

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580302

研究課題名(和文) 組換えタンパク質を用いたカロテナロプロテインの色彩多様性に関する研究

研究課題名(英文) The study for the color variation of crustacean by recombinant protein expression systems of carotenoprotein

研究代表者

足立 亨介 (ADACHI, KOHSUKE)

高知大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00399114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲殻類は見た目に緑青食から赤橙色まで様々な色を呈するが、これは外骨格中に含まれる色素タンパクであるクラスタシアニン(CRCN)によるものである。CRCNはアポタンパク質とアスタキサンチン(Asx)が結合した複合体としての色を本来呈するが、加熱などで変性するとタンパク質の変性によりAsxが放出され、赤色を呈する。エビ・カニがゆでると赤くなるのはこのためである。本研究では組換え発現系によってクルマエビCRCNアポタンパク質を調製し、Asxと再結合することによりその色彩多様性の解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Crustacean shows various color which is due to the pigment protein called crustacyanin (CRCN) in the exoskeleton. CRCN represents its native color as the complex of the apoprotein and astaxanthin (Asx) but turn red by releasing Asx upon denaturation (This is the reason the cooked prawn/crab shows red color.). The aim of this study is to establish the recombinant protein expression system of CRCN of kuruma prawn to characterize its color variation.

研究分野：水圏生物工学

キーワード：甲殻類 クルマエビ 色彩 クラスタシアニン アスタキサンチン

## 1. 研究開始当初の背景

甲殻類は見た目に緑青色から赤橙色まで様々な色を呈するが、これは外骨格中に含まれるクラスタシアニン (crustacyanin: CRCN) と呼ばれる色素タンパク質によるものである。CRCN はタンパク質とカロテノイドが非共有結合で会合した複合体としての色を持つが、加熱するとタンパク質の変性により放出されたカロテノイド本来の色が呈される。この変色は一般に Bathochromic shift (深色彩移動: BS) と呼ばれている。例えば、見た目が薄い茶色のバナメイエビと黒色のブラックタイガーに熱を加えると両方とも赤色を呈するのは CRCN のアポタンパク質からカロテノイドが放出され、それ本来の色を呈するからであるからであるのは周知のことである。

カロテノイドは自然界に 700 種以上の種類が存在すると考えられているが、我々はこれまで研究対象とされてきた CRCN に結合するカロテノイドがアスタキサンチン (Asx) のみであることに着目している (それゆえ甲殻類はゆでると全て赤くなる)。一方で CP の色彩を示す甲殻類の外骨格の色彩は非常に多様である。この事実は CRCN が Asx の色を基にした上でそのアポタンパク質の構造に依存して多様な色彩を呈していることを示している。

## 2. 研究の目的

しかしながら我々が知る限り、カロテノイド側を Asx に固定し、このアポタンパク質の構造とその色彩の多様性を関連付けた報告、およびまたそのアポタンパク質の配列と BS を関連させた報告はない。

本研究ではこの着眼点から、水産業上価値が高いクルマエビの外骨格を用いてまずはその CRCN の生化学的な性質を解析した。次にその cDNA 配列を入手し、その色彩多様性との関連性を考察した。最後にアポタンパク質を大腸菌を用いた組換えタンパク質とし

て作出し、Asx と再結合する条件を作り出し、その変異体を作成することによって本宅パク質が多様な色彩を示す機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 材料

徳島県産の養殖クルマエビを用いた。

### 方法

(1) CRCN の部分精製と性質の解明: クルマエビの殻を 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中でホモジナイズし、遠心分離後の上清を 20% -55% にて硫酸分画を行った。得られた沈殿を 50mM リン酸 (pH7.0) に溶解し、ゲルろ過、陰イオン交換、およびヒドロキシアパタイトの各種クロマトグラフィーにより分画し、青色 (吸収極大 635nm) を確認できたものを CRCN 画分として用いた。

(2) CRCN の構造解析: (a) 尾扇より抽出した全 RNA を用い定法にて、RT-PCR および 5' / 3' RACE を行い 2 種類のサブユニット CRCN-A、および CRCN-C の配列を得た。(b) Roche GS junior および Illumina Miseq によって尾扇全 RNA、およびその RT-PCR 産物からデータを入手した。

(3) CRCN の組換えタンパク質発現系の構築: (2) によって得られたサブユニット配列を pCold、および pet19 ベクターに挿入し、Origami、BL21、BL21 (DE3)、および Rosetta-gami2 (DE3) を宿主に用い発現を行った。これとは別に pET Duet-1 を用いて A/C を同時発現できる組換え系も構築し、上記の宿主で発現を試みた。

## 4. 研究成果

(1) CRCN の部分精製と性質の解明: クルマエビ外骨格 88g より上記の手法で 485nm に吸収極大を持つ 64mg のタンパク質を含む画分を入手した。本画分を用いた SDS-PAGE 解析においては CRCN の分子量として知られる 20k の位置にバンドが確認された他、73k、および 83k にもバンドが見られた。本画分は 60

以上の温度帯で、吸収極大が485nmから640nmへとシフトする深色移動することが確認された。pH4以下およびpH10以上でも同様の深色移動することが明らかになった。

(2) CRCNの構造解析：5' / 3' RACEによってCRCN-A、Cの完全長cDNAの入手を試みた。結果、CRCN AおよびCのcDNA全長は各々719bpおよび665bp、ORFは各々570bpおよび591bpであった。ORFから類推されるアミノ酸残基数はCRCN Aが190aa、Cが197aaと推察された。しかしながらRACEで断片をつなぎ合わせる際に点変異が見つかる場合があったことから、両サブユニットには多数のパラログ遺伝子が存在する可能性が推察された。そこで両サブユニット配列の開始コドン、終始コドン周辺で設計したプライマーを用いてPCRを行い得られたORFの配列を解析したところ、数10のパラログ遺伝子の候補配列が入手された。NGS解析でも同傾向の結果が得られているがPCRを用いた解析では1塩基のエラーでも増幅がかかってしまうため、本研究で得られた結果によってパラログ遺伝子の大きな多様性に結びつけるのは拙速の感がある。本データは今後慎重に扱う必要がある。

(3) CRCNの組換えタンパク質発現系の構築：様々なベクターではタンパク質発現系の構築を試み、Hisタグを用いた精製後のSDS-PAGE解析によって目的の位置(約20kDa)にバンドは確認されている。しかしながら現段階では0.5mg(精製タンパク質)/L(培養液)程度の量しか確保できておらず、その後の解析に十分な量の試料を得られているとはいえない。また現段階まででは外骨格から精製したCRCNと同じ吸収極大を持つ再結合条件の確立にはいたっていない。

まとめ：本研究によってクルマエビCRCNの簡単な性質、配列などは明らかになった。そのサブユニットは複数にわたる可能性があり、今後精査を要する。組換えタンパク質の発現系については量的に十分な量が確保で

きなかったが、一旦その系が確立できてしまえば、今後パラログ遺伝子の多様性と絡めた研究の進展も期待できる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計4件)

・クルマエビ(*Marsipenaeus japonicus*)カロテノプロテインの部分精製と深色移動条件の検討 中塚和樹・足立亨介・森岡克司  
平成24年度中国・四国支部例会 平成24年12月1日 於 福山大学

・クルマエビクラスタシアニン遺伝子の組み換えタンパク質発現系の構築 中塚和樹・足立亨介・森岡克司

平成25年度日本水産学会春季大会 平成25年3月26日-30日 於 東京海洋大学

・クルマエビクラスタシアニンのパラログ遺伝子の多様性に関する研究 志水謙太・足立亨介・森岡克司

平成26年度中国・四国支部例会 平成26年11月29日 於 高知大学

・クルマエビクラスタシアニンAサブユニットのパラログ遺伝子の多様性に関する研究 川龍祥子・足立亨介・森岡克司

平成27年度中国・四国支部例会 平成27年10月24日 於 香川大学

〔図書〕(計0件)

〔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 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

足立 亨介 ( KOHSUKE, Adachi )  
高知大学・教育研究部自然科学系・准教授  
研究者番号：00399114

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：