

学位論文題名

Immunochemical and Biochemical Studies on Precursors of  
Vitelline Envelope Proteins in Serum of Sakhalin Taimen(*Hucho perryi*)

(イトウ血清中の卵膜蛋白前駆物質に関する免疫生化学的研究)

学位論文内容の要旨

硬骨魚類の卵は、胚体を外部環境から保護する役目を持った卵膜 (vitelline envelope, VE) に包まれている。これまで卵膜を構成する蛋白は卵巣内で産生されると考えられていた。最近、メダカを用いた一連の研究により、本種の卵膜蛋白はエストラジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) の作用により肝臓で合成された後、血流を介して卵巣に運ばれることが明らかとなり、この血中卵膜蛋白前駆物質をコリオゲニンと呼ぶことが提唱された (Yamagami, 1996)。サケ科魚類においても、卵膜蛋白が卵巣外由来であることが示唆されているが、この蛋白に関しては未解明な点が多い。本研究は、肝臓-血液-卵巣を経路とするサケ科魚類の卵膜形成機構を明らかにすることを目的とし、免疫生化学的手法を用いてイトウ (*Hucho perryi*) の卵膜蛋白前駆物質の検索と精製を行い、さらにE<sub>2</sub>処理および成熟に伴う血清中の動態を調べた。

供試魚は、北大水産学部附属七飯養魚実習施設で飼育中のイトウを用いた。孵化直後に得た卵膜を抗原として家兎に免疫し、抗卵膜血清 (a-VE) を作製した。a-VEを用いて卵膜抽出液、雌雄成熟魚の血清と肝抽出液およびE<sub>2</sub>処理魚の血清と肝抽出液をオクタロニー法により解析したところ、雄成熟魚を除いて免疫沈降反応が観察された。また、免疫電気泳動法により雌血清中にはa-VEと反応する卵膜関連蛋白 (vitelline envelope-related protein, VERP) が少なくとも2成分存在することが明らかとなった。これらの結果から、イトウにおいても卵膜

蛋白が肝臓で合成され、血中に分泌されることが示唆された。

SDS-PAGEでの分子量から2つのVERPをそれぞれ*h*VERPおよび*l*VERP (high and low molecular weight VERP) と名付け、これら2成分の精製を試みた。卵黄形成期の雌魚血清を50%飽和硫酸により塩析し、沈殿画分を陰イオン交換クロマトグラフィー (DE52) に供した。*h*VERPを含む素通り画分を、吸着クロマトグラフィー (ハイドロキシルアパタイト) に添加し、0.04 M リン酸カリウム (KP) 溶出画分を得た。さらに陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q) で分画し、0.05 M NaCl溶出画分をSuperdex 75カラムを用いたゲル濾過に供した。分子量83 kDaの主ピークを得、精製*h*VERPとした。一方、陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて0.05 M NaClで溶出された*l*VERP画分を吸着クロマトグラフィーで分画し、0.16 M KP溶出画分を得た。この画分をゲル濾過に供し、分子量56 kDaのピークを再度ゲル濾過をすることにより*l*VERPを精製した。精製蛋白を非還元下でSDS-PAGEに供した結果、*h*VERPでは48 kDa、*l*VERPでは42 kDaと35 kDa (フラグメント) のバンドのみが認められた。精製*h*VERPはゲル濾過では分子量約83 kDaであり、SDS-PAGEにおいては非還元下で48 kDa、還元下で54 kDaであった。一方、精製*l*VERPはゲル濾過で約56 kDa、SDS-PAGEでは非還元下42 kDa、還元下46 kDaであった。これらの結果から、*h*VERPは2量体、*l*VERPは単量体でそれぞれ血中に存在する可能性が示唆された。また、アミノ酸組成は*h*VERPではグルタミン酸 (13.76 %) とプロリン (15.86 %) の含有率が高く、*l*VERPではグルタミン酸 (10.77 %) とアスパラギン酸 (10.53 %) が高かった。これらの組成は、メダカのコリオゲニンHおよびコリオゲニンLとそれぞれ類似しており、卵膜という構造蛋白の特徴を反映していると考えられた。

次に、精製品を抗原として家兎に免疫し、特異抗体を作製した。*h*VERPおよび*l*VERPに対する各特異抗体は、ウエスタンブロットにおいて雌血清および卵膜抽出液中の48 kDaおよび42 kDaのバンドをそれぞれ特異的に認めた。また、免疫組織化学的観察においては、両抗体は卵黄球期の卵膜を特異的に認める一方、*h*VERP抗体は周辺仁期の卵母細胞の細胞質を、*l*VERP抗体は周辺仁期の卵

の小顆粒をそれぞれ特異的に染色した。これらの結果から、イトウのVERPは一旦卵母細胞に取り込まれ、何らかの分子変化を受けた後に卵母細胞表面に卵膜として沈着する可能性があると考えられた。他方、作製した各特異抗体はアメマス、ブラウトラウトおよびサクラマスの成熟雌血清と免疫交叉性を示し、他のサケ科魚類におけるVERPの検索に有用であることが明らかとなった。

次に、Single radial immunodiffusion (SRID) およびEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による*h*VERPおよび*I*VERPの測定系を確立した。ELISAの測定限界は*h*VERPでは15.8 ng/ml、*I*VERPでは47.4 ng/mlであった。これらを用いてE<sub>2</sub>処理および成熟期の血中量を測定した。E<sub>2</sub>処理したイトウ未熟魚の血清*h*VERPおよび*I*VERPを定量した結果、E<sub>2</sub>の単一処理(2 mg/kg体重)では24 hr後に*h*VERP(0.3 μg/ml) および*I*VERP(1.6 μg/ml) が検出された。一方、E<sub>2</sub>の投与量の違い(1-1,000 μg/kg体重)により、各VERPの検出に差違が認められた。一般にイトウは6歳の春に初回産卵を行う。3年魚から6年魚までの雌血清中のVERP量を測定した結果、*h*VERPと*I*VERPは共に3年魚の9月において検出され、卵膜形成がこの時期にすでに開始していることが示唆された。5年魚においては、産卵前年の9月から血中量は増加して1月に最大値を示したが(*h*VERP 179 ± 25.1 μg/ml, *I*VERP 291 ± 52.8 μg/ml)、その後産卵期の5月まで減少した。これらの変化は、血中レベルに差はあるもののピテロゲニンと概ね一致していた。

以上、本研究ではイトウの卵膜蛋白が卵巣外由来であることを示し、サケ科魚類では初めて2成分の卵膜蛋白前駆物質、*h*VERPおよび*I*VERPを精製し、コリオゲニンと同定した。さらに各成分の測定系を確立し、E<sub>2</sub>処理および成熟に伴う血中量の動態を明らかにした。一方、*h*VERPと*I*VERPの合成調節、取り込みおよび卵膜構築過程の詳細は今後の課題として残された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 健 二  
副 査 教 授 原 彰 彦  
副 査 教 授 小 城 春 雄  
副 査 教 授 山 内 皓 平

## 学位論文題名

### Immunochemical and Biochemical Studies on Precursors of Vitelline Envelope Proteins in Serum of Sakhalin Taimen(*Hucho perryi*)

(イトウ血清中の卵膜蛋白前駆物質に関する免疫生化学的研究)

イトウ (*Hucho perryi*) はサケ科イトウ属に属し、北海道をはじめ沿海州、サハリン、南千島などに分布する。近年、その個体群は河川環境の悪化および乱獲のため減少しており、系統群の保護ならびに増養殖の必要性が叫ばれている。増養殖を行う上で健全な卵を得ることは重要であるが、それには親魚の卵形成過程を理解する必要がある。

一般に硬骨魚類の卵は胚体を外部環境から保護する役目を持った卵膜 (vitelline envelope, VE) に包まれている。これまで卵膜を構成する蛋白は卵巢内で産生されると考えられていた。最近、メダカを用いた一連の研究により、本種の卵膜蛋白はエストラジオール-17 $\beta$  (E2) の作用により肝臓で合成された後、血流を介して卵巢に運ばれることが明らかとなり、この血中卵膜蛋白前駆物質をコリオゲニンと呼ぶことが提唱された (Yamagami, 1996)。サケ科魚類においても、卵膜蛋白が卵巢外由来であることが示唆されているが、この蛋白に関しては未解明な点が多い。

本研究は、肝臓-血液-卵巢を経路とするサケ科魚類の卵膜形成機構を明らかにすることを目的とし、免疫生化学的手法を用いてイトウの卵膜蛋白前駆物質の検索と精製を行い、さらにE2処理および成熟に伴う血清中の動態を調べた。

孵化直後に得た卵膜を抗原として家兎に免疫し、抗卵膜血清 (a-VE) を作製した。a-VEを用いた免疫電気泳動法の結果から雌血清中にはa-VEと反応する卵膜関連蛋白 (vitelline envelope-related protein, VERP) が少なくとも2成分存在することが明らかとなった。

SDS-PAGEでの分子量から2つのVERPをそれぞれhVERPおよびlVERP (high and low molecular weight VERP) と名付け、これら2成分の精製を試みた。成熟雌血清から陰イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーおよび

ゲル濾過により*h*VERPおよび*I*VERPをそれぞれ精製した。ゲル濾過およびSDS-PAGEの結果から、*h*VERPは2量体、*I*VERPは単量体でそれぞれ血中に存在する可能性が示唆された。また、*h*VERPと*I*VERPのアミノ酸組成は、メダカのコリオゲニンHおよびコリオゲニンLとそれぞれ類似しており、卵膜という構造蛋白の特徴を反映していると考えられた。

次に、*h*VERPおよび*I*VERPを抗原として家兎に免疫し、特異抗体を作製した。各特異抗体は、ウエスタンブロットにおいて雌血清および卵膜抽出液中の48 kDaおよび42 kDaのバンドをそれぞれ特異的に認めた。免疫組織化学的観察では、両抗体は卵黄球期の卵母細胞の卵膜を特異的に認めた。以上の結果から、VERPはイトウの卵膜蛋白前駆物質すなわちコリオゲニンであると同定した。また、*h*VERP抗体は周辺仁期後期の卵母細胞においては細胞質全体を、*I*VERP抗体は細胞質縁辺部の小顆粒をそれぞれ特異的に染色した。このことからVERPは一旦卵母細胞質に取り込まれ、何らかの分子変化を受けた後に卵母細胞表面に卵膜として沈着する可能性があると考えられた。他方、作製した各特異抗体はアメマス、ブラウントラウトおよびサクラマスの成熟雌血清と免疫交叉性を示し、他のサケ科魚類におけるVERPの検索に有用であることが明らかとなった。

さらに、Single radial immunodiffusion (SRID) およびEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による*h*VERPおよび*I*VERPの測定系を確立した。ELISAの測定限界は*h*VERPでは15.8 ng/ml、*I*VERPでは47.4 ng/mlであった。これらを用いてE<sub>2</sub>処理および成熟期の血中量を測定した。E<sub>2</sub>処理したイトウ未熟魚の血清*h*VERPおよび*I*VERPを定量した結果、E<sub>2</sub>の単一処理(2 mg/kg体重)では24 hr後に*h*VERPおよび*I*VERPが検出された。一般にイトウは6歳の春に初回産卵を行う。成熟に伴う雌血清中のVERP量を測定した結果、産卵前年の9月から血中量は増加して1月に最大値を示したが、その後産卵期の5月まで減少した。これらの変化は、血中レベルに差はあるもののピテロゲニンと概ね一致していた。

以上のように本研究では、サケ科魚類で初めて2種類の卵膜蛋白前駆物質を精製し、それぞれに対する特異抗体を作製した。これらの特異抗体を用いて測定系を確立し、血中量の定量を可能とした。以上の成果は、卵巣外由来と考えられるサケ科魚類の卵膜形成機構の解明に重要な知見をもたらしたものと高く評価され、本論文が博士(水産学)の学位請求論文として相当の業績であると認定した。