



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Biochemical and Molecular Biological Studies of Vitellogenins and their Derivative Yolk Proteins in the Mosquitofish (*Gambusia affinis*), a Viviparous Teleost

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 澤口, 小有美 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/3078">http://hdl.handle.net/20.500.12099/3078</a>

氏 名 (本 國 籍)	澤 口 小有美 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 381 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 9 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Biochemical and Molecular Biological Studies of Vitellogenins and their Derivative Yolk Proteins in the Mosquitofish ( <i>Gambusia affinis</i> ), a Viviparous Teleost (カダヤシにおけるビテロジェニンおよび卵黄蛋白の 生化学的および分子生物学的研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 吉 崎 範 夫 副査 岐阜大学 教授 伊 藤 慎 一 副査 静岡大学 教授 森 誠 副査 信州大学 教授 小 野 珠 乙

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

カダヤシ *Gambusia affinis* は、濾胞内妊娠と呼ばれる胎性様式をとり、卵成熟しても排卵せず、出産まで濾胞内で胚発生が進行する。また、卵胎生である本種は、胚発生に必要な栄養の大部分を卵内に蓄えた卵黄に依存している。一般的に魚類を含む卵生脊椎動物では、卵黄の主体である卵黄タンパクは雌性ホルモンの刺激により肝臓で前駆体 (ビテロジェニン: Vg) が合成され、血液により運搬されて、受容体を介して卵母細胞内に取り込まれる。その際、Vgは限定的な分解を受け、リポビテリン (Lv)、フォスビチン (Pv)、および $\beta'$ -成分 ( $\beta c$ ) の3種類の卵黄タンパクとして蓄積される。これまでにマツカワなどで、Lv-Pv- $\beta c$ -C 末端成分 (Ct) からなる一般的な構造をもつ2種類のVg (VgA および VgB) の存在が明らかにされている。また、ゼブラフィッシュでは一般型 Vg 遺伝子の他に、Pv 領域を欠いた Pv 欠損型 Vg (PvIVg) 遺伝子の存在が証明されている。

本研究では、カダヤシを材料として3種類のVgの存在を遺伝子とタンパクの両面から明らかにすることを試みた。雌性ホルモン処理したカダヤシの血漿から分子量 600 kDa および 400

kDa の Vg (600Vg および 400Vg) が精製され、免疫学的分析により 600Vg 中に 2 種類の異なる Vg タンパク (600VgA および 600VgB) が存在することが示された。卵黄形成期の卵母細胞中には、560 kDa (560Yp)、400kDa (400Yp) および 28 kDa (28Yp) の 3 種類の卵黄タンパクが確認され、そのうち 560Yp および 28Yp は 600Vg に由来し、それぞれ Lv 重鎖-Pv-Lv 軽鎖からなる複合体と $\beta$ c であると考えられた。また、400Yp は免疫学的分析から 400Vg が卵母細胞に蓄積する際に分解を受けずに取込まれたものであることが示された。雌性ホルモン処理したカダヤシ雌肝臓から作製した cDNA ライブラリより、600VgA、600VgB および 400Vg の完全な cDNA クローンを単離し、全配列を決定した。そのうち 600VgA および 600VgB は一般型 Vg であり、400Vg は PvlVg であった。

浮遊性卵を生む海産魚であるマダイ *Pagrus major* を用いて同様の分析を行った。カダヤシ Vg 遺伝子情報をもとに、マダイ肝臓 cDNA ライブラリより 3 種類の Vg 遺伝子の全配列を決定した。3 種類の Vg のうち 2 種類はカダヤシ VgA および VgB と、もう 1 種類は PvlVg と高い相同性を示した。雌性ホルモン処理したマダイの血中から 610 kDa (610Vg) および 340 kDa (340Vg) の 2 種類の Vg タンパクが分離された。N-末端アミノ酸配列分析から、610Vg は 540 kDa Lv と 33 kDa  $\beta$ c に分解されて卵母細胞に蓄積されることが示された。一方、340Vg は免疫学的分析により PvlVg であることが示され、カダヤシ PvlVg と同様に卵母細胞に取込まれても分子量に変化を示さなかった。卵成熟時には、VgA および VgB に由来する卵黄タンパクはそれぞれ異なる分解を受け、生じるアミノ酸により浮遊性獲得のための吸水を調節することが示唆された。それに対し、340Vg 由来の卵黄タンパクは、吸水への関与は認められなかった。これらの結果から、胎性のカダヤシとは異なり、浮遊性卵を産生する系統学的に高位な海産魚では、VgA と VgB 由来の卵黄タンパクを精妙に分解しわけることで卵の物理的性質を調節していることが示唆された。

カダヤシの 3 種類の Vg に由来する卵黄タンパクが、どのように蓄積・利用されるのかを明らかにするため、卵母細胞および胚に含まれる卵黄タンパク量を測定し、その変化を調べた。600Vg、400Vg、560Yp および 400Yp 量の測定のため、600Vg 抗体および 400Yp 抗体を用いた酵素免疫測定系を確立した。卵黄形成期の卵母細胞にはごく初期のものを除いて 560Yp と 400Yp が約 4 対 1 のモル比で蓄積されていた。一方、卵黄形成期の雌の血中には 600Vg と 400Vg が約 3.3 対 1 のモル比で存在し、Vg がその比率を概ね維持したまま卵母細胞に取込まれることが示唆された。その後、胚発生が進行するとそのモル比は変化し、神経胚期を過ぎると 560Yp と 400Yp の比率が約 1.4 対 1 となった。このことから、カダヤシでは一般型 Vg と PvlVg

が一定の比率で卵母細胞に取込まれ、胚発生時には一般型 Vg 由来の卵黄タンパクが先行して利用されていることが明らかとなった。

本研究ではカダヤシに一般型 Vg である VgA と VgB、そして PvlVg の 3 種類の Vg が存在することを、魚類で初めて証明した。これら 3 種類の Vg は、繁殖様式の異なるマダイにおいても確認され、系統進化的に高位の魚種に共通する可能性を示唆した。さらにカダヤシでは 3 種類の Vg 由来の卵黄タンパクについて、卵黄形成期の取り込みから胚発生時の利用までの量的な変化を明らかにし、異なる卵黄蛋白の蓄積・利用動態の一端を解明した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文の公開学位論文発表会は、審査委員全員を含む関連教員や学生の出席のもと、平成 17 年 8 月 3 日、岐阜大学連合農学研究科棟において実施された。提出された学位論文の主な審査結果は以下の通りである。

本論文では、カダヤシを材料として次の三つの実験観察が行われた。

第一の実験では、カダヤシの 3 種類の卵黄前駆体(ビテロジェニン;Vg)の存在を遺伝子とタンパクの両面から明らかにすることを試みた。雌性ホルモン処理したカダヤシの血漿から分子量 600 kDa および 400 kDa の Vg (600Vg および 400Vg) が精製され、免疫学的分析により 600Vg 中に 2 種類の異なる Vg タンパク (600VgA および 600VgB) が存在することが示された。卵黄タンパクはリポビテリン(Lv), フォスビチン(Pv) および  $\beta'$ -成分( $\beta c$ )の 3 種類からなる。卵黄形成期の卵母細胞中には、560 kDa (560Yp)、400kDa (400Yp) および 28 kDa (28Yp) の 3 種類の卵黄タンパクが確認され、そのうち 560Yp および 28Yp は 600Vg に由来し、それぞれ Lv 重鎖-Pv-Lv 軽鎖からなる複合体と  $\beta c$  であると考えられた。また、400Yp は免疫学的分析から 400Vg が卵母細胞に分解を受けずに取込まれたものであることが示された。雌性ホルモン処理したカダヤシ雌肝臓から作製した cDNA ライブラリより、600VgA、600VgB および 400Vg の完全な cDNA クローンを単離し、全配列を決定した。そのうち 600VgA および 600VgB は一般型 Vg であり、400Vg は PvlVg であった。これらの結果からカダヤシでは 2 種類の一般型 Vg (VgA および VgB) と 1 種類のフォスビチン欠損型 Vg (PvlVg) の 3 種類存在することがタンパクと遺伝子の双方で証明された。

第二の実験として、カダヤシの 3 種類の Vg に由来する卵黄タンパクが、どのように蓄積・利用されるのかを明らかにするため、卵母細胞および胚に含まれる卵黄タンパク量を測定し、その変化を調べた。卵黄形成期の卵母細胞には 560Yp と 400Yp が約 4 対 1 のモル比で蓄積されていた。一方、卵黄形成期の雌の血中には 600Vg と 400Vg が約 3.3 対 1 のモル比で存在し、Vg がその比率を概ね維持したまま卵母細胞に取込まれることが示唆された。その後、胚発生が進行するとそのモル比は変化し、神経胚期を過ぎると 560Yp と 400Yp の比率が約 1.4 対 1 となった。このことから、カダヤシでは一般型 Vg と PvlVg が一定の比率で卵母細胞に取込まれ、胚発生時には一般型 Vg 由来の卵黄タンパクが先行して利用されていることが明らかとなった。

第三の実験として、カダヤシで得られた多型 Vg の一次構造と、卵黄タンパクの分子変化を繁殖様式の異なる他の魚種と比較するため、浮遊性卵を生む海産魚であるマダイ *Pagrus major* を用いて同様の分析を行った。3 種類の Vg のうち 2 種類はカダヤシ VgA お

よび VgB と、もう 1 種類は PvlVg と高い相同性を示した。雌性ホルモン処理したマダイの血中から 610 kDa (610Vg) および 340 kDa (340Vg) の 2 種類の Vg タンパクが分離され、610Vg は 540 kDa Lv と 33 kDa  $\beta$ c に分解されて卵母細胞に蓄積され、340Vg は卵母細胞に取込まれても分子量に変化を示さなかった。卵成熟時には、VgA および VgB に由来する卵黄タンパクはそれぞれ異なる分解を受け、生じるアミノ酸により浮遊性獲得のための吸水を調節することが示唆された。これらの結果から、マダイにおいても 3 種類の Vg の存在が証明されたが、胎性のカダヤシとは異なり、浮遊性卵を産生する海産魚では、VgA と VgB 由来の卵黄タンパクを精妙に分解しわけることで卵の物理的性質を調節していることが示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文:

- 1 Sawaguchi, S., Koya, Y., Yoshizaki, N., Ohkubo, N., Andoh, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A. and Matsubara, T. 2005. Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.* 72: 1045-1060
- 2 Sawaguchi, S., Ohkubo, N., Koya, Y. and Matsubara, T. 2005. Incorporation and utilization of multiple forms of vitellogenin and their derivative yolk proteins during vitellogenesis and embryonic development in the mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 22: 701-710