

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and Biochemical Studies on Vitellogenin and Its Related Egg Yolk Proteins in Salmonids

(サケ科魚類におけるビテロジェニンと卵黄
蛋白質に関する免疫生化学的研究)

学位論文内容の要旨

一般に卵生脊椎動物において、卵黄蛋白前駆物質であるビテロジェニン（Vg）は雌性ホルモンの作用により雌の肝臓で合成される。血中に分泌されたVgは、Vgレセプターを介したエンドサイトーシスにより卵母細胞に取り込まれた後、卵黄を構築すると考えられている。両生類および鳥類では、血中のVgが卵母細胞に取り込まれる際に、蛋白分解を受け、卵黄蛋白質のリポビテリン（Lv）とホスピチン（Pv）に分子解裂することが示されている。魚類では、この過程が未だ直接的には証明されていないが、卵黄からLvとPvが分離精製され、性状が明らかにされている。これらの主要な卵黄蛋白質に加えて、サケ科魚類で脂質とリンを含まない分子量約30kDaの β' -component（ β' ）と呼ばれる蛋白質が初めて報告され、Vgの構成蛋白質の一つである可能性が示された。Vgと卵黄蛋白質成分に関する数多くの研究にも関わらず、魚類のVgと卵黄蛋白質の関連性、また卵黄蛋白質の構成成分については未解決な問題が多い。一方、近年Vg分子の卵黄蛋白質への解裂には、卵母細胞質中のカテプシンDが関与する可能性が両生類・鳥類において示唆されている。しかしながら魚類においては、Vgを卵黄蛋白質へ転換する因子およびその機構に関する知見はない。

本研究では、サケ科魚類におけるVgの取り込みおよび卵黄の形成過程を免疫生化学的側面から解析することを目的とした。初めにイトウを用いて、Vgおよび卵黄蛋白質の主成分を分離精製し、免疫学的、電気泳動学的手法等によりこれら蛋白の性状を解析するとともに、これまで報告されているLv、Pvおよび β' について再検討を行った。またVgと各卵黄

蛋白質成分の関係を明らかにするため、各蛋白質の抗原性を比較した。一方、Vgの定量法を免疫学的な手法を用い確立し、イトウの成熟に伴う血中Vg量を測定した。次にVgの分子解裂機構を解明する一歩として、アメマス卵水溶性画分を用いてVgの卵黄蛋白質への分解能を解析するとともに、サクラマス卵巣からこの限定的な分解能を持つVg分解酵素の精製を試みた。さらにイトウを用い、Vgの取り込み過程に重要と考えられるVgレセプターの検出および定性を行った。

イトウのVgおよび各卵黄蛋白質を精製し性状を解析した結果、Vgは540kDaであり、240kDaのサブユニットからなる2量体として血中に存在すると考えられた。卵黄蛋白質のリポ蛋白であるLvは330kDaであり、SDS-PAGEにより92kDaと29kDaのサブユニットバンドが観察された。 β' は17kDaのサブユニット2つからなる34kDaの単純蛋白であった。Pvは23kDaであり、SDS-PAGEでは、23kDaおよび6.5kDa以下のスミアーなバンドが確認された。Pvは通常の蛋白染色には染色されず、波長280nmにおける吸収はほとんどなく、また抗原性も有さないリン蛋白であり、アミノ酸組成では約56%がセリンであった。

Vgと各卵黄蛋白質の抗原性を比較するために行ったオクタロニー法の結果から、少なくともLv、 β' に関してはVg由来の蛋白質であることが示された。さらに、通常抗原性を持たないPvに関し、脱リン酸化後のPvを家兎に免疫することにより抗血清を作製した。この抗体を用いVgとの抗原性をウェスタンブロッティング法により比較した結果、脱リン酸化したPvおよびVgに免疫交叉性が認められたことにより、Pvに関してもVgから分子解裂した蛋白であることが初めて免疫学的に証明された。

イトウの成熟に伴う血中Vg量を確立したマンシーニ法およびELISA法を用いて観察した結果、3年魚の5月においてVgが検出され、4年魚において一時的なVgのピークが確認された。さらに5年魚において、卵巣の発達に伴いVg量は急激な上昇を見せ、10月より高値を維持し、6年魚となった5月の排卵時に減少した。卵黄形成初期に一次的なピークを観察したことおよび排卵半年前から高値を維持することは、他のサケ科魚類においてこれまで報告されておらず極めて興味深い知見である。

次にVgの卵黄蛋白質への特異的分解を*in vitro*で観察した。ビオチン標識アメマスVgを37℃、pH5.2の条件下で16時間、ウシカタプシンDまたはアメマス卵水溶性画分により消化した。分解産物をSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングで解析した結果、Vg由来の卵黄蛋白質成分

と抗原性および分子量ともに良く一致したポリペプチドが出現した。本結果は魚類のVgを *in vitro*で卵黄蛋白質へ分解した初めての例である。

上述の条件下で精製Vgの分解活性をSDS-PAGEにより検出し、サクラマス卵巣からVg分解酵素の精製を行った。卵水溶性画分を40%飽和硫酸により塩析し、沈殿画分を DE-52によるイオン交換クロマトグラフィーに供した。0.2Mの塩濃度で溶出された画分をHydroxylapatite、Phenyl Superose、Mono QおよびSuperose 12の各カラムに順次供し、Vg分解酵素を精製した。精製蛋白をSDS-PAGEにより解析した結果、42kDaの位置に1本のバンドが観察された。このバンドは抗ヒトカテプシンD血清を用いたウエスタンブロッティングにおいて反応し、サケ科魚類のVgの分子解裂は、卵母細胞中のカテプシンD様酵素の作用によることが強く示唆された。

イトウ卵巣より卵母細胞を分離し、破碎した後に卵黄を洗浄・除去することにより卵母細胞膜を含む卵膜を得た。これをn-octyl- β -D-glucopyranosideを用い可溶化し、Enhanced Chemical Luminescence (ECL) -リガンドブロッティングによりVgレセプターを検出した。ビオチン標識イトウVgをプローブとした非還元下でのECL-リガンドブロッティングにおいて、35kDa, 46kDa, 63kDa, 90kDaおよび175kDa以上の5つのバンドが検出された。これらの蛋白質は、標識イトウVgに加え過剰量の未標識イトウVgを添加したとき検出不能となり、Vgとの特異性が示されたことからVgレセプターであると考えられた。さらにVg由来の各卵黄蛋白質成分を競合リガンドとしてレセプターバインディングアッセイを行った。その結果、Lvでは約90%、 β' では約50%の割合で標識イトウVgの置換が起こった。これまで鳥類・両生類でVg分子中のレセプター結合部位はLvドメインであることが報告されていたが、本研究により新たに β' ドメインもレセプター結合能を持つことが示唆された。

以上、本研究は、サケ科魚類の卵黄の形成過程において、Vgと卵黄蛋白質成分の関係およびその分子解裂機構に関与する酵素について初めて報告した。またVgの取り込み過程において、Vgレセプターの存在を確認しVg分子中のレセプター結合部位について新たな知見を得た。本研究は、今後魚類の再生産を検討する上で有効な知見を提供すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	原	彰彦
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	助教授	足立	伸次
副査	助教授	上田	宏

学位論文題名

Immunochemical and Biochemical Studies on Vitellogenin and Its Related Egg Yolk Proteins in Salmonids

(サケ科魚類におけるビテロジェニンと卵黄
蛋白質に関する免疫生化学的研究)

一般に卵生脊椎動物において、卵黄蛋白前駆物質であるビテロジェニン (Vg) は雌性ホルモンの作用により雌の肝臓で合成される。血中に分泌されたVgは、Vgレセプターを介したエンドサイトーシスにより卵母細胞に取り込まれた後、卵黄を構築すると考えられている。両生類および鳥類では、血中のVgが卵母細胞に取り込まれる際に、蛋白分解を受け、卵黄蛋白質のリポビテリン (Lv) とホスピチン (Pv) に分子解裂することが示されている。魚類では、これらの主要な卵黄蛋白質に加えて、サケ科魚類で脂質とリンを含まない分子量約30kDaの β' -component (β') と呼ばれる蛋白質が報告されている。Vgと卵黄蛋白質成分に関する数多くの研究にも関わらず、魚類Vgと卵黄蛋白質の関連性、また卵黄蛋白質の構成成分については未解決な問題が多い。近年両生類・鳥類において、Vg分子の卵黄蛋白質への解裂には、卵母細胞質中のカテプシンDが関与する可能性が示唆されている。しかしながら魚類においては、Vgを卵黄蛋白質へ転換する因子およびその機構に関する知見はない。本研究では、サケ科魚類におけるVgの取り込みおよび卵黄の形成過程を免疫生化学的側面から解析することを目的とし実験を行い、以下の知見を得た。

イトウのVgおよび各卵黄蛋白質を精製し性状を解析した結果、Vgは540kDaであり、240kDaのサブユニットからなる2量体として血中に存在すると考えられた。Lvは330kDaであり、92kDa (H鎖) と29kDa (L鎖) の2つのサブユニットから構成され、また β' は17kDaのサブユニット2つからなる34kDaの単純蛋白であった。Pvは23kDaであり、SDS-PAGEでは23kDaおよび6.5kDa以下のスミアーなバンドが確認された。

Vgと各卵黄蛋白質の抗原性を比較するために行ったオクタロニー法の結果から、少なくともLv, β' に関してはVg由来の蛋白質であることが示された。さらに、通常抗原性を持たないPvに関し、脱リン酸化後のPvを家兎に免疫することにより抗血清を作製した。この抗体を用いVgとの抗原性を比較した結果、Pvに関してもVgから分子解裂した蛋白であることが初めて免疫学的に証明された。

イトウの成熟に伴う血中Vg量を測定した。その結果、卵黄形成の進行に伴い血中量が増加し、排卵時に減少することは他のサケ科魚類での報告と同様であったが、卵黄形成初期に一次的なピークを観察したことおよび排卵半年前から高値を維持することはこれまで報告されておらず、極めて興味深い知見である。

次にVgの卵黄蛋白質への特異的分解を*in vitro*で観察した。ビオチン標識アメマスVgを37℃、pH5.2の条件下で16時間、ウシカテプシンDまたはアメマス卵水溶性画分により消化した。分解産物を解析した結果、Vg由来の卵黄蛋白質成分と抗原性および分子量ともに良く一致したポリペプチドが出現した。本結果は魚類のVgを*in vitro*で卵黄蛋白質へ分解した初めての例である。

上述の条件下で精製Vgの分解活性をSDS-PAGEにより検出し、サクラマス卵巣からVg分解酵素の精製を行った。卵水溶性画分を40%飽和硫酸により塩析し、沈殿画分を5つの異なるカラムに供し、Vg分解酵素を精製した。精製蛋白をSDS-PAGEにより解析した結果、42kDaの位置に1本のバンドが観察された。このバンドは抗ヒトカテプシンD血清を用いたウエスタンブロッティングにおいて反応し、サケ科魚類のVgの分子解裂は、卵母細胞中のカテプシンD様酵素の作用によることが強く示唆された。

イトウ卵巣より卵母細胞膜を含む卵膜を得た。これをn-octyl- β -D-glucopyranosideを用い可溶化し、リガンドブロッティングによりVgレセプターを検出した。リガンドブロッティングにおいて、175kDa以上および90kDa, 63kDa, 46kDa, 35kDaの5つのバンドが検出され、Vgとの特異性が示されたことからVgレセプターであると考えられた。さらにVg由来の各卵黄蛋白質成分を競合リガンドとしてレセプターバインディングアッセイを行った。その結果、これまで鳥類・両生類でVg分子中のレセプター結合部位はLvドメインであることが報告されていたが、本研究により新たに β' ドメインもレセプター結合能を持つことが示唆された。

以上、本研究は、サケ科魚類の卵黄の形成過程において、Vgと卵黄蛋白質成分の関係およびその分子解裂機構に関与する酵素について初めて報告した。またVgの取り込み過程において、Vgレセプターの存在を確認しVg分子中のレセプター結合部位について新たな知見を得た。これらの成果は、今後魚類の再生産を検討する上で有効な知見を提供すると評価され、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。