

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and biochemical studies on egg yolk protein, vitellin, in Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*)

(エゾアワビにおける卵黄蛋白ビテリンに関する免疫生化学的研究)

学位論文内容の要旨

アワビ類は軟体動物の原始腹足類に属する草食性の大型巻き貝であり、古くから食用に供されてきたが、その漁獲量は年々減少している。近年、資源を回復するために増養殖が行われ、特に人工種苗生産技術の開発が進められてきた。エゾアワビは国内のアワビ類漁獲高の40%以上を占めており、水産上重要種である。しかしながら、成熟生理機構、特に卵黄形成に関する生化学的研究はほとんどなく、基礎的な知見を得ることは重要であると考えられる。

無脊椎動物である昆虫において、卵黄蛋白前駆物質（ビテロジェニン）は脂肪体で合成されヘモリンフを介して卵黄蛋白の主成分であるビテリンとして卵内に貯蔵される。また、海産無脊椎動物であるエビ・カニ類では、卵巣内で合成される種と、卵巣外器官（肝臓、脂肪組織）で合成される種が存在することがこれまで報告されている。一方、貝類におけるビテリンの合成部位に関する研究は、陸上巻き貝のカタツムリ、二枚貝のムラサキガイおよびマガキに限られ、海産巻き貝におけるこの分野の研究はない。

卵内に蓄積された卵黄蛋白は、摂餌をするまで初期発生時の栄養源並びにエネルギー源として消費される。最近、マガキにおいて胚発生並びに幼生発生に伴うビテリンの低分子化が観察されているが、他の軟体動物における卵黄蛋白の低分子化に関する研究はほとんどない。そこで、本研究では腹足類のエゾアワビを対象種として、その卵黄形成機構を解明することを目的として、卵黄蛋白の主成分であるビテリンを精製し、その諸性質を解析した。次に精製蛋白に対する抗血清を作製し、卵

黄形成に伴うビテリンの動態並びに免疫組織学的観察によりビテリンの合成部位を検討した。また、貝類間のビテリンを比較するためにホタテガイのビテリンを精製した。さらに、エゾアワビにおいて胚発生並びに幼生発生に伴う卵黄蛋白の低分子化を観察し、その低分子化に関わる酵素を解析した。

実験に用いたアワビは、北海道南西部大成町種苗育成センターで飼育中のエゾアワビを用いた。卵抽出液をハイドロキシルアパタイトおよびゲル濾過カラムの2つのクロマトグラフィーに供してビテリンを精製した。精製ビテリンはゲル濾過で500kDaであり、糖、脂質およびカロテノイドを含む複合蛋白であった。また、精製蛋白をSDS-PAGEにより泳動した結果、150kDaと95kDaのポリペプチドから成るヘテロダイマーであった。アミノ酸組成を解析した結果、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニンおよびロイシンを各々9%以上含んでいた。これらの分子量およびサブユニット構造、並びにアミノ酸組成は、カイコ、ウシエビ等の無脊椎動物のビテリンと類似していた。作製したエゾアワビのビテリンに対する抗血清(a-Vn)を用いて、免疫交叉反応性を有するヘモリンフ蛋白を検索した結果、ビテリン関連雌特異蛋白、即ちビテロジェニン様蛋白はエゾアワビには存在しないことが示された。

二枚貝のホタテガイのビテリンを精製し、腹足類のエゾアワビと性状比較を行った。ホタテガイのビテリンはゲル濾過で500kDaの糖、脂質およびカロテノイドを含む複合蛋白であり、エゾアワビのビテリンの結果とよく一致した。また、アミノ酸組成もエゾアワビのビテリンとほぼ同様であった。一方、ホタテガイのビテリンは210kDaのポリペプチドから成るホモダイマーであり、エゾアワビやマガキのサブユニット構造と異なっていた。

エゾアワビの卵成長に伴うビテリンの動態を観察するために、a-Vnを用いたマンシーニ法により卵巣内のビテリン量を測定した。ビテリン量は卵成熟に伴って増加し、産卵期の9月(1997年)または10月(1998年)に最大値(100, 350mg/g ovary)を示した。この傾向はマガキやホタテガイの結果とよく一致していた。

各月における卵母細胞のステージを組織学的に解析した結果、卵原細胞、染色仁期、無卵黄期および油球期の卵母細胞は一年を通して観察された。一方、卵黄顆粒

期および成熟期の卵母細胞は各々5月、7月から出現した。免疫組織学的観察により、卵母細胞内の卵黄顆粒がa-Vnで染色され、この卵母細胞は5月の卵巣で観察された。これより、5月には既に卵巣内でビテリンの蓄積が開始されており、生殖周期に伴って発達した卵母細胞内に蓄積されと考えられた。

ビテリンの合成部位を検討するために、a-Vnを用いた免疫組織学的観察を行った結果、卵黄顆粒は染色されたが、肝臓においては検出されなかった。また、鰓、筋肉、肝臓および生殖巣の抽出液をa-Vnを用いたWestern blottingに供した結果、卵巣以外では免疫染色される蛋白は観察されなかった。これらの結果およびヘモリンフ中にビテリン関連蛋白が存在しないことから、エゾアワビのビテリンは卵巣内で合成される可能性が強く示唆された。

エゾアワビにおける胚発生並びに幼生発生に伴うビテリンの低分子化をa-Vnを用いたWestern blottingにより観察した。150kDaと95kDaの2つのビテリンのサブユニットのうち、150kDaが受精後48hrに消失し、135kDa、133kDaおよび50kDaのバンドが新たに出現した。一方、95kDaのサブユニットバンドは受精後48hrにおいても検出された。最終的に、受精後120hrでは2つのサブユニットはほぼ消失した。異なるステージの胚体抽出液はゲル濾過カラムで2つのメインピーク(500kDaのビテリンピークと6.5kDa以下の低分子ピーク)を示した。メインピークの位置は胚発生に伴って変化しなかったが、ステージが進むに従いビテリン量は減少した。受精後48hrで150kDaのサブユニットが消失したにもかかわらず、ゲル濾過では500kDaのビテリンピークが観察された。これらの結果から、胚体または幼生の抽出液中のビテリンは分解されたのではなく、分子内にニックが入ったと推察された。各ステージの胚体中のビテリン相対量は受精後12hrまで変化しなかったが、受精後18hrから減少し始め、120hrでは42%まで減少したことから、ビテリンが胚発生に伴って消費されたと考えられた。

ビテリンの低分子化に関わる酵素を検討するために、Digoxigenin標識ビテリン(DIG-ビテリン)を、受精後48hrの抽出液の水可溶性分画(WSF)と共に37℃、pH5.6-5.8、16hrの条件下で反応させた後、SDS-PAGEで解析した。その結果、DIG-ビテリンの*in vitro*での蛋白分解の泳動パターンは受精後48hrと同様なパタ

ーンを示した。ビテリンの低分子化を様々なインヒビターを用いて阻害した結果、キモスタチンで阻害されたことから、この低分子化にはセリンプロテアーゼが関与している可能性が考えられた。

以上、エゾアワビのビテリンは他の無脊椎動物と同様に糖、脂質およびカロテノイドを含む高分子複合蛋白であり、卵母細胞内の卵黄顆粒中に蓄積されることが示された。また免疫生化学的解析の結果、ビテリンは卵巣内で合成されと考えられた。一方、エゾアワビのビテリンは胚発生並びに幼生発生に伴って低分子化し、その低分子化にはセリンプロテアーゼが関与している可能性が示唆された。本研究は、今後貝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	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 egg yolk protein, vitellin, in Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*)

(エゾアワビにおける卵黄蛋白ビテリンに関する免疫生化学的研究)

エゾアワビは国内のアワビ類漁獲高の40%以上を占め、商業的価値が高く、水産上の重要種であり、これまで増養殖が盛んに行われてきた。しかしながら、成熟生理機構、特に卵黄形成並びに胚発生に関する生化学的研究はほとんどなく、基礎的な知見を得ることは重要であると考えられる。

無脊椎動物の昆虫においては、卵黄蛋白前駆物質（ビテロジェニン）は脂肪体で合成されヘモリンフを介して卵黄蛋白の主成分であるビテリンとして卵内に貯蔵される。また、エビ・カニ類では、ビテロジェニンが卵巣内で合成される種と、卵巣外器官（肝臓、脂肪組織）で合成される種が存在することがこれまで報告されている。一方、貝類におけるビテリンの合成部位に関する研究は少なく、海産巻き貝におけるこの分野の研究はない。

卵内に蓄積された卵黄蛋白は、摂餌をするまでの初期発生時のエネルギー源並びに器官形成に関わっていると考えられている。最近、マガキにおいて胚発生に伴うビテリンの低分子化が観察されているが、分解過程に関する研究はほとんどない。そこで、本研究では海産巻き貝のエゾアワビを対象種として、その卵黄形成機構並びに胚発生機構を解明することを目的として、卵黄蛋白の主成分であるビテリンを精製し、その諸性質を解析した。次にビテリンに対する抗血清を作製し、卵黄形成

に伴うビテリンの変動を観察するとともに、免疫組織学的手法によりビテリンの合成部位を特定した。さらに、胚発生に伴うビテリンの低分子化を観察し、その低分子化に関わる酵素を解析した。

実験に用いたアワビは、北海道南西部大成町種苗育成センターで飼育中のエゾアワビを用いた。卵抽出液をハイドロキシルアパタイトおよびゲル濾過カラムに供してビテリンを精製した。精製ビテリンは分子量500kDaの糖および脂質を含む複合蛋白であり、150kDaと95kDaの2つのサブユニットから構成されると推察された。エゾアワビのビテリンの分子量、サブユニット構造、並びにアミノ酸組成は、カイコ、ウシエビ等の他の無脊椎動物のビテリンと類似していた。ビテリンに対する抗血清(a-Vn)を作製し、免疫交叉反応性を有するビテロジェニン様蛋白を検索した結果、ヘモリンフ中には検出されなかった。

エゾアワビの卵成長に伴うビテリンの動態をa-Vnを用いたマンシーニ法により測定した結果、卵巣内ビテリン量は卵黄形成に伴って増加し、産卵期に最大値(350mg/g ovary)を示した。

卵母細胞のステージを組織学的に解析した結果、卵黄球期および成熟期の卵母細胞は各々5月、7月から出現した。これより、5月には既に卵巣内でビテリンの蓄積が開始されており、7月以降卵母細胞内の卵黄の蓄積が活発であることが示された。

ビテリンの合成部位を検討するために、a-Vnを用いて免疫染色した結果、卵黄球期以降の卵母細胞は染色されたが、肝臓では免疫反応が認められなかった。また、各体組織の抽出液をWestern blotting に供した結果、卵巣以外では免疫染色される蛋白は観察されなかった。これらの結果およびヘモリンフ中にビテロジェニン様蛋白が検出されないことから、ビテリンは卵母細胞内で合成される可能性が強く示唆された。

胚発生に伴うビテリンの低分子化をa-Vnを用いたWestern blotting により観察した。受精後48hrに2つのビテリンのサブユニットのうち、150kDaのバンドが完全に消失し、135kDaおよび50kDa前後のバンドが新たに出現した。さらに、受精後120hrで95kDaのバンドの染色性が減少した。異なるステージの胚体抽出液はゲ

ル濾過カラムで2つのメインピーク(ビテリンのピークと6.5kDa以下の低分子ピーク)を示した。ビテリンのピーク的位置は胚発生に伴って変化しなかったが、発生が進むに従いビテリン量は減少した。これらの結果から、胚体または幼生中のビテリンは低分子化されると考えられたが、Intact の分子量には変化が見られないことから、一部は分子構造が保持されていると推察された。

ビテリンの低分子化に関わる酵素を解析するために、Digoxigenin を標識したビテリンを受精後48hrの抽出液の水溶性画分と共に至適条件下で反応させた後、SDS-PAGEで解析した。その結果、分解産物の泳動パターンは受精後48hrと同様なパターンを示した。ビテリンの低分子化を様々なインヒビターを用いて阻害した結果、キモスタチンで比較的阻害されたことから、この低分子化にはセリンプロテアーゼが関与している可能性が考えられた。

以上のように、本研究では海産巻き貝で初めてビテリンを精製し、その合成部位が卵母細胞である可能性を強く示唆した。さらに、ビテリンは胚発生に伴って低分子化し、その低分子化には酵素が関与している可能性を示唆した。これらの結果は、今後貝類の再生産を検討する上で有効な知見を提供する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。