— Note —

Characteristics of Tear Proteins in the Voles, *Microtus arvalis*

Masashi SASAKI, and Yoshio OKI

Department of Physiological Chemistry, Nippon Veterinary and
Zootechnical College, 1-7-1 Kyonanchō, Musashino, Tokyo 180, Japan.

(Received 17 July 1987/Accepted 7 October 1987)

Tear proteins were detected by polyacrylamide gel electrophoresis in the vole, *Microtus arvalis*. The tear proteins were separated to 6 to 8 bands and the bands were divided to three regions on the anodic side. In the adult male vole, a male specific band (Vtp-1) was detected in the first region. The first region of adult female and immature voles contained two specific bands (Vtp-2, 3). In the castrated adult males or adult males injected with estrogen, the male specific band, Vtp-1, disappeared and Vtp-2 and 3 bands appeared. In all castrated voles, the Vtp-1 band appeared and Vtp-2 and 3 bands disappeared after the administration of testosterone. Thus, sex hormone-dependent proteins are present in vole tears.

ハタネズミ (*Microtus arvalis*) における涙液蛋白質の特性

佐々木昌志・大木与志雄

日本獣医畜産大学生理化学教室

涙液蛋白質は電気泳動により数本のバンドとして観察され、ラットの泳動パターンには系統間差が [2], マウスには系統間差および性差が認められ [3-5], 近交系の遺伝的モニタリングに応用されている。

著者らは現在、ハンガリーげっ歯類生物研究所由来のハタネズミ, *Microtus arvalis* Pallas を維持し、その実験動物としての特性を検索しているが、本研究では涙液蛋白質の電気泳動パターンを観察し、さらに、去勢や性ホルモン投与の影響について若干の検討を加えた。

動物は温度 18~26℃, 14 時間照明 (7:00~21:00) の条件下で兄妹交配によって維持されている F₃~F₅ 代の

ハタネズミ, 77 匹 (雌: 35 匹, 雄: 42 匹) を用いた。これらの動物に 1% 塩酸ピロカルピン (和光純薬) 0.2 ml を腹腔内注射し、漏出する涙液を 2×5 mm の濾紙片 (東洋濾紙, No. 2) に吸着させて採取した。試料は実験に供するまで -25℃ にて保存した。1 枚の濾紙片に吸着される涙液量は、約 1~1.5 μl であった。去勢および性ホルモン投与群は、14~15 週齢の動物を用いて 1 群 6 匹とし、エーテル麻酔下で常法 [1] に従って、精巣および卵巣のみを完全に摘出した。このうち性ホルモン投与群にはテストステロンプロピオネート (東京化成), β-エストラジオール (和光純薬) をそれぞれ約 1 cm のサイラ

スティック医療用チューブ (ダウ コーニング社, No. 602-235) に詰め, 両端をサイラスティック医療用接着剤 A (No. 890) にて密閉し, 去勢時に雌には背部皮下, 雄では腹部皮下に 4 週間埋め込んで投与した。去勢および性ホルモン投与群についても, 前述と同様の方法で涙液を採取した。

採取した涙液はポリアクリルアミドゲル薄層電気泳動法 [6] を用い, その蛋白泳動パターンを検索した。ゲルは総アクリルアミド濃度 4.5% (W/V) とし, ゲル用緩衝液としてトリス-EDTA-ホウ酸緩衝液 (pH 8.9), 電極用緩衝液としてホウ酸緩衝液 (0.3M, pH 8.0) を用いた [7]。泳動はゲルの陰極側より 2cm のところに涙液付着濾紙片 (各 1 枚) を挿入し, 170V 定電圧, 氷冷下で行い, 指標として用いた BPB (ブロムフェノールブルー) が原点から 8cm 移動した時 (約 70 分) を目安として終了した。染色は 0.5% Coomassie brilliant blue R で 30 分間行い, 7% 酢酸・20% エタノール溶液にて脱色した。

成熟および幼若ハタネズミの, 涙液蛋白質の電気泳動パターンを Fig. 1 に示した。14 週齢以降の成熟ハタネズミの涙液蛋白質は, ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって陽極側に合計 6~8 本のバンドが検出された。これらのバンドは大きく 3 つの分画に分けることができ,

Fig. 1. Electrophoretic patterns of tear proteins in *Microtus arvalis*.

- (1) and (7) normal adult male.
- (2) normal adult female.
- (3) immature male, 5 weeks old.
- (4) immature male, 3 weeks old.
- (5) immature female, 5 weeks old.
- (6) immature female, 3 weeks old.

最も陽極側に位置する第 I 分画の中で雄に特有のバンドを Vtp-1 (Vole tear protein-1), 雌に特有の 2 本バンドを易動度の速いものより Vtp-2, 3 と名付けた。しかし, 幼若個体ではこのような性差は認められず, 雌雄いずれも 3 週齢では第 I 分画を欠くか, あるいは染色性の弱い Vtp-2, 3 バンドを持つ泳動像を示し, 5 週齢ではすべて雌雄ともに成熟雌と同じ泳動型を示した。第 II, 第 III 分画については性差は認められなかったが, 幼若個体の第 II 分画の易動度には, 3 週齢と 5 週齢の個体の間に差異がみられた。また, 第 III 分画のバンドは個体によって染色性に違いがみられた。

去勢したハタネズミおよび去勢後, 性ホルモンを投与したハタネズミの涙液蛋白質の電気泳動パターンを Fig. 2 に示した。去勢雄では術後 4 週間で成熟雄特有の Vtp-1 バンドが消失し, Vtp-2, 3 バンドが出現したが, 去勢雌の泳動パターンには特に変化がみられなかった。また,

Fig. 2. Effects of testosterone or estrogen on tear proteins in *Microtus arvalis*.

- (1) normal adult male.
- (2) normal adult female.
- (3) castrated adult male.
- (4) castrated male injected with testosterone.
- (5) castrated adult female.
- (6) castrated female injected with testosterone.
- (7) adult male injected with estrogen.

去勢雄および去勢雌にテストステロンを投与した群では、Vtp-2, 3 バンドが消失し、Vtp-1 バンドが出現して成熟雄型の泳動パターンを示した。一方、成熟雄（非去勢）にエストロゲンを投与した群では、投与後 4 週間で雌型の泳動パターンを示した。このときの副生殖腺重量を測定したところ、精のう腺は $29.0 \pm 4.0 \text{ mg}$ （平均±標準誤差）、前立腺は $13.2 \pm 2.8 \text{ mg}$ で、無処置成熟雄の値（ $84.0 \pm 2.2 \text{ mg}$, $28.8 \pm 4.5 \text{ mg}$ ）に比べて有意（ $p < 0.01$, $p < 0.05$ ）に減少していた。

ハタネズミの涙液蛋白質は、電気泳動によって 6～8 本のバンドとして検出されたが、これはマウスの 15～20 本 [3, 4] と比べて少なかった。そしてその泳動パターンには、マウスで報告されているのと同様に、明らかな性差があることが示された。この性差は成熟に伴って発現し、雌雄とも 3 週齢頃までは第 I 分画のバンドを欠き、5 週齢までに Vtp-2, 3 バンドが出現した。雄ではその後週齢を増すと Vtp-2, 3 バンドが消失し、Vtp-1 バンドが出現して成熟雄型のパターンを示すようになった。このような雄における泳動パターンの変化は、去勢試験および性ホルモン投与の結果より、テストステロンに依存することが明らかになった。テストステロンは、第 I 分画における成熟雄特有の Vtp-1 蛋白産生を促進し、Vtp-2, 3 蛋白の産生を抑制すると思われる。また、成熟雄にエストロゲンを投与すると去勢と同様の効果を示し、涙液蛋白質の電気泳動パターンは雌型に転換した。

以上のことから、ハタネズミにおいてもマウスと同様に、性ホルモン依存性の涙液蛋白質が存在することが明らかとなった。そして、この電気泳動パターンの変化を指標として、性ホルモンの投与効果を推察することも可能であると考えられた。

要 約

ハタネズミ、*Microtus arvalis* の涙液蛋白質を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検索した。涙液蛋白質は 6～8 本のバンドとして検出され、陽極側より 3 つの分画に分かれ、その第 I 分画には成熟雄特有のバンド (Vtp-1) と、成熟雌と若週齢の雌雄に認められる 2 本のバンド (Vtp-2, 3) が含まれた。成熟雄を去勢するか、エストロゲンを投与すると、Vtp-1 バンドが消失し、Vtp-2, 3 バンドが出現した。去勢雄、去勢雌にテストステロンを投与すると、いずれも Vtp-1 バンドが出現し、Vtp-2, 3 バンドは消失した。

以上のことから、ハタネズミには性ホルモン依存性の涙液蛋白質が存在することが明らかとなった。

文 献

- [1] 小林洋四郎・井上 正(1981). 図説 動物実験の手技手法, pp. 25-42, 井上 正・松本一彦編, 共立出版, 東京.
- [2] Kondo, Y., Hamada, S., Serikawa, T., and Yamada, J. (1987). *Transplant. Proc.*, **19**, 3146-3147.
- [3] 松島芳文・池本卯典 (1981). 日畜会報, **52**, 775-779.
- [4] Matsushima, Y., and Ikemoto, S. (1983). *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **54**, 269-274.
- [5] Matsushima, Y., Imai, T., and Ikemoto, S. (1984). *Biochem. Genet.*, **22**, 577-585.
- [6] 荻田善一・中村正二郎(1976). 電気泳動実験法, pp. 167-217, 電気泳動学会編, 文光堂, 東京.
- [7] 大西保行・大木与志雄・藤田淳吉(1981). 日獣畜大研報, **30**, 49-55.