アメマス *Salvelinus leucomaenis* ビテロゲニンの 卵黄蛋白質への特異的分解

平松 尚志, 原 彰彦

(1996年10月15日受付)

Specific Proteolysis of Vitellogenin to Egg Yolk
Proteins in White Spotted-charr *Salvelinus leucomaenis*

Naoshi Hiramatsu*¹ and Akihiko Hara*²

Vitellogenin (Vg) was purified from white spotted-charr *Salvelinus leucomaenis* serum and biotinylated (b-Vg). The b-Vg was digested under mild acidic conditions by bovine cathepsin-D (BCD) or a water soluble fraction of charr eggs (WSF). Digests were analyzed by 5.0-22.5% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Western blotting, and gel filtration on Superose 6. Western blotting was done using: 1) streptavidin coupled to horseradish peroxidase (HRPO) to identify biotinylated products of b-Vg digestion, and 2) antisera against lipovitellin (α -Lv) or β -component (α - β) to immunologically relate digestion products to specific charr egg yolk proteins. With respect to antigenicity and apparent molecular weight, fragments resulting from digestion of b-Vg by WSF or BCD were almost indistinguishable from those found in charr egg yolk, except for phosvitin (Pv). Pv-related phosphorus in BCD digests eluted at a position corresponding to a molecular weight slightly greater than that of Pv in egg yolk. The present study is the first to demonstrate *in vitro* conversion of salmonid Vg to its related egg yolk proteins. The similar catalytic effect of WSF or BCD on *in vitro* generation of egg yolk proteins suggests that cathepsin-D, present in WSF or intact eggs, may play a key role in natural yolk formation in salmonids.

キーワード: アメマス, カテプシン D, ビテロゲニン, リポビテリン, ホスピチン, β' 成分

一般に卵生脊椎動物において、卵黄形成期の卵母細胞は卵黄蛋白前駆物質 (vitellogenin, Vg) を血流から取り込み、蓄積することにより急速に成長する。Vg はエストロゲンの作用の下、肝臓で合成される高分子 glycolipophosphoprotein であり、レセプター媒介エンドサイトーシスにより卵内へ取り込まれた後酵素的分解を受け、より低分子な卵黄蛋白質成分へ分子分解することが報告されている。¹⁻⁴⁾

両生類および鳥類では、Vg は分子分解の結果、卵内で脂質含量の高いリポビテリン (lipovitellin, Lv) およびリン含量の高いホスピチン (phosvitin, Pv) として存在する。⁵⁾ 最近著者らは、サケ科魚類のイトウ *Hucho perryi* を用いて3成分の卵黄蛋白質、すなわち両生類・鳥類にみられる Lv, Pv に加え、魚類に特異的な卵黄蛋白質である β' 成分 (β' -component, β') は Vg 由来の蛋

白であることを免疫生化学的手法により示した。⁶⁾

Vg と卵黄蛋白質成分に関する数多くの研究にも関わらず、Vg を卵黄蛋白質へ転換する因子およびその機構に関する知見は殆どない。近年 Vg 分子の解裂に卵母細胞のリソゾーム的細胞内小器官であると考えられる Multivesicular body (MVB) 内のアスバラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D が関与する可能性が示唆されている。しかしながら魚類においては直接的に Vg を卵黄蛋白質へ分解した例はない。本研究ではサケ科魚類の Vg 分子解裂機構を解明する一歩として、アメマス *Salvelinus leucomaenis* を用いて血中から Vg を精製し、水洗殿法により卵水溶性分画を得た。これを用いて Vg の卵黄蛋白質への分解能を免疫生化学的手法を用い解析し、さらにウシカテプシン D を用い同様な実験を行い比較検討した。

*1 北海道大学水産学部水産増殖学科淡水増殖学講座 (Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Department of Biology and Aquaculture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido, 041, Japan).

*2 北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設 (Nanae Fish Culture Experimental Station, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Nanae, Kameda-gun, Hokkaido, 041-11, Japan).

材料および方法

実験魚 実験に供した卵黄形成期の雌アメマスは、北海道大学水産学部附属七飯養魚実習施設において累代飼育されている3年魚を用いた。採血は尾柄部よりシリンジにて行い、アプロチニンを0.84 TIU 添加した試験管に血液を10 ml づつ分注し、4°C にて一晩静置した。血清は血液を4°C にて3,000 rpm で20分間遠心分離して得た。採血後卵巣を取り出し、サケマス用生理食塩水(7.861 g NaCl, 0.281 g KCl, 0.47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, および0.02 g NaHCO_3 を1リットルの蒸留水に溶解)中で十分洗浄後、卵試料の調製に用いた。血清はVgの精製まで-30°Cで保存した。

卵試料 氷冷した0.02 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 (2% NaCl, 0.1% NaN_3 を含む) 中で、アメマス卵をピンセットを用いて結合組織および濾胞組織からできるだけ分離した。分離した卵は、ミキサーにて破碎し、ガーゼによる濾過を行い卵膜および大きな破砕物(濾胞組織等)を取り除いた。得られた卵抽出液に等量の上記のTris-HCl 緩衝液を加え、流水および蒸留水(DW)で3日間透析した。透析後、15,000 rpm で1時間4°C にて遠心分離を行った。上清を凍結乾燥し卵水溶性画分(water soluble fraction, WSF)とし、実験まで-30°Cで保存した。

抗血清 家兎抗アメマスLv血清(a-Lv)および抗アメマス β' 血清(a- β')は先の報告⁷⁾と同様のものを用いた。

電気泳動法および免疫学的手法 濃度勾配スラブゲル(5-22.5%)を用いたTris緩衝液系での、SDS(sodium dodecyl sulfate)ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)法は、Laemmli⁸⁾の方法に従った。2-mercaptoethanol(2-ME)およびSDS濃度がそれぞれ1%になるように試料に添加した後、100°Cで2分間処理した。泳動は24 mA 定電流で約5時間行った。染色は0.1%のCoomassie brilliant blue R250(CBB)を40%エタノール-10%酢酸水溶液に溶解した染色液にて行った。

分子量マーカー (Pharmacia 社)は以下のものを用いた; low molecular marker としては α -lactalbumin (14.4 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), albumin (67 kDa) および phosphorylase b (94 kDa) を用い、high molecular marker としては lactate dehydrogenase (36 kDa), catalase (60 kDa), albumin (67 kDa), ferritin (220 kDa), 18.5 kDa および thyroglobulin (330 kDa) を用いた。

Western blotting (WB) 法は先の報告⁷⁾に従った。a-Lv および a- β' は1:4000の希釈倍率で用いた。

カラムクロマトグラフィー ゲル濾過カラムクロマトグラフィーはFPLCシステム(Pharmacia 社)により、Superose 6 HR 10/30 カラムを用いて行った。カラムへの試料の添加量は200 μ l とし、リン定量に用いる試料は0.2 M 重炭酸アンモニウム溶液にて、また、SDS-PAGEに供するサンプルは0.02 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0 (2% NaCl, 0.1% NaN_3 を含む) で溶出した。流速は0.5 ml/min で0.5 ml づつ分取した。溶出された蛋白の分子量はcytochrome C (12.3 kDa), trypsinogen (24 kDa), egg albumin (45 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), α -amylase (200 kDa), apoferritin (443 kDa) および thyroglobulin (669 kDa) をマーカー蛋白として測定した。

リン定量 リン定量はGamst and Try⁹⁾の方法を一部改変して行った。即ち、0.5 ml の試料を凍結乾燥し、これに200 μ l の2N NaOHを加え、100°Cの湯浴中で15分間加熱した。室温まで冷却後、200 μ l の2N HCl で中和し、その後500 μ l の2.4 mM モリブデン酸アンモニウム溶液と200 μ l の0.2 M クエン酸溶液を加え、20分間放置後、366 nm で吸光値を測定した。

Vgのビオチン標識 アメマスVg精製は先の報告⁷⁾と同様に水沈殿法およびゲル濾過法を用いて行った。精製Vgのビオチンによる標識は以下の様に行った。10 μ l のbiotin-7-NHS (N-hydroxysuccinimide-biotin) 溶液 (20 mg/ml) と90 μ l のDMSO (dimethylsulfoxide) の混合溶液22.5 μ l に1 ml の精製Vg溶液 ($\text{OD}_{280 \text{ nm}} = 1.2-1.5$) を加え、4°C にて攪拌しながら4時間反応させた。反応後、過剰なbiotin-7-NHSの除去および反応条件設定におけるpH調整のためpH5.2, 5.5または5.8の120 mM クエン酸緩衝液にて4°Cで一晩透析した。ビオチン標識Vgは実験まで-30°Cで保存した。

ビオチン化蛋白質のアビジン-ペルオキシダーゼによる検出 ビオチン標識Vgの検出はWBおよびDot blotting後、avidinとbiotinの特異的結合(avidin-biotin complex; abc)を利用し行った。方法を以下に示す。SDS-PAGEで泳動した後に転写されたニトロセルロース膜(NC)は5%スキムミルクによるブロッキング後、1:1000に希釈された西洋わさびペルオキシダーゼ標識streptavidin (streptavidin-HRPO, Boehringer Mannheim Biochem.) で室温にて2時間反応させ、洗浄後発色させた。Dot blottingはNCに試料5 μ l を滴下し、同様にstreptavidin-HRPOによる検出を行った。洗浄および発色は先の報告⁷⁾と同様に行った。抗原-抗体反応を利用したWBと区別するため、以下に本方法を用いた場合はabc法を用いたWBと記す。

酵素および蛋白質分解酵素阻害剤 ウシカタブシンD (EC 3.4.23.5, C-3138) およびペプスタチンA (P-

4265) は Sigma 社から、アプロチニン (T010A) は宝酒造社から購入した。

Vg の消化 アメマス WSF およびウシカテプシン D による Vg の卵黄蛋白への分解は以下のように観察した。WSF は pH の異なるクエン酸緩衝液に溶解 (20 mg/ml) し、同一の pH に平衡化したビオチン化 Vg ($OD_{280\text{ nm}}=1.5$) と等量の割合で混合した。反応後の試料は、SDS-PAGE および WB または abc 法を用いた WB に供した。また pH 5.2 に調整された WSF (5 mg/ml) とビオチン化 Vg を等量ずつ混合し、37°C、16 時間反応を行った後、ゲル濾過カラムに添加した。ゲル濾過にて溶出された画分は、SDS-PAGE および WB または abc 法を用いた WB により解析した。一方、pH 5.2 のクエン酸緩衝液で平衡化したビオチン化 Vg 溶液 ($OD_{280\text{ nm}}=1.2$) 0.5 ml にベプスタチン A の存在下または非存在下で同緩衝液に溶解されたウシカテプシン D (25 unit/ml) を 50 μ l 添加し、37°C、16 時間反応後、同様にゲル濾過、SDS-PAGE および WB または abc 法を用いた WB により解析した。

結 果

ビオチン標識 Vg 標識および無標識 Vg の SDS-PAGE および abc 法を用いた WB 像を Fig. 1 に示す。 SDS-PAGE において、標識および無標識の両 Vg とともに還元下では 240 kDa、還元下では 165 kDa の位置にメインバンドが観察された。一方、abc 法を用いた WB においては、標識 Vg のみに各々のメインバンドが染色された。このことにより、biotin-NHS が Vg に結合していることおよび標識による Vg の分子量の変化はないことが示された。

WSF による Vg の分解 WSF による Vg の卵黄蛋白への分解能を解析するため、異なる温度、pH および反応時間を WB により検討した。pH 5.2, 5.5 および 5.8 で 4°C または 37°C の条件下で 16 時間、WSF と反応させた後の biotin 標識 Vg を abc 法を用いた WB により検出した像を Fig. 2 に示した。37°C で反応したものにおいて、165 kDa の Vg のメインバンドはより低分子のバンドに分解されていた。pH 5.8 および 5.5 の条件下では 125 kDa のメインバンドが認識されたが、pH 5.2 ではさらに低分子化し Lv の heavy chain と同じ 92 kDa のバンドがメインバンドとなり、これ以下にも数本のバンドが確認された。4°C においても 165 kDa のバンドは完全に消化されていたが、37°C に比較し、92 kDa のバンドへの転換は起こらなかった。図には示さないが 25°C においては、37°C と同様の 92 kDa のバンドへの転換が確認されたが、37°C のほうがより卵黄蛋白質のパターンと近似していた。

Fig. 1. SDS-PAGE and Western blotting of vitellogenin before and after biotinylation.

The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB). Western blotting was carried out using streptavidin-HRPO. Lanes 1 and 3, purified white spotted-charr vitellogenin; lanes 2 and 4, biotinylated charr vitellogenin. Lanes 1 and 2 were loaded with samples reduced with 2-mercaptoethanol and lanes 3 and 4 were loaded with samples run under non-reduced conditions.

Fig. 2. Digestion of biotinylated vitellogenin by a water soluble fraction from charr eggs at various conditions of pH.

Incubation was performed at 4°C (left-side) or 37°C (right-side) for 16 hr. Samples were analyzed by Western blotting using streptavidin-HRPO. Lanes 1-3 were loaded with samples digested at pH 5.2, 5.5 and 5.8, respectively.

Fig. 3. Changes over time in digestion of biotinylated vitellogenin by a water soluble fraction from charr eggs during incubation at 37°C. Incubation was performed at pH 5.2. The SDS-PAGE gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB). Western blotting was done using streptavidin-HRP. E, aqueous extract of white spotted-charr eggs; lanes 1-4, samples incubated for 0, 4, 8, and 24 hr, respectively.

37°C, pH 5.2 で 0, 4, 8 および 24 時間反応した後の SDS-PAGE および abc 法を用いた WB パターンを Fig. 3 に示した。WSF と Vg を混合した直後 (0 時間) に泳動した試料においてすでに 165 kDa のメインバンドは消失していた。時間の経過とともに、125 kDa のバンドが消失し、92 kDa のバンドが濃くなる傾向が観察された。24 時間後には 16 時間の像 (Fig. 2) と同じく本種の卵黄蛋白質の泳動パターン (Fig. 3, lane E) と良く似たパターンとなった。abc 法を用いた WB では、92 kDa のバンドが観察された他、それより低分子位に CBB での観察より多数のマイナーバンドが確認された。

37°C, pH 5.2 での反応直後 (0 時間) および 16 時間反応後の試料のゲル濾過パターンを Fig. 4 に示した。0 時間では Vg は 520 kDa にピークとして観察された (Fig. 4B)。他の複数のピークは Vg を単独で溶出したとき (Fig. 4A) には見られないことから、WSF 中に含まれる蛋白質成分と考えられた。16 時間後 (Fig. 4C) には、先ほどの Vg ピークは消失し、360 kDa に Vg より低分子側にシフトしたピークが出現した。このピークはアメマス卵黄蛋白質の Lv の溶出位置 (340 kDa) とほぼ一致していた。また β' の溶出位置にも小さいピークが観察された (30 kDa)。

ゲル濾過による各溶出画分を Dot blotting に供したと

Fig. 4. Pattern of elution of biotinylated vitellogenin from the Superose 6 gel filtration column.

Vitellogenin (A) was digested with a water soluble fraction from charr eggs for 0 hr (B) or 16 hr (C) at pH 5.2 and 37°C.

ころ、0 時間ではチューブ No. 27 (溶出位置 13-13.5 ml) および No. 35 (17-17.5 ml) に streptavidin-HRP により検出されたピークが観察された。一方、16 時間後にはチューブ No. 28-29 (13.5-14.5 ml) および No. 35 にピークが確認された。Fig. 5 に示すように、0 時間の No. 27-28 には、abc 法を用いた WB において精製 Vg と同様な 165 kDa および 125 kDa のメインバンドが観察された。No. 35 にはより低分子のバンドが 6-7 本観察された。一方、16 時間後の No. 27-29 には、0 時間に見られた 165 kDa および 125 kDa のバンドはほとんど消化されており、92 kDa のバンドがメインバンドとなった。また No. 35 には 17 kDa 付近に 2 本のメインバンドが観察された。反応 16 時間後におけるこれらの画分を a-Lv および a- β' を用いた WB に供した結果を Fig. 6 に示す。0 時間において、a-Lv はチューブ No. 27-28 において 165 kDa および 125 kDa のメインバンドを認識したが、16 時間後では No. 27-29 において Lv の heavy chain と同様な 92 kDa のメインバンドおよび light chain よりわずかに高分子の位置 (32 kDa) に 1 本のバンドが観察された。しかしながら No. 35 においては反応を示さなかった。一方、a- β' を

Fig. 5. Western blots of fractions eluted from the Superose 6 column and detected using streptavidin-HRP.

Samples applied to the column and incubation conditions were the same as indicated in Fig. 4. Numbers in the upper area of the photograph represent sequential 0.5 ml fractions eluted from the gel filtration column.

Fig. 6. Western blots of fractions eluted from the Superose 6 column done using antisera against lipovitellin (a-Lv) and β' -component (a- β').

Samples applied to the column and incubation conditions were the same as in Fig. 4. Numbers in the upper area of the photograph represent sequential 0.5 ml fractions eluted from the gel filtration column, as in Fig. 5.

用いた場合は、0時間でa-Lvと同様にチューブNo. 27-28にVg (165 kDa) のバンドが見られたが、16時間においてはNo. 27-29に反応はなく、No. 35に β' と同様な分子量 (17 kDa) を持つ一本のメインバンドとその前後に反応性の弱い2本のバンドが観察された。以上のことよりWSFには弱酸性下でVgを卵黄蛋白質であるLvおよび β' とほぼ一致した分子量および抗原性を持つ蛋白質へと分解する因子が存在していることが

明らかとなった。

ウシカテプシンDによるVgの分解 BCDに加え、カテプシンDのインヒビターであるペプスタチンA (PA) の存在および非存在下で反応直後 (0時間) および16時間後のビオチン化Vgの溶出パターンおよび各溶出画分のリン測定結果をFig. 7に示した。0時間において (Fig. 7A & 7C), 全ての試料で波長280 nmでの吸光値およびリンのピーク (366 nm) がチューブNo. 27に観察され、一方BCDの試料においてはNo. 35に見られた。16時間後には (Fig. 7B & 7D) PAの非存在下でVgにBCDを添加した試料においてのみ、第一ピークが低分子側にシフトし、No. 29に蛋白質およびリンのピークが観察された。またPAの存在に関わらず、BCDを添加した試料においてはNo. 35の蛋白質ピークが0時間に比べ増大したが、リンの第二ピークが新たにNo. 33に出現した。これらのピークをa-Lvおよびa- β' を用いたWBにより解析した結果 (Fig. 8), 各々の泳動パターンはWSFによるVg分解のWB像とほぼ一致していた。即ち、0時間においては両抗体はVgと考えられる165 kDaのメインバンドを染色した。16時間後ではa-LvはチューブNo. 27および29に92 kDaのLvのheavy chainと考えられるメインバンドを、a- β' はNo. 35に17 kDa付近の2本のバンドを認めた。これによりBCDはVg分解においてWSFと良く似た作用を持つことが明らかとなった。

考 察

Vgを分解する際の至適条件に関して、pH, 反応温度および時間をSDS-PAGEにより検討した結果、37°C, pH 5.2で16時間以上反応する条件下で最も卵黄蛋白質抽出液に近い電気泳動パターンが得られた (Fig. 2 & Fig. 3)。pH 4.5-5.2の範囲においても実験を行ったが、pH 5.2より酸性側では基質としてのVgが沈殿し検出が不可能であった。ニトリカテプシンDを用いたニトリVgの分解実験では、pH 5.4-5.6の間で37°C, 16時間反応する条件が至適な条件であり、¹⁰⁾ 今回のアメマスVgでの実験結果とはほぼ同様であった。今回の結果により示された至適pH 5.2はRetzek *et al.*¹⁰⁾ の結果 (pH 5.4-5.6) より若干低い。しかしながらBCDを用いて行ったElkin *et al.*¹¹⁾ の結果は、同じニトリVgを基質としているにも関わらずpH 5.8が最適であったとしている。このことはカテプシンDのVg分解における至適条件に種差があることを示している。

アメマスのビオチン化VgにWSFを37°C, pH 5.2の条件下で反応した場合、165 kDaのVgのサブユニットバンドは0時間で消失した (Fig. 3)。しかしながら、92 kDaのLvのheavy chainにはほぼ完全に転換される

Fig. 7. Protein (A, B) and phosphorus (C, D) contents of fractions eluted from the Superose 6 gel filtration column.

Protein and phosphorus contents are expressed as absorbance at 280 nm and 366 nm, respectively. b-Vg, biotinylated vitellogenin; b-Vg+BCD, b-Vg incubated with bovine cathepsin-D; b-Vg+BCD+PA, b-Vg incubated with both bovine cathepsin-D and pepstatin A. Incubation conditions and fraction volumes were the same as in Fig. 4.

には16時間を必要とした。このことはインタクトVgの分解はかなり短時間のうちに起こっているが完全な卵黄蛋白質へ転換するには時間を要することが推察される。一方、ゲル濾過パターンでは、反応16時間後にVgピークの消失とLvおよび β' の溶出位置に新たにピークが観察された。Vg, Lvおよび β' の溶出される画分をabc法または α -Lvと α - β' を用いたWBにより解析した結果 (Fig. 5 & Fig. 6), チューブNo. 27-29では反応直後には α -Lvおよび α - β' に反応する165 kDaのVgのバンドが保存されていたのに対し、16時間後には α -Lvにのみ反応する92 kDaのバンドに消化されていた。このゲル濾過による解析に関して、添加したWSF濃度は反応直後におけるビテロゲニンのピークを観察できるように設定した (5 mg/ml)。反応直後に165 kDaのバンドが保存されていたことは、Fig. 3での結果と一

致しないが、このことは加えたWSF量が少なかったためと考えられる。チューブNo. 35には、16時間後に α - β' のみに反応する17 kDaのバンドが観察された。これらの溶出位置およびポリペプチドの分子量は卵黄から精製したLvおよび β' のものとはほぼ一致していた。このことはWSFにより一部のVgは完全に卵黄蛋白質成分へ分解されたことを示している。しかしながらいくつかの卵黄蛋白質の泳動パターンに見られないポリペプチドバンドがabc法を用いたWBにより観察された。またLvのlight chainと考えられるバンドは精製Lvに観察されるもの (29 kDa) より若干高い分子量 (32 kDa) を示した。これらの原因として、Vgをbiotin標識していること、WSF中に正常な転換反応を阻害している因子が存在している可能性があることおよびWSF添加量が不足していたこと等が挙げられる。またFig.

Fig. 8. Western blots of fractions eluted from Superose 6 column using antisera against lipovitellin (a-Lv) and β' -component (a- β').

The fractions, indicated by numbers in the upper area of the photograph, are the same as those from the b-Vg+BCD digests shown in Fig. 7.

1およびFig. 3に見られるように、abc法を用いたWBによる検出はCBBより感度が高く前者に観察されるマイナーなバンドはCBBでは確認されなかった。CBBでは観察されず、abc法を用いたWBにより濃く染色されたバンドは、Vgの分子表面上にあり、biotin-7-NHSの結合部位を多く有するペプチドと考えられた。実際CBBにより観察した結果は、卵抽出液のパターンと良く一致していた (Fig. 3)。

Pvは一般にその分子内のセリン残基に多量のリンを結合していることが知られている。そのため他の蛋白質とは異なる様々な特徴を有する。⁶⁾ すなわち、PvはCBBに染色性を示さず、抗原性を持たず、波長280 nmに吸収がほとんどない。実験結果には示していないが、WSFを用いたVgの分解後のゲル濾過溶出画分のリンを測定した結果、 β' の溶出位置 (チューブNo. 35) 以降にリンのピークが観察された。Pvは20 kDa前後であるため30 kDa前後の β' より低分子側に溶出される⁶⁾ことから、このリンピークはPvによるものと考えられる。しかしながら、今回abc法を用いたWBにおいてチューブNo. 35以降に反応性を示すバンドは見られなかった。このことはbiotin標識の際、Vg分子中のPv領域にリンによるbiotin結合の阻害があったのではないかと推察している。

近年、両生類 *Xenopus* において、Vgが卵内に取り込まれ卵黄蛋白質を構築する経路に関して、金コロイドおよびヨードラベルしたVgをトレーサーとして電顕により詳細に報告された。¹²⁾ その結果、ビテログニンレセプターと結合し卵内に取り込まれたVgはMVB内に入

り、数時間のうちにVgの液状化および結晶化が観察されている。一方、Wall and Patel¹³⁾はVgの卵内貯蔵の際の最終的な形態であるheavy yolk plateletへの変化およびVgの卵黄蛋白質への転換にはMVBの経由が必要であることを報告している。このことはMVBはVgの卵黄蛋白質への分解に重要な役割を持っていることを示している。さらにカテプシンDの阻害剤であるPAの存在下ではこのheavy yolk plateletへの変化および卵黄蛋白質への分解は起こらない。¹⁴⁾ 鳥類では、Vgおよびvery low density lipoprotein (VLDL)の両卵黄蛋白前駆物質をニワトリ卵から精製したカテプシンDと直接反応させた。¹⁰⁾ その結果、VgおよびVLDLともSDS-PAGEにおいて卵黄蛋白質 (LvとPvおよびyolk VLDL)と同様なポリペプチドバンドに特異的に分解された。これらの結果はVg分子分解過程へのカテプシンDの関与を強く示唆している。

本研究ではWSFを用いたVg分解実験に加え、BCDによるVg分解能の観察を行った。BCDを用いて行ったアメマスVgの分解実験は、WSFを用いた時とはほぼ一致した結果を示した (Fig. 7 & Fig. 8)。PAを添加することによりBCDのVg分解活性はほぼ阻害されたが、若干の分解がリン測定の結果から確認された。BCDの添加により、16時間後、リンのピークはチューブNo. 27から29および33にシフトした。No. 27のピークはVg、No. 29はLvのリン脂質を反映していると考えられる。No. 33のピークについては蛋白質ピークが観察されないことよりPv由来であると考えられるが、溶出位置が β' よりも高分子位であった。これらの分子量の相違に関し、魚類Vgの分解実験には乳類のカテプシンDを使用したことが原因である可能性がある。Elkin *et al.*¹¹⁾のBCDを用いたニワトリVgの分解能は、Retzek *et al.*¹⁰⁾のニワトリカテプシンDを用いた結果ほどには完全でない。また前記2つの報告により示されたVg分解に対する最適pHはpH 5.4-5.8であったのに対し、今回のBCDの分解条件はWSFとの比較のためpH 5.2で行った。さらに遺伝子レベルではニワトリカテプシンDは、魚類のカテプシンDと約88%の高い相同性を示したが、触媒としての機能を伴ういわゆるプロセッシング領域やaromatic残基の欠如など、種間での相違を示している。¹⁰⁾

今回の研究は、魚類において*in vitro*でVgを直接卵黄蛋白質成分へ分解した最初の例である。また本結果はWSFがBCDと良く似たVgの分解能を示したことから、サケ科魚類のVg分子分解過程の一部には少なくともカテプシンD様酵素が触媒作用を果たしている可能性を強く示唆した。WSF中にアメマスのカテプシンDが存在しているか否かは今回の実験では明らかでない。

しかしながら、ニワトリ卵からのカテプシンDの精製は、そのステップの第一段階でWSF画分を用いている。¹⁰⁾ サケ科魚類のVgの卵黄蛋白質への分解能を理解するためには、同種のカテプシンDを精製し分解実験を行う必要があると考えられる。今後、サケ科魚類のVg分解酵素を同定しその機構を解析することは、魚類の卵黄形成機構に新たな知見を加えるばかりでなく、正常な卵形成を行っている卵か否かのいわゆる卵質の評価へ応用可能となるであろう。

謝 辞

本稿を進めるにあたり、ご指導を頂いた北海道大学水産学部機能生物学講座、山内皓平教授に深く感謝の意を表すと共に、貴重な御助言を頂いた同講座、足立伸次助教授および三浦猛助手に厚く御礼申し上げる。また本稿の英文校閲を賜った米国ノースキャロライナ大学理学部、Craig V. Sullivan 教授に深甚なる謝意を表す。本実験の一部は、水産庁新品種作出基礎技術開発事業および文部省科学研究費補助金における研究補助金によってなされた。

文 献

- 1) T. B. Ng and D. R. Idler: Yolk formation and differentiation in teleost fishes, in "Fish Physiology" (ed. by W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson), Vol. 9, Academic Press, New York, 1983, pp. 373-404.
- 2) R. A. Wallace: Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates, in "Developmental Biology" (ed. by L. W. Browder), Vol. 1, Plenum Press, New York, 1985, pp. 127-177.
- 3) T. P. Mommsen and P. L. Walsh: Vitellogenesis and oocyte assembly, in "Fish Physiology" (ed. by W. S. Hoar and D. J. Randall), Vol. 11A, Academic Press, New York, 1988, pp. 347-406.
- 4) K. Selman and R. A. Wallace: Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, **6**, 211-231 (1989).
- 5) R. A. Wallace: Oocyte growth in nonmammalian vertebrates, in "The Vertebrate Ovary" (ed. by R. E. Jones), Plenum Press, New York, 1978, pp. 469-502.
- 6) N. Hiramatsu and A. Hara: Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **115A**, 243-251 (1996).
- 7) H. C. Kwon, A. Hara, Y. Mugiya, and J. Yamada: Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in whitespotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bull. Fac. Hokkaido Univ.*, **41**, 162-180 (1990).
- 8) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 9) O. Gamst and K. Try: Determination of serum-phosphate without deproteinization by ultraviolet spectrophotometry of the phosphomolybdic acid complex. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **40**, 483-486 (1980).
- 10) H. Retzek, E. Steyrer, E. J. Sanders, J. Nimpf, and W. J. Schneider: Molecular cloning and functional characterization of chicken cathepsin D, a key enzyme for yolk formation. *DNA Cell Biol.*, **11**, 661-672 (1992).
- 11) R. G. Elkin, M. B. Freed, S. A. H. Danetz, and C. A. Bidwell: Proteolysis of Japanese quail and chicken plasma apolipoprotein B and vitellogenin by cathepsin D: similarity of the resulting protein fragments with egg yolk polypeptides. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112B**, 191-196 (1995).
- 12) D. A. Wall and S. Patel: Multivesicular bodies play a key role in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocyte. *Dev. Biol.*, **119**, 275-289 (1987).
- 13) D. A. Wall and S. Patel: The intracellular fate of vitellogenin in *Xenopus* oocytes is determined by its extracellular concentration during endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **262**, 14779-14879 (1987).
- 14) L. K. Opresko and R. A. Karpf: Specific proteolysis regulated fusion between endocytic compartments in *Xenopus* oocyte. *Cell*, **51**, 557-568 (1987).