

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and biochemical studies
on precursors of vitelline envelope proteins
of masu salmon(*Oncorhynchus masou*)

(サクラマスのお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

サクラマス (*Oncorhynchus masou*) は北部日本に広く分布する重要な増養殖対象魚であり、北海道の河川では稚魚の放流事業また沿岸では海中養殖なども推進されている。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詳細に理解する必要がある。卵重量の殆どを占める卵黄蛋白は発生中の胚の栄養として必要不可欠である。一方、卵膜は受精時の多精拒否および浸透圧保持の機能を持つばかりでなく、外部環境からの胚体の保護など多くの役割を果たしている。

硬骨魚類の卵膜は一般に、ほ乳類の卵透明帯と相同な器官とされ、卵母細胞由来のいわゆる一次卵膜と考えられてきた。しかし、近年多くの魚類において、卵膜蛋白はエストラジオール- 17β (E₂) の刺激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、メダカにおいては、この卵膜蛋白前駆物質をコリオジェニン (Chg) と呼ぶことが初めて提唱された (Yamagami, 1996)。従って卵膜蛋白前駆物質は、卵黄蛋白前駆物質 (ビテロジェニン; Vg) と同様に、卵母細胞の成長に関わる外因性の卵形成因子に加えられる。しかし、魚類の卵膜蛋白前駆物質に関する知見、ホルモンによる合成の制御および卵膜の構築過程には未解明な点が多く残されており、統一した見解は得られていない。本研究では卵膜形成過程を明らかにすることを目的に、

サクラマス卵膜蛋白前駆物質の検出、精製を行い、さらにE2処理による血中への誘導および成熟に伴う血中量の変化、並びに卵巣における卵膜蛋白前駆物質と卵膜蛋白の動態を調べた。

供試魚には北大水産学部附属七飯養魚実習施設で飼育中のサクラマスを用いた。非イオン性界面活性剤を用いて可溶化した孵化後の卵膜を抗原として抗卵膜血清 (a-VE) を作製した。a-VEを用いた二重免疫拡散法により雌雄成熟魚の血清と肝臓抽出液および卵膜抽出液を解析した結果、成熟雌の血清および肝臓抽出液中には卵膜関連蛋白 (vitelline envelope-related protein; VERP) が存在することが明らかになったことから、サクラマスの卵膜もまた卵巣外由来であると考えられた。さらに、非還元下でのa-VEを用いたウエスタンブロッティングにおいて雌血清中に126、48および43kDaのバンドが観察され、3種類のVERPが存在することが示唆された。

ウエスタンブロッティングでの分子量の違いから血清中の3つのVERPをそれぞれvery high、high および low molecular weight VERP (*vh*VERP、*h*VERP および *l*VERP) と名付け、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行った。精製 *vh*VERP はゲル濾過では分子量520kDaであり、SDS-PAGEでは175および126kDaのバンドが還元処理に関わらず観察された。精製 *h*VERP はゲル濾過で分子量88kDa、SDS-PAGEでは、非還元下で48kDa、還元下では53kDaであった。さらに精製 *l*VERP の分子量はゲル濾過で55kDaと推定され、SDS-PAGEにおいて非還元下で43kDa、還元下で47kDaのバンドが観察された。これらの結果から *h*VERP は2量体、*l*VERP は単量体として血中に存在することが示唆された。さらに、*h*VERP および *l*VERP のアミノ酸組成はそれぞれメダカとイトウのコリオジェニンHおよびコリオジェニンLに極めて類似していた。一方、*vh*VERP は、コリオジェニンHもしくは本種の *h*VERP との類似性を示した。続いて、それぞれの精製品に対する特異抗体 (a-VH、a-H、a-L) を作製した。ウエスタンブロッティングにおいて、a-Lは *l*VERP のみを特異的に染色した。一方、a-VHとa-H GSIならびにE2の増加に伴って上昇し、8月に最大値 (Vg 10.93mg/ml、Chg H

618.47 μ g/ml、Chg L 977.05 μ g/ml) を示した後、排卵月の9月には急激に減少した。血中Vg濃度はChgと比較して著しく高い値を示したが、E2濃度が低い個体(<1ng/ml)ではVgより高濃度のChgが検出された。以上の結果からChgの合成分泌がE2によって直接的に制御されることおよびChgとVgの合成量の割合はE2の濃度によって調整されることが示唆された。

Chgから卵膜が形成される過程を明らかにするために、a-Hおよびa-Lを用いて卵母細胞質を解析した。抽出した卵母細胞質はa-HとLの両者に対して、沈降線を形成した。これらの沈降線はそれぞれ血清中のChg HおよびChg Lの沈降線と融合したことから、卵母細胞質中にはChg HおよびLとそれぞれ共通する抗原性を持つ成分が存在することが示された。従って、Chgは卵母細胞質中に取り込まれた後、卵膜を構築することが示唆された。さらに、成熟に伴う卵膜蛋白の変化をSDS-PAGE並びにウエスタンブロッティングで観察した。その結果、卵母細胞の成長に伴い、比較的高分子量のバンドの割合が増加することが明らかになった。これらのバンドはa-HとLの両者に反応したことから、Chg HおよびL由来の成分から構成されと考えられた。排卵卵の卵膜においては血中のChgと同じ分子量をもつバンドは殆ど消失し、それらより分子量の大きいバンドのみが観察された。以上の様なバンドパターンの変化は他の魚種で報告されている受精時における卵膜の不溶化の際に観察される変化と類似していた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 彰 彦
副 査 教 授 山 内 皓 平
副 査 教 授 麦 谷 泰 雄
副 査 助 教 授 足 立 伸 次

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and biochemical studies on precursors of vitelline envelope proteins of masu salmon(*Oncorhynchus masou*)

(サクラマスの卵膜蛋白前駆物質に関する免疫生化学的研究)

硬骨魚類の卵膜は、受精から孵化に至る間多くの重要な役割を果たしており、種の繁殖に深く関わっている。近年数種の魚類において、卵膜蛋白がエストラジオール- 17β (E₂) により肝臓で合成されることが示唆されており、メダカにおいては2種類の卵膜蛋白前駆物質が同定、精製され、コリオジェニン (Chg) と呼ぶことが提唱された (Yamagami, 1996)。しかし、魚類の卵膜蛋白前駆物質に関する知見は非常に限られており、特に卵形成過程における血中量の変化は、ほとんど明らかにされていない。サクラマス

(*Oncorhynchus masou*) は北部日本に分布する重要な増養殖対象魚であり、健全な卵を得るために親魚の卵形成過程を詳細に理解する必要がある。本研究はサクラマス雌の卵膜形成過程を解明することを目的として行われた。

最初に、孵化後の卵膜を抗原として抗卵膜血清 (a-VE) を作製し、卵膜関連成分の検索を行った。a-VEを用いた二重免疫拡散法により成熟雌の血清および肝臓抽出液中には卵膜関連蛋白 (vitelline envelope-related protein; VERP) が存在することが明らかになり、サクラマスの卵膜蛋白質は肝臓由来であることが示唆された。さらに、ウエスタンブロッティングにおいて、雌

血清中には126、48および43kDaのバンドが観察され、3種類のVERPが存在することが示された。

次に、3つのVERPをそれぞれvery high、high および low-molecular weight VERP (*vh*VERP、*h*VERP および *l*VERP) と名付け、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行った。精製した *vh*VERP、*h*VERP、および *l*VERPの分子量はゲル濾過法においてそれぞれ520、88および55kDaと推定された。さらに、*h*VERPおよび*l*VERPのアミノ酸組成はそれぞれメダカおよびイトウのChg HおよびLに極めて類似しており、これらに対して作製した特異抗体 (a-H、a-L) は卵膜を特異的に免疫染色した。一方、*vh*VERPのアミノ酸組成は *h*VERPと類似し、*h*VERPと抗原性を一部共有することが示された。従って、*vh*VERPは*h*VERPを構成成分の一つとする蛋白質であると考えられた。以上の結果より、精製した *h*VERPと*l*VERPは本種の卵膜蛋白前駆物質であることが免疫化学的に明らかとなり、*h*VERPをChg H、*l*VERPをChg Lと同定した。

続いて、血清中のChgの測定法をa-Hおよびa-Lを用いて一元放射免疫拡散法 (SRID) および酵素免疫測定法により確立した。E2投与の結果、Chg HとLは少なくとも投与8時間後には血中に誘導されたが、10 μ g/kg魚体重以下のE2投与ではChgの増加は認められなかった。また、血中量の最大値はE2投与量依存的に増加した。成熟に伴う血清Chg、VgおよびE2量を測定した結果、雌魚の成熟に伴ってChgおよびVg量は増加した。卵黄形成期に血中VgはChgに比較して非常に高い値を示したが、それ以前にはChg量の方が高濃度であった。E2の投与量または血清中の濃度が低い個体 (<1ng/ml) ではVgよりもChg量が高く、E2投与量または血清濃度が高い個体ではChgよりVgが高濃度に検出された。以上の結果からChgの合成分泌がE2によって直接的に制御されることおよびChgとVgの合成量の割合はE2の濃度によって調整されることが示された。

最後に、Chgから卵膜が形成される過程を明らかにするために、a-H

およびa-Lを用いて卵母細胞質中のChg関連蛋白質を解析した。卵母細胞質中にはChg HおよびLとそれぞれ共通する抗原性を持つ2種類の成分が存在することが明らかになり、Chgは卵母細胞質中に取り込まれた後、卵膜を構築することが示唆された。さらに、成熟に伴う卵膜蛋白の変化をSDS-PAGE並びにウエスタンブロッティングで観察した結果、卵母細胞の成長に伴いa-HとLの両者に反応する比較的高分子量のバンドの割合が増加した。還元処理後もこれらのバンドが低分子化しないことから卵膜蛋白はS-S結合ではない結合様式により架橋され、卵成長に伴って強固になることが示された。

以上のように、本研究では、サクラマスの卵膜蛋白が卵巣外由来であることを明らかにし、血清中に存在する卵膜蛋白質の前駆物質2種類を免疫化学的に同定した。また、それらの合成がE₂濃度によって調節されていることを示した。さらに、卵膜蛋白前駆物質が卵母細胞に取り込まれた後卵膜を構築する可能性を示し、卵膜蛋白質は卵成長に伴って架橋され高分子化することを明らかにした。これらの結果は、健全な卵を得る上で重要な知見を提供したものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文に値する業績であると認定した。