

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and Biochemical Studies of
Multiple Vitellogenins and their Related Egg Yolk Proteins
in Grey Mullet (*Mugil cephalus*)

(ボラの複数ビテロジェニンおよび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

ビテロジェニン (Vg) は、estradiol-17 β (E2) の作用により、卵黄形成期の雌肝臓で合成され、血中に分泌される卵黄蛋白前駆物質である。魚類 Vg は卵に取り込まれた後、リポビテリン (Lv)、ホスビチン (Pv) および β' -コンポーネント (β' -c) に分子解裂される。近年、これら3つの卵黄蛋白質に加え新たに C-ターミナルコンポーネント (Ct) が Vg 遺伝子の解析から見つかった。さらに、数種の魚類において2~3型の Vg が同定され、魚類の卵黄形成過程はより複雑化している。これら Vg は Lv、Pv、 β' -c および Ct をすべて含む complete Vg、VgA タイプと VgB タイプ、および Pv ドメインを欠く incomplete Vg、VgC タイプに分けられる。3型 Vg それぞれの機能は未だ明らかにされていないが、分離浮性卵をもつマツカワでは、2型 Vg (VgA と VgB) 由来の各卵黄蛋白が最終成熟時に異なる分解を受け、吸水に伴う卵の浮力調節に係わることが報告されている。

ボラは生息域が広く、主に底性のデトライタスを索餌することから底質の影響を受けやすく、環境エストロジェン調査の対象魚種とされている。しかし、ボラの複数 Vg や卵黄蛋白質に関する報告はこれまでにない。今後、環境エストロジェンの指標蛋白として雄魚 Vg を評価するためには、正常な卵黄形成過程を知ることは重要である。本研究では、ボラの複数 Vg および関

連卵黄蛋白の基礎的知見を得ることを目的として、主に免疫生化学的手法を用いて以下の実験を行った。

初めに卵黄蛋白 (YP) の主成分である Lv を精製した。卵抽出液から 4 種の Lv 様蛋白質 (YP1、YP2、YP3 および YP4) を検出し、水沈殿、硫安沈殿、hydroxylapatite (HA)、陰イオン交換、immunoabsorbent およびゲル濾過 (Superose 6) の各カラムを用いて精製した。精製蛋白はすべて脂質染色され、ゲル濾過法では 330kDa (YP1)、325kDa (YP2)、335kDa (YP3) および 570kDa (YP4) であり、SDS-PAGE 法では 110kDa と 30kDa (YP1)、99kDa と 29kDa (YP2)、97kDa と 21.5kDa (YP3) および 110kDa と 54kDa (YP4) のバンドが観察されたため、いずれも 2 つのサブユニットからなると推察された。YP のアミノ酸組成は他魚種 Lv の特徴とよく一致したが、YP4 はセリン含有量が高値を示した。また、YP1、YP2、YP3 の抗原性は異なっていたが、YP4 は YP1 と同じ抗原性であった。以上の結果から、YP1、YP2 および YP3 をボラの Lv と同定し、それぞれ Lv1、Lv2 および Lv3 とした。YP4 はその特性から Lv1 と Pv の complex であると考えられた。

ボラ卵抽出液を、抗サクラマス β' -c 血清 (anti-m β' -c) を用いた Western blotting により解析した結果、非還元下 27kDa、還元下 16kDa のバンドが観察された。この蛋白をボラ β' -c として、硫安沈殿、HA カラムおよびゲル濾過カラム (Superdex 200、Superdex 75) を用いて精製し、2 つの精製画分 (0.1M β' -c および 0.25M β' -c) を得た。ともに、ゲル濾過法では 34kDa、SDS-PAGE 法では非還元下 27kDa、還元下 16kDa を示した。anti-m β' -c を用いたオクタロニー法の結果から、0.1M β' -c と 0.25M β' -c は抗原性の一部共通性が認められ、ボラには少なくとも 2 型の β' -c が存在することが明らかとなった。

さらに、ボラ Pv は、卵抽出液の 67%飽和硫安の上清画分を HA カラムお

よびゲル濾過カラム (Superose 6) により精製した。精製蛋白はリン染色により初めて可視化される 25kDa のバンドを示した。この蛋白はセリン含有量が 45.9%と高値を示し、他魚種の Pv の特徴とよく一致した。

以上の結果から、ボラには 3 型の Lv、1 つの Lv-Pv complex、少なくとも 2 型の β' -c、および 1 つの Pv が存在することが初めて明らかになった。これらのうち、3 型の Lv に対する抗体 (anti-Lv1、anti-Lv2、anti-Lv3) を作製し血清中の Vg の検索を行った。

3 つの抗体は、雄とは反応せず、雌魚と E2 処理魚の血清に反応した。anti-Lv1、anti-Lv2 および anti-Lv3 に反応した血清蛋白をそれぞれ Vg1、Vg2 および Vg3 とした。また、沈降線の強さから Vg2 がメインの Vg であると考えられた。3 型 Vg の精製は、E2 処理魚血清を陰イオン交換、HA、immunoabsorbent およびゲル濾過の各カラムに供して行った。精製蛋白はゲル濾過法において 570kDa (Vg1)、580kDa (Vg2)、335kDa (Vg3)、SDS-PAGE 法では還元下 165kDa (Vg1)、160kDa (Vg2)、および 118kDa (Vg3) であった。3 型 Vg はすべて脂質染色および糖染色され、リン染色では Vg1 および Vg2 のバンドが観察された。アミノ酸組成において、3 型ともに他魚種 Vg の特徴とよく一致したが、Vg3 はセリン含有量が低値を示した。また、3 つの抗原性はそれぞれ異なっていた。以上の結果から、精製した Vg1 および Vg2 は complete Vg、Vg3 は incomplete Vg であると考えられた。

Vg1 および Vg2 に対する抗体を作製し、卵黄蛋白との関連を解析した。Vg1 は Lv1 と 0.25M β' -c、Vg2 は Lv2 および 0.1M β' -c からなることが明らかになった。一方、Vg3 は Lv3 のみからなることが示唆された。

ボラ肝臓から、3 型 Vg (VgA、VgB および VgC) 遺伝子をクローニングした。得られた塩基配列と精製蛋白の N 末端シーケンスの結果、Vg1、Vg2

および Vg3 はそれぞれ VgA、VgB、VgC と一致した。一方、各卵黄蛋白質は N 末端シーケンスと抗原性から、Lv1 と 0.25M β' -c は VgA、Lv2、Pv および 0.1M β' -c は VgB、Lv3 は VgC 由来であることが明らかになった。

最終成熟時における各 Vg 由来の卵黄蛋白の変化を観察した。LvA、LvA-Pv complex、 β' -c および Pv は排卵後の卵にはほとんど検出されなかった。メイン Vg (VgB) 由来の LvB には低分子化が観察され、相対量も 1/3 に減少していた。一方、LvC は Native の分子量および相対量に変化はなかったが、サブユニットは低分子化していた。以上の結果から、3 型 Vg 由来の卵黄蛋白はそれぞれ最終成熟時の分解過程が異なることが示され、マツカワでの 2 型 Vg (VgA と VgB) の分解様式とよく一致していた。

以上本研究では、ボラの 3 型 Vg およびこれらに関連する卵黄蛋白 (3 型の Lv、LvA-Pv complex、2 型の β' -c および Pv) を精製し、それぞれが異なる性状を持つことを明らかにした。本研究により得られた結果は、魚類の複数 Vg および卵黄蛋白質に関する重要な基礎的知見を提供するとともに、将来の環境ホルモンのバイオメーカーとしての応用面においても役立つものと考えられる。

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 助 教 授 東 藤 孝

学 位 論 文 題 名

Immunochemical and Biochemical Studies of Multiple Vitellogenins and their Related Egg Yolk Proteins in Grey Mullet (*Mugil cephalus*)

(ボラの複数ビテロジェニンおよび卵黄蛋白質に関する免疫生化学的研究)

ビテロジェニン (Vg) は、卵黄形成期の雌肝臓で estradiol-17 β (E2) の作用によって合成され、血中に分泌される卵黄蛋白前駆物質である。魚類 Vg は卵に取り込まれた後、リポビテリン (Lv)、ホスピチン (Pv) および β' -コンポーネント (β' -c) に分子解裂される。近年、数種の魚類において2～3型のVgが同定され、魚類の卵黄形成過程はより複雑化してきた。これらのVgはLv、Pvおよび β' -cをすべて含むcomplete Vgタイプ(VgAとVgB)およびPvドメインを欠くincomplete Vgタイプ(VgC)に分けられる。3型Vgの機能はほとんどの魚種で未だ明らかにされていないが、分離浮性卵をもつマツカワでは、VgAとVgB由来の各卵黄蛋白が最終成熟時に異なる分解を受け、吸水に伴う卵の浮力調節に係わることが報告されている。

ボラ (*Mugil cephalus*) は生息域が広く、主に底性のデトライタスを索餌することから底質の影響を受けやすく、環境エストロジェン調査の対象魚種として注目されている。しかし、ボラの複数Vgや関連卵黄蛋白質に関する報告はこれまでにない。本研究では、ボラの複数Vgおよび卵黄蛋白の基礎的知見を得ることを目的として、主に免疫生化学的手法を用いて以下の知見を得た。

ボラ卵抽出液から初めて3型のLv (Lv1、Lv2およびLv3)、2型の β' -c (0.1M β' -cおよび0.25M β' -c) およびPvを分離精製した。精製Lvはすべて脂質を含む蛋白であった。ゲル濾過法では330kDa (Lv1)、325kDa (Lv2)および335kDa (Lv3)であり、SDS-PAGE

法では 110kDa と 30kDa (Lv1)、99kDa と 29kDa (Lv2) および 97kDa と 21.5kDa (Lv3) のバンドが観察された。このことから、いずれの Lv も 2 つのサブユニット、H 鎖と L 鎖からなると推察された。3 つの精製 Lv のアミノ酸組成は他魚種 Lv の特徴とよく一致し、それぞれの抗原性は異なっていた。2 つの精製 β' -c はともに、16kDa のサブユニットからなる 34kDa の蛋白で、これらの抗原性は一部共通であった。このことから、ボラには少なくとも 2 型の β' -c が存在することが明らかになった。さらに、ボラ Pv はリン染色により 25kDa のバンドとして可視化された。アミノ酸組成はセリン含有量が 45.9% と高値であり、他魚種 Pv とよく一致した。

3 型の Lv に対する特異抗体を用いて血清中に 3 型の Vg (Vg1、Vg2 および Vg3) を検出し、精製を行った。精製蛋白はゲル濾過法において 570kDa (Vg1)、580kDa (Vg2)、335kDa (Vg3)、SDS-PAGE 法では還元下で 165kDa (Vg1)、160kDa (Vg2)、および 118kDa (Vg3) であった。また、染色性から 3 型 Vg のうち Vg1 および Vg2 は糖・脂質・リンを含む複合蛋白であり、Vg3 はリン染色されず、糖・脂質を含む蛋白であった。Vg1 および Vg2 に対する抗体を作製し、卵黄蛋白との関連を解析した。Vg1 は Lv1 と 0.25M β' -c、Vg2 は Lv2 および 0.1M β' -c をそれぞれ含むこと、一方、Vg3 は Lv3 のみを含むことが示唆された。以上の結果から、精製した Vg1 および Vg2 は complete Vg タイプ、Vg3 は incomplete Vg タイプであると考えられた。

ボラ肝臓から、3 型 Vg (VgA、VgB および VgC) 遺伝子をクローニングした。精製蛋白の N 末端アミノ酸配列との比較から、Vg1、Vg2 および Vg3 はそれぞれ VgA、VgB および VgC と同定された。さらに、Lv1 と 0.25M β' -c は VgA 由来、Lv2、Pv および 0.1M β' -c は VgB 由来、Lv3 は VgC 由来であることが明らかになった。

最終成熟時における各卵黄蛋白の変化を観察した。LvA、 β' -c および Pv は排卵後の卵にはほとんど検出されなかった。一方、LvB は低分子化すること、LvC は intact の分子量は変化せず、SDS-PAGE で低分子化が観察された。3 型 Vg 由来の卵黄蛋白はそれぞれ最終成熟時の分解過程が異なることが示され、マツカワにおける VgA と VgB の報告によく一致していた。また、魚類で初めて LvC の最終成熟時の変化を示した。

以上、本研究は、ボラの 3 型 Vg およびそれぞれに由来した卵黄蛋白を精製し、これらの生化学的性状を明らかにするとともに、各 Vg の分子解裂過程を詳細に解析した。これらの結果は、魚類の卵黄形成機構に関して、重要な新知見を提供したものとして高く評価され、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。