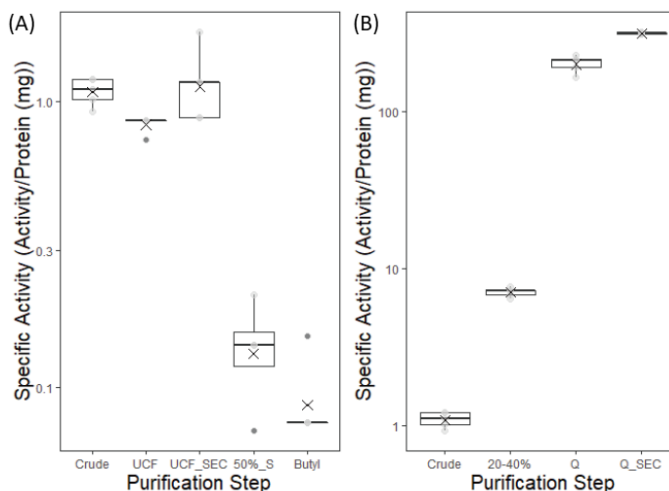


図3 ヘモシアニン(A)と体液型フェノールオキシダーゼ(B)の精製過程におけるフェノールオキシダーゼ活性の推移

(A)クルマエビヘモシアニンの精製。Crude: 粗体液、UCF:超遠心分離による精製、UCF\_SEC:超遠心後のゲルろ過クロマトグラフィー、50%\_S: 50%飽和硫酸アンモニウム塩析の上清、Butyl: 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー

(B)クルマエビ体液型フェノールオキシダーゼ(P0β)の精製。Crude: 粗体液、20-40%:硫酸アンモニウム塩析の20-40%沈殿画分、Q: 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Q\_SEC: ゲルろ過クロマトグラフィー

#### 参考資料

1) Taro Masuda (2021) Update on the source of phenoloxidase activity in the hemolymph of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Sci.* 87, pages861–869 (2021) doi: 10.1007/s12562-021-01558-x

2) Taro Masuda, Seiki Baba, Koichi Matsuo, Shinji Ito, and Bunzo Mikami (2020) The high-resolution crystal structure of lobster hemocyanin shows its enzymatic capability as a phenoloxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 688 108370, DOI 10.1016/j.abb.2020.108370

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taro Masuda, Yoshiko Shimono, Daisuke Kishi and Itsuro Koizumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Systematic headwater sampling of white-spotted charr reveals stream capture events across dynamic topography.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biogeography	6. 最初と最後の頁 453-627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jbi.14553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taro Masuda	4. 巻 87
2. 論文標題 Update on the source of phenoloxidase activity in the hemolymph of kuruma prawn <i>Marsupenaeus japonicus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 861-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-021-01558-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yasuyuki Matoba, Kosuke Oda, Yoshimi Muraki, Taro Masuda	4. 巻 183
2. 論文標題 The basicity of an active-site water molecule discriminates between tyrosinase and catechol oxidase activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 1861-1870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taro Masuda, Seiki Baba, Koichi Matsuo, Shinji Ito, and Bunzo Mikami	4. 巻 688
2. 論文標題 The high-resolution crystal structure of lobster hemocyanin shows its enzymatic capability as a phenoloxidase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野有紀, 川本善之, 増田太郎
2. 発表標題 Caco-2 細胞における大豆由来フェリチンによる抗酸化酵素遺伝子の発現応答
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田太郎, 下野嘉子, 岸大弼, 小泉逸郎
2. 発表標題 河川性魚類の分布拡大・移動分散様式：イワナを例とした河川争奪イベントの検証
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田太郎・河内達暉、豊原治彦
2. 発表標題 甲殻類黒変現象に寄与するタイプ3銅タンパク質群
3. 学会等名 日本水産学会2020年度春季大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 上野有紀、川本善之、増田太郎
2. 発表標題 大豆フェリチンによるFOXO1を介したSOD2遺伝子発現機構
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中井心大朗, 小祝敬一郎, 廣野育生, 伊藤慎二, 芳本玲, 増田太郎
2. 発表標題 食用甲殻類体液における黒変反応の鍵酵素の探索
3. 学会等名 日本水産学会令和6年度春季大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和三年度日本水産学会論文賞受賞論文 <a href="https://jsfs.jp/act/paper/">https://jsfs.jp/act/paper/</a>
---

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------