受賞者総説

魚類卵黄タンパク質前駆物質に関する免疫生化学的研究

(平成 12 年度日本水産学会賞進歩賞受賞)

原 彰 彦*

北海道大学大学院水産科学研究科

Immunobiochemical Studies on Precursor of Egg Yolk Proteins in Fish

Akihiko Hara*

Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

一般に卵生脊椎動物（鳥類，爬虫類，両生類，魚類）では，卵黄形成に伴い血中に特異的に出現するタンパク質がある。このタンパク質は卵黄タンパク質の前駆物質，即ちビテロジェニンとして知られている。ビテロジェニンはエストロジェンにより肝臓で合成され，血流を介して卵に取り込まれ，卵黄タンパク質として貯蔵される。筆者は，魚類血清タンパク質の研究中に鉄結合性の雌特異タンパク質を見出した。以降，サケ科魚類を主な対象種として，雌特異鉄結合性タンパク質をビテロジェニンと同定し，卵黄タンパク質との関連性を明らかにするとともに精製法，定量法を確立し，卵黄形成に伴う血中量の動態など卵黄形成機構に関して研究を行ってきた。ここでは，これまで得られた研究成果ならびに外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）のバイオマーカーとしてのビテロジェニンに関する知見を概説する。

1. 雌特異タンパク質，ビテロジェニン

20 世紀の初め，Uhlenhuth，児玉¹⁾は「性別反応ノ研究」と題した論文の中で，成熟した卵を持つコイ血液中に，コイ卵の抽出液に対する抗血清と免疫沈降反応をする雌に特異な抗原が存在することを見出し，この物質を ovumin と命名した。その後，1960 年以降，電気泳動法，ゲル濾過法，イオン交換クロマトグラフィー，超遠心分析法などの新たに開発された分析法により多くの魚種で血中に雌特異タンパク質が存在することが明らかにされた。1969 年，昆虫の卵黄形成期（vitellogenesis）の血液に出現する雌特異タンパク質に初めてビテロジェニン（vitellogenin）の名称が提唱され，²⁾ 鳥類，両生類など他動物でもこの種のタンパク質に使われるようになった。

筆者は数種の魚類の血清タンパク質に関して，電気泳動的手法を用いて種差並びに個体差を観察中，雌特異的に出現するトランスフェリンとは異なる鉄結合性タンパク質の存在を見出した。^{3,4)} サケ科魚類（シロサケ *Oncorhynchus keta* 及びニジマス *O. mykiss*）の成熟雌魚血清並びに卵抽出液に対する抗体を雄血清で吸収して作製した吸収抗血清を用いることにより，血清中に 2 つの雌特異抗原があることを確認した。このうち鉄結合性タンパク質を分離精製し，物理化学的性状から魚類のビテロジェニンであると同定した。^{5,6)} 鉄結合性を有しない雌特異血清タンパク質は，ビテロジェニンのフラグメント，即ちビテロジェニンを構成する β' -コンポーネント（後述）と同一の抗原性をもつ成分であることが後にわかった。⁷⁾ また，これらのタンパク質はエストロジェン処理をした魚の血清中にも誘導され，免疫学的にもビテロジェニンと同一であることを示した。⁵⁾ さらに免疫組織学的手法を用いて，ビテロジェニンの肝臓における局在性を観察した。^{8,9)} 一方，他の魚種においても複数の雌特異血清タンパク質が存在することもわかってきた。メダカ *Oryzias latipes* では 3 成分，¹⁰⁾ エゾメバル *Sebastes taczanowskii* では 4-5 成分¹¹⁾ が検出された。これらのタンパク質のうち，メダカではビテロジェニン以外の 2 つの成分は卵黄形成期以前に血中に観察され，しかもエストロジェンで誘導されることから，最近報告された卵膜タンパク質前駆物質であるコリオジェニン¹²⁾ である可能性が考えられる。卵黄形成期に特異的に出現するビテロジェニン以外の雌特異血清タンパク質に関しては，未解明な部分も多く今後の研究が期待される。

* Tel : +81-138-40-8878, Fax : +81-138-40-8878, E-mail : aki@pop.fish.hokudai.ac.jp

2. ビテロジェニンと卵黄タンパク質

筆者は、サケ科魚類のビテロジェニンの精製法として、卵黄形成期の雌血清を低イオン強度で沈澱させ、直ちにゲル濾過カラムへ添加し分離する方法を確立した。^{5,13)} 本法は操作が簡単で短時間で分離でき、分解を受けやすいビテロジェニンの精製法として優れていると考えられる。また沈澱しにくい試料や他魚種でのビテロジェニンの分離にはハイドロキシルアパタイトカラムによる精製法を開発した。^{6,7)} この方法は無脊椎動物であるエビ類¹⁴⁾や貝類¹⁵⁾のビテロジェニン並びにビテリンの精製にも広く用いることができた。

一方、卵黄タンパク質としては、3つの成分、すなわち約20%の脂質を含むリポビテリン、リンを約10%含有するホスピチン及び魚類に特有とされている卵黄タンパク質である β' -コンポーネントが知られていた。ホスピチンはアミノ酸組成のうちセリンが50%を占め、通常のタンパク染色には染まらず、280 nmの吸収がほとんどなく、しかも抗原性が弱い特殊なタンパク質である。筆者は、Markert and Vanstone¹⁶⁾の方法に順じて、ニジマス、ギンザケ *Oncorhynchus kisutch*, アメマス *Salvelinus leucomaenis* の卵黄タンパク質を egg protein 1 (E1: リポビテリン) 及び egg protein 2 (E2: β' -コンポーネント及びホスピチン分画) として分離し、それぞれの抗体を作製した。ビテロジェニンと E1 及び E2 の抗原性を比較し、ビテロジェニンが少なくとも2つの卵黄タンパク質 (E1, E2) から構成されることを示した。^{5,7,13)} E1 はリポビテリンであると同定できたが、E2 に関しては、抗原としては β' -コンポーネント及びホスピチンを含む分画、抗体としては β' -コンポーネントであることがその後にはわかった。イトウ *Hucho perryi* を用いて、これまで困難であったホスピチンに対する抗体を脱リン化した抗原を用いることにより作製することに成功し、ビテロジェニンが3つの卵黄タンパク質へ分子解裂することを免疫拡散法並びに Western blot 法により魚類で初めて証明した。¹⁷⁾ イトウのビテロジェニンは240 kDaのサブユニットからなる540 kDaの2量体であり、H鎖92 kDa、L鎖29 kDaのそれぞれ2つよりなる330 kDaのリポビテリン、17 kDaからなる34 kDaの β' -コンポーネント、及び23 kDaの分子量をもつホスピチンから構成されると考えられた。また、ビオチン標識したビテロジェニンを用い、直接ビテロジェニンが牛カテプシン D により卵黄タンパク質へ分解されることを観察し、卵内でカテプシン D 様酵素により特異的に分解されることを強く示唆した。¹⁸⁾ 一方、ビテロジェニンの卵への特異的な取り込みに関しては、ビテロジェニン受容体の存在が明らかとなり、ビテロジェニン分子内のリポビテリンドメインが受容体結合部位であると考えている。¹⁹⁾

貯蔵タンパク質としての卵黄タンパク質は、受精後の胚発生において栄養を補給する役割を担う。サケ科魚類では、発眼期以降にリポビテリン H 鎖の低分子化並びにホスピチンの脱リン化が起こることが明らかになった。また β' -コンポーネントは発生段階を通じて変化しないこともわかった。²⁰⁾ これらタンパク質はペプチドとして胚に吸収されることが示唆された。一方、浮遊性卵を産む海産魚類では血清中に2種類のビテロジェニン (Vg A, Vg B) が存在し、それぞれからリポビテリン、ホスピチン及び β' -コンポーネントが分子解裂することも初めて明らかとなった。さらに卵黄形成を終了した最終成熟から排卵時にすでに一部卵黄タンパク質の低分子化がはじまり、アミノ酸まで分解されることにより吸水に伴う浮力獲得への関与が示唆された。²¹⁾

筆者らが明らかにした魚類ビテロジェニンの一般的な性質をまとめると、以下ようになる。1) 卵黄形成期の雌血清中に特異的に出現するタンパク質である。2) 雄及び未熟雌魚にエストロジェンを投与することにより、血中に誘導されるタンパク質である。3) 鉄を結合する糖、脂質、リンを含む高分子 (450–600 kDa) の複合タンパク質である。4) 卵の抽出液を免疫して得られる抗血清と反応する卵黄タンパク質 (リポビテリン、 β' -コンポーネント及びホスピチン) の前駆物質である。

3. 血清ビテロジェニンの定量

ビテロジェニンの定量法としては、抗体を用いた免疫学的測定法が一般的である。測定に用いる抗血清としては初期にはビテロジェニンに対する抗体を用いたが、サケ科魚類で β' -コンポーネントが遊離した形で血清に出現することがわかってからは、より正確に定量するために抗リポビテリン血清を用い、ビテロジェニンをスタンダードとすることにより測定を行うようにした。測定初期においては検出限界 20 $\mu\text{g/ml}$ の寒天ゲル内一元放射免疫拡散法 (Mancini 法) により、エストロジェン処理魚血清におけるビテロジェニンの動態や卵黄形成に伴う変化を、サケ科魚類、ウナギ *Anguilla japonica*, ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*, カワヤツメウナギ *Lampetra japonica*, チョウザメ (*Huso huso* ♀ x *Acipenser ruthenus* ♂) などについて観察した。^{22–26)}

その後、酵素免疫測定法 (EIA) を完成することにより、数 ng/ml の濃度が測定可能となり、卵黄形成初期におけるビテロジェニンの詳細を観察できるようになった。^{27–29)} ここでは代表的な魚種として卵黄形成期が比較的長期間にわたるイトウ³⁰⁾の例を紹介する。池で飼育しているイトウは、通常、6–7年で採卵できる。血清ビテロジェニンは3年魚で数 ng/ml–10 $\mu\text{g/ml}$ で検出される個体が観察され、その後徐々に増加し、採卵1年前には1 mg/ml となり、さらに急速に増加し、採卵数ヶ

月前には数 10 mg/ml に達する。このように、雌血清中のビテロジェニンは、数 ng/ml から数 10 mg/ml と他の血清タンパク質と比較して極めて広い範囲で変化する。最近ではサケ科魚類成長ホルモンの測定法として開発した数 10 pg/ml の感度を有する化学発光イムノアッセイ法 (CLIA)³¹⁾ を導入したことにより、さらに簡便かつ迅速なビテロジェニン定量法をルーチン化した。また、サケ科魚類ビテロジェニンの一次スクリーニングのための迅速な検出法として、イムノクロマトグラフィーを民間企業と共同開発した。³²⁾ 作製したイムノクロマトグラフィーは、試料添加後 2-15 分以内に判定ができ、30 ng/ml の感度を有する。

4. 雄魚血中のビテロジェニン

雌に特異的に出現するビテロジェニンの水産増養殖への関りは、早期雌雄判別法の指標タンパク質として、また成熟度合いのモニタリングなどに役立ってきた。一方、1995 年頃から雄血中に出現するビテロジェニンが、水圏の環境ホルモンのなかのエストロジェン作用を持つ物質 (環境エストロジェン) の影響評価を行うバイオマーカーとして注目されはじめた。ビテロジェニンをを用いた国内外の調査研究の事例は総説で紹介した。^{33,34)} 筆者らが、国内で初めて多摩川に放出している下水処理場下に生息するコイについて調査したところ、雄血清に最高 12 mg/ml の高濃度のビテロジェニンが観察され、さらに EIA 法で測定した結果では、95% 以上の雄個体にビテロジェニンが検出された。³⁴⁾ 本結果を受け、その後建設省を中心に全国的な野生ゴイの調査が開始され、現在も継続中である。

一方、正常に再生産を行っている飼育環境下でのコイ雄血中にビテロジェニンが出現することがわかってきた。1 つの要因として飼料中に含まれる植物性エストロジェンの影響が考えられた。そこで筆者らは、池中養殖のサケ科魚類を用いて雄魚血中のビテロジェニン並びにエストラジオール-17 β に関して詳細にそれらの変動を観察した。1 月から 3 月頃に採卵するカットスロートトラウト *Oncorhynchus clarki* の周年変化を調べた結果、雌のビテロジェニンは冬期間にエストラジオール-17 β の上昇とともに増加する。雄魚においては、周年エストラジオール-17 β は 200 pg/ml 前後で推移するが、冬期に一過性に上昇し、その時期雄魚においてビテロジェニンが検出され、最高数 μ g/ml を示した。これらの結果から、雄のビテロジェニンのベースライン濃度を 10 μ g/ml と設定し、この濃度を越える個体は何らかの外因性エストロジェン物質に曝露された可能性があると判断できることを提唱した。³²⁾ 雄魚のビテロジェニンの出現要因としては、餌由来のエストロジェンの他に、共存している雌魚の尿中のエストロジェン物質が考えられる。こ

の点に関しては、予備的データを蓄積中であり今後の研究により明らかにされるであろう。北海道に天然に生息しているアメマスについて一部調査したところ、現在までは 10 μ g/ml を越える雄個体は出現していない。

先に述べたように、近年ビテロジェニンと同様エストロジェンにより誘導される卵膜タンパク質前駆物質、コリオジェニンが報告された。¹²⁾ これまで魚類の卵膜内層を構成するタンパク質は、卵巣内で産生されると考えられていたが、メダカにおいて肝臓で合成された後、血流を介して卵巣に運ばれることが明らかとなった。筆者らの研究室ではこれまでサケ科魚類を用いてメダカと同様、2 種のコリオジェニン (コリオジェニン H 及び L) を精製し、これらに対する抗体を作製後、測定法を確立した。³⁵⁾ エストロジェン処理したサクラマスでは処理濃度が低い場合はコリオジェニン (H 及び L) がビテロジェニンより血中濃度が高く、エストロジェン処理濃度が高くなるに従い、ビテロジェニン量がコリオジェニンを上回ることがわかってきた。同様な現象は、前卵黄形成期においても観察された。低濃度のエストロジェン処理の場合、コリオジェニンはビテロジェニンより血中濃度が高いことから、今後、低濃度のエストロジェン様物質の影響を調べる上で良いマーカーになると考えられる。ビテロジェニンの動向とあわせ、今後フィールドでの環境エストロジェン様物質の影響調査に役立つことが期待される。

エストロジェンで支配されるビテロジェニン及びコリオジェニンの研究は、水産増養殖における基礎並びに応用面から重要な課題である。一方、これらタンパク質は今後ますます環境科学分野でバイオマーカーとして用いられると予測される。最近、鳥類および両生類と同様、魚類でも複数のビテロジェニン遺伝子がクローニングされ、遺伝子レベルの研究と併せ、基礎的研究の蓄積が重要となろう。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、研究の“イロハ”からご指導並びにご助言を賜り終始温かく見守って頂いた故元田 茂北海道大学名誉教授、故佐藤忠勇の矢野養殖研究所長及び故平井秀松北海道大学名誉教授に謹んで感謝の意を表します。また、常に励ましを頂いた北海道大学山内皓平教授に心から感謝申し上げますとともに、共同研究を行ってきた多くの先輩、後輩諸氏に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Uhlenhuth P, 児玉豊次郎. 性別反応の研究. 日衛誌 1914; 10: 13-34.
- 2) Pan MJ, Bell WJ, Telfer WH. Vitellogenic blood protein

- synthesis by insect fat body. *Science* 1969; **165**: 393-394.
- 3) 原 彰彦. 魚類血清蛋白の電気泳動的, 免疫学的分析. 日水誌 1975; **41**: 105-113.
 - 4) Hara A. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta* 1976; **427**: 549-557.
 - 5) Hara A, Hirai H. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1978; **59B**: 339-343.
 - 6) 原 彰彦. サケ血清蛋白の性差ならびにメス特異蛋白の精製. 日水誌 1978; **44**: 689-693.
 - 7) 原 彰彦, 松原孝博, 実吉峯郎, 高野和則. アメマスのビテロゲニンと卵黄蛋白. 北大水産彙報 1984; **35**: 144-153.
 - 8) 布村 渉, 原 彰彦, 高野和則, 平井秀松. サケ科魚類肝におけるビテロゲニンの免疫組織学的局在. 北大水産彙報 1983; **34**: 79-87.
 - 9) Hara A. Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: immunochemical, physicochemical and structural studies. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 1987; **34**: 1-59.
 - 10) Hara A, Takano K, Hirai H. Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (Teleosts). *Comp. Biochem. Physiol.* 1983; **76A**: 135-141.
 - 11) 原 彰彦, 竹村明洋, 松原孝博, 高野和則. エゾメバル雌特異血清蛋白の免疫学的検索. 北大水産彙報 1986; **37**: 101-110.
 - 12) Yamagami K. Studies on the hatching enzyme (choriolytin) and its substrate, egg envelope, constructed of the precursors (choriogenins) in *Oryzias latipes*: a sequel to the information in 1991/1992. *Zool. Sci.* 1996; **13**: 331-340.
 - 13) Hara A, Sullivan CV, Dickhoff WW. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.* 1993; **10**: 245-256.
 - 14) Quinitio ET, Hara A, Yamauchi K, Fuji A. Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. *Invertebrate Reproduction and Development* 1990; **17**: 221-227.
 - 15) Suzuki T, Hara A, Yamaguchi K, Mori K. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 1992; **113**: 239-245.
 - 16) Markert JR, Vanstone WE. Egg proteins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma. *J. Fish. Res. Bd Can.* 1971; **28**: 1853-1856.
 - 17) Hiramatsu N, Hara A. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1996; **115A**: 243-251.
 - 18) 平松尚志, 原 彰彦. アメマス (*Salvelinus leucomaenis*) ビテロゲニンの卵黄蛋白への特異的分解. 日水誌 1997; **63**: 701-708.
 - 19) Hiramatsu N, Fukada H, Sullivan CV, Hara A. Simple and sensitive detection of vitellogenin receptor(s) in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Bull. Fish. Hokkaido Univ.* 2001; **52**: 5-9.
 - 20) Hiramatsu N, Ichikawa N, Hosokawa K, Hara A. Limited proteolysis of vitellogenin and its derived yolk proteins in salmonids. In Kawashima S, Kikuyama S *Advances in Comparative Endocrinology*, (eds) Monduzzi Editore, Bologna Italy, 1997; 1481-1486.
 - 21) Matsubara T, Ohkubo N, Ando T, Sullivan CV, Hara A. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 1999; **213**: 18-32.
 - 22) 高島葉二, 高野和則, 原 彰彦. 人為催熟ウナギ (*Anguilla japonica*) 雌の成熟に伴う雌特異血清蛋白の変化. 北大水産彙報 1979; **30**: 50-61.
 - 23) 寺西哲夫, 原 彰彦, 高橋裕哉. ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の生殖周期に伴うビテロジェニンの変動. 北大水産彙報 1981; **32**: 281-292.
 - 24) Fukayama S, Takahashi H, Matsubara T, Hara A. Profiles of the female-specific serum protein in the Japanese river lamprey, *Lampetra japonica* (MARTENS), and the sand lamprey, *Lampetra reissneri* (DYBOWSKI), in relation to sexual maturation. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; **84B**: 497-501.
 - 25) Fujii K, Hirose H, Hara A, Shiraishi M, Maruyama T. Use of vitellogenin level as a maturational indicator for artificial spawning of cultured hybrid sturgeon, *Huso huso* ♀ x *Acipenser ruthenus* ♂. In Williot P (ed) *Acipenser*, Cemagref Publ., 1991; 381-388.
 - 26) Tao Y, Hara A, Hodson RG, Woods III C, Sullivan CV. Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 1993; **12**: 31-46.
 - 27) Kwon HC, Mugiya Y, Yamada J, Hara A. Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in white-spotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 1990; **41**: 241-259.
 - 28) Okumura H, Hara A., Saeki F, Todo T, Adachi S, Yamauchi K. Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.* 1995; **61**: 283-289.
 - 29) Matsubara T, Wada T, Hara A. Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1994; **109B**: 545-555.
 - 30) Hiramatsu N, Shimizu M, Fukada H, Kitamura M, Ura K, Fuda H, Hara A. Transition of serum vitellogenin cycle in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **118C**: 149-157.
 - 31) Fukada H, Hiramatsu N, Kitamura M, Chiba H, Hara A. Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for salmon growth hormone (GH). *J. Biolumin. Chemilumin.* 1997; **12**: 271-275.
 - 32) 原 彰彦. 魚類の卵形成と雌特異蛋白質ビテロジェニン. 化学と生物 2001; **39**: 29-36.
 - 33) 原 彰彦. 魚の血液で環境ホルモン汚染をみる—バイオマーカーとしての血清タンパク, ビテロジェニン. 科学 (岩波書店) 1998; **68**: 591-596.
 - 34) 原 彰彦. 内分泌攪乱物質の生態影響—魚類への影響. 廃棄物学会誌 1999; **10**: 278-287.
 - 35) Shimizu M, Fujita T, Hara A. Purification of the precursors to vitelline envelope proteins from serum of Sakhalin taimen, *Hucho perryi*. *J. Exp. Zool.* 1998; **282**: 385-395.