

## マダイおよびベステルのビテロジェニンに関する研究

藤井 一 則

### Studies on Vitellogenin in Red Sea Bream and Bester

Kazunori Fujii

**Abstract** Vitellogenin (Vg), a female-specific protein found in serum of fish with developing oocytes, is a precursor to egg yolk proteins that provide nutrients during early stage development. The objective of this study was to improve artificial propagation of red sea bream, *Pagrus major*, and the bester, a hybrid sturgeon cross between female *Huso huso* and male *Acipenser ruthenus*.

(1) Two specific proteins were identified in sera from vitellogenic red sea bream females. These proteins showed female specificity, estrogen ( $E_2$ ) inductivity, and antigenic similarity to major egg yolk proteins. Consequently, both of the proteins were confirmed as Vg. (2) The red sea bream Vgs were purified by hydroxylapatite chromatography followed by gel filtration chromatography. (3) A single radial immunodiffusion method (SRID) was developed for the quantification of red sea bream Vgs using antiserum against red sea bream egg yolk proteins. The sensitivity range of the SRID was 20.7  $\mu\text{l/ml}$  to 42.4 mg/ml of Vgs with 1 day incubation on a 1% antiserum plate. (4) In vivo effects of  $E_2$  on Vg synthesis were investigated in red sea bream. Vg synthesis by hepatocytes was found to be dependent upon dose and time of  $E_2$  administration. (5) Vitellogenin in serum of female red sea bream was first detected when oocytes reached the latter part of the primary yolk stage (from mid-December to late January). From that point on, serum Vg levels increased during oocyte growth, reaching a maximum level (2.75 mg/ml) in the spawning season (April). (6) Two red sea bream Vg cDNA fragments, 855 and 3,539 base-pairs, were cloned and sequenced. Both cDNAs encoded unique protein, each which appeared to be carboxyl-terminal fragments of Vgs. (7) Serum Vg of female bester was first detected by SRID when the most mature oocytes of the female reached 0.9 mm in diameter. Serum Vg levels increased during oocyte growth, sharply decreased when oocytes reached 2.9 mm in diameter, and increased again when oocytes became over-ripe. The increase of Vg is thought to be caused by re-absorption of egg yolk proteins. (8) The concentration of serum Vg, the oocyte germinal vesicle position, body weight, and in vitro oocyte maturation response to progesterone can be used as maturational indicators for female bester propagation. (9) Artificial spawning of bester was successfully induced for the first time in Japan by selecting female using Vg as a maturational predictor of ovarian development.

**Key words:** red sea bream, sturgeon, bester, vitellogenin, maturation

#### 目 次

第1章 緒 言
第2章 マダイビテロジェニンの精製
第3章 マダイビテロジェニンの免疫学的定量
第4章 マダイビテロジェニン遺伝子のクローニング

第5章 ビテロジェニンによるベステルの成熟度判定
第6章 ビテロジェニンを指標としたベステルの種苗生産
謝 辞
要 約
文 献

2000年1月24日受理 (Accepted on January 24, 2000)

瀬戸内海区水産研究所業績 A 第9号 (Contribution No. A 9 from National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea)  
藤井一則: 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (K. Fujii: National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

## 第1章 緒 言

### 研究の背景

世界人口は急激な増加を示しており、1990年の53億人から2050年には100億人に達すると予想されている。この急激な人口の増加に対応して食料を確保するためには、鈍化した陸上での供給に比べ、海洋における食料供給産業である水産業への期待が大きい。また、国連海洋法条約発効に伴い、我が国においても排他的経済水域及びその周辺水域の水産資源の持続的利用方策の確立が大きな課題となっている。これらの視点から、水産増養殖にかけられた期待は極めて大きく、内水面利用を含め、つくり育てる漁業をより成果のあるものとするための技術開発が益々重要になっている。

一方で、我が国の漁業経営体数および漁業就業者数は、年々減少しており、就業者の高齢化も一層高まっている。今や水産業は、若年層にとって魅力のない職場になっており、そのブレイクスルーが研究分野にまで求められている。さらに、水産物は、国民への動物性タンパク質の最大の供給源としての位置を維持してはいるが、国内供給の減少を輸入が補う形で推移しており、価格面での問題点以外にも国民のニーズに応える供給体制の確立が要求されている。

このような背景から、消費者のニーズに応える魚、即ち漁業者にとっても魅力のある新しい養殖魚の開発が求められている。新しい養殖魚の開発には、2通りの方法があり、1つは既存の魚の改良、他の1つはこれまで養殖対象とされていない魚種の養殖である。後者には、我が国既存の魚の中から探し出す方法と、外国産の魚を導入する方法がある。いずれの場合も新たな魚種の養殖魚化には、餌や飼育環境などの飼育方法を確立すると共に、安定的にしかも適正価格で種苗が入手できる体制を整える必要がある。特に、外国産新魚種の導入には、国内での種苗生産を確立する事が大きな課題となる。

ここで取り上げたチョウザメは、養殖魚としての適正を調べるために1978年から1983年にかけてソ連（現ロシア）から導入されたバス（*Huso huso* 雌と *Acipenser ruthenus* 雄を掛け合わせた属間交配種）であり、主に受精卵で送られてきた（丸山他 1987）。以来、孵化から成魚に至る飼育試験が行われ、飼育面での技術的な問題点はほぼ解決された。しかしながら、成熟卵を得ることが出来なかったため、国内での種苗生産が出来ない状況が続いていた。飼育下におけるチョウザメの自然産卵は、現在でも例がなく、産卵の引き金となる何らかの環境因子の欠如が原因であると推測されている。

本研究は、筆者のこれまで行ってきたビテロジェニンの基礎研究および応用研究の成果をまとめたものであるが、そのきっかけとなったのがチョウザメの種苗生産技

術の開発である。飼育環境下では自然産卵することのないチョウザメから成熟卵を得るためには、ホルモンを投与することにより人為的に成熟、産卵を誘導しなければならない。過去にも先人により、その試みは幾度となく行われてきたが、いずれも良い結果が得られていなかった。筆者は、成熟卵が得られない原因がホルモン投与のタイミングにあると推測し、最適投与時期すなわち良い親魚を選別するために、雌魚の成熟度判定法を開発することにした。最も確実な成熟度判定法は、生殖腺の一部を生検により摘出し、組織学的観察を行うことであるが、手間がかかる上に魚に与える負の影響が大きくなる恐れがある。また、性ステロイドホルモン量も成熟度を知るための指標になると考えられたが、その定量には放射性同位体を使う必要があり、技術の普及を見据えた場合、適当ではないと考えられた。その点ビテロジェニンは、極少量の血液試料があれば簡便に定量でき、魚体に与えるダメージは最小限に抑えることが出来る。さらに、雌雄判別にも応用できるという利点もあり、雌の成熟指標に最適であると考えられた。

本研究では、ビテロジェニンに関する基礎研究にはマダイを用い、応用研究にはバスを用いた。基礎研究にマダイを用いた理由は、当初の研究対象であったバスが上述のように雑種であり、基礎研究の材料としては適していないと考えたこと、およびマダイを用いて魚類の性成熟の流れを解明しようとするプロジェクト研究（バイオメディア計画、農林水産技術会議）において、卵黄形成に関する研究を筆者が担当したためである。

本研究は、魚類のビテロジェニンの性状を探るとともに、その成果が健全な種苗生産に資することを目的とした。

### 序 論

ビテロジェニンは、卵生生物全般に見られる卵黄タンパク質の前駆物質であり、ラテン語の卵黄を意味する vitellus の素という意味である。Pan *et al.* (1969) が昆虫においてこの名称を使ったのが最初であり、現在では卵生生物全般に広く用いられている。しかし、魚類のビテロジェニンの存在は Pan *et al.* が報告する以前から知られており、Vanstone and Ho (1961) は、電気泳動法における移動度の低いバンドとして検出している。彼らは、ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* を用いた実験で、雄や未熟雌の血清には見られず、成熟した雌の血清にのみ見られることから、このタンパク質は血清中の卵黄タンパク質 (serum vitelin) であろうと推察している。また、Urist and Schjeide (1961) は、エストロゲンの投与により血清中に特定のタンパク質が増加することを報告しており、Krauel and Ridgway (1963) は、ベニザケ *Oncorhynchus nerka* の成熟した雌にのみ血清中に出現

する抗原物質として Sm antigen と呼ぶ新たなタンパク質の出現を報告していた。その後、Merkert and Vanstone (1971) は、ギンザケの卵抽出液から3種類の卵黄タンパク質を精製し、少なくともその内の2つが両生類で明らかにされていた2種類の卵黄タンパク質、リポビテリン (lipovitellin) とフォスビチン (phosvitin) に相当するタンパク質であると報告している。ピテロジェニンという名称が昆虫以外でも使われるようになってからも (Wallace 1970), Aida et al. (1973a, 1973b) は、成熟を開始したアユの雌の血漿中に特異的に現れるタンパク質を female specific plasma protein と呼び、エストロゲンの投与により未熟雌や雄の血漿中にも出現すること、卵巣抽出液中に共通抗原性を有するタンパク質が存在することを明らかにしている。魚の卵黄タンパク質前駆物質をピテロジェニンと最初に呼称したのは、Emmersen and Petersen (1976) であろう。彼らは、卵黄形成期の雌の flounder *Platichthys flesus* 血清中にアルカリ不安定リンを含むリポタンパク質の存在を示し、エストロゲン投与により雄や未熟雌にも合成が誘導されることから、そのタンパク質を既に両生類等でも使われるようになっていたピテロジェニンという名で呼び、Emmersen and Emmersen (1976) は、卵黄形成過程の肝臓における RNA 合成の変化から、エストロゲンの標的器官、即ちピテロジェニンの産生器官を肝臓であると推察している。同時期に Hara (1976) は、成熟したニジマス雌の血清中にトランスフェリンとは別の鉄との結合能を有するタンパク質を見出し、female-specific serum protein (FS) と呼称している。また、Hara and Hirai (1978) は、免疫学的手法による卵黄タンパク質との共通抗原性、エストロゲン投与による雄および未熟雌での発現誘導等から、FS が卵黄タンパク質の前駆物質すなわちピテロジェニンであることを証明した。その後、ピテロジェニンという名称は魚類でも広く使われるようになり、上記以外にも、円口類のカワヤツメ *Lampetra japonica* (Fukayama et al. 1986)、スナヤツメ *Lampetra reissneri* (Fukayama et al. 1986)、板鰓類のトラザメ *Scyliorhynchus canicula* (Craik 1978)、硬骨魚類ではチョウザメ目のベステル (藤井他 1987b, Amiri et al. 1996)、シロチョウザメ *Acipenser transmontanus* (Kroll and Doroshov 1991, Moberg et al. 1991)、シベリアチョウザメ *Acipenser baeri* (Cuisset et al. 1991, Pelissero et al. 1991)、サケ目のサケ *Oncorhynchus keta* (原 1978, Ueda et al. 1984)、サクラマス *Oncorhynchus masou* (太田他 1984)、タイセイヨウサケ *Salmo salar* (Wiegand and Idler 1984, So et al. 1985)、ブラウントラウト *Salmo trutta* (Crim and Idler 1978, Norberg and Haux 1988)、アメマス *Salvelinus leucomaenis* (原他 1984)、カワマス *Salvelinus fontinalis* (Tam et al. 1990)、コイ目のキン

ギョ *Carassius auratus* (Hori et al. 1979, de Vlaming et al. 1980)、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (寺西他 1981)、ゼブラフィッシュ *Brachydanio rerio* (Heesen and Engels 1973)、トウゴロウイワシ目のカダヤシ *Gambusia affinis* (Denison et al. 1981)、メダカ *Oryzias latipes* (Hara et al. 1983, Murakami et al. 1991)、マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* (Kanungo et al. 1990)、グッピー *Poecilia reticulata* (Hori et al. 1991)、ウナギ目のウナギ *Anguilla japonica* (Hara et al. 1980)、ヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* (Petersen and Korsgaard 1989)、スズキ目の goby *Gobius niger* (Le Menn 1979)、ティラピア *Oreochromis aureus* (Ding et al. 1989)、*Oreochromis niloticus* (Chan et al. 1991)、*Oreochromis mossambicus* (Kishida and Specker 1994)、spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* (Copeland and Thomas 1988)、sea bass *Dicentrarchus labrax* (Mananos et al. 1994a, 1994b)、striped bass *Morone saxatilis* (Kishida et al. 1992, Tao et al. 1993)、white perch *Morone americana* (Monosson et al. 1994)、マダイ *Pagrus major* (原他 1987)、red drum *Sciaenopus ocellata* (Ghosh and Thomas 1995)、カレイ目の sole *Solea vulgaris* (Nunez Rodriguez et al. 1989)、turbot *Scophthalmus maximus* (Silversand and Haux 1989, Silversand et al. 1993)、winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Nagler et al. 1993)、flounder *Platichthys flesus* (Povlsen et al. 1990)、English sole *Parophrys ventulus* (Johnson et al. 1991)、Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Norberg 1995)、オヒョウ *Hippoglossus stenolepis* (松原・澤野 1992)、マツカワ *Verasper moseri* (Matsubara and Sawano 1995)、ナマズ目の catfish *Heteropneustes fossilis* (Nath and Sundararaj 1981a, 1981b)、*Clarias gariepinus* (Van Weerd et al. 1991)、アメリカナマズ *Ictalurus punctatus* (Bradley and Grizzle 1989)、カサゴ目のエゾメバル *Sebastes taczanowskii* (原他 1986)、ニジカジカ *Alcichthys alcicornis* (Choi et al. 1995)、トゲウオ目のハリヨ *Gasterosteus aculeatus* (Covens et al. 1988)、ニシン目のマイワシ *Sardinops melanostictus* (Matsubara et al. 1994) 等、多くの魚種で研究がなされている。

これまでの研究報告から魚類のピテロジェニンの諸特性をまとめると、(1)卵黄形成期の雌に特異的に発現している、(2)卵濾胞により産生されるエストロゲンにより肝臓で産生される、(3)卵黄形成期の卵母細胞に特異的に取り込まれ、卵母細胞内で分子開裂し卵黄タンパク質となる、(4)卵発生から孵化仔稚が餌を捕り始めるまでの主要な栄養源であり、他の物質と結合して卵母細胞内への輸送を行う、こと等が明らかにされてきた。

(1)の雌特異性に関しては、上述のように1961年以来、雌の成熟過程におけるビテロジェニン量の変化あるいは血清タンパク質の雌雄の差として多くの報告がある。しかし、魚種によっては複数の雌特異血清タンパク質の存在が報告されており (Plack *et al.* 1971, Aida *et al.* 1973a, Le Menn 1979), メダカ (Hara *et al.* 1983) やエゾメバル (原他 1986) では卵黄形成期以前の雌血清中にも出現している成分が確認されている。したがってビテロジェニンが雌特異血清タンパク質であることは間違いないが、雌特異血清タンパク質が全てビテロジェニン、即ち卵黄タンパク質前駆物質であるとは言えない可能性が残されている。また、近年イワシに見られる複数の雌特異血清タンパク質の内の1つは、卵膜形成に関わっていることが示唆されており (Matsubara *et al.* 1994), 雌特異血清タンパク質の役割を個々に詳細に調べる必要があろう。

(2)のビテロジェニンの産生に関しては、魚の場合、その産生臓器が両生類や鳥類と同様肝臓であり、卵濾胞組織で産生されるエストロゲンの直接的な誘導によることが明らかにされている。エストロゲンの産生に関しては、長浜らのグループが明らかにしている。彼らは、卵胞の大きなサケ科魚類を用いて卵濾胞組織の莢膜細胞と顆粒膜細胞とを分離培養し、莢膜細胞で生殖腺刺激ホルモン (GtH) の作用によりコレステロールからテストステロンが、顆粒膜細胞では GtH の有無に関係無くテストステロンからエストロゲン (estradiol-17 $\beta$ , 以下 E<sub>2</sub>) が生合成されることを見出した (Nagahama *et al.* 1982, Kagawa *et al.* 1982a, 1982b, 1983)。

このように産生された E<sub>2</sub> は、血流を介して肝臓に働き、ビテロジェニン産生に直接働くことがニジマスの培養肝細胞を用いた実験により証明されている (Vaillant *et al.* 1988, Kwon *et al.* 1993)。しかし、ウナギでは、培養肝細胞のビテロジェニン産生を E<sub>2</sub> 単独で誘導するためには、ニジマスの100倍という非生理的多量の E<sub>2</sub> (10<sup>-4</sup>M) を投与する必要がある (Komatsu and Hayashi 1997)。また、ウナギのビテロジェニン産生には、成長ホルモンあるいはプロラクチンの関与も示唆されており (Kwon and Mugiya 1994), 魚種別にビテロジェニンの産生機構を解明する必要があろう。

ビテロジェニンの発現機構は、ステロイドホルモン誘導型の遺伝子発現のモデルとして、主にニワトリ *Gallus domesticus* やアフリカツメガエル *Xenopus laevis* のビテロジェニンを中心に明らかにされてきた (Lazier and MacKay 1993)。それらを要約すると、E<sub>2</sub> は肝細胞に存在する E<sub>2</sub> 受容体と複合体を形成してゲノム上のエストロゲンレスポンスエレメントに結合し、その下流にあるビテロジェニン遺伝子の発現を誘導する。転写、翻訳されたビテロジェニン分子は、肝細胞内で脂質、リン酸、

糖鎖などの修飾を受けた後、血中へと放出される。このような肝細胞内における遺伝子レベルのビテロジェニン産生機構については、魚類での研究例は未だ報告されていない。

(3)に挙げたビテロジェニンの卵母細胞への取り込みおよび卵内での挙動に関しては以下のような報告がある。肝細胞で産生され、血中に放出されたビテロジェニンは、血流に乗って卵母細胞に到達し、GtH 及び特異的な受容体の関与により取り込まれる (Stifani *et al.* 1988, Lancaster and Tyler 1994)。卵母細胞に取り込まれたビテロジェニンは、分子開裂を受けて脂質に富んだ lipovitellin と、リン及びセリンを多く含む phosvitin に分かれる。これらの卵黄タンパク質は卵黄顆粒の主成分となるがその形成機構は明らかではない。また、ウナギではビテロジェニンと卵黄タンパク質の分子量が変わらないとの報告があり (Hara *et al.* 1980), 全ての種で分子開裂が起こるのではない可能性が示唆されている。

(4)に挙げたように、卵黄タンパク質は、卵発生から孵化仔稚が餌を捕り始めるまでの主要栄養源であり、他の物質と結合して卵母細胞内への輸送を行う役目も果たしている。カエルの場合、卵黄は卵黄小板として存在し、この中に卵のタンパク質態窒素の80%以上、リンタンパク質の90%以上が含まれるが (原 1985), 魚類の場合も、成熟卵の主要タンパク質はビテロジェニン由来である。Matsubara and Sawano (1995) によると、マツカワのビテロジェニンは、卵母細胞への取り込み時および最終成熟の際の2回にわたり分解を受け、特に最終成熟時の分解により派生した遊離アミノ酸が、吸水現象を引き起こすと共に、卵発生におけるエネルギー源になると考察している。また、ビテロジェニンは、脂質、糖、リンを含む複合タンパク質であると共に、鉄などの金属類やカロテノイド等を結合して卵母細胞内へと運び込む輸送タンパク質としての役割も果たしている (Hara 1976, Ando and Hatano 1986, Ando *et al.* 1986, Ghosh and Thomas 1995)。

これまでの研究結果から、ビテロジェニンは卵形成過程における主要なタンパク質であり、卵やふ化仔魚の質を左右する極めて重要な因子であると考えられている。本研究では、マダイビテロジェニンの精製法および定量法を確立し、タンパク質レベルでの発現を検出した。さらに、マダイビテロジェニン cDNA をクローニングし、その構造を解析した。これらの成果は、ビテロジェニンの機能解析への発展、さらには良質の親魚や種苗を生産するための基礎となることが期待される。また、その応用として、血清中のビテロジェニンが雌魚の成熟指標となることを示し、ビテロジェニンを主たる指標として選別した雌親魚を用いて、我が国で初めてのチョウザメの種苗生産に成功した。これらの成果は、今後種苗生産が

困難とされている魚種の、種苗生産技術の確立にも役立つものと期待される。

以下にその研究結果を報告する。

## 第2章 マダイピテロジェニンの精製

一般に、タンパク質に関する研究は、その精製から始まる。特定のタンパク質を定量するためには、精製したタンパク質を標品とした標準曲線を求める必要があり、遺伝子解析の出発点となるアミノ酸配列の部分決定には、高純度の精製タンパク質が要求されるからである。タンパク質の精製には、一般的にカラムクロマトグラフィーが用いられ、これまでに報告されているピテロジェニンの精製法としても、イオン交換カラムやヒドロキシルアパタイトカラムが多く使用されている。しかしながら、これらクロマトグラフィーの条件決定や比較検討に関する詳細な報告はなく、回収率さえ記載されていない場合が多い。

ここでは、陰イオン交換体であるジエチルアミノエチル (DEAE) セルロースおよびヒドロキシルアパタイトを用いて、マダイのピテロジェニン精製における特性を検討するとともに、最適条件にて精製を行った。

### 材料と方法

供試魚：養殖業者より購入し、養殖研究所南勢庁舎の網生け簀 (5×5×5 m) で飼育した平均体重 1.7 kg のマダイ 3 年魚を、産卵期である 4 月に取り上げ、排卵が確認された魚を成熟雌マダイ、排精が確認された魚を成熟雄マダイとした。取り上げた魚から採血し、雌雄別にプールして 4°C にて一晩静置した後、2,000×g、15 分間遠心し、血清を分離した。なお、血清は使用時まで -20°C にて保管した。

卵抽出液：成熟雌マダイより摘出した卵巣卵に、1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride を含む 10 mM リン酸緩衝液 (PBS; 150 mM NaCl, 0.05% アジ化ナトリウムを含む, pH7.5) を 10 倍量 (容量/重量) 添加し、ホモジナイズ後、遠心 (4°C, 15,000×g, 30 分間) した。遠心後、透明感のある中層をピペットで採取し、卵抽出液とした。

エストロゲン処理：養殖業者より購入した平均体重 2 kg のマダイを屋外に設置した組立式円形水槽 (2 t) に収容した。E<sub>2</sub> (Sigma) を 10 mg/ml となるようにプロピレングリコール (和光純薬) に溶解し、雄 3 尾に対し体重 1 kg 当たり E<sub>2</sub> 量として 2 mg を腹腔内に注射した。注射後 7 日目に採血し、成熟マダイと同様に血清を分離した (E<sub>2</sub> 処理マダイ血清)。

抗雄マダイ血清ウサギ抗体：雄マダイ血清タンパク質に対する抗体 (anti-M) は、以下のようにして作成した。(1) 成熟雄マダイ血清 0.5 ml とフロイドの完全アジュバント (Difco) 0.5 ml を別々のガラス製注射器に取り、

3 方コックでつないで完全に乳化するまで混合、(2) 乳化物を家兎の背部 10ヶ所程に皮下注射、(3) 更に 2 週間後、雄血清のみを 0.5 ml 同様に注射、(4) 最終注射 2 週間後に耳縁辺部の血管より採血し、抗血清を分離、(5) Protein G カラム (Amersham Pharmacia) により anti-M を精製した。

抗マダイ卵抽出液ウサギ抗体：卵抽出液を用いて上記と同手順で家兎に免疫し、抗マダイ卵抽出液抗血清を作成した。同抗血清を雄血清で吸収操作した後、特異抗体 (anti-E) を精製した。吸収操作以降は、以下の手順で行った。(1) 抗血清に同量の雄血清を添加混合し、4°C で 1 晩静置、(2) 4°C, 15,000×g, 30 分間遠心して沈殿物を除去し、上清をポアサイズ 0.45 μm のフィルター (Advantec, DISMIC 25CS045AN) で濾過、(3) Protein G カラムにより anti-E を精製した。

タンパク質量の測定：血清中の総タンパク質量は、池田 (1977) の方法に若干の修正を加えたビュレット法 (マイクロアッセイ法)、精製過程における各画分のタンパク質量はマイクロアッセイ法あるいはプロテインアッセイキット (Bio-Rad) により、ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma, fraction V) を標準タンパク質として測定した。マイクロアッセイ法は、以下の手順で行った。試料を平底の 96 穴マルチプレートに添加し、ビュレット試薬 (0.15% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 3.0% NaOH, 0.6% NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.1% KI) あるいは濁度補正試薬 (3.0% NaOH, 0.6% NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.1% KI) を各 200 μl 加えて 30 分間反応させた。反応液の最大吸収波長は、545 nm であるが、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, model 3550) には同波長のフィルターが無かったため、最も近い波長である 595 nm での吸光度を測定した。マイクロアッセイ法で試料中のタンパク質量を測定するにあたり、池田 (1977) の方法と比較するとともに、反応時間、試料容量、試料濃度の最適条件を検討した。

ゲル濾過クロマトグラフィー：ゲル濾過は、TSKgel G2000SW (東ソー, 0.75×60 cm) と TSKgel G3000SW (東ソー, 0.75×30 cm) の連結、あるいは Superose 6 pg (Amersham Pharmacia, 1.6×60 cm) と Superose 12 pg (Amersham Pharmacia, 1.6×30 cm) を連結したものを、溶出液に 5 mM EDTA および 1% グリセロールを含む PBS を用いた。また、流速は 0.5 ml/min で、TSKgel は 1 ml, Superose は 2 ml 毎に分取した。なお、各画分中のピテロジェニン含量は、次章で述べる放射免疫拡散法により測定した。分子量の推定には、標準タンパク質として thyroglobulin (分子量 670,000), bovine gamma globulin (分子量 158,000), chicken ovalbumin (分子量 44,000), equine myoglobin (分子量 17,000) および vitamin B-12 (分子量 1,350) を用いた。

なお、本章の液体クロマトグラフィーには全て Waters 625 LC system を用いた。

**DEAE セルロースクロマトグラフィー**：まず、クロマトグラフィーにおける条件を検討するために、試験管テストを行った。溶出液としては、pH7.5 から pH9.5 まで 0.5 刻みに調整した 1.0M トリス塩酸緩衝液 (TB)，結合液としては、同 TB の 10 倍希釈液 (0.1M TB) を使用した。DEAE Sephacel (Amersham Pharmacia) 0.5 ml を 1.5 ml 容量のディスポーザブル遠沈管に取り、各 pH の 0.1M TB で平衡化した。同 TB で 10 倍希釈した成熟雌マダイ血清 (希釈血清) 0.8 ml を各遠沈管に添加し、ロータリーシェーカーで 10 分間インキュベートした後、500×g で 5 分間遠心し、上清 (未結合画分) を取り除いた。残存する未結合タンパク質は、1 ml の同 TB で 3 回洗浄する事により除去した (未結合画分)。DEAE Sephacel に結合したタンパク質は、各 pH の 1.0M TB 1 ml で 2 回溶出した (溶出画分)。希釈血清、未結合画分、溶出画分のタンパク質量およびビテロジェニン量を測定した。なお、濃縮率は、希釈血清と溶出画分の単位タンパク質量当たりのビテロジェニン量の比として求めた。

DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーには、上記試験管テストの結果から、pH7.5 の TB を用いた。0.1M TB で 5 倍希釈した E<sub>2</sub> 処理マダイ血清 1 ml を、同 TB で平衡化した DEAE Sephacel カラム (1×6.4 cm) に添加した。同 TB で洗浄後、TB の濃度を 1.0M まで直線的に上げ、担体に結合したタンパク質を溶出した。溶出タンパク質のピークは 280 nm で検出し、各ピークをゲル濾過クロマトグラフィーでさらに分画した後、各画分のタンパク質量およびビテロジェニン量を測定した。

**ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー**：DEAE セルロースクロマトグラフィーと同様に、まず試験管テストを行った。溶出液としては、pH6.0 から pH9.0 まで 0.5 刻みに調整した 1.2M リン酸カリウム緩衝液 (KP)，結合液としては、同 KP の 6 倍希釈液 (0.2M KP) を使用した。ヒドロキシルアパタイト (ナカライ) 0.2 g (膨潤後約 0.5 ml) を 1.5 ml 容量のディスポーザブル遠沈管に取り、各 pH の 0.2M KP で平衡化した。同 KP で 10 倍希釈した成熟雌マダイ血清 (希釈血清) 0.8 ml を各遠沈管に添加し、ロータリーシェーカーで 10 分間インキュベートした後、500×g で 5 分間遠心し、上清 (未結合画分) を取り除いた。残存する未結合タンパク質は、1 ml の同 KP で 3 回洗浄する事により除去した (未結合画分)。ヒドロキシルアパタイトに結合したタンパク質は、各 pH の 1.2M KP 1 ml で 2 回溶出した (溶出画分)。希釈血清、未結合画分、溶出画分のタンパク質量およびビテロジェニン量を測定した。なお、濃縮率は、希

釈血清と溶出画分の単位タンパク質量当たりのビテロジェニン量の比として求めた。

ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーには、上記試験管テストの結果から、pH9.0 の KP を用いた。0.2M KP で 5 倍希釈した E<sub>2</sub> 処理マダイ血清 1 ml を、同 KP で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラム (1×6.4 cm) に添加した。同 KP で洗浄後、KP の濃度を 1.2M まで直線的に上げ、担体に結合したタンパク質を溶出した。溶出タンパク質のピークは 280 nm で検出し、各ピークをゲル濾過クロマトグラフィーでさらに分画した後、各画分のタンパク質量およびビテロジェニン量を測定した。

**免疫電気泳動**：トリスバルビタール緩衝液 (8.86 g/l トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 4.48 g/l バルビタール, 0.11 g/l 乳酸カルシウム, 0.13 g/l アジ化ナトリウム, pH8.6) で 1.2% に調整したアガロース (FMC, SeaKem™ LE) 溶液 12 ml を加熱・溶解し、水平台上でガラス板 (84×94 mm) に密着させた GelBond™ Film (FMC) 上に注いだ。室温で放置し、ゲル化を確認後、免疫電気泳動用テンプレート (Amersham Pharmacia) に沿って 2.5 mm の試料穴を作成した。試料 5 μl および 0.1% プロモフェノールブルー (BPB) 溶液 1 μl を添加後、直ちに 5V/cm で泳動し、血清タンパク質に結合した BPB が約 3 cm 泳動された時点で終了した。泳動終了後、上記テンプレートに沿って溝を作成し、抗体 100 μl を添加した。湿潤箱内で 24 時間反応後、試料穴および抗体溝を蒸留水で洗い、濾紙 10 枚および 1 kg の重しを重ね、5 分間水分を除去した。200 ml の 3% 食塩水中で 15 分間振盪後、上記と同様に濾紙で水分を除去した後、蒸留水中で 15 分間振盪、脱水を 2 回繰り返した。その後 50°C の乾燥器中で完全に水分を除去し、染色液 (1% クマシーブリリアントブルー R-250 (CBB), 45% 酢酸, 45% メタノール, 10% 蒸留水) 中で 5 分間振盪した。染色後、脱色液 (45% 酢酸, 45% メタノール, 10% 蒸留水) に移して振盪し、バックグラウンドが透明となるまで液を数回交換した。

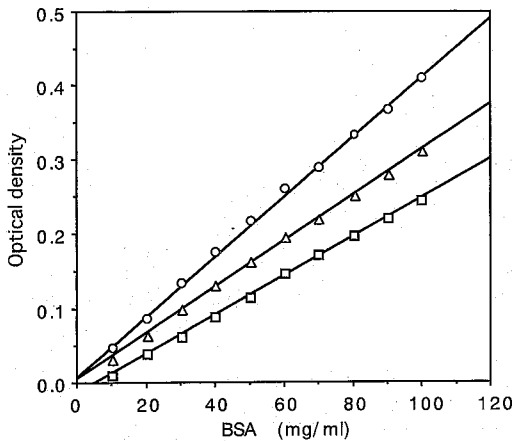
**SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング**：ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli (1970) に準じ、5-20% グラジュエントゲル (アトー、パジェル) を用いて行った。

泳動後のゲル中に含まれるタンパク質は、ポリビニリデンフルオリド膜 (ミリポア、イモビロン-P) にセミドライ方式で転写した (アトー、AE-6675)。転写後、膜を 3% スキムミルクを含む PBS 20 ml 中で 1 時間振盪し (ブロッッキング)、一次抗体として anti-E あるいは anti-M 20 μl を添加して、更に 1 時間振盪した。その後、膜を 0.1% Tween 20 を含み、アジ化ナトリウムを含まない PBS (PBS-T) 50 ml で 15 分間洗浄した (5 分毎に

新しい PBS-T に交換)。洗浄後の膜は、PBS-T で3,000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (Bio-Rad) 10 ml 中で1時間振盪した。上記と同様に膜を PBS-T で洗浄後、一次抗体が認識するバンドを0.01% o-ジアニシジン, 0.003% 4-クロロ-1-ナフトール, 0.01% 過酸化水素を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.5) で発色させた。

結 果

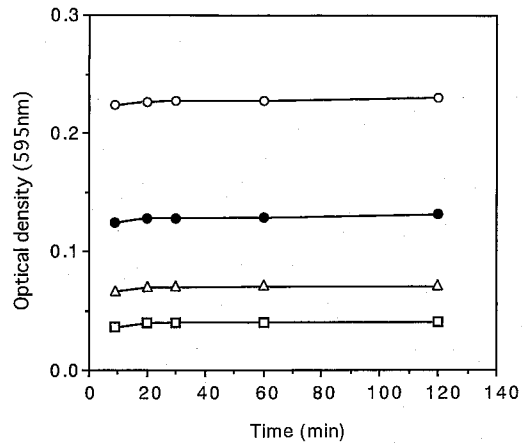
タンパク質量の測定：10~100 mg/ml の BSA 溶液を試料とし、池田 (1977) の方法 (試料 100  $\mu$ l, 試薬 4 ml, 光路長10mm, 反応時間30分) により、分光光度計 (日立, U-2000) で 545 nm (最大吸収波長) および 595 nm の吸光度を測定した結果と、マイクロアッセイ法 (試料 5  $\mu$ l, 試薬 200  $\mu$ l, 反応時間30分) によりマイクロプレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した結果を Fig. 2-1 に示す。タンパク質量と吸光度の関係を線形回帰分析 (最小二乗法) した結果、何れも高い相関を示し ( $r^2 > 0.99$ )、マイクロアッセイ法によるタンパク質量が可能であることが示された。



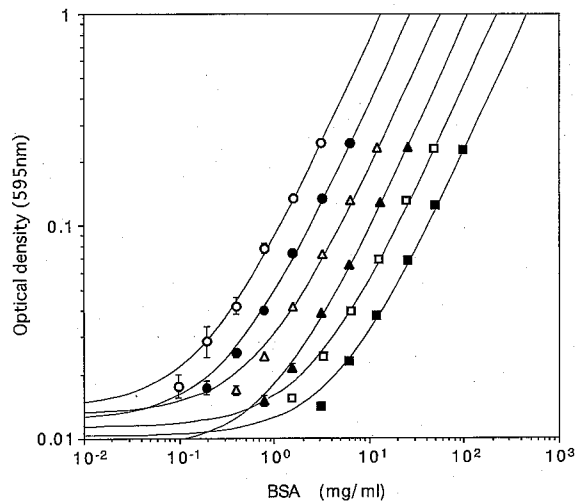
**Fig. 2-1.** Relation between the BSA concentration and biuret color intensity. The color intensity was measured by standard assay at 545 nm (circles;  $y = 7.6667e-3 + 4.0206e-3x$ ,  $r^2 = 0.998$ ), by standard assay at 595 nm (triangles;  $y = 5.5333e-3 + 3.0885e-3x$ ,  $r^2 = 0.999$ ), and by micro assay at 595 nm (squares;  $y = -1.2867e-2 + 2.6103e-3x$ ,  $r^2 = 0.999$ ).

マイクロアッセイ法におけるビュレット反応は、Fig. 2-2 に示すように30分間で完結し、少なくとも2時間は吸光度が安定していた。このため、以後の測定は池田 (1977) に準じ、反応時間を30分間とした。

次に、マイクロアッセイ法におけるタンパク質濃度と吸光度の関係を、試料容量別 (5~160  $\mu$ l) に調べた。結果は Fig. 2-3 に示すように、試料容量 5  $\mu$ l では、3.13



**Fig. 2-2.** Effects of incubation time on biuret color intensity in micro assay. BSA concentration is presented by open circles (100 mg/ml), closed circles (50 mg/ml), triangles (25 mg/ml), and squares (12.5 mg/ml).



**Fig. 2-3.** Relation between the BSA concentration and biuret color intensity by micro assay. Sample volume of BSA solution is represented by open circles (160  $\mu$ l;  $y = 1.4129e-2 + 7.5585e-2x$ ,  $r^2 = 0.999$ ), closed circles (80  $\mu$ l;  $y = 1.2367e-2 + 3.7246e-2x$ ,  $r^2 = 0.998$ ), open triangles (40  $\mu$ l;  $y = 1.3207e-2 + 1.7906e-2x$ ,  $r^2 = 0.997$ ), closed triangles (20  $\mu$ l;  $y = 8.9592e-3 + 9.0828e-3x$ ,  $r^2 = 0.999$ ), open squares (10  $\mu$ l;  $y = 1.1415e-2 + 4.5218e-3x$ ,  $r^2 = 0.998$ ), and closed squares (5  $\mu$ l;  $y = 1.0328e-2 + 2.1985e-3x$ ,  $r^2 = 0.998$ ).

~100 mg/ml, 10  $\mu$ l では、1.56~50 mg/ml, 20  $\mu$ l では、0.78~25 mg/ml, 40  $\mu$ l では、0.39~12.5 mg/ml, 80  $\mu$ l では、0.20~6.25 mg/ml, 160  $\mu$ l では 0.098~3.13 mg/ml の範囲で極めて相関の高い ( $r^2 > 0.99$ ) 回帰式が得られた。即ち、今回測定した範囲では、試料の容量に関わらず、絶対量として 15.6~500  $\mu$ g の範囲でタンパク質の定量が可能であることが明らかとなった。

なお、本法で測定したマダイの血清タンパク質量は、成熟雄 45.9 mg/ml, 成熟雌 58.3 mg/ml, E<sub>2</sub> 処理魚 87.8 mg/ml であった。これらの値は、池田 (1977) の方法に準じて求めた値、各々 43.8, 58.7, 87.3 mg/ml と良く一致した。

抗体の特性: Fig. 2-4 に anti-E および anti-M を用いた免疫電気泳動像を示した。anti-E に対し、成熟雌マダイ血清および E<sub>2</sub> 処理マダイ血清は試料穴から陽極側に伸びる主たる沈降線と、ほぼ同位置に 1 本の弱い沈降線が観察され、卵抽出液もほぼ同じ位置に 3 本の濃い沈降線と 2 本の弱い沈降線を形成した。一方、雄血清は anti-E とは全く反応せず、吸収操作が十分であることを示した。また、anti-M は成熟雄マダイ血清、成熟雌マダイ血清および E<sub>2</sub> 処理マダイ血清とは 10 数本の沈降線を形成したが、卵抽出液とは抗体溝の陽極側末端に強い 1 本の沈降線と 2~3 本の弱い沈降線のみが観察された。

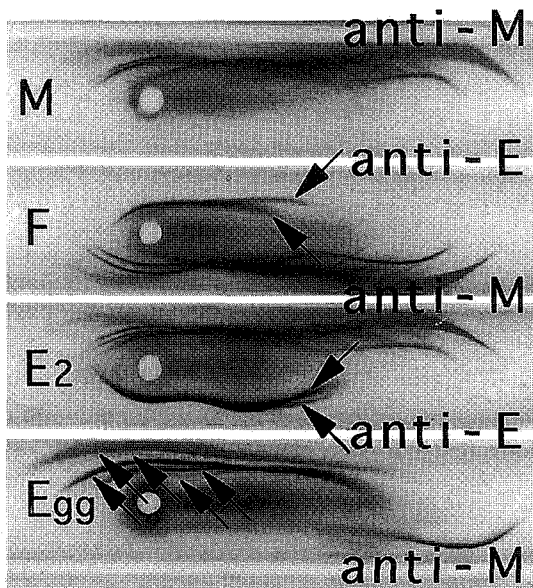


Fig. 2-4. Immunoelectrophoresis of male, female, and E<sub>2</sub>-treated fish serum, and egg extracts.

anti-M, antibody against male serum; anti-E, antibody against egg extracts absorbed with male serum; M, male serum; F, female serum; E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>-treated fish serum; Egg, egg extracts. Arrows show antigens in sera reacted with anti-E.

ゲル濾過クロマトグラフィー: 成熟雄マダイ血清、成熟雌マダイ血清および E<sub>2</sub> 処理マダイ血清を TSKgel を用いたゲル濾過に供し、放射免疫拡散法により各画分のビテロジェニン量を測定した結果を Fig. 2-5 に示す。ビテロジェニンは成熟雌マダイ血清および E<sub>2</sub> 処理マダイ血清の画分番号 21 にピークを形成し、分子量は 486 kDa

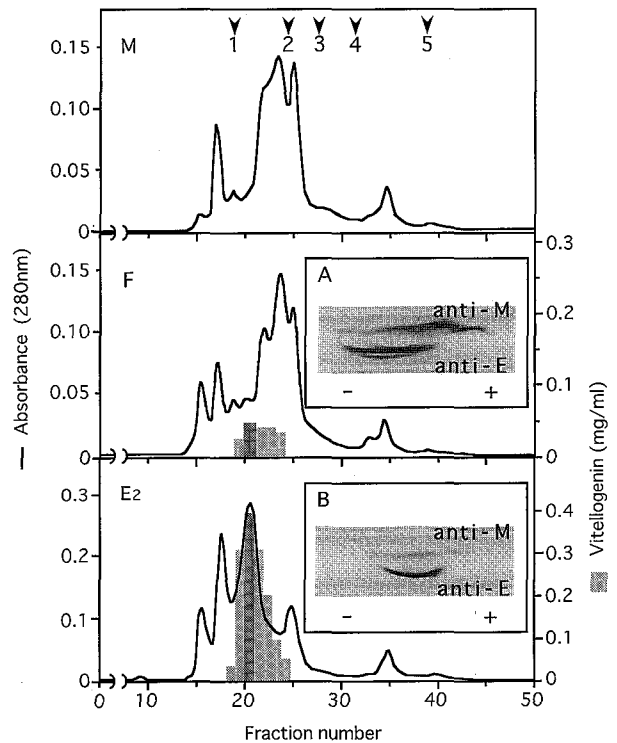


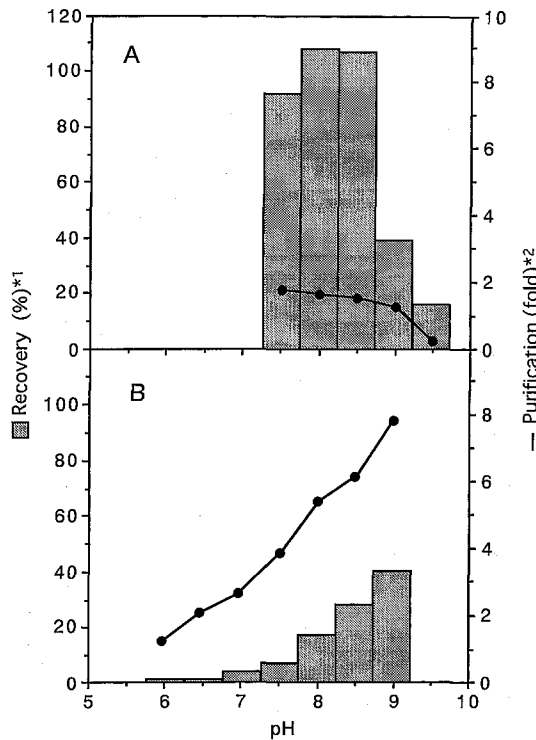
Fig. 2-5. Gel filtration chromatography of male (M), female (F), and E<sub>2</sub>-treated fish serum (E<sub>2</sub>) and immunoelectrophoresis of dark shaded fractions of female (A) and E<sub>2</sub>-treated fish serum (B). Upper arrows show elution positions of thyroglobulin (1; 670 kDa), bovine gamma globulin (2; 158 kDa), chicken ovalbumin (3; 44 kDa), equine myoglobin (4; 17 kDa), and vitamin B-12 (5; 1.35 kD). Abbreviations are the same as in Fig. 2-4.

であると推定された。しかし、この画分を免疫電気泳動に供した結果、anti-M と反応するタンパク質の混在が明らかになり、ゲル濾過法のみでは精製が不十分であることが示された (Fig. 2-5A, B)。なお、雄血清は、何れの画分も anti-E とは反応しなかった。

精製条件: 液体クロマトグラフィーによる精製条件を決めるために行った試験管テストの結果を Fig. 2-6 に示す。DEAE セルロースに吸着した成熟雌マダイ血清中のビテロジェニンは、pH7.5~8.5 の 1.0 M TB によりほぼ完全に溶出されたが、pH9.0 以上の TB では回収率が急激に減少した (Fig. 2-6A)。また、濃縮率も TB の pH が高くなるほど減少した。最も高いビテロジェニンの濃縮率は、pH7.5 の TB を使用時における 1.7 倍であった。以上の結果から、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにおける TB の最適 pH は、7.5 であると考えられた。

一方、ヒドロキシルアパタイトを用いた試験管テストの結果は、KP の pH が高いほどビテロジェニンの回収率および濃縮率が高くなる傾向を示した (Fig. 2-6B)。pH6.0 の KP を用いた場合の回収率は 1%, 濃縮率は





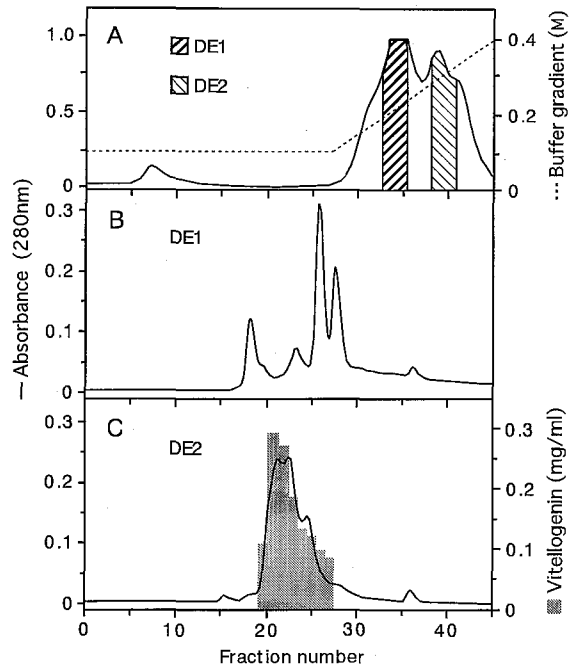
**Fig. 2-6.** Effects of pH level on recovery and purity of vitellogenin by DEAE-cellulose chromatography (A) and hydroxylapatite chromatography (B).

\*1 amount of vitellogenin in eluting fraction relative to amount of vitellogenin in original female serum.

\*2 purity of vitellogenin in eluting fraction relative to that in original female serum.

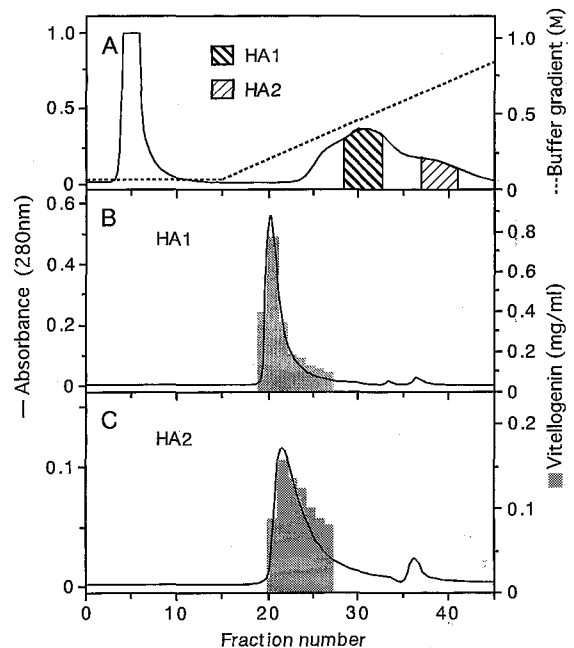
1.2倍であったのに対し、pH9.0のKPを用いた場合には、回収率が40%、濃縮率は7.9倍にまで高まった。以上の結果から、ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィーには、pH9.0のKPを用いることにした。

**DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー：**E<sub>2</sub> 処理マダイ血清を0.1M TB (pH7.5) で平衡化したDEAEセルロースカラムに添加し、緩衝液の濃度を勾配法により直線的に上昇させ、カラムに吸着した血清タンパク質を溶出した。添加した血清中のタンパク質の多くは、素通りすることなくカラムに吸着し、溶出液の濃度が0.4Mに上がるまでにその殆どが溶出された (Fig. 2-7A)。Fig. 2-7Aに示すクロマトグラムの2つのピークを指標とし、溶出画分をDE1とDE2としてプールした。DE1とDE2は、TSKgelを用いたゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに分画し、各画分中のビテロジェニン量を測定した。その結果、DE1のゲル濾過画分からは、全くビテロジェニンが検出されなかった (Fig. 2-7B)。一方、DE2のゲル濾過画分は、画分番号21をピークとしてビテロジェニンが検出されたが、その溶出位置は、280nmの吸光度のピークと一致しなかった (Fig. 2-7C)。



**Fig. 2-7.** Vitellogenin purification from E<sub>2</sub>-treated fish serum by gel filtration chromatography (B and C) following DEAE-cellulose chromatography (A).

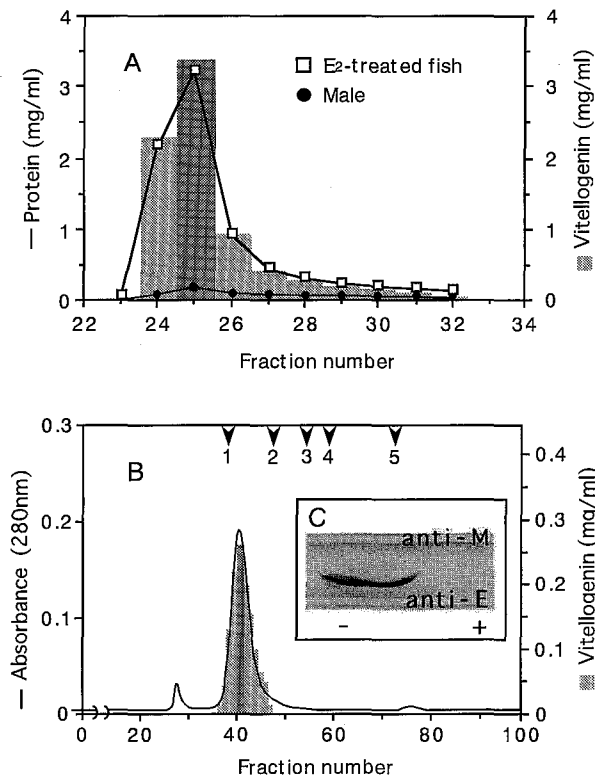
**ヒドロキシルアパタイトカラムクロマトグラフィー：**E<sub>2</sub> 処理マダイ血清を0.2M KP (pH9.0) で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラムに添加した場合、血清中の殆どのタンパク質はカラムに吸着せず、開始緩衝液により素通り・溶出した (Fig. 2-8A)。溶出液の濃度を直線的



**Fig. 2-8.** Vitellogenin purification from E<sub>2</sub>-treated fish serum by gel filtration chromatography (B and C) following hydroxylapatite chromatography (A).

に上げると、両側にショルダーを形成する 280 nm の吸光度ピークが現れ、HA1 および HA2 として分取した。HA1 と HA2 を TSKgel を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによってさらに分画した結果、各々分画番号21 (Fig. 2-8B) あるいは分画番号22 (Fig. 2-8C) にピテロジェニンのピークが検出された。これらのピテロジェニンの溶出位置は、280 nm の吸光度のピークと良く一致した。

上記の結果から、0.2M KP で平衡化したヒドロキシルアパタイトカラムには、ピテロジェニン以外の成分はほとんど吸着しないことが示唆されたため、成熟雄マダイ血清あるいはE<sub>2</sub> 処理マダイ血清を用いて、0.2M から1.2M への段階溶出を行った。その結果、雄血清成分はほとんどカラムを素通りし、1.2M KP での溶出におけるピーク画分 (画分番号25) でさえ、タンパク質濃度は0.14 mg/ml にすぎなかった。一方、E<sub>2</sub> 処理マダイ血清では、1.2M KP による大きな溶出ピークが見られた



**Fig. 2-9.** Purification of red sea bream vitellogenin by hydroxylapatite chromatography (A) and gel filtration chromatography (B).

The fraction (No. 25) of E<sub>2</sub>-treated fish serum eluted from hydroxylapatite using 1.2M KP was applied on Superose 6 pg column connected with Superose 12 pg column. Upper arrows show elution positions of standard proteins (see Fig. 2-5). The dark shaded fraction (No. 41) in B was tested for purity by immunoelectrophoresis (C). Abbreviations are the same as in Fig. 2-4.

(Fig. 2-9A)。ピーク画分 (画分番号25, 3.17 mg/ml) を Superose によるゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、280 nm の吸光度は、ポイドボリウム付近に小さなピークと分子量約 480 kDa の位置に左右対称の大きなピークを形成し、後者の吸光度ピークは、ピテロジェニンの溶出ピークと良く一致した (Fig. 2-9B)。Figure 2-9B の濃い斜線で表した画分番号41を免疫電気泳動に供した結果、雄血清タンパク質との共通抗原は完全に除かれていることが明らかになった (Fig. 2-9C)。本画分は、限外濾過による濃縮後、精製ピテロジェニンとして使用した。

**SDS-PAGE** およびウエスタンブロッティング：成熟雄マダイ血清 (M)、成熟雌マダイ血清 (F)、E<sub>2</sub> 処理マダイ血清 (E<sub>2</sub>) および精製ピテロジェニン (Vg) の SDS-PAGE (A) および anti-E (B)、anti-M (C) を用いたウエスタンブロッティングの結果を Fig. 2-10 に示す。精製ピテロジェニンは、SDS-PAGE によって、推定分子量 183 kDa の位置に主たるバンド、107 kDa、87 kDa の位置に比較的明瞭なバンドと、その他数本のマイナーバンドを形成した (Fig. 2-10A)。183 kDa のバンドは、anti-E に対しても強い抗原性を示し、成熟雌マダイ血清および E<sub>2</sub> 処理マダイ血清においても、anti-E に対する主たる抗原であることが確認された (Fig. 2-10B)。精製ピテロジェニンは、それ以外にも分子量 70 kDa から 183 kDa の間に10本前後の anti-E と反応するバンドを形成した。一方、成熟雄マダイ血清は anti-E を用いたウエスタンブロッティングでは明瞭なバンドを形成せず、抗体の吸収操作がほぼ完全であることを示した。また、精製ピテロジェニンは、anti-M を用いたウエスタンブロッティングでは明瞭なバンドを形成せず、成熟雄マダイ血清との共通抗原を含んでいないことが確認された。

## 考 察

本章では、マダイ血清中の総タンパク質量の簡易定量法、およびマダイ血清を出発材料とした液体クロマトグラフィーによるピテロジェニンの精製法について検討した。

マイクロプレートリーダーを用いたタンパク質の定量法については、すでに各社より試薬キットが販売されており、共存試薬の影響の減少や高感度化が進められている。しかしながら、血清のような高濃度タンパク質溶液を試料とする場合、測定範囲内に納めるためには適度な希釈を必要とし、煩雑さに加え、希釈による誤差が加わる。一方、池田 (1977) は、ミクロ・キェルダール法を標準法として、ニジマス血清タンパク質量を5種類の測定法で測定し、ビュレット法が最良の簡易定量法であるとしている。今回、ビュレット法をスケールダウンして

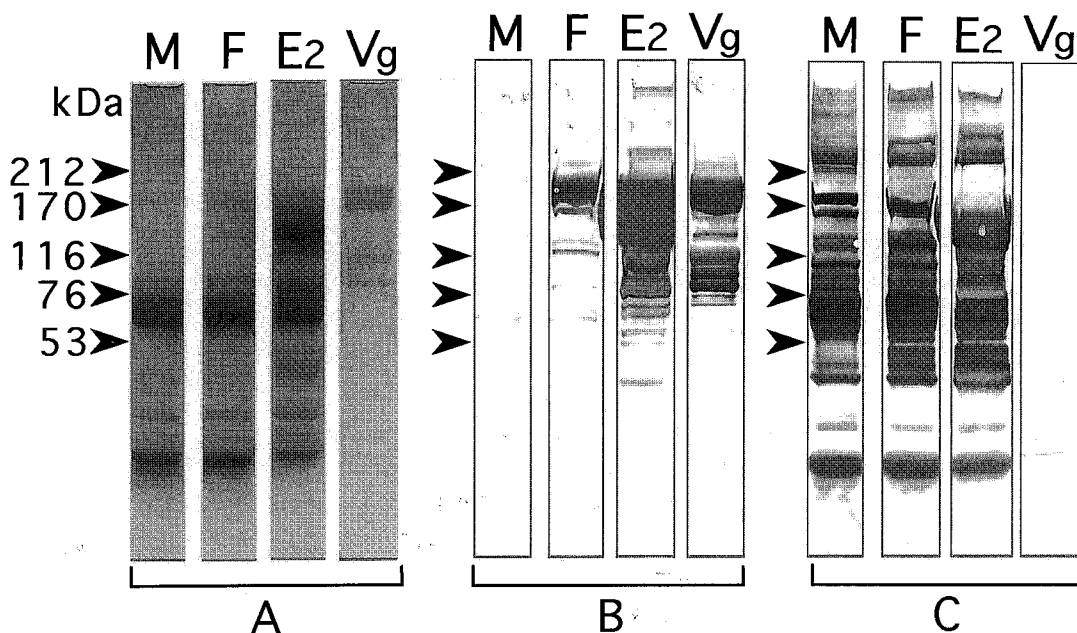


Fig. 2-10. SDS-PAGE (A) and immunoblotting of male serum, female serum, E<sub>2</sub>-treated fish serum, and purified vitellogenin (Vg) with antibodies from anti-E (B) and anti-M (C).

Arrows at the left side of each figure show the positions of myosin (212 kDa),  $\alpha_2$ -macroglobulin (170 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa), and glutamic dehydrogenase (53 kDa). Abbreviations are the same as in Fig. 2-4.

マイクロプレート上で測定したが、BSAを標準タンパク質として検討した結果では、試料容量の調節により0.098~100 mg/mlの範囲で定量が可能であることが明らかとなった。このことは、血清からその精製過程におけるほとんどの試料を、希釈や濃縮することなく測定できることを意味している。実際、マダイの血清総タンパク質を本法で測定した結果は、池田(1977)の方法に準じて測定した結果と良く一致し、試薬や試料の少量化、省力化等に加え、市販の試薬キットでは直接測定できない血清等の高濃度試料のタンパク質を測定する上で有利である。

ピテロジェニンの精製に関しては、水沈殿法(Hara *et al.* 1993)、密度勾配超遠心分離法(Ando and Mori 1995)、各種の担体を用いた液体クロマトグラフィー(Silversand *et al.* 1993, Mananos *et al.* 1994a, Matsubara *et al.* 1994, Ando 1995)、あるいはこれらの組み合わせによる精製例が報告されている。水沈殿法については、ギンザケのピテロジェニン精製において、試料中のピテロジェニン濃度が5 mg/ml以下の場合には、沈殿物を形成しないことが指摘されている(Hara *et al.* 1993)。マダイの卵は、サケ科魚類の卵よりも小さく、また多回産卵魚であるため、産卵期においても卵黄形成期の卵母細胞数は限られていること等から、血清ピテロジェニン量がサケ科魚類ほど高まらないものと推察される。実際、今回用いた成熟雌マダイ血清中のピテロジェ

ニン濃度は5 mg/mlに満たず(次章参照)、予備的に行った実験ではピテロジェニンの沈殿を形成しなかったため、ここでは検討を省略した。

密度勾配超遠心分離法は、魚類ピテロジェニンの精製法としては比較的新しい手法であり、本法によりティラピア(Ando and Mori 1995)やウナギ(Komatsu *et al.* 1996)の血清からピテロジェニンが精製されている。ピテロジェニンは、精製過程でタンパク質分解を受けやすいことが知られており(Silversand *et al.* 1993)、その分解にはカルシウムイオンやピテロジェニン分子自体に内在する因子の関与が示唆されている(Ando and Mori 1995, Komatsu *et al.* 1996)。密度勾配超遠心分離法では、精製過程のタンパク質分解を受けることなく単一タンパク質にまでピテロジェニンが精製可能であり、今後、本法によるマダイのピテロジェニン精製を検討する必要がある。

本章では、DEAEセルロースおよびヒドロキシルアパタイトを用いた液体クロマトグラフィーによるマダイピテロジェニンの精製を試みた。DEAEセルロースは、弱陰イオン交換体であり、等電点より高いpHにおいて総電荷が負になったタンパク質を吸着する(吉田 1990)。担体に吸着したタンパク質は、緩衝液濃度の上昇あるいは一価中性塩(塩化ナトリウム等)の添加によって対イオンと置き換えることにより担体から溶出するが、選択したpHが高すぎると溶出し難くなる。これまで

に, striped bass *Morone saxatilis* (Kishida *et al.* 1992, Tao *et al.* 1993) や sea bass *Dicentrarchus labrax* (Mananos *et al.* 1994a) のビテロジェニンが DEAE 交換体を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製されている。本章では, まずマダイビテロジェニンの精製において, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーに用いる TB の最適 pH を明らかにした (Fig. 2-6A)。しかし, ビテロジェニンの回収率および濃縮率とともに最も高かった pH7.5 の TB を用い, 本クロマトグラフィーにて分画したビテロジェニン画分には, さらにゲル濾過クロマトグラフィーで精製度を高めても, 複雑タンパク質が混在していた (Fig. 2-7C)。本法によりマダイのビテロジェニンを精製するためには, カラムの長さ, 溶出条件 (溶出液の組成, 溶出液の濃度勾配等) 等の更なる検討が必要である。

ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーによるタンパク質の精製には, 使用緩衝液として pH6.8 の KP が一般的に用いられている (川崎 1990)。しかし, 同 KP を用いてマダイビテロジェニンの精製を試みた予備実験では, 回収率が極めて低かった (約 5%)。そこで, KP の pH について検討した結果, pH6~9 の範囲では添加した試料中のビテロジェニン全てが担体に吸着すること, KP の pH を上げることによりビテロジェニンの回収率および濃縮率が高まること (Fig. 2-6B) が明らかになった。ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーは, 陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーの両方の側面を持つことが知られている (川崎 1990)。また, ビテロジェニンはカルシウム結合性リンタンパク質であり, ヒドロキシルアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) への吸着には, 特異的親和力も働いていると考えられる。しかし, ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーの機構は, 未だ完全には明らかにされていない。従って, 高い pH の溶出液を用いることにより, 結合したビテロジェニンの回収率が高まるという今回の結果を考察するためには, その機構に関する詳細な検討が必要である。

マダイビテロジェニンの分子量は, ゲル濾過 (native form) では 486 kDa であり, SDS-PAGE では 183 kDa, 107 kDa, 87 kDa の 3 本の主たるバンドを形成した。anti-E を用いたウェスタンブロットティングにおいては, 推定分子量 70 kDa から 183 kDa の間に 10 本前後のバンドが確認された。ビテロジェニン分子は, 複数のペプチドで構成されるサブユニット構造を取ることが両生類 (Bergink and Wallece 1974), 鳥類 (Deeley *et al.* 1975) および魚類 (Hara 1987, Matsubara and Sawano 1995) でも報告されている。さらに魚類においては, これまでにヤツメウナギ (Accession No. M88749; Sharrock *et al.* 1992), シロチョウザメ (Accession No. U00455; Bidwell and Carlson 1995),

マミチヨグ VTG I (Accession No. U07055; LaFleur *et al.* 1995a), マミチヨグ VTG II (Accession No. U70826; LaFleur *et al.* 1995b) およびニジマス (Accession No. X92804; Mouchel *et al.* 1996) のビテロジェニン遺伝子の塩基配列 (シロチョウザメは 5' 末端の一部欠損) がデータベース (日本 DNA データバンク) に登録されており, 計算上のペプチド骨格の分子量は各々 200 kDa, 186 kDa, 188 kDa, 186 kDa, 183 kDa である。従ってマダイの場合, SDS-PAGE で確認された最も大きなペプチド (183 kDa) が, ビテロジェニンの主たるサブユニットであると推定された。その構造については, 第 4 章で述べる。

原他 (1987) は, マダイには免疫学的に少なくとも 2 種類のビテロジェニン様タンパク質が存在すると述べている。今回の免疫電気泳動においても, 成熟雌マダイ血清や  $\text{E}_2$  処理マダイ血清は anti-E と 2 本の沈降線を形成し, やはり 2 種類のタンパク質の存在が示唆された (Fig. 2-4)。ここでは両者の分離精製には至らなかったが, 両者ともに, 卵黄形成期の雌血清特異性,  $\text{E}_2$  による産生誘導, 卵黄タンパク質との共通抗原性というビテロジェニンの特性を有しており (原他 1984), ビテロジェニンの精製という目的は達したものと考える。今後, マダイのビテロジェニンを単一タンパク質にまで精製し, 各々の諸特性を解明する必要がある。

### 第 3 章 マダイビテロジェニンの免疫学的定量

前章で作成した抗体 (anti-E) は, 雄血清成分とは全く反応せず, 成熟雌血清,  $\text{E}_2$  処理魚血清および卵抽出液にのみ抗原性を示すタンパク質の存在が確認された。この血清中のタンパク質は, 成熟雌特異的であり, 卵黄タンパク質との共通抗原性を示し, しかも  $\text{E}_2$  によって誘導されることから, ビテロジェニンであると言える条件を満たしていた。そこで, この抗体を用いたビテロジェニンの免疫学的定量法の確立を試みた。

これまでに報告されているビテロジェニンの検出法としては, ビテロジェニンがアルカリ不安定リンを有する唯一の血清タンパク質であることをもとに, アルカリ不安定リン量からビテロジェニン量を求める間接的な方法 (Tinsley 1985), 電気泳動後のデンシトメトリーによる方法 (Van Bohemen *et al.* 1981), 特異抗体を用いた直接的な免疫学的定量法などが報告されている。免疫学的定量法としては, 免疫凝集反応 (Le Bail and Breton 1981), ラジオイムノアッセイ (So *et al.* 1985, Copeland *et al.* 1986), 放射免疫拡散法 (太田他 1984), 二重拡散法 (藤井他 1987b), 酵素免疫測定法 (Okumura *et al.* 1995) 等が報告されている。これらの手法は何れも長所, 短所を合わせ持ち, 高感度のラジオイムノアッセイや酵素免疫測定法では数 mg/ml にも達

する高濃度のピテロジェニンを含む血清試料の測定には不向きであるし、特殊な機器を必要とする。一方、放射免疫拡散法は、感度は前2法よりも劣るが、高濃度のピテロジェニンを希釈することなく直接定量することが可能であり、しかも特殊・高額な機器を必要としないなど、多くの利点を有する。

ここでは、マダイピテロジェニンの定量法として、簡便でかつ特異性の高い放射免疫拡散法を開発するとともに、卵黄形成過程における雌マダイ血清中に含まれるピテロジェニンの量的変化について検討した。

#### 材料と方法

抗血清：前章で作成した、雄マダイ血清で吸収したウサギ抗マダイ卵抽出液血清（以下抗血清）を用いた。

放射免疫拡散法：放射免疫拡散法は概ね Mancini *et al.* (1965) に従い、以下の手順で行った。(1) 2.4%量のアガロース (FMC, SeaKem™ LE) を PBS に添加し、加熱、溶解 (2) このアガロース溶液を、ウォーターバス上で 55°C まで冷却した後、55°C に保温した抗血清を終濃度 0.5~32% となるように添加し、55°C の PBS でアガロースの終濃度を 1.2% に調整 (3) この溶液を、水平台上の直径 9 cm のシャーレ 1 枚あたり 12 ml 分注し、固化するまで室温に放置 (4) 固化アガロースプレートに、直径 2 mm の試料穴を空け、その穴に E<sub>2</sub> 処理マダイ血清の 2 倍希釈系列を 5  $\mu$ l 添加 (5) シャーレに蓋をしてビニールテープで密閉し、室温にてインキュベート (6) 各試料穴の回りに形成された沈降輪の直径をイムノビューワー (常光) 上で経時的に計測 (7) 沈降輪の面積とピテロジェニン量との線形回帰分析 (最小二乗法) を行った。なお、沈降輪の面積は、以下の式で算出した。

$$\text{沈降輪の面積} = (\text{沈降輪の半径})^2 \times 3.14 - (\text{試料穴の半径})^2 \times 3.14$$

染色する場合は、7×9 cm のゲルボンドフィルム (FMC) をシャーレの代わりに用い、沈降輪形成後 (1) 濾紙 (ワットマン No. 1) 6 枚と 1 kg の重しをかけて約 5 分間脱水 (2) 100 ml の 3% 食塩水中で 1 時間振盪 (3) 濾紙による脱水 (4) 蒸留水中で 30 分間振盪 (5) 濾紙による脱水 (6) 乾燥機 (40°C) で 30 分間乾燥 (7) 染色液 (0.5% CBB, 10% 酢酸, 45% エタノール) 中で 5 分間振盪 (8) 脱色液 (10% 酢酸, 45% エタノール) に移して振盪し、バックグラウンドが透明となるまで液を数回交換 (9) 自然乾燥後、沈降輪の直径を測定した。

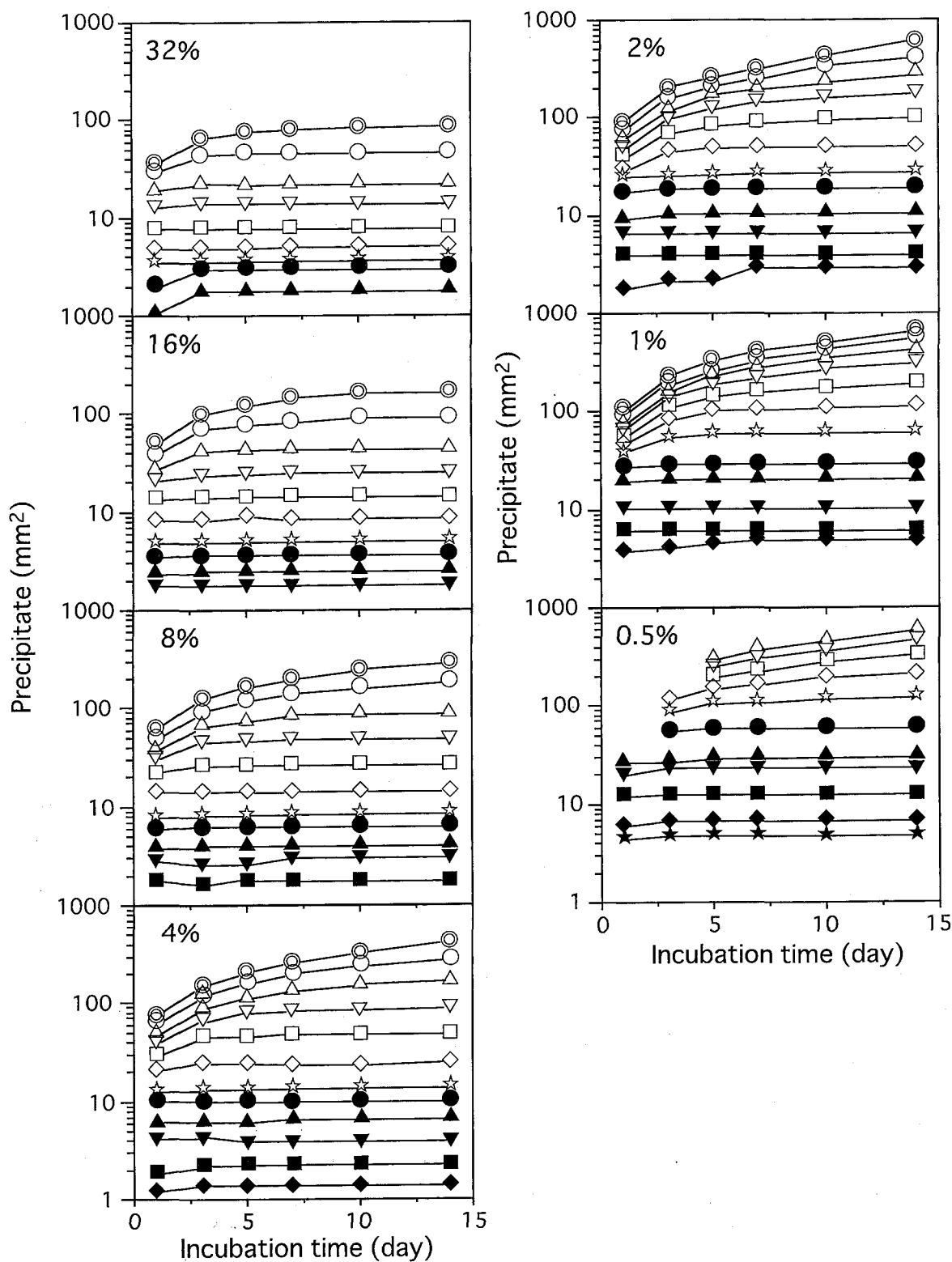
雄マダイへのエストロゲン投与：E<sub>2</sub> を 100 mg/ml となるようにプロピレングリコール (和光純薬) に溶解し、雄マダイ 24 尾 (平均体重 1.3 kg) に体重 1 kg 当たり E<sub>2</sub> 量として 10 mg を腹腔内に注射した。対照魚 6 尾には体重 1 kg 当たり 0.1 ml のプロピレングリコールのみを

注射した。E<sub>2</sub> 投与群から、投与直前および投与後 1, 3, 5, 7, 10 日目に各 3 尾を取り上げて採血し、血清を分離した後、血清中のピテロジェニン量を放射免疫拡散法により測定した。また、対照魚は、プロピレングリコール投与後 5 日目と 10 日目に各 3 尾を取り上げ、E<sub>2</sub> 投与魚と同様に血清中のピテロジェニン量を測定した。

卵黄形成過程におけるピテロジェニンの量的変化：養殖業者より購入し、養殖研究所南勢庁舎の網生け簀 (5×5×5 m) で飼育していたマダイ 3 年魚から、雌マダイ 5 尾 (平均体重 1.8 kg) を選別し、屋外に設置した組立式円形水槽 (2 t) に収容した。選別した雌マダイを 1989 年 11 月 28 日から 1990 年 3 月 20 日にかけて個体追跡し、毎月 2 回の頻度で採血し、血清中のピテロジェニン量を放射免疫拡散法によって測定した。また同時に、生殖口からカニキュレーション法により卵巣卵の一部を採取し、最も発達した卵母細胞の卵径を万能投影機 (ニコン, V-16D) 上で拡大し、計測した。

#### 結 果

放射免疫拡散法における抗血清濃度および反応時間の検討：0.5~32%の抗血清を含むアガロースプレートを用い、E<sub>2</sub> 処理魚血清 (42.4 mg/ml のピテロジェニンを含む) の 2 倍希釈系列を試料として、沈降輪の面積を経時的に測定した結果を Fig. 3-1 に示す。抗血清濃度 0.5% の場合、沈降輪が観察できた試料中のピテロジェニン濃度の上限は、試料添加後 1 日目では 0.166 mg/ml (256 倍希釈)、3 日目では 1.33 mg/ml (32 倍希釈)、5 日目以降では 10.6 mg/ml (4 倍希釈) であった。2 倍希釈血清 (21.2 mg/ml) と血清原液の形成する沈降輪は 14 日間を通して観察されなかった。また、沈降輪が観察できたピテロジェニンの最少濃度は、14 日間を通して 10.4  $\mu$ g/ml (4,096 倍希釈) であった。1%以上の抗血清を含むアガロースプレートを使用した場合には、1 日目以降のピテロジェニンの検出上限は変わらず、血清原液 (42.4 mg/ml) においても沈降輪を観察することができた。しかし、プレート中の抗血清濃度が上昇するにつれて、同じ試料における沈降輪の面積は逆に小さくなった。ピテロジェニンの検出最少濃度は、抗血清 1~4% のプレートでは 20.7  $\mu$ g/ml (2,048 倍希釈)、8% では 41.4  $\mu$ g/ml (1,024 倍希釈)、16% では 82.8  $\mu$ g/ml (512 倍希釈)、32% では 166  $\mu$ g/ml (256 倍希釈) となり、抗血清濃度の上昇に伴い、測定感度が低くなった (Fig. 3-2)。また、沈降輪は経時的に拡大し、抗血清濃度が低いほど、また、試料中のピテロジェニン濃度が高いほど面積が一定となる (抗原抗体反応が完結する) までに時間を要した。14 日目までに抗原抗体反応をほぼ完結したピテロジェニン濃度は、抗血清 32% と 16% のプレートでは 42.4 mg/ml、8% では 21.2 mg/ml、4% では 10.6 mg/ml、2% では



**Fig. 3-1.** Effects of concentration of antiserum and incubation time on area of the precipitate.

Numbers of percentage in the graphs show the concentrations of the antiserum included in the plates. Vitellogenin concentration is represented by  $\odot$ , 42.4 mg/ml;  $\circ$ , 21.2 mg/ml;  $\triangle$ , 10.6 mg/ml;  $\nabla$ , 5.3 mg/ml;  $\square$ , 2.65 mg/ml;  $\diamond$ , 1.33 mg/ml;  $\star$ , 663  $\mu$ g/ml;  $\bullet$ , 331  $\mu$ g/ml;  $\blacktriangle$ , 166  $\mu$ g/ml;  $\blacktriangledown$ , 83  $\mu$ g/ml;  $\blacksquare$ , 41  $\mu$ g/ml;  $\blacklozenge$ , 20.7  $\mu$ g/ml;  $\blackstar$ , 10.4  $\mu$ g/ml.

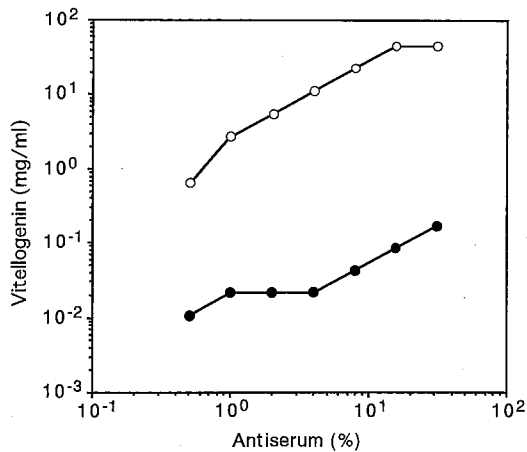


Fig. 3-2. Effect of antiserum concentration included in the plate on the sensitivity range of the single radial immunodiffusion.

Open circles represent the highest concentrations of vitellogenin which finish the diffusion in 14 days. Closed circles represent the lowest concentrations of vitellogenin which can be detected.

5.3 mg/ml, 1%では 2.65 mg/ml, 0.5%では 0.66 mg/ml であった (Fig. 3-2)。

14日目における沈降輪の面積と試料のビテロジェニン濃度との関係を回帰分析した結果、プレートに含まれる抗血清の濃度が低いほど、両者の相関も弱くなった。そこで、抗原抗体反応が完結した試料と未完結の試料とに分けて別々に分析したところ、抗原抗体反応が完結した濃度範囲では1次回帰直線、それ以上の濃度では、対数回帰曲線で表すことにより強い相関を示すことが明らかになった (Fig. 3-3, Table 3-1)。この結果は、抗血清の節約と測定時間の短縮が可能であることを示唆しており、実際、抗血清濃度1%, 反応時間1日の測定条件でも、以下の式で表される相関の強い回帰方程式が得られた (Fig. 3-4)。

$$y = 1.8476 + 105.52 \times (20.7 - 166 \mu\text{g/ml}; r^2 = 0.999).$$

$$y = 42.837 + 34.064 \log x \quad (0.166 - 42.4 \text{ mg/ml}; r^2 = 0.988).$$

放射免疫拡散法における信頼性の検討：成熟雄血清、E<sub>2</sub>処理魚血清および精製ビテロジェニンの2倍希釈系列を試料として、沈降輪の面積と試料中のビテロジェニン濃度との関係（用量反応曲線）を調べた。測定条件は、アガロースプレートの抗血清濃度を1%とし、反応時間は1日間とした。その結果、雄血清は全ての希釈倍率で沈降輪を全く形成せず、E<sub>2</sub>処理魚血清の用量反応曲線は、精製ビテロジェニンの用量反応曲線と平行となった (Fig. 3-5)。以上の結果は、本法により試料中のビテロジェニン濃度が特異的に測定できることを示している。

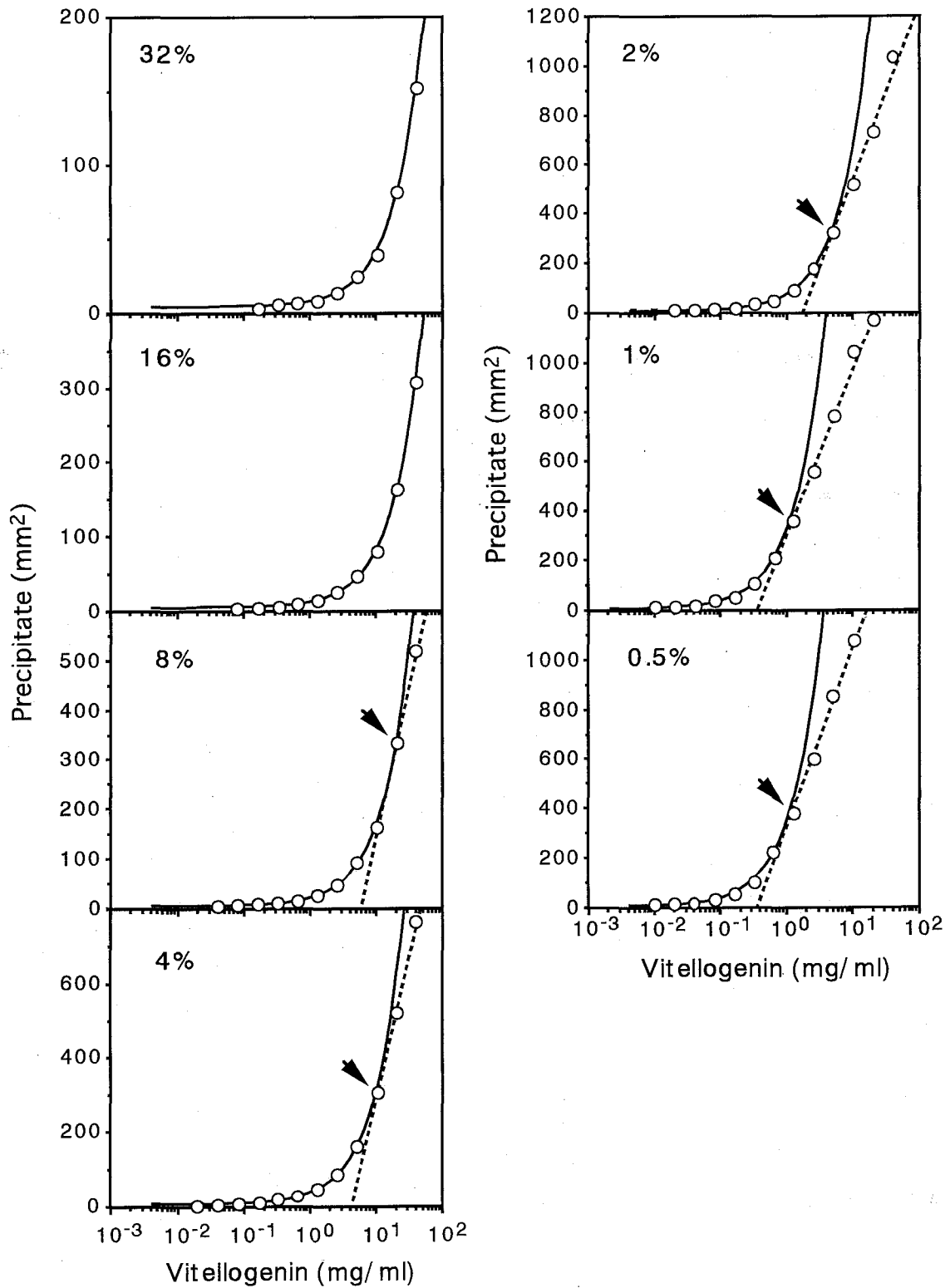
なお、本測定条件（抗血清1%, 反応1日間）において、抗原抗体反応を完結するビテロジェニンの最高濃度である 166  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 3-4) の精製ビテロジェニンを用い、アッセイ内変動係数とアッセイ間変動係数を求めた結果、各々1.71% (n=9) と4.85% (n=5) であった。エストロゲン処理マダイのビテロジェニン産生：E<sub>2</sub>投与後の、雄マダイ血清中のビテロジェニン量の変化を Fig. 3-6 に示す。E<sub>2</sub>投与直前には、血清ビテロジェニンは検出されず、E<sub>2</sub>投与後1日目には 1.69 mg/ml となり、その後3日目には 16.5 mg/ml, 5日目には 45.8 mg/ml, 7日目には 68.1 mg/ml, 10日目には 84.1 mg/ml となり、経時的に増加した。なお、E<sub>2</sub>投与群は5日目から死魚（外部所見としては眼球突出、立鱗等）が出始め、10日目には生存魚は1尾であったため、その日の測定値は1尾による値である。他の測定値は、3尾の平均値をとった。対照魚の血清中には、ビテロジェニンは全く検出されなかった。

卵黄形成過程におけるビテロジェニンの量的変化：1989年11月28日から1990年3月20日における、雌マダイ5尾の平均血清ビテロジェニン量および平均卵巣卵径の経時変化を Fig. 3-7 に示す。実験開始時（11月28日）の平均卵径は 188  $\mu\text{m}$  であり、血清中のビテロジェニンは全ての個体で全く検出されなかった。12月12日には、卵径 330  $\mu\text{m}$  の卵巣卵を有する1尾の血清から 16.3  $\mu\text{g/ml}$  のビテロジェニンが初めて検出された。血清ビテロジェニンが検出されなかった他の4尾の卵巣卵径は、160~200  $\mu\text{m}$  であった。過半数（3尾以上）の雌マダイから、ビテロジェニンが検出されたのは1月23日が最初であり（平均 87.7  $\mu\text{g/ml}$ ）、その時点での平均卵径は 323  $\mu\text{m}$  であった。2月22日には、全ての雌マダイ血清中からビテロジェニンが検出されるようになり（平均 326  $\mu\text{g/ml}$ ）、実験最終日の3月20日には、平均 1.34 mg/ml にまで増加した。3月20日の平均卵径は 460  $\mu\text{m}$  であった。

本実験期間中には、供試魚の排卵は全く確認されなかったが、本実験とは別に網生け簀で飼育していた同年魚のマダイの中には、1990年4月6日に排卵する個体が確認された。排卵が確認された雌マダイ10尾（平均体重 1.8 kg）のプール血清中のビテロジェニン濃度は、2.75 mg/ml であり、排卵卵の平均卵径は 975  $\mu\text{m}$  であった。

## 考 察

放射免疫拡散法は、Mancini *et al.* (1965) によって考案され、マンシーニ法あるいは一元放射免疫拡散法 (Single radial immunodiffusion method, SRID) ともよばれている。これまでも、魚類の血清ビテロジェニンを放射免疫拡散法により定量した例はあるが (太田他 1984, Amiri *et al.* 1996)、検出感度等を詳細に記述した



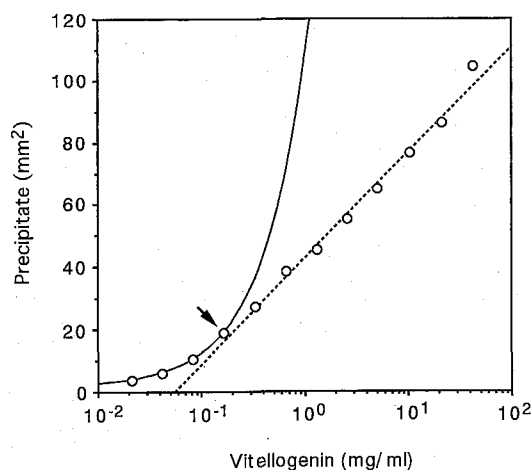
**Fig. 3-3.** Relation between area of precipitate and concentration of vitellogenin with 14 days incubation. Numbers of percentage in the graphs show the concentrations of the antiserum included in the plates. Dotted lines and solid curves represent regression curves from the data of complete precipitates and from those of developing precipitates respectively. Arrows show turning points which the diffusion is completed or not.



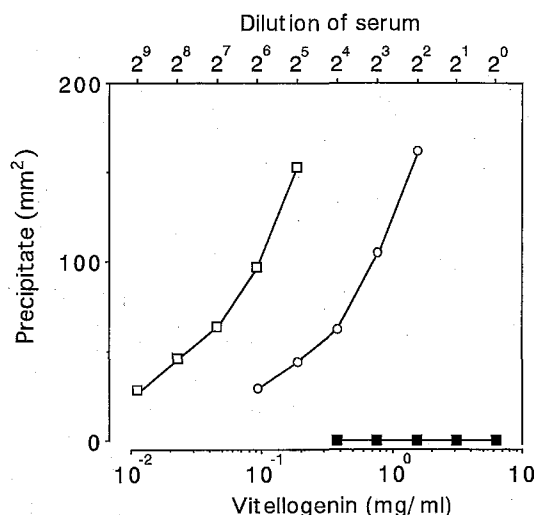
**Table 3-1.** Relation between area of precipitate and concentration of vitellogenin with 14 days incubation

Antiserum conc. (%)	Vitellogenin conc. (mg/ml)*	Regression curve	Coefficient of determination (r <sup>2</sup> )
32	0.166-42.4	y=4.1931+3.5105 x	0.999
16	0.083-42.4	y=5.0637+7.1938 x	0.999
8	0.041-21.2	y=4.7886+15.396 x	0.999
8	21.2-42.4	y=-471.11+606.69 log x	1.000
4	0.021-10.6	y=6.2656+28.680 x	0.999
4	10.6-42.4	y=-474.81+758.50 log x	0.999
2	0.021-5.3	y=9.0337+59.326 x	0.998
2	5.3-42.4	y=-273.16+784.75 log x	0.989
1	0.021-2.65	y=11.353+134.45 x	0.994
1	2.65-42.4	y=61.539+701.55 log x	0.992
0.5	0.010-0.663	y=10.688+286.93 x	0.995
0.5	0.663-10.6	y=278.80+780.94 log x	0.999

\* calculated from serial dilutions of E<sub>2</sub>-treated fish serum (42.4 mg/ml)



**Fig. 3-4.** Relation between area of precipitate and concentration of vitellogenin with 1 day incubation on a 1% antiserum gel plate. Solid curve and dotted line represent regression curves from the data of complete precipitates ( $y=1.8476+105.52x$ ;  $r^2=0.999$ ) and from those of developing precipitates ( $y=42.837+34.064 \log x$ ;  $r^2=0.988$ ), respectively. Arrow shows the turning point (166  $\mu\text{g/ml}$ ) of the diffusion completed or not completed.

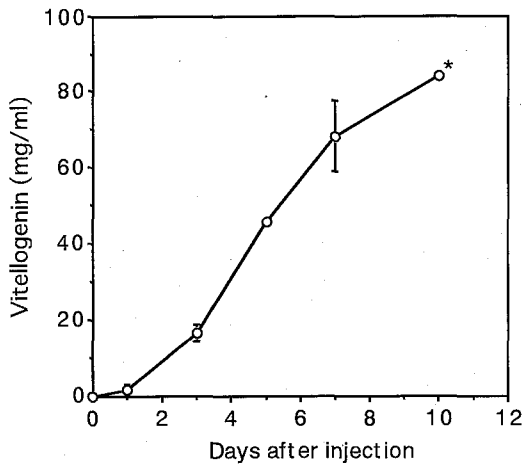


**Fig. 3-5.** Relations between areas of precipitates and concentrations of purified vitellogenin, E<sub>2</sub>-treated fish serum, and male serum with 1 day incubation on a 1% antiserum plate. □, E<sub>2</sub>-treated fish serum; ○, purified vitellogenin; ■, male serum.

報告は見当たらない。本実験の結果、アガロースプレート中の抗血清濃度が低いほどビテロジェニンの検出感度が高まることが明らかとなり、Mancini *et al.* (1965) の報告と良く一致した。これは、抗原量が一定の場合、抗体と反応を完結した複合体量も一定となり、ゲル内の抗血清（抗体）の濃度が低いほど抗原・抗体複合体の濃度も低くなる反面、面積が広がるためであると考えられる。本法による対象抗原の検出下限濃度は、抗原の種類、試料の容量および抗血清の抗体価により左右されると考えられるが、一般に 10~50  $\mu\text{g/ml}$  の範囲である（中村・

杉浦 1986)。今回のマダイビテロジェニンの測定系における検出下限は、抗血清濃度0.5%のプレート使用時の 10.4  $\mu\text{g/ml}$  であり、比較的高い感度を示したが（Fig. 3-2）、ポリエチレングリコール（終濃度 3~4%）あるいはジヒドロキシフェニールアラニン（終濃度 0.1M）をゲルに添加することにより、さらに検出感度が高まる可能性が残されている（中村 1985）。

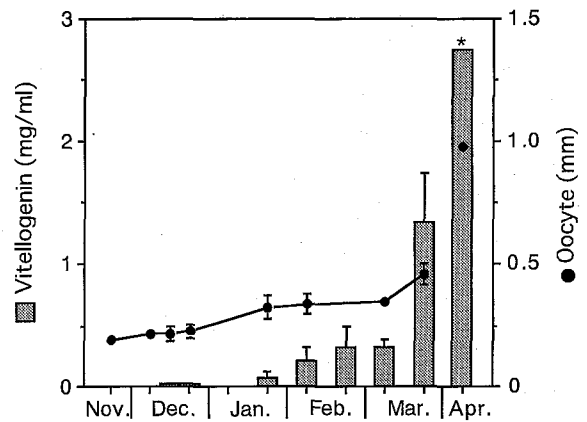
抗血清濃度0.5%のプレートを使用した場合には、最も高い検出感度を示した反面、高濃度のビテロジェニン（10.6 mg/ml 以上）を含む試料では、沈降輪が観察できなかった（Fig. 3-1）。Mancini *et al.* (1965) も、抗血清



**Fig. 3-6.** Changes in serum vitellogenin levels of male red sea bream after a single injection of 10 mg  $E_2$ /kg body weight. Vertical bars represent standard errors of mean ( $n=3$ ). \* a datum from one fish.

濃度の低いプレートに高い濃度の試料を添加した場合に、沈降輪の輪郭が不明瞭になると報告している。これは、抗血清濃度の低いゲル内では抗原・抗体複合体の濃度が薄いこと、および試料の拡散が進むに従って最縁部の境界が拡散することが原因であると考えられた (Fig. 3-8)。

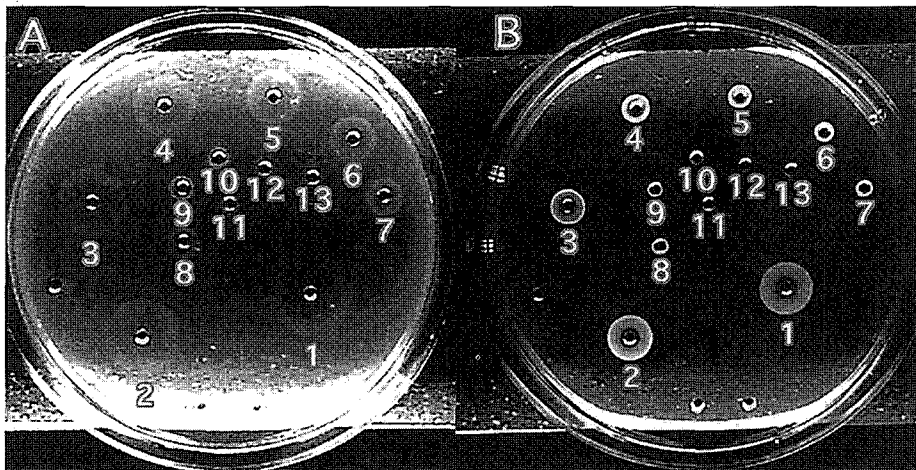
本法で試料中の抗原を定量するためには、ゲル内の抗体との抗原抗体反応を完結させる必要があると言われており (Mancini *et al.* 1965, 中村 1985), 抗原量が多い場合には、長い反応時間と多量の抗血清を必要とする (Fig. 3-2)。しかし今回の実験結果から、抗原抗体反応が未完結であっても、抗原量と沈降輪の面積との関係を対数回帰式で表すことで、強い相関を示すことが明らか



**Fig. 3-7.** Changes in serum vitellogenin levels and oocyte diameters of female red sea bream during gonadal maturation. Determinations of 5 females were individually made from 28 Nov. to 20 Mar. The datum of vitellogenin level from the pooled sera of 10 females that confirmed ovulation (0.98 mm in diameter) on 6 Apr. was added as a reference (asterisk). Vertical bars represent standard errors of mean.

になった (Fig. 3-3, Table 3-1)。このことは、試料の拡散速度が一定であり、沈降輪の面積は指数関数的に拡大することを示している。以上の結果および考察から、希釈標準試料の濃度範囲内であり、かつ沈降輪が計測できる条件 (抗血清濃度等) であれば、抗原抗体反応の完結を待つことなく定量が可能であり、抗血清や測定時間が大幅に節約出来ることが明らかになった。

$E_2$  投与による魚類のビテロジェニン産生は、序論でも述べたように多くの魚種で確認されているが、海産の多



**Fig. 3-8** Single radial immunodiffusion of serial dilutions of  $E_2$ -treated fish serum with 2 days incubation on a 2% antiserum plate (A) and 32% antiserum plate (B). Vitellogenin concentrations of the dilutions were 42.4 mg/ml (1), 21.2 mg/ml (2), 10.6 mg/ml (3), 5.30 mg/ml (4), 2.65 mg/ml (5), 1.33 mg/ml (6), 663  $\mu$ g/ml (7), 331  $\mu$ g/ml (8), 166  $\mu$ g/ml (9), 82.8  $\mu$ g/ml (10), 41.4  $\mu$ g/ml (11), 20.7  $\mu$ g/ml (12), and 10.4  $\mu$ g/ml (13).

回産卵魚に関する報告はあまり無く、マダイに関しては唯一、原他 (1987) が定性的な検索結果を報告しているに過ぎない。今回、 $E_2$  を体重 1 kg 当たり 10 mg 投与した雄マダイは、投与翌日にはピテロジェニンの産生が確認され、3 日目以降自然成熟雌マダイよりはるかに高いレベルとなり、10 日目には 84.1 mg/ml にも達した (Fig. 3-6)。この間、血清総タンパク量は 62.9 mg/ml から 137.3 mg/ml にまで上昇している。即ち、10 日目には血清タンパク質のおよそ 2/3 をピテロジェニンが占め、ピテロジェニン以外の血清タンパク質は 61.2 mg/ml から 53.2 mg/ml に減少したことになる。 $E_2$  投与後 5 日目以降、11 尾のマダイが眼球突出や立鱗等を呈して斃死した。今回の投与量 (10 mg  $E_2$ /kg・体重) は、マダラ *Gadus morhua* (Silversand *et al.* 1993)、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Norberg and Haux 1985, Silversand *et al.* 1993), turbot *Scophthalmus maximus* (Silversand *et al.* 1993), wolfish *Anarhichas lupus* (Silversand *et al.* 1993), ブラウントラウト *Salmo trutta* (Norberg and Haux 1985), マイワシ *Sardinops melanostictus* (Matsubara *et al.* 1994) 等にも使用されているが、供試魚が斃死したという記述は見あたらない。産卵期のマダイの血中  $E_2$  量は、ピーク時で 1.2 ng/ml であり、同時期の他魚種に比べて低いことが報告されている (Matsuyama *et al.* 1988)。従って、マダイはこれらの魚種に比べて  $E_2$  に対する許容量が低い可能性が示唆された。また、 $E_2$  投与後 7 日目の血清ピテロジェニン濃度 (68.1 mg/ml) は、体重 1 kg あたり 2 mg 投与した第 2 章の結果 (7 日目に 42.4 mg/ml) と比較して高い値であり、 $E_2$  濃度依存的に産生量が変化することが示唆された。

本章で個体追跡した 5 尾の雌マダイの血清ピテロジェニンは、卵巣卵径が 300  $\mu\text{m}$  に達した時点で検出され始めた (Fig. 3-7)。Matsuyama *et al.* (1988) は、マダイ卵母細胞を組織学的に観察し、その発達段階を卵径別に 9 段階に分類している。彼らの分類に従えば、卵径 300  $\mu\text{m}$  の卵母細胞は、第一次卵黄球期の後期あるいは第二次卵黄球期の初期に相当すると考えられる。卵黄形成の進行に伴い、血清ピテロジェニン量は増加することは、これまでに報告されているサケ科魚類 (Ueda *et al.* 1984, Hara 1987) やチョウザメ (Fujii *et al.* 1991, Amiri *et al.* 1996) と同様であり、血清ピテロジェニン量による成熟度判定が可能であることを示唆している。サケ科魚類やチョウザメでは、産卵個体の血清ピテロジェニン量は卵黄形成期と比較して著しく低下するが、マダイの場合には排卵が確認された個体の血清中にも、高い濃度のピテロジェニンが含まれていた (Fig. 3-7)。このことは、種々の発達段階の卵母細胞が、産卵期の雌マダイの卵巣卵中に混在するためと考えられる。産業的

に重要度が高いマダイを含む海産多回産卵魚の卵黄形成機構は、あまり解明が進んでおらず、今後さらに詳細に検討する必要がある。

#### 第 4 章 マダイピテロジェニン遺伝子のクローニング

ピテロジェニン遺伝子の発現は、第 1 章でも述べたようにステロイドホルモンによる遺伝子発現機構解明のモデルとして注目され、アフリカツメガエルやニワトリを中心として研究されている。エストロゲン誘導タンパク質であるピテロジェニンは、環境水中の外因性内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) の影響実態を探る指標としても、近年注目を集めている (Cadbury 1998)。しかしながら、魚類のピテロジェニン遺伝子に関する研究例は少なく、DNA データベース (日本 DNA データバンク) 上には、完全長のアミノ酸配列を推測できるゲノム DNA あるいは cDNA の塩基配列は、ヤツメウナギ、マミチヨグ (VTG I と VTG II)、シロチョウザメおよびニジマスの 4 魚種が登録されているに過ぎない。さらに、ピテロジェニンは初期発生における主要な栄養源であり、その量および質が種苗の良否を大きく左右する重要なタンパク質であると考えられているが、その機能に関する知見は未だ乏しい。

本章では、ピテロジェニンの機能を解明するための最初のステップとして、マダイのピテロジェニン cDNA をクローニングし、構造を明らかにするとともに、 $E_2$  投与によるピテロジェニン遺伝子の発現検出を試みた。

#### 材料と方法

エストロゲン処理：体重 1 kg 当たり  $E_2$  量として 10 mg を腹腔内に注射した 24 尾の雄マダイ (第 3 章参照) から、 $E_2$  投与直前 (0 日目) および投与後 1, 3, 5, 7, 10 日目に肝臓を摘出し、直ちに約 5 mm 角に細片し、液体窒素で凍結した。なお、凍結後は使用時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

mRNA の抽出：法橋 (1991) に従い、塩酸グアニジン-フェノール-クロロホルム法で  $E_2$  処理したマダイの凍結肝臓細片から総 RNA を抽出した。抽出した総 RNA から、藤本 (1991) に従い、oligo d(T)-Latex (宝酒造) を用いて mRNA を精製した。

部分アミノ酸配列の決定：副島・正木 (1984) に従い、*Achromobacter protease I* (和光純薬、リシルエンドペプチダーゼ) で精製マダイピテロジェニンを消化した。酵素消化後の各ペプチド断片は、マイクロボンドスフェア-カラム (Waters, C4, 300Å, 3.9×300 mm) を用いた逆相クロマトグラフィーにより分離精製した (Fig. 4-1)。各ペプチドのアミノ酸配列は、アミノ酸シーケンサー (Applied Biosystems, model 477A) を用いて決定

した。

逆転写 PCR による遺伝子断片の増幅：上記で決定した部分アミノ酸配列を元に Vg1U (5'TCTTGGCTGAAGCTCCCAA 3') および Vg2D (5'ATCAGCTGGGACGAAGAGGTAGCCAAC 3') の2種類のオリゴ DNA を DNA 合成機 (Applied Biosystems, model 381A) で合成した。鋳型となる mRNA は、E<sub>2</sub> 処理後3日目のマダイ肝臓より抽出した。逆転写用のプライマーとして oligo(dT)<sub>16</sub> を、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) 用プライマーとして Vg1U および Vg2D を使い、TaKaRa RNA PCR Kit (宝酒造) にて同キットに添付されたプロトコールに従って逆転写 PCR を行った。なお、PCR の温度調節には DNA Thermal Cycler™ (Perkin-Elmer) を用いた。PCR 増幅断片のシーケンス：上記 PCR 増幅断片の末端を DNA Blunting Kit (宝酒造) で平滑化した後、Hinc II で平滑消化したベクター pBluescript II SK (-) (Stratagene) に挿入し、大腸菌 XL1-Blue (Stratagene) に導入した。形質転換した大腸菌を、NZY/Amp/X-gal/IPTG 寒天培地 (50 µg/ml アンピシリン, 20 µg/ml 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-gal), 0.1 mM イソプロピル β-D(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG), 0.5% 塩化ナトリウム, 0.2% 硫酸マグネシウム, 0.5% 粉末酵母エキス, 1% NZ アミン, 1.5% 寒天) 上で選択培養した。選択培地上に形成された白色コロニーを、LB/Amp 培地 (50 µg/ml アンピシリン, 1% トリプトン, 0.5% 粉末酵母エキス, 1% 塩化ナトリウム) 2 ml で培養した後、菌体からプラスミドを FlexiPrep Kit (Pharmacia) で精製した。精製プラスミドは、Bss H II で消化し、アガロースゲル電気泳動により挿入断片の長さを確認した。確認された最長の挿入断片の塩基配列を DNA シークエンサー (Applied Biosystems, model 373A) で決定した。なおシーケンス反応には、プライマーとして Vg1U, Vg2D, -21M21 primer (Applied Biosystems) および M13 Rev. primer (Applied Biosystems) を使い、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にて上流および下流の両方向から塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、他生物のピテロジェニン遺伝子の塩基配列との類似性を塩基配列解析ソフトウェア (Hitachi Software Eng. Co., Ltd.; DNASIS v 3.5) を用いて解析した。

標識プローブの作成：上記 PCR により特異的に増幅された DNA 断片 (PMVG-1) を、DIG DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) を用いて digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (DIG) 標識を施した。

ノーザンハイブリダイゼーション：E<sub>2</sub> 投与後 0~10日目の雄マダイ肝臓由来の総 RNA 各 10 µg を、市野

(1991) に従いホルムアルデヒド変性条件下でアガロース電気泳動で分画した後、ポジティブチャージナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim) に転写した。ピテロジェニン mRNA の検出には、DIG DNA ディテクションキット (Boehringer Mannheim) を使い、同キットのプロトコールに準じて行った。プローブには、上記 DIG 標識 PMVG-1 を用いた。

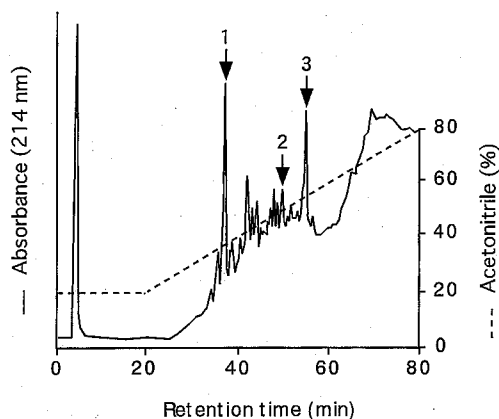
マダイ肝臓 cDNA ライブラリーの作成：E<sub>2</sub> 処理後3日目のマダイ肝臓から精製した mRNA を鋳型とし、oligo(dT)<sub>16</sub> をプライマーとして TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) にて cDNA を合成した。合成した cDNA をアガロース電気泳動にかけ、4000~7000塩基対 (base pair, bp) に位置するゲルを切り出し、DNACELL (第一化学薬品) で DNA を抽出した。抽出した DNA は、フェノール・クロロフォルム (1:1) 処理およびエタノール沈澱により精製後、ベクター pBluescript II SK(+) に挿入し、大腸菌 XL1-Blue に導入した。NZY/Amp/X-gal/IPTG 寒天培地上で選択培養後、コロニーを Repli Plate (FMC) でポジティブチャージナイロンメンブレンに転写し、DIG 標識 PMVG-1 でスクリーニングした。ポジティブクローンは、Bss H II で消化した後、アガロース電気泳動によりインサートの長さを確認した。

ピテロジェニン遺伝子の構造解析：上記で得られた最長のポジティブクローンから、Exo/Mung Deletion Kit (Stratagene) を用いてデリーションクローンを作成し、各クローンのインサートの塩基配列を前述の方法で決定・解析した。

## 結 果

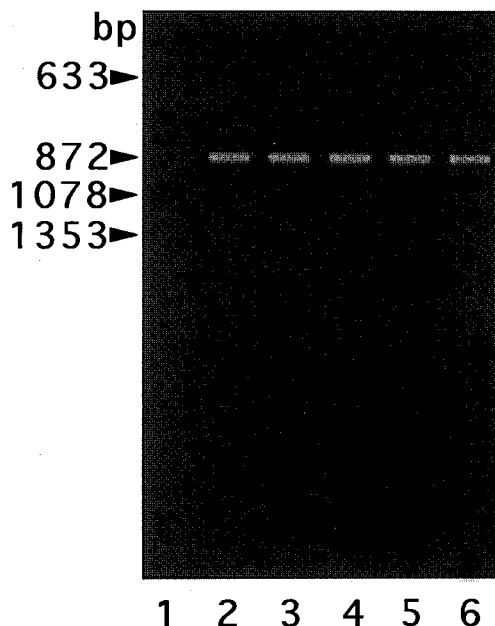
マダイピテロジェニン用 PCR プライマーの作成：精製ピテロジェニンのリシルエンドペプチダーゼ消化断片から、5種類の部分アミノ酸配列が決定できた。それらのアミノ酸配列から DNA 塩基配列を推定し、アフリカツメガエル (Accession No. M18061; Nardelli *et al.* 1987), ニワトリ (Accession No. M18060; Nardelli *et al.* 1987), ヤツメウナギ (Accession No. M88749; Sharrock *et al.* 1992) およびニジマス (Accession No. M27651; Le Guellec *et al.* 1988) のピテロジェニン遺伝子との類似性から3つの配列を選択した。選択した DNA 塩基配列をもとに、上流プライマーと下流プライマー各3種類を作成した (Fig. 4-1, Table 4-1)。

逆転写 PCR によるピテロジェニン遺伝子断片の増幅：E<sub>2</sub> 処理3日目のマダイ肝臓より精製した mRNA を鋳型とし、上記各3種類のプライマー全ての組み合わせ (6通り) で逆転写 PCR を行ったところ、Vg1U (TCTTGGCTGAAGCTCCCAA) と Vg2D (ATCAGCTGGACGAAGAGGTAGCCAAC) の組み合わせで約



**Fig. 4-1.** HPLC elution profile of the digested vitellogenin. The purified vitellogenin (1 mg protein) digested with *Acromobacter* protease I was chromatographed on a reverse-phase column in a solvent system of 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile. The flow rate was 1.0 ml/min. The N-terminal amino acid sequences of the purified peptides (arrows) were determined (see Table 4-1).

850 bp の断片 (PMVG-1) が増幅された。そこで、これらのプライマーを用いて E<sub>2</sub> 処理後 0~10日目のマダイ肝臓由来 mRNA を用い、PMVG-1 の増幅を試みた。その結果、E<sub>2</sub> 処理前 (0 日目) のマダイ肝臓由来 mRNA からは PMVG-1 は増幅せず、処理後 1 日目以降の mRNA を鋳型とした場合のみ増幅が確認された (Fig. 4-2)。このことから、PMVG-1 は少なくともエストロゲン誘導型の遺伝子の一部であることが明らかとなった。



**Fig. 4-2.** Amplification of particular segment of the vitellogenin cDNA (PMVG-1) by PCR. Template mRNAs were extracted from livers of 0 (lane 1), 1 (lane 2), 3 (lane 3), 5 (lane 4), 7 (lane 5), and 10 days (lane 6) after E<sub>2</sub> administration.

め、次にその塩基配列を解析した。

**PCR 増幅断片の塩基配列:** PMVG-1 の塩基配列と、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を Fig. 4-3 に示す。PMVG-1 の長さは 855 bp であり、ニジマス、ニワトリ

**Table 4-1.** Synthetic primers used in PCR

Amino acid sequence 1* <sup>1</sup>	Ser	Trp	Leu	Lys	Leu	Pro	Lys		
cDNA sequence 1* <sup>2</sup>	5' TCN	TGG	YTN	AAR	YTN	CCN	AAR	3'	
Chicken (4713-4733)* <sup>3</sup>	5' TCT	TTG	CTG	AAG	CCC	CCT	CTG	3'	
<i>Xenopus</i> (4578-4598)* <sup>3</sup>	5' TAT	TTG	CTG	AAG	CTC	CCA	AAT	3'	
Vg1U	5' TCT	TGG	CTG	AAG	CTC	CCA	AA	3'	
Vg1D	3' AGA	ACC	GAC	TTC	GAG	GGT	TT	5'	
Amino acid sequence 2* <sup>1</sup>	Val	Gly	Tyr	Leu	Phe	Val	Pro	Ala	Asp
cDNA sequence 2* <sup>2</sup>	5' GTY	GGN	TAY	YTN	TTY	GTN	CCN	GCN	GAY 3'
Chicken (5429-5455)* <sup>3</sup>	5' GTT	GGC	TTC	CAC	TGC	CTC	CCA	GCT	GAT 3'
Vg2U	5' GTT	GGC	TAC	CTC	TTC	GTC	CCA	GCT	GAT 3'
Vg2D	3' CAA	CCG	ATG	GAG	AAG	CAG	GGT	CGA	CTA 5'
Amino acid sequence 3* <sup>1</sup>	Leu	Pro	Val	Asn	Met	Pro	Phe		
cDNA sequence 3* <sup>2</sup>	5' YTN	CCN	GTN	AAY	ATG	CCN	TTY	3'	
Trout (436-456)* <sup>3</sup>	5' CTC	CCC	TGT	TCT	CTG	CCA	TTT	3'	
Ug3U	5' CTC	CCC	GTT	AAT	ATG	CCA	TTT	3'	
Vg3D	3' GAG	GGG	CAA	TTA	TAC	GGT	AAA	5'	

\*<sup>1</sup> amino acid sequence of the peptide derived from the purified red sea bream vitellogenin (see Fig. 4-1).

\*<sup>2</sup> nucleotide sequence derived from the amino acid sequence.

\*<sup>3</sup> position of the sequence in vitellogenin cDNA (chicken; Accession No. M18060, *Xenopus*; Accession No. M18061, trout; Accession No. M27651).

5' TCT TGG CTG AAG CTC CCA AAG AGG ACC ATG TAC AAA CTC GAC GTT GGT CTC CCT 54  
 Ser Trp Leu Lys Leu Pro Lys Arg Thr Met Tyr Lys Leu Asp Val Gly Leu Pro 18  
 GTT AAT ATG CCA TTC GGA GAC ACC GCT GCT GAG CTG GAA GCG TAC CAG GAC AAC 108  
 Val Asn Met Pro Phe Gly Asp Thr Ala Ala Glu Leu Glu Ala Tyr Gln Asp Asn 36  
 TGG GCT GAC AAG ATC TTC ATG CTC ACC AAG GCT CAC GCA GCT GAG TGT GCC 162  
 Trp Ala Asp Lys Ile Ser Phe Met Leu Thr Lys Ala His Ala Ala Glu Cys Ala 54  
 ATG GTC AAA GAC ACA CTC GTC ACA TTC AAC AAC AGG AAG TTC AGG AGC GAC ATG 216  
 Met Val Lys Asp Thr Leu Val Thr Phe Asn Asn Arg Lys Phe Arg Ser Asp Met 72  
 CCC CAT TCT TGC TAC CAG GTT TTG GCT CAG GAC TGC ACA CCA GAA CTT AAA TTC 270  
 Pro His Ser Cys Tyr Gln Val Leu Ala Gln Asp Cys Thr Pro Glu Leu Lys Phe 90  
 ATA GTT CTG CTG AAG AGG GAC CAG ACA CAG GAA CAG AAC CAG ATC AAT GTC AAG 324  
 Ile Val Leu Leu Lys Arg Asp Gln Thr Gln Glu Gln Asn Gln Ile Asn Val Lys 108  
 ATC GCA GAC ATT GAT GTC GAC ATG TAC CCC AAG GAC AGT GTT GTA ATG GTG AAG 378  
 Ile Ala Asp Ile Asp Val Asp Met Tyr Pro Lys Asp Ser Val Val Met Val Lys 126  
 GTT AAT GGA GTT GAA ATC CCC ATC AGC AAC CTG CCA TAT CAC CAT CCT GCA GGC 432  
 Val Asn Gly Val Glu Ile Pro Ile Ser Asn Leu Pro Tyr His His Pro Ala Gly 144  
 AAG ATT CAG ATC AGA CAG AGA GGT GAG GGC ATC GCT CTC CAC GCT CCC ACC CAT 486  
 Lys Ile Gln Ile Arg Gln Arg Gly Glu Gly Ile Ala Leu His Ala Pro Thr His 162  
 GGT CTC CAG GAA GTC TAC TTT GAT CTG AAC GCA CTG AAG GTT AAA GTT GTG GAC 540  
 Gly Leu Gln Glu Val Tyr Phe Asp Leu Asn Ala Leu Lys Val Lys Val Val Asp 180  
 TGG ATG AGA GGA CAG ACC TGT GGA CTC TGT GGC AAG GCT GAC GGT GAA GTC AGA 594  
 Trp Met Arg Gly Gln Thr Cys Gly Leu Cys Gly Lys Ala Asp Gly Glu Val Arg 198  
 CAG GAC TAC AGC ACA CCC AAC GAA GCG CTG AGC AAG AAC GCA GTC AGC TAC GCT 648  
 Gln Glu Tyr Ser Thr Pro Asn Glu Arg Leu Ser Lys Asn Ala Val Ser Tyr Ala 216  
 CAT TCC TGG GTT CTG CCT GGA AAG ACC TGC CGT GAT GCA TCT GAG TGT TAC ATG 702  
 His Ser Trp Val Leu Pro Gly Lys Thr Cys Arg Asp Ala Ser Glu Cys Tyr Met 234  
 AAG CCT GAA TCT GTG AAG TTG GAG AAG CAG GTG ATC CTC CTC GGC GAG GAC TCC 756  
 Lys Pro Glu Ser Val Lys Leu Glu Lys Gln Val Ile Leu Leu Gly Glu Glu Ser 252  
 AAA TGC TAC TCT GTT GAG CCC GTG CTG CGC TGC CTG CCC GGC TGC ATC CCA CTG 810  
 Lys Cys Tyr Ser Val Glu Pro Val Leu Arg Cys Leu Pro Gly Cys Met Pro Leu 270  
 AGG ACC ACC ACC GTC AAA GTT GGC TAC CTC TTC GTC CCA GCT GAT 3' 855  
 Arg Thr Thr Thr Val Lys Val Gly Tyr Leu Phe Val Pro Ala Asp 285

Fig. 4-3. Nucleotide sequence of the red sea bream vitellogenin cDNA (PMVG-1) amplified by PCR and the derived amino acid sequence of the protein.

(VTG II), アフリカツメガエル (VTG A2), およびヤツメウナギのビテロジェニン遺伝子の 3' 末端近傍と、各々71.7%, 57.5%, 52.3%および47.8% (平均57.3%) という高い類似性を示した (Fig. 4-4A)。また、推定されるアミノ酸配列の類似性は、各々58.3%, 40.6%, 34.8%および31.3% (平均41.3%) であった (Fig. 4-4B)。PMVG-1 以外のこれら4種ビテロジェニン遺伝子の同領域を比較した場合、塩基配列の類似性は平均51.8%, アミノ酸配列の類似性は平均35.8%であり、PMVG-1 との類似性とほぼ同じ値であった。以上の結果から、PMVG-1 はマダイのビテロジェニン遺伝子の一部であることが強く示唆された。

エストロゲン投与によるビテロジェニン遺伝子の発現：E<sub>2</sub> 投与後0~10日目のマダイ肝臓由来の総 RNA を試料とし、プローブとして DIG 標識 PMVG-1 を用いたノー

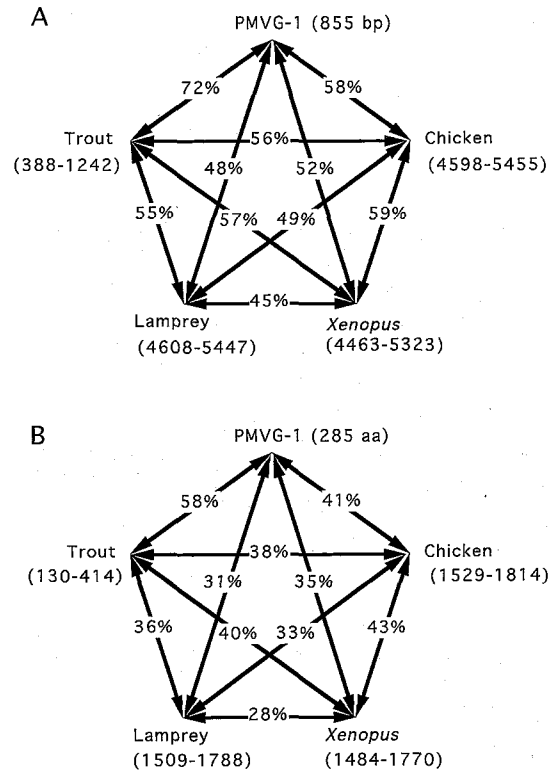
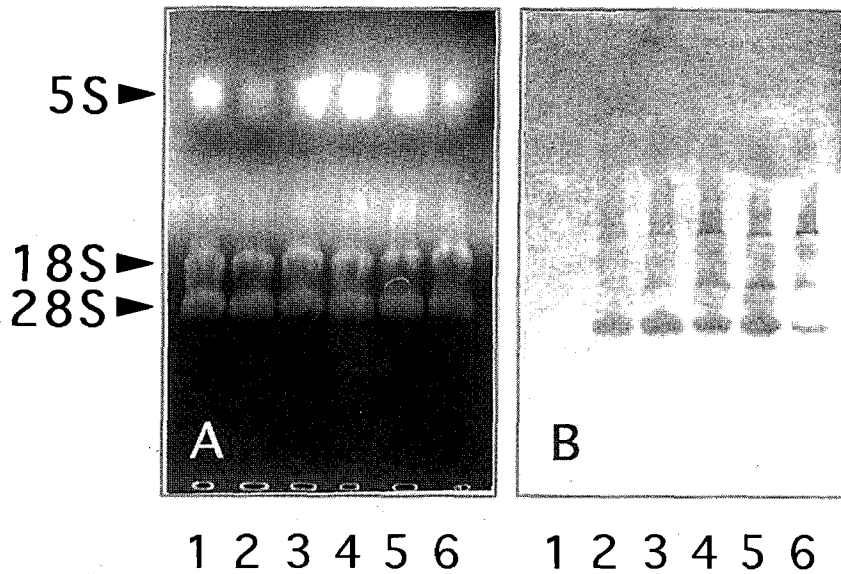


Fig. 4-4. Similarities of nucleotide sequences (A) and putative amino acid sequences (B) between PMVG-1 (red sea bream) and published sequences for *Xenopus* (VTG A2, Accession No. M18061), chicken (VTG II, Accession No. M18060), lamprey (Accession No. M88749), trout (rainbow trout, Accession No. M27651) vitellogenin cDNAs. Numbers in parentheses express ranges of the sequences showed the highest similarities with PMVG-1.

ザンハイブリダイゼーションにより、エストロゲンによるビテロジェニン遺伝子の発現を検索した。結果は Fig. 4-5 に示すように、E<sub>2</sub> 投与前のマダイ肝臓由来総 RNA 中には標識 PMVG-1 と複合体を形成する RNA のバンドは見当たらず、E<sub>2</sub> 投与後の肝臓からは約 6 千塩基 (kb), 4 kb, 1 kb の位置に 3 本の RNA バンドが検出された。この 3 本の中では、約 6 kb のバンドのシグナルが最も強かった。

ビテロジェニン遺伝子のクローニング：プラスミドライブラリーからは、3' 末端にポリ A 鎖を含む 3,539 bp のクローン (PMVG-2) が得られた。PMVG-2 の塩基配列を決定し (Fig. 4-6), マミチヨグ, ニジマス, シロチヨウザメ, ヤツメウナギ, アフリカツメガエルおよびニワトリのビテロジェニン遺伝子との類似性を調べた結果、各々69.6, 54.4, 49.0, 45.5, 44.7, 45.6% (平均51.5%) の高い値を示した (Fig. 4-7)。PMVG-2 と高い類似性を示した領域は、これら6種のビテロジェニン遺伝子の何れもが 5' 末端から 1.8 kbp 前後 (1678~1938 bp)



**Fig. 4-5.** Agarose gel electrophoresis (A) and northern analysis (B) of vitellogenin mRNA. Total RNA samples (10 mg/lane) were extracted from the liver at 0 (lane 1), 1 (lane 2), 3 (lane 3), 5 (lane 4), 7 (lane 5), and 10 days (lane 6) after E<sub>2</sub> administration. Digoxigenin-labeled PMVG-1 was used as a hybridization probe in the northern analysis. Arrow heads show the positions of the 28S, 18S, and 5S rRNA subunits.

5' A ACT AGT GGA TCC CCC GGG CTG CAG GTT GTG AAG CAA GAG GAG AAT CTG CAG GTG 55  
 Thr Ser Gly Ser Pro Gly Leu Gln Val Val Lys Gln Glu Asn Leu Gln Val 18  
 GCA AGC TTC ACC TAC TCA CAC ATG AAG TCC CTG ACC AGG AGC ACT GCT GCT ATC 109  
 Ala Ser Phe Thr Tyr Ser His Met Lys Ser Leu Thr Arg Ser Thr Ala Ala Ile 36  
 CAT GCC TCA GTT GCT GCA GCT TGC AAC GTC GCT GTC AAA ATC TTG AGC CCA AAG 163  
 His Ala Ser Val Ala Ala Ala Cys Asn Val Ala Val Lys Ile Leu Ser Pro Lys 54  
 CTG AAC AGA CTG AGC ATG CGT TTC AGC AAA GCC ATC CAT GTG GAC AGC TAT TAC 217  
 Leu Asn Arg Leu Ser Met Arg Phe Ser Lys Ala Ile His Val Asp Ser Tyr Tyr 72  
 AGT CCC TTG ATG ATT GGT GCT GCT GCC AGC GCT TTC TAC ATC AAT GAT GCT GCC 271  
 Ser Pro Leu Met Ile Gly Ala Ala Ala Ser Ala Phe Tyr Ile Asn Asp Ala Ala 90  
 ACC ATT CTG CCC AGA TCT TTT GTG TCC AAG ACC AGC GCC TAC CTT GCT GGA GCT 325  
 Thr Ile Leu Pro Arg Ser Phe Val Ser Lys Thr Ser Ala Tyr Leu Ala Gly Ala 108  
 GCT GCT GAT GTT CTG GAG GTT GGA GTC AGA ACT GAG GGA CTC CAG GAG GCT CTT 379  
 Ala Ala Asp Val Leu Glu Val Gly Val Arg Thr Glu Gly Leu Gln Glu Ala Leu 126  
 CTG AAA AAC CCT GCA CTG ATC AAC AAT GCC GAC AGG ATG ACC AAG ATG AAG CGT 433  
 Leu Lys Asn Pro Ala Leu Ile Asn Asn Ala Asp Arg Met Thr Lys Met Lys Arg 144  
 GTC ATT AAG GCT CTC TCT GAG TTG AGG TCT TTA CCC GCC AGA ACA CCT CTG GCC 487  
 Val Ile Lys Ala Leu Ser Glu Leu Arg Ser Leu Pro Ala Arg Thr Pro Leu Ala 162  
 TCT GTC TAC ATC AAA TTC TTC GGA CAG GAA ATT GCC TTT GCC AAC ATT GAC AAA 541  
 Ser Val Tyr Ile Lys Phe Phe Gly Gln Glu Ile Ala Phe Ala Asn Ile Asp Lys 180  
 AAC ATA ATT GAC CAG GCC ATT GCG CTC GCT ACT GCC CCC TCT TTG CAT ACA TTT 595  
 Asn Ile Ile Asp Gln Ala Ile Ala Leu Ala Thr Ala Pro Ser Leu His Thr Phe 198  
 GGT AAG AAT GCC ATC AAG GCT CTG CTG ACT GGT GCA TCC TTC CAT GTT GCT AAG 649  
 Gly Lys Asn Ala Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Ala Ser Phe His Val Ala Lys 216  
 CCT CTG CTG GCC ACT GAG GTG AGG CGT ATC ATG CCT ACT GCT GCT GGT CTT CCA 703  
 Pro Leu Leu Ala Thr Glu Val Arg Arg Ile Met Pro Thr Ala Ala Gly Leu Pro 234  
 ATG GAG CTC AGT CTG TAC ACT GCT GCT GTG GCT GCT GCA GCT GTC CAA GTC AAG 757  
 Met Glu Leu Ser Leu Tyr Thr Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Val Gln Val Lys 252

GCC ACC ACA ACA CCA GCT CTG CCA GAA AAC TTC CTT CTG ACT CAC CTT CTG AAG 811  
 Ala Thr Thr Thr Pro Ala Leu Pro Glu Asn Phe Leu Leu Thr His Leu Leu Lys 270  
 ACA GAC ATT CAG TTT GAG ACC GAG ATC AGA CCA AGT GTT GCT GTG AAC ACA TTT 865  
 Thr Asp Ile Gln Phe Glu Thr Glu Ile Arg Pro Ser Val Ala Val Asn Thr Phe 288  
 GCT GTG ATG GGT GTT AAC ACT GCC ATG CTC CAG GCT GCG CTG ATT TCA AGA GCT 919  
 Ala Val Met Gly Val Asn Thr Ala Met Leu Gln Ala Ala Leu Ile Ser Arg Ala 306  
 AAA CTG AAC TCG ATT GTG CCA GCC AAG ATC GCT GCA AGA CTT GAC ATC AAT GAG 973  
 Lys Leu Asn Ser Ile Val Pro Ala Lys Ile Ala Ala Arg Leu Asp Ile Asn Glu 324  
 GCC CAC TTT AAG ATC GAA GCT CTG CCT GGT TCT GTG CCT GAA AAC ATT GCA GCT 1027  
 Gly His Phe Lys Ile Glu Ala Leu Pro Val Ser Val Pro Glu Asn Ile Ala Ala 342  
 GTG CAT GTT GAG ACT TTT GCT GTG GCT AGA AAC ATT GAG GAT CTT GCT GCT GCA 1081  
 Val His Val Glu Thr Phe Ala Val Ala Arg Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Ala 360  
 AGA ATC ACT CCC ATC ATC CCT GCC AAA GTG TTG AAG CCT TTC TCA AGG GAG ATT 1135  
 Arg Ile Thr Pro Ile Ile Pro Ala Lys Val Leu Lys Pro Phe Ser Arg Glu Ile 378  
 CTC ACT TCT AAG CTT GCA TCT GCT GCT AGT TTT TCA CAG TCC TCA GAG ATC 1189  
 Leu Thr Ser Lys Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Phe Ser Gln Ser Ser Glu Ile 396  
 ATT GAC CAA GAT GTG GCT GAT GCC GAG CAC ATT GTG AAA ACC AAA GCC GCT CAG 1243  
 Ile Asp Gln Asp Val Ala Asp Ala Glu His Ile Val Lys Thr Lys Ala Ala Gln 414  
 TAT GAG AAG AAG TAC TGT GCT AAA GTT GCT GCC GTT GGA CTG AAG GGC TGT TTC 1297  
 Tyr Glu Lys Lys Tyr Cys Ala Lys Val Ala Ala Val Gly Leu Lys Gly Cys Phe 432  
 AAG GTT GCC ACT GAC AAT GCC GCT TTC ATC AGG GAC ATT CCC CTG TAC AAA CTG 1351  
 Lys Val Ala Thr Asp Asn Ala Ala Phe Ile Arg Asp Ile Pro Leu Tyr Lys Leu 450  
 GCT GGA AAG CAC TCT GTT ATT CTT TCT TTC AAA CCA ATT GAA GGG GAA GTC ATT 1405  
 Ala Gly Lys His Ser Val Ile Leu Ser Phe Lys Pro Ile Glu Gly Glu Val Ile 468  
 GAG AGA CTG GAG ATG GAG GTT CAA GTT GGA CCA AAG GCT GCA GAG AAG CTT ATT 1459  
 Glu Arg Leu Glu Met Glu Val Gln Val Gly Pro Lys Ala Ala Glu Lys Leu Ile 486  
 AAA CAG ATC AAT CTG AGC GAA GAA GAA ATC GTT GAG GGC AGA CCA GTC TTG ATG 1513  
 Lys Gln Ile Asn Leu Ser Glu Glu Glu Ile Val Glu Gly Arg Pro Val Leu Met 504

AAG CTG AAG AAG ATC CTG GCT CCT GGT CTG AGG AAT CGC ACC TCA TCC TCC TCT 1567  
 Lys Leu Lys Lys Ile Leu Ala Pro Gly Leu Arg Asn Arg Thr Ser Ser Ser Ser 522  
 TCT AGC TCA AGC AGC TCT CGC TCA AGC GTG AGC TCA AAG TCC TCT TCC AGC TCC 1621  
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Ser Val Ser Ser Lys Ser Ser Ser Ser Ser 540  
 TCA TCT CGT GTC ACC AGC AAG GCC ATT GAT GTA GCT GCT CGC AAA AGC AGA AAC 1675  
 Ser Ser Arg Val Thr Ser Lys Ala Ile Asp Val Ala Ala Arg Lys Ser Arg Asn 558  
 AGT AGG AGC AGC AGC AGC ATC AGC AGC AGC AGC AGC AGT GGC AGT AGC AGC AGC 1729  
 Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser 576  
 AGG AGG AGC AGC AGC AGC AGT AGC AGC AGC AGT AGC AGC AGG AGT AGC AGC AGG 1783  
 Arg Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg 594  
 AGC AGC AGG AGC AGC AGC AGC TCC TCC AGA TCT GTG AGC AGC TCT TCT TCC AGG 1837  
 Ser Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Val Ser Ser Ser Ser Ser Arg 612  
 ACC AGC TCC GCA TCT AGC CTT GCA TCA CTC TTC AGT GCT AGC TCA AGC TCC TCT 1891  
 Thr Ser Ser Ala Ser Ser Leu Ala Ser Leu Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser 630  
 CGC TCC AGT GCT CGT GTC TCA AAG AGA GTG GCT TAT CCC CAC AAG TTC CAG AAG 1945  
 Arg Ser Ser Ala Arg Val Ser Lys Arg Val Ala Tyr Pro His Lys Phe Gln Lys 648  
 GAC CAC AAG AAG CAG GCT CTC ACT TCT CAA GCA GCA TTA CTT TCC AAG AGC AGA 1999  
 Asp His Lys Lys Gln Ala Leu Thr Ser Gln Ala Ala Leu Leu Ser Lys Ser Arg 666  
 AGC AGT GCC GCA AGC TTT GAG GCC CTC ACT ACA CAG AAC AAA TTC CTT GGC AAT 2053  
 Ser Ser Ala Ala Ser Phe Glu Ala Leu Thr Thr Gln Asn Lys Phe Leu Gly Asn 684  
 GAA GCA CCT CCT GCC TTT GCC ATC ATC GTC CGT GCT GTC AGA GCC GAC AAT AAG 2107  
 Glu Ala Pro Pro Ala Phe Ala Ile Ile Val Arg Ala Val Arg Ala Asp Asn Lys 702  
 ATG ATG GGA TAC CAG CTG GCA GTG TAC TTG GAC AAA CCT TCC ACC AGA ATT CAG 2161  
 Met Met Gly Tyr Gln Leu Ala Val Tyr Leu Asp Lys Pro Ser Thr Arg Ile Gln 720  
 ATT ATT CTG GCT GCC TTG GCT GCC GAC AAC AAC TGG AAG CTC TGT GCT GAT GGA 2215  
 Ile Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ala Asp Asn Asn Trp Lys Leu Cys Ala Asp Gly 738  
 GCT CTG CTG AGC AAG CAC AAA GTC ACT GCT AAA ATC GGC TGG GGA GCA GAA TGC 2269  
 Ala Leu Leu Ser Lys His Lys Val Thr Ala Lys Ile Gly Trp Gly Ala Glu Cys 756  
 AAG CAG TAT GAC ACC ATG ATC ACA GCT GAG ACT GGT CTT GTT GGT CCA AGC CCT 2323  
 Lys Gln Tyr Asp Thr Met Ile Thr Ala Glu Thr Gly Leu Val Gly Pro Ser Pro 774  
 GCA GCT CGC GTC AGA GTT GCC TGG AAT GAC CTC CCT TCT GCC ATT AAA CAC TAC 2377  
 Ala Ala Arg Val Arg Val Ala Trp Asn Asp Leu Pro Ser Ala Ile Lys His Tyr 792  
 GCA AAG AAG ATG TAC GAC CTC ATT CCT GCT AAC ATG CTG CCT GGC TTG ATT AAA 2431  
 Ala Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Pro Ala Asn Met Leu Pro Gly Leu Ile Lys 810  
 GGA AAG GAC GAA AAC AGC GCC AAT CAG CTA TCA ATG ACA CTG ATT GCC ACA TCT 2485  
 Gly Lys Asp Glu Asn Ser Ala Asn Gln Leu Ser Met Thr Val Ile Ala Thr Ser 828  
 GAC AGG ACC ATT GAC TTC ATT TGG AAA TCA CCA ACA CGT ACT TTC TAT AAG CTG 2539  
 Asp Arg Thr Ile Asp Phe Ile Trp Lys Ser Pro Thr Arg Thr Phe Tyr Lys Leu 846  
 GCT TTG GAT CTT CCC TAC CCT CTG CCG CTT GAT GGA ATC AAA GGT CTC ACC CCC 2593  
 Ala Leu Asp Leu Pro Tyr Pro Leu Pro Leu Asp Gly Ile Lys Gly Leu Thr Pro 864  
 TTC GAT GGC TTA GCT GAT CAA GTC CAC TAC TTG TTT GCA AAG GCT GCC GCA GCC 2647  
 Phe Asp Gly Leu Ala Asp Gln Val His Tyr Leu Phe Ala Lys Ala Ala Ala Ala 882  
 GAG TGT AGC TTC AAC AGA GAC GCA CTG ACC ACA TTC AAC GGC AGG AAA TAC AAG 2701  
 Glu Cys Ser Phe Asn Arg Asp Ala Leu Thr Thr Phe Asn Gly Arg Lys Tyr Lys 900  
 AAC GAG ATG CCG TTG TCT TGC TAC CAA GTT CTG GCA CAG GAT TGC ACC AAT GAG 2755  
 Asn Glu Met Pro Leu Ser Cys Tyr Gln Val Leu Ala Gln Asp Cys Thr Asn Glu 918  
 CTG AAA TTC ATG GTT CTG CTG AAG AAG GAT CAC ATT GAA CAG AAC CAC ATC AAT 2809  
 Leu Lys Phe Met Val Leu Leu Lys Lys Asp His Ile Glu Gln Asn His Ile Asn 936  
 GTG AAA ATT GCT GAC ATT GAT ATT GAC CTG TAC CCG AAG AAC ACT GAC GTG ATC 2863  
 Val Lys Ile Ala Asp Ile Asp Ile Asp Leu Tyr Pro Lys Asn Thr Asp Val Ile 954  
 GTG AAG GTC AAT GGA ATG GAA ATA CCC ATC AAC AAC CTG CCT TAC CAG CAT CCT 2917  
 Val Lys Val Asn Gly Met Glu Ile Pro Ile Asn Asn Leu Pro Tyr Gln His Pro 972

ACA GCC AAA ATC CAG ATC AGA CCA AAG GGT GAG GGC ATC TCT GTG TAC GCT CCC 2971  
 Thr Ala Lys Ile Gln Ile Arg Pro Lys Gly Glu Gly Ile Ser Val Tyr Ala Pro 990  
 AGC CTT GGT CTT CAT GAA GTC TAC TTT GAC AGG AAC TCA TGG ACG GTT AAA GTG 3025  
 Ser Leu Gly Leu His Glu Val Tyr Phe Asp Arg Asn Ser Trp Thr Val Lys Val 1008  
 GTG GAC TGG ATG AAG GGA CAA ACC TGT GGA CTC TGT GGA AAG GCT GAT GGG GAA 3079  
 Val Asp Trp Met Lys Gly Gln Thr Cys Gly Leu Cys Gly Lys Ala Asp Gly Glu 1026  
 GTC AGA CAG GAG TAC CGC ACA CCC AAC GGA CGT GTG ACC AAG AGC GCA GTC AGT 3133  
 Val Arg Gln Glu Tyr Arg Thr Pro Asn Gly Arg Val Thr Lys Ser Ala Val Ser 1044  
 TAT GCT CAT TCC TGG GTT CTG CCT GCC GAG AGC TGT AGG GAC ACC ACT GAG TGC 3187  
 Tyr Ala His Ser Trp Val Leu Pro Ala Glu Ser Cys Arg Asp Thr Thr Glu Cys 1062  
 CGT ATG AAG CTT GAA TCT GTG CAG CTG GAG AAG CAG GTG AAC ATC CAT GGC CAG 3241  
 Arg Met Lys Leu Glu Ser Val Gln Leu Glu Lys Gln Val Asn Ile His Gly Gln 1080  
 GAA TCC AAA TGC TTC TCT GTT GAG CCC GTG CTG CGC TGC CTG CCC GGC TGC TTC 3295  
 Glu Ser Lys Cys Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Arg Cys Leu Pro Gly Cys Phe 1098  
 CCT GTG AAG ACC ACC ACT GTC ACT ATC GGT TAC CAC TGC ATG CCT GCT GAG TCT 3349  
 Pro Val Lys Thr Thr Thr Val Thr Ile Gly Tyr His Cys Met Pro Ala Glu Ser 1116  
 GCC CTG AAT CGC CCC GAG AGT CTG AGC AGC ATC ACC AAC AAC AGC GTG GAC CTG 3403  
 Ala Leu Asn Arg Pro Glu Ser Leu Ser Ser Ile Thr Asn Asn Ser Val Asp Leu 1134  
 AGG GAA ACA GCA GAG GCC CAC CTA GCC TGC AGC TGT ACT GCT CAG TGT GCT TAA 3457  
 Arg Glu Thr Ala Glu Ala His Leu Ala Cys Ser Cys Thr Ala Gln Cys Ala \*\*\* 1151  
 TAA TAT TGT CCT ATG TCA GTC ACT TAC ATT TTT ATC TTG AAA TAA ATT TTT ATC 3511  
 AGC TCT TGA CTG CAT CTC AAA AAA AAA A 3' 3539

Fig. 4-6. Nucleotide sequence of the vitellogenin cDNA (PMVG-2) and the derived amino acid sequence of the protein.

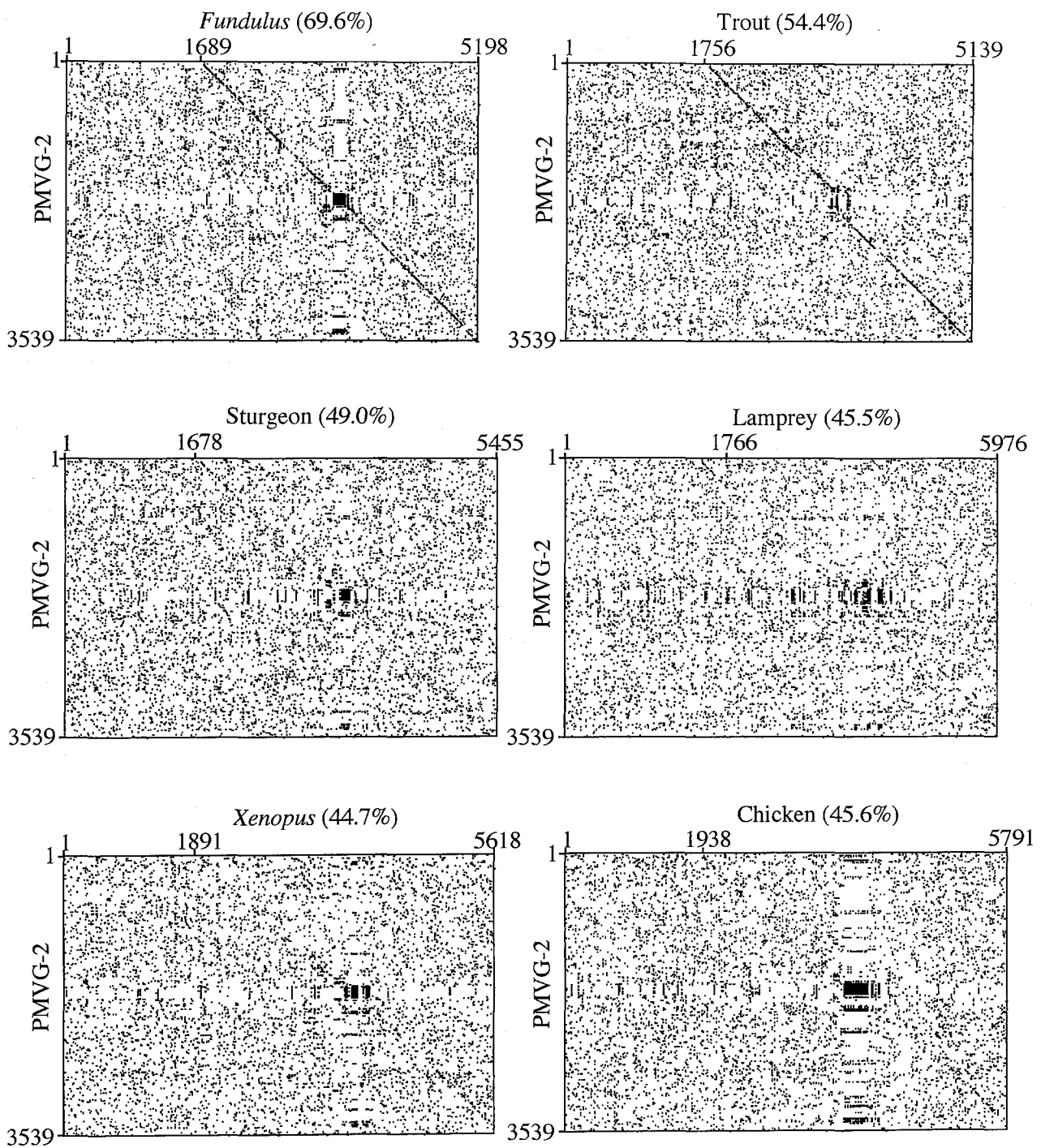
下流を始点とし、3'末端を終点とする領域であった。

PMVG-2の塩基配列からアミノ酸配列を推定した結果、ビテロジェニン特有のセリン含量の高い領域(phosvitin領域)を含んでいた(Fig. 4-6)。上記6種のビテロジェニンのアミノ酸配列と比較した場合、アミノ末端から600残基(aa)前後(498~659 aa)離れた始点よりカルボキシル末端にかけて、マミチヨグ(59.6%)、ニジマス(58.8%)、ニワトリ(45.5%)、シロチョウザメ(35.5%)、アフリカツメガエル(34.6%)、ヤツメウナギ(21.8%)の順に高い類似性(平均42.6%)を示した(Fig. 4-8)。なお、PMVG-2とPMVG-1との類似性は、塩基配列で74.2%、アミノ酸配列では64.8%と極めて高い値を示したが、完全には一致しなかった。

## 考 察

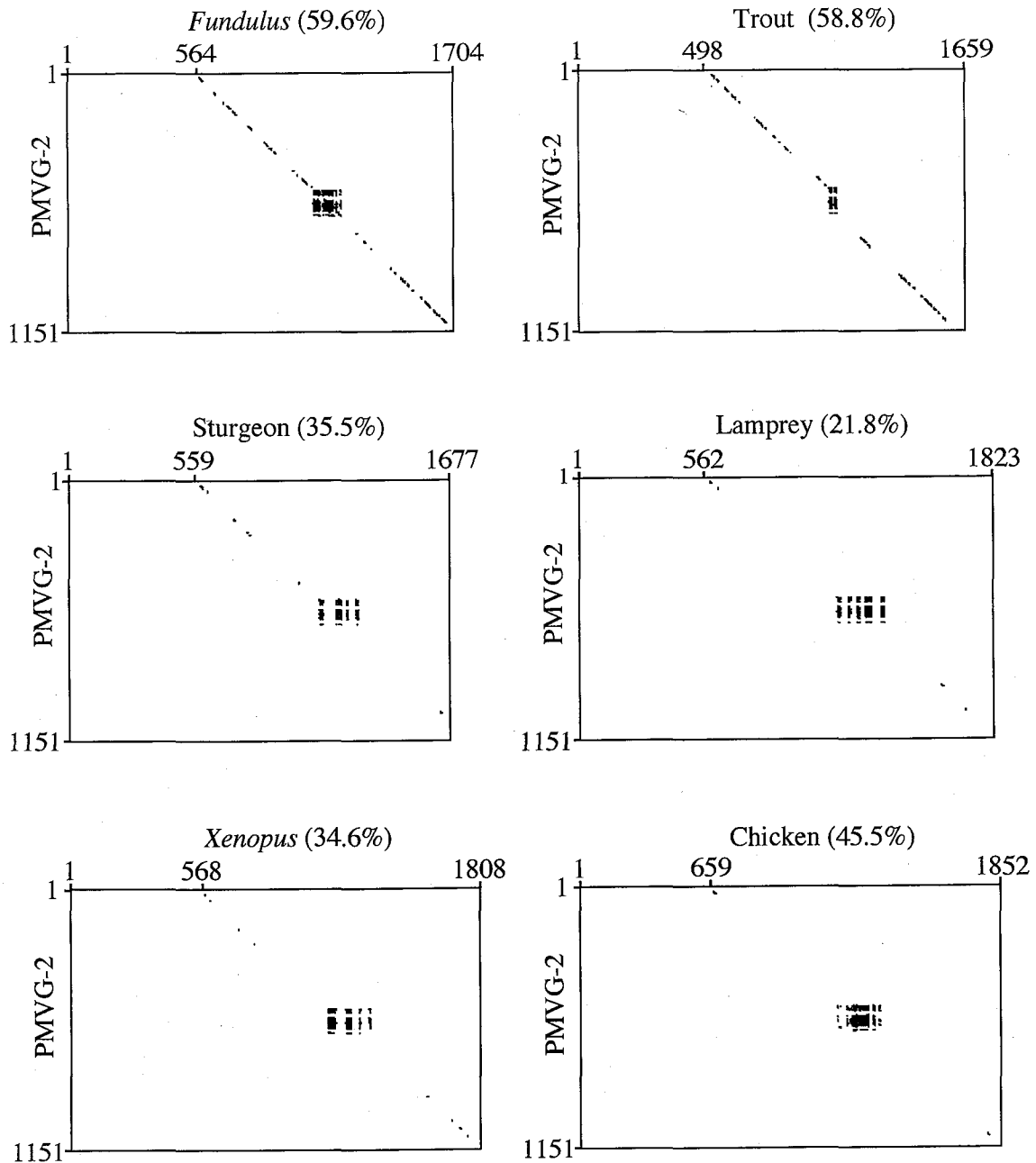
本章ではまず、精製マダイビテロジェニンの部分アミノ酸配列をもとにしてプライマーを設計、作成し、PCRによるマダイビテロジェニン遺伝子のクローニングを試みた。プライマーの設計には、出来るだけコドン数の少ない7残基以上のアミノ酸配列を選び、ロイシン等、コドン数の多いアミノ酸は出来るだけプライマー中央に位置させ、これまでに報告されているビテロジェニン遺伝子との類似性を参考に設計した。第2章でも述べたよう





**Fig. 4-7.** Dot-plot comparisons of the nucleotide sequence of PMVG-2 (red sea bream vitellogenin) with *Fundulus* (VTG I, Accession No. U70826), trout (rainbow trout, Accession No. X92804), sturgeon (white sturgeon, Accession No. U00455), lamprey (Accession No. M88749), *Xenopus* (VTG A2, Accession No. M18061), and chicken vitellogenins (VTG II, Accession No. M18060).

The dots in the matrix indicate regions where eight of ten nucleotides are identical between the two vitellogenin sequences. Numbers in parentheses show the similarities between the two sequences.



**Fig. 4-8.** Dot-plot comparisons of the putative amino acid sequence of PMVG-2 (red sea bream vitellogenin) with *Fundulus* (VTG I, Accession No. U70826), trout (rainbow trout, Accession No. X92804), sturgeon (white sturgeon, Accession No. U00455), lamprey (Accession No. M88749), *Xenopus* (VTG A2, Accession No. M18061), and chicken vitellogenins (VTG II, Accession No. M18060).

The dots in the matrix indicate regions where four of five residues are identical between the two vitellogenin sequences. Numbers in parentheses show the similarities between the two sequences.

に、精製マダイビテロジェニンにはビテロジェニンの定義を備えた2種類のタンパク質を含んでおり、両者の分離精製には至っていない。しかし、酵素消化断片の最低3つのペプチドを選択すれば、何れかの組み合わせでどちらかのタンパク質の2ヶ所に当たると期待し、実際、Vg1UとVg2Dの組合せでPCRによる特異的断片(PMVG-1)が増幅された(Fig. 4-2)。

ここで得られたPCR増幅断片のPMVG-1は、E<sub>2</sub>投与後の発現パターンや他の生物のビテロジェニン遺伝子との類似性から、マダイビテロジェニン遺伝子の一部であると考えられたが、塩基配列から推定されたペプチドは32.1 kDaにすぎず、大部分が欠損していた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果(Fig. 4-5)から、マダイビテロジェニン mRNAの完全長は約6 kbである

		10	20	30	40	50	
PMVG-1	1	-----	-----	-----	-----	-----	50
PMVG-2	1	TSG-----	-----	-----	-----	-----S	50
Fundulus 1	1	MKAVVL-ALT	LAFVAGQ--N	FAPEFAAGKT	YVYKYEALIL	GGLPEEGLAR	50
Fundulus 2	1	MRVLVL-ALT	VALVAGNQVS	YAPFAPGKT	YEYKYEGYIL	GGLPEEGLAK	50
Trout	1	MRAVVL-ALT	LALVASQSVN	FAPDFAASKT	YVYKYEALLL	GGLPEEGLAR	50
Sturgeon	1	LT-----	IALVGSQOTK	YEPSTFGSKT	YQYKYEGVIL	TGLPEKGLAR	50
Lamprey	1	MWKLVLVALA	FALADAQ---	---FQPGKV	YRYSYDAFSI	SGLPEPGVNR	50
Xenopus A2	1	MKGIYL-ALL	LALAGSERTH	IEPVFSESKI	SVYNYEAVIL	NGFPESGLSR	50
Chicken 1	1	MRGLIS-ALV	LTLVGSOHLN	YQPDFGENKV	YTNYYESILF	SGIPEKGLAR	50
Chicken 2	1	MRGIIL-ALV	LTLVGSQKFD	IDPFGNSRRS	YLYNYEGSML	NGLQDRSLGK	50
		60	70	80	90	100	
PMVG-1	51	-----	-----	-----	-----	-----	100
PMVG-2	51	PGLQV----	-----	-----	-----	-----	100
Fundulus 1	51	AGLKITSTKLL	LSAADQNTYM	LKLEVEPELSE	YSGIWPKDPA	VPATKLTAL	100
Fundulus 2	51	AGVKIQSKVL	TGAAGPDSYI	LKLEDPVISG	YSGIWPKEVF	HPATKLTSAI	100
Trout	51	AGVKVISKVL	TSAVAENTYL	LKLVNPEIFE	YSGVWPKDPF	VPAAKLTSAI	100
Sturgeon	51	AGLVKHCKVE	ISEVAQKTYL	LKLVNPEIQE	YNGIWPKAPF	YPASKLTOAL	100
Lamprey	51	AGLSGEMKIE	THGHTHNQAT	LKITQVNLKY	FLGPNPSSDF	YPLTAGYDHF	100
Xenopus A2	51	AGTKINCKVE	ISAYAQRSYF	LKIQSPEIKE	YNGVWPKDPF	TRSSKLTQAL	100
Chicken 1	51	TGIRIRSEVE	ISGIGPKLCL	IRLHSIEAAE	YNGIWPSSSF	SRSLKLTQAL	100
Chicken 2	51	AGVRLSSKLE	ISGLPENAYL	LKVRSPQVEE	YNGVWPRDPF	TRSSKITQVI	100
		110	120	130	140	150	
PMVG-1	101	-----	-----	-----	-----	-----	150
PMVG-2	101	-----	-----	-----	-----	-----	150
Fundulus 1	101	HLSSQFPSSL	NTPMFVVGKV	FAPEEVSTLV	LNIYRGILNI	LQLNIKKTHK	150
Fundulus 2	101	SAQLLTPVKF	EYANGVIGKV	FAPPGISTNV	LNVFRGLNM	FQMNICKTON	150
Trout	101	AAQFSTPIKF	EYAKGVVGKV	LAPTAVSETV	LNVHRGILNI	LQLNIKKTON	150
Sturgeon	101	ASQLTQPIKF	QYRNGQVGTI	FASQEDVSDT	LNIQRGILNM	LQLTIKKTQN	150
Lamprey	101	IQQLQVPRV	DYSAGRIQDI	YAPQVTDTA	VNIVRGILNL	FQLSLKKNQ	150
Xenopus A2	101	AEQLTKPARF	EYSNGRVGDI	FVADQVSDTV	ANIYRGILNL	LQVTIKKSD	150
Chicken 1	101	TGQLSTPIKF	EYSNGHVGNL	MAPDSVSDDG	LNIYRGILNI	LELSLKKMCH	150
Chicken 2	101	SSCFTRLKFK	EYSSGRITGNI	YAPEDCPDLC	VNIVRGILNM	FQMTIKKSON	150
		160	170	180	190	200	
PMVG-1	151	-----	-----	-----	-----	-----	200
PMVG-2	151	-----	-----	-----	-----	-----	200
Fundulus 1	151	VYDLQEVGTQ	GVCKTLYSIS	EDARIENTLL	TKTRDLSNCO	ERLNKDIGLA	200
Fundulus 2	151	VYDLQETGVK	GVCKTHYLH	EDSKADRLHL	TKTTDLNHCT	DSIHMDVGM	200
Trout	151	VYELQEAQAV	GVCKTHYVIR	EDAKAERIHL	TKSKDLNCCO	QRIMKDFGLA	200
Sturgeon	151	VYGLQENQIA	GICEASYVIO	EDRKANKIIV	TKSKDLNCCO	EKIKMDIGMA	200
Lamprey	151	TFELQETGVE	GICQTTYVVO	EGYRTNEMAV	VKTCDLNNCD	HKVYKTMG-T	200
Xenopus A2	151	VYDLQESSVG	GICHTRYVIO	EDKRGDQIRI	IKSTDFNNCO	DKVSKTIGLE	200
Chicken 1	151	SYSIQEAGIG	GICNTTYATQ	ENKKANLVDV	TKSKDLNSCE	EKVQVVTGSA	200
Chicken 2	151	VYELQEAQIG	GICHARYVIO	EDRKNRSRIYV	TRTVDLNCCO	EKVOKSIGMA	200
		210	220	230	240	250	
PMVG-1	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
PMVG-2	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
Fundulus 1	201	-YTEKCDKCO	EETKNLRGTT	TLSYVLKQVA	DAVMIKAYV	NELIQFSPFS	250
Fundulus 2	201	GYTEKCAECM	ARGITLSGAI	SVNYIMKPSA	SGTLILEATA	TELLQYSPVN	250
Trout	201	-YTEKQVECR	QRGEALMGAA	TYNYLMPKAD	NGALILEATV	TELHQFTPFN	250
Sturgeon	201	-YSHTCSNCR	KIRKNTRGTA	AYTYILKPTD	TGTLITQATS	QEVHQLTQFN	250
Lamprey	201	AYAERCPTCO	KMNKNLRSTA	VYNYAIFDEP	SGYIIKSAHS	EETQQLSVF-	250
Xenopus A2	201	-LAEFCHSCK	QLNRVIQGA	TYTYKLKGRD	QGTVIMEVTA	ROVLQVTPFA	250
Chicken 1	201	-YTQPCQTCQ	QRNKNRSRATA	TYNYIKKYTH	NEAVITQAEV	EEVHQFTPFH	250
Chicken 2	201	-YIYPCPVDV	MKERLTKGTT	AFSYKLGQSD	SGTLITDVSS	ROYQITSPFN	250
		260	270	280	290	300	
PMVG-1	251	-----	-----	-----	-----	-----	300
PMVG-2	251	-----	-----	-----	-----	-----	300
Fundulus 1	251	EANGA-AQMR	TKQSIEFLEI	EKEPIPSVKA	EYRHRGSLKY	EFSDELLQTP	300
Fundulus 2	251	IVNGA-VOME	AKQIVTFVDI	RKTPLEPLKA	DYIPRGS�KY	ELGTEFLQTP	300
Trout	251	EMSGA-AOME	AKQMLTFVEI	KKDPIIVPDN	NYVHRGSTRY	EFATTEILQMP	300
Sturgeon	251	EMTGA-ATTE	ARQKLVLEDA	KVIHVTPEQ	ELKNRGSIQY	QFASIEILQTP	300
Lamprey	251	DIKEGMVVEI	SROKLILEGI	QSAPAAQAA	SLQNRGGLMY	KFPSAITKM	300
Xenopus A2	251	ERHGA-ATME	SROVLAWVGS	KSGQLTPQI	QLKNRGNLHY	QFASELHQMP	300
Chicken 1	251	EITGGNAIVE	ARQKLALIEV	QKQVAEVPK	EFOKRGSLQY	QFGSELLQLP	300
Chicken 2	251	EPTGV-AVME	ARQQLTLVEV	RSERGSAPDV	PMQNYGSLRY	RFPVAVLQMP	300

		310	320	330	340	350	
PMVG-1	301	-----	-----	-----	-----	-----	350
PMVG-2	301	-----	-----	-----	-----	-----	350
Fundulus 1	301	LQLI--KISD	APAQVAEVLK	HLATYNIEDV	HENAPLKFLE	LVQLLRARY	350
Fundulus 2	301	IQLL--RITN	VEAQIVESLN	NLVSLNMGHA	HEDSPLKFIE	LIQLLRVAKY	350
Trout	301	IQLL--KISN	ARAQAVKILN	HLVITYNTAPV	HEDAPLKFLO	FIQLLRMASS	350
Sturgeon	301	IQLF--KTRS	PETKIKEVLQ	HLVONNQOQV	QSDAPSKFLO	LTQLLRACTH	350
Lamprey	301	SALFVTKGKN	LESEIHTVLK	HLVENNQLSV	HEDAPAKFLR	LTAFLRNVDA	350
Xenopus A2	301	IHLM--KTKS	PEAQAVEVLQ	HLVQDTQQHI	REDAPAKFLO	LVQLLRASNF	350
Chicken 1	301	VHLE--KIKD	VERQIEERLQ	DLVETTYEQL	PSDAPAKALK	LMHLRAANE	350
Chicken 2	301	LQLI--KTKN	PEQRIVETLQ	HLVLNQQQDF	HDDVSYRFEI	VVQLCRIANA	350
		360	370	380	390	400	
PMVG-1	351	-----	-----	-----	-----	-----	400
PMVG-2	351	-----	-----	-----	-----	-----	400
Fundulus 1	351	EDLEMYWNOY	KKMSPHRHWF	LDTIPATGTF	AGLRFIKEKF	MAEIIITIAEA	400
Fundulus 2	351	ESIEALWSQF	KTAKIDHRHWL	LSSTPAIGTH	VALKFKIKEKI	VAGEVITAAEA	400
Trout	351	ETINATWAEF	KAKPAYRHWI	LDVAPSIGSS	VAVRFIKEKF	LAGDITIFEA	400
Sturgeon	351	ENIEGTWRQV	EKTQLYRRWI	LDALPAAATP	TAFRFITQRI	MKRDLTDAEA	400
Lamprey	351	GVLQSIWHKL	HQOKDYRRWI	LDAVPAMATS	EALLFLKRTL	ASEQLTSAEA	400
Xenopus A2	351	ENLQALWKQF	AQRTQYRRCL	LDALPMAGTV	DCLKFKIKQLT	HNEELTTQEA	400
Chicken 1	351	ENYESVWKQF	SSRPAYRRYL	LDLPPAAASH	RSRFRLRHKM	ERQELTNWEI	400
Chicken 2	351	DNLESFWRQV	SDKPRYRRWL	LSAVSASGTT	ETLKFLKNRI	RNDDLNYIQT	400
		410	420	430	440	450	
PMVG-1	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
PMVG-2	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
Fundulus 1	401	AQAFITAVHM	VTADPEVTKL	FESLVDSKIV	VENPLLRREV	FLGYGTMVNK	450
Fundulus 2	401	AQAIMSSTHL	VKADLEAIKL	QEGAVTPTNI	RENAGLRELV	MLGFGIMVHK	450
Trout	401	AQALVAAMHM	VAADLETVKL	VESAFNHKTI	QTHPVLRELT	MLGYGTMVSK	450
Sturgeon	401	IQTLYTAMHL	VQTNHQIVQM	AAELVFDNAN	LKCPVLRKHA	VLAYGSMVNR	450
Lamprey	401	TQIVYSTLSN	QATRELSLY	ARELHTSFTI	RNRPILRKTA	VLYGYSLVFR	450
Xenopus A2	401	AVLITFAMRS	ARPGQRNFQI	SADLVQDSKV	QKYSTVHKAA	ILAYGTMVRR	450
Chicken 1	401	AQTVLVALHS	SSPTQEVMEE	ATLIVKHKCP	RSSSVLRKVC	LLSYASLCHK	450
Chicken 2	401	LLTVSLTLHL	LQADIEHTLPI	AADLMTSSRI	QKNPVLQQVA	CLGYSSVVRN	450
		460	470	480	490	500	
PMVG-1	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
PMVG-2	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
Fundulus 1	451	YCNKIVDCPV	ELIKPTQORL	SDAIKNEEEI	NIIILYIKVLG	NAGHPSSFKS	500
Fundulus 2	451	YCVENPSCPS	ELVRRPVHDII	AKALEKRDND	EISLALKVLG	NAGHPSSLKP	500
Trout	451	YCVHEPNCPA	ELVKPIHELA	VQAVANSKFE	ELSMVLKALG	NAGHPASIKP	500
Sturgeon	451	YCAETLNCRE	EALKPLHDFE	NDATSRHHEE	ETVLALKALG	NAGQPSSIKR	500
Lamprey	451	YCANTVSCPD	ELLOPLHDL	QSSSDRADEE	ETVLALKALG	NAGQPNSIKK	500
Xenopus A2	451	YCDQLSSCPE	HALLEPLHELA	AEAANKGHYE	DTALALKALG	NAGQPSSIKR	500
Chicken 1	451	RCSSPYSCSE	-CLQVHFVFA	GEALGKSNI	EVLALKALG	NVGHPASIKH	500
Chicken 2	451	YCSQTSACPK	EALQPIHDLA	DEATSRGRED	KMKLALKCIG	NMGEPASLKR	500
		510	520	530	540	550	
PMVG-1	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
PMVG-2	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
Fundulus 1	501	LTAKIMPIHGT	AAVSLPMTIHT	VEAIMALRNI	AKKESRMVQE	LALQLYMDKA	550
Fundulus 2	501	ITMKLLPGFGS	SASELELRVH	IDATLALRKI	GKREPKMIQD	VALQLFMDRT	550
Trout	501	ITKLLPVFGT	AAAAALPLRVQ	ADAVLALRNI	AKREPRMVQE	VAVQLFMDKA	550
Sturgeon	501	IQKCLPGFSS	GASQLPVKIQ	VDAVMALRNI	AKKEPGKVQE	LTMQLFMDHQ	550
Lamprey	501	IQRFLPGQGG	SLDEYSTRVQ	AEAIMALRNI	AKRDPRKVQE	ITVLPFLNVA	550
Xenopus A2	501	IQKFLPGFSS	SADQLPVRIQ	TDAVMALRNI	AKEDPRKVQE	ITLQIFMDRD	550
Chicken 1	501	IKKFLPGYAA	GASELPLKVH	ETAVMALKSI	GMRDPMVQA	ITLEIFLNHK	550
Chicken 2	501	ILKFLPISSS	SAADIPVHIQ	IDAITALKKI	AWKDPKTVQG	YLIQLADQS	550
		560	570	580	590	600	
PMVG-1	551	-----	-----	-----	-----	-----	600
PMVG-2	551	-----	-----	-----	-----	-----	600
Fundulus 1	551	LHPELRMLSC	ITVLFETSPSM	GLVTTVANSV	KQEE--NLQV	ASFTYSHMKS	600
Fundulus 2	551	LDPELRMVAV	VVLFDTKLPM	GLITTLAQSL	LKEP--NLQV	LSFVYSYMKA	600
Trout	551	LHPELRMLAG	ITVLFETKPPM	GLVITLASIL	KTEK--NMQV	ASFTYSHMKS	600
Sturgeon	551	LHSEVRMVAS	MVLLSTRPSM	ALVATLAEAL	LKE--TSLQV	ASFTYSHMKA	600
Lamprey	551	IKSELRIRSC	IVFESKPSV	ELVSMVAVRL	RREP--NLQV	ASFVYSQMR	600
Xenopus A2	551	VRTEVRMAG	LALFETRPGL	ATVTAIANVA	ARESKTNLQL	ASFTFSQMK	600
Chicken 1	551	IHPRIRMLAA	VVLEETKPGI	PILMLVDVA	LKEP--SMQV	ASFTYSHLRA	600
Chicken 2	551	LPPEVRMAG	AVIFETRPAL	ALITTIANVA	MKESKTNMQV	ASFVYSHMKS	600

	610	620	630	640	650		
PMVG-1	601	-----	-----	-----	-----	650	
PMVG-2	601	LTRSTAAIHA	SVA AACNVAV	KILSPKLNRL	SMRFSKAIHV	DSYYSPLMIG	650
Fundulus 1	601	LSRSPATIHP	DVAAACSAAM	KILGTKLDRL	SLRYSKAVHV	DLYNSSLAVG	650
Fundulus 2	601	FTKTITPDHS	TVA AACNVAI	RILSPRFRERL	SYRYSRAFHV	DHYHNPWMLG	650
Trout	601	LTRSTAPDFA	SVA AACNVAV	KMLSNKFRRL	SCHFSQAHL	DAYSNPRLIG	650
Sturgeon	601	ITRSTAPENH	ALSSACNVAV	KLLSRKLDRL	SYRYSKAMHM	DTFKYPLMAG	650
Lamprey	601	LSRSNPEFR	DVAAACSVAI	KMLGSKLDRL	GCRYSKAVHV	DTFNARTMAG	650
Xenopus A2	601	LSKSSVPHLE	PLAAACSVAV	KILNPSLDNL	GYRYSKVMRV	DTFKYPLMAG	650
Chicken 1	601	LGRSTAPDLQ	MMA SACRMAV	RALSPKFDRL	GYQFSKVFVR	SMFKFELMSG	650
Chicken 2	601	LSKSRLPFMY	NISSACNIAL	KLLSPKLDLDM	SYRYSKVLTRA	DTYFDNRYVG	650

	660	670	680	690	700		
PMVG-1	651	-----	-----	-----	-----	700	
PMVG-2	651	AAASAFYIND	AATILPRSFV	SKTSA YLAGA	AADVLEVGV	TEGLQEALLK	700
Fundulus 1	651	AAATAFYIND	AATFMPKSFV	AKTKGFTAGS	TAEVLETGAN	IEGLQELTLK	700
Fundulus 2	651	AAASAFYIND	AATVLPKNTM	AKARVYLSGV	SVDVLEFGAR	AEGVQEALLK	700
Trout	651	AAASAFYIND	AATLFPRTVV	AKARTYFAGA	AADVLEVGV	TEGIQEALLK	700
Sturgeon	651	AAANIHIIN	AASILP SAVV	MKFOAYILSA	TADPLEIGLH	TEGLQEVLMQ	700
Lamprey	651	VSADYFRINS	PSGPLPRAVA	AKIRGGMGY	ASDIVEFGLR	AEGLOELLYR	700
Xenopus A2	651	AAAKVFIMNS	ANTMFPVFIL	AKFREYTSLV	ENDDIEIGIR	GEGIEEFLRK	700
Chicken 1	651	LAAYKVFVNN	AGSLIPTMAV	SQLRTHFLGR	VADPIEVGIA	AEGLOEFVVR	700
Chicken 2	651	ATGEIFVVNS	PRTMFP SAI	SKLMANSAGS	VADLVEVGIR	VEGLADVIMK	700

	710	720	730	740	750		
PMVG-1	701	-----	-----	-----	-----	750	
PMVG-2	701	NPALINNADR	-----	-----MTKM	KRVIKALSEL	RSLPARTPLA	750
Fundulus 1	701	NPALSESTR	-----	-----ITKM	KRVIKALSEW	RSLPTSKPLA	750
Fundulus 2	701	ARDVPE SADR	-----	-----LTKM	KQALKALTEW	RANPSROPLG	750
Trout	701	LPPAPENADR	-----	-----ITKM	RRVIKALSDW	RSLATSKPLA	750
Sturgeon	701	NHEHTDQMP	-----	-----AGKI	QQIMKMLSGW	KSVPSEKTLA	750
Lamprey	701	GSQEQDAYGT	ALDRQTL LRS	GQARSHVSSI	HDTLRKLSDW	KSVPEERPLA	750
Xenopus A2	701	QNIQFANFPM	-----	-----RKKI	SQIVKSL LGF	KGLPSQVPLI	750
Chicken 1	701	GYSPOKDWET	-----	-----NYDF	REILK KLSDW	KALPRDKPFA	750
Chicken 2	701	RNIPFAEYPT	-----	-----YKQI	KELGKALQGW	KELPTETPLV	750

	760	770	780	790	800		
PMVG-1	751	-----	-----	-----	-----	800	
PMVG-2	751	SVYIKFFGQE	I AFANIDKNI	IDOATALATA	PSLHTFG---	-KNAIKALL-	800
Fundulus 1	751	SVYVKFFGQE	IGFANIDKPM	IDKAVKFGKE	LPIQEYG---	-REALKALL-	800
Fundulus 2	751	SLYVKV LQGD	VAFANIDKEM	VEKITEFATG	PEIRTRG---	-KKALDALL-	800
Trout	751	SIYVKFFGQE	I AFANIDKSI	IDOALQ LANS	PSAHALG---	-RNALKALL-	800
Sturgeon	751	SAYIKLFGQE	ISFSRLDKKT	IQEALQAVRE	PVERQTV---	-IKRVVNOLE	800
Lamprey	751	SGYVKVHGQE	VVFAELDKKM	MQRISQ L WHS	ARSHHAAAQE	QIRAVVSKLE	800
Xenopus A2	751	SGYIKLFGQE	I AFTELNKEV	IQNTIQALNQ	PAERHTM---	-IRNVLNKLE	800
Chicken 1	751	SGYIKLFGQE	LLFGR LDKDT	LQNV LQVWYG	PDEKIPS---	-TRRLISSLQ	800
Chicken 2	751	SAYLKILGQE	VAFININKEL	LQVVMKTVE	PADR NAA---	-IKRIANQIL	800

	810	820	830	840	850		
PMVG-1	801	-----	-----	-----	-----	850	
PMVG-2	801	TGASFHVAKP	LLATEVRRIM	PTAAGLPMEL	SLYTA AVAAA	AVQVKATITP	850
Fundulus 1	801	SGINEHYAKP	VLA AEMRRIL	PTVAGIPMEL	SLYSA AVAAA	SVEIKPNTSP	850
Fundulus 2	801	SGYSMKYSKP	MSAIEVRRIF	PTSLGLPMEL	SLYTA AVTAA	SVEVQATISP	850
Trout	801	AGATFOYVKP	LLAAEVRRIE	PTAVGLPMEL	SYTA AVAKA	YVNV RATLTP	850
Sturgeon	801	RGAAALSKP	LLVAEVRRIE	PTCIGLPMEM	SLYVS AVTTA	DINVAQHTIP	850
Lamprey	801	QGM DVLLTKG	YVVSEVRYMQ	PVCIIGLPMEL	NLLVSGVTTN	RANLHASFSQ	850
Xenopus A2	801	NGVVGQYARR	WMTWEYRHII	PTTVGLPAEL	SLYQSAIVHA	AVNSDVKVKP	850
Chicken 1	801	TGIGRQWTKA	LLSEIRCLV	PTCVGFPMET	SFYYS SVTKV	AGNVQAQITP	850
Chicken 2	801	NSIAGQWTP	VVMGELRYVV	PSCGLPLEY	GSYTTALARA	AVSVEGKMITP	850

	860	870	880	890	900		
PMVG-1	851	-----	-----	-----	-----	900	
PMVG-2	851	ALPENFLTH	LLKTDIQFET	EIRPSVAVNT	FVMGVNTAM	LQALISRAK	900
Fundulus 1	851	RLSADFVKT	LLKTDV LKA	EIRPMVAMDT	YAVMGLNTDI	FOAALVARAK	900
Fundulus 2	851	PLPEDFHPAH	LLKSDISMKA	SVTPSVSLHT	YGVMGVNSPF	IQASVLSRAK	900
Trout	851	ALPETFHAAQ	LLKTNIE LHA	EVRPSIVMHT	FVMGVNTAF	IQAAIMARAK	900
Sturgeon	851	SPTNDENVAQ	LLNSNIVLHT	DVTPSIAMHT	IAVMGINTHV	IQTGVELHVK	900
Lamprey	851	SLPADMKLAD	LLATNIELRV	AATTSMSQHA	VATMGLTTDL	AKAGMQTHYK	900
Xenopus A2	851	TPSGDFSAAQ	LLSQIQ L NG	EVKPSVLVHT	VATMGINSPL	FOAGIEFHGK	900
Chicken 1	851	SPRSDFRLTE	LLNSNVRLRS	KMSLSMAKHM	TFVIGINTNM	IQAGLEAHTK	900
Chicken 2	851	PLTGDFRLSQ	LLESTMQTRS	DLKPSLYVHT	VATMGVNTIEY	FOHAVEIQGE	900

	910	920	930	940	950		
PMVG-1	901	-----	-----	-----	-----	950	
PMVG-2	901	LNSIVPAKIA	ARLDINEGFH	KIEALPVSV	ENIAAVHVET	FAVARNIEDL	950
Fundulus 1	901	LHSVVPKIA	ARLNIEKEDF	KLIALPVDVP	ENITSMNVIT	FAVARNIEEP	950
Fundulus 2	901	DHAALPKKME	ARLDIVKGYF	SYQFLPVEGV	KTIASARLET	VATARDVEGL	950
Trout	901	VRTIVPAKFA	AQLDIANGNF	KFEAFPVSPP	EHTAAHIET	FAVARNVEDV	950
Sturgeon	901	ARTTVPMKFT	AKIDLKKNF	KIESEPCQQE	TEVLSLSAQ	FAISRNVEDL	950
Lamprey	901	TSAGLGVNGK	IEMNARESNF	KASLKPFOOK	TVVVLSTMES	IVFVRDPSG-	950
Xenopus A2	901	VHAHLPAKFT	AFLDMKDRNF	KIETPPFQQE	NHLVEIRAQT	FAFTRNTADL	950
Chicken 1	901	VNAHVPVNVV	ATIOMKEKSI	KAEIAPPCKEE	TNLIIVSSKI	FAVTRNIEDL	950
Chicken 2	901	VQTRMPMKFD	AKIDVILKNL	KIETNPCKEE	TEIVVGRHKA	FAVSRNIGEL	950

	960	970	980	990	1000		
PMVG-1	951	-----	-----	-----	-----	1000	
PMVG-2	951	AAARITPIIP	AK-----VLK	PFSE---IIL	TSKLSAAA--	ASFSQSSE	1000
Fundulus 1	951	LVERITPLLP	TK-----VLV	PIPIR---RH	TSKLDPTR--	NSMLDSSE	1000
Fundulus 2	951	AAAKVTPVVP	YE-----PIV	--SKNATLNL	SQM----SYY	LNSISASSE	1000
Trout	951	PAERITPLIP	AQ-----GVA	RSTQQRDKL	TSMIADSAAS	FAGSLRSSE	1000
Sturgeon	951	DAAKKNPLLP	EE-----AVR	NILNEQ-FNS	GTEDSNRER	AGKFARPSAE	1000
Lamprey	951	--SRILPVLV	PKMTLDKGLI	SQQQQPHHQ	QPPHQHQDQ	ARAAYQRPWA	1000
Xenopus A2	951	DSARKTLVVP	RN-----NEQ	NILKKH-FET	TGRTSAE---	GASMMEDSSE	1000
Chicken 1	951	AASKMTPVLL	PE-----AVP	DEMKMS-FDS	DSASG---ET	DNIRDROSVF	1000
Chicken 2	951	GVEKRTSILP	ED-----APL	DVTEEP-FQT	SERASREH--	FAMQGPD	1000

	1010	1020	1030	1040	1050		
PMVG-1	1001	-----	-----	-----	-----	1050	
PMVG-2	1001	TIDQDVA---	DAEHTVTKA	AQYEKKYCAK	VAAVGLKGC	KVATDNAAFI	1050
Fundulus 1	1001	LLPMEEE---	DVEPIPEYKF	RREAKKYCAK	HIGVGLKACF	KEASQNGAST	1050
Fundulus 2	1001	LLPFSLQRQT	GKNKIPKPIV	KKMCATTYT-	-YGI--EGCV	DIWSRNATFL	1050
Trout	1001	ILYSDLPSNF	--KPIIKATV	VHLEETICVE	RLGV--KACF	EFTSESAAFI	1050
Sturgeon	1001	MMSQELMNSG	EHQNRKGA--	HATRSACAK	AKNFGFEVCF	EGKSENVAFI	1050
Lamprey	1001	SHEFSPAEQK	QIHDMTAR	VMRKQHCCK	SAALSQKVC	SARLRNAAFI	1050
Xenopus A2	1001	MGPKKYSAEP	GHHQYAPN--	-INSYDACTK	FSKAGVHLCI	QCRTHNAASR	1050
Chicken 1	1001	DVSSGNSFSF	GH--PSSGK	EPFIQSMCSN	ASTFGVQVCI	EKKSVAHAFFI	1050
Chicken 2	1001	SMPRKQSHSS	REDLRRSTGK	RAHKRDICLK	MHHIGCQLCF	SRRSRDASFI	1050

	1060	1070	1080	1090	1100		
PMVG-1	1051	-----	-----	-----	-----	1100	
PMVG-2	1051	RDIPLYKLAG	KHSVILSKFP	I-EGE-VIER	LEMEVQVGP	AAEKLKQIN	1100
Fundulus 1	1051	QDIVLYKLAG	SHNFSFVTP	I-EGE-VVIER	LEMEVKVGA	AAEKLVKRIN	1100
Fundulus 2	1051	RNTPTIYATIG	NHSLLVNVT	A-AG-PSIER	LEIEVQFGEQ	AAEKLKVEVY	1100
Trout	1051	RNTLFYNMIG	KHSVLISVKP	S-ASEPAIER	LEFEVQVGP	AAEKIKVIT	1100
Sturgeon	1051	RDSPLYKIIG	QHCKIALKP	SHSSEATIEK	IQLELOIGNK	AASKIIRVVA	1100
Lamprey	1051	RNALLYKITG	DYVSKVYQ	T-SSKAQIQK	VELELQAGPQ	AAEKVIRMVV	1100
Xenopus A2	1051	RNTIFYQAVG	EHDKLTMKP	AHT-EGAIK	LQLEITAGPK	AASKIMGLVE	1100
Chicken 1	1051	RNVPLYNATG	EHALRMSFKP	VYS-DVPIEK	IQVTIQAGDQ	APTQMVRLVT	1100
Chicken 2	1051	QNTYLHKLIG	EHEAKIVLMP	VHT-DADIDK	IQLEIQAGSR	AAARLITEVN	1100

	1110	1120	1130	1140	1150			
PMVG-1	1101	-----	-----	-----	-----	1150		
PMVG-2	1101	LSE-EEIVEG	R--PVLMLK	KILAPGLRNR	TSSS-----	-----	1150	
Fundulus 1	1101	LSEDEETEEG	G--PVLVKLN	KILSSRRNSS	SSSS-----	-----	1150	
Fundulus 2	1101	LNEEEVLED	K--NVLMKLK	KILSPGLKNS	TKAS-----	-----	1150	
Trout	1101	MNEEEAPEG	K--TVLLKLN	KILLPDLKNG	TRAS-----	-----	1150	
Sturgeon	1101	MQSLAEADM	K-GNILKLN	KLLT-----	-----	VQGE---	1150	
Lamprey	1101	LVA-----	-----	-----	KAS	KKSKNSTIT	EEGVGETIIS	1150
Xenopus A2	1101	VEGTEGEPMD	E-TAVTKRLK	MILG-----	-----	-----	IDESRKD	1150
Chicken 1	1101	FEDPERQESS	R-KEVMKRVK	KILDDTDNQA	TRNSRSSSSS	ASSISESSES	-----	1150
Chicken 2	1101	PESEEDESS	PYEDIQAKLK	RILG-----	-----	-----	IDSMTKVV	1150

	1160	1170	1180	1190	1200		
PMVG-1	1151	-----	-----	-----	-----	1200	
PMVG-2	1151	-----	-----	-----	SSSS	-----	1200
Fundulus 1	1151	-----	-----	-----	SSSS	-----	1200
Fundulus 2	1151	-----	-----	-----	SSSS	-----	1200
Trout	1151	-----	-----	-----	SS--	-----	1200
Sturgeon	1151	-----	-----	-----	-----	-----	1200
Lamprey	1151	QLKKILSSDK	DK-----	-----	-----	--DAKPPGS	1200
Xenopus A2	1151	TNETA-----	-----	-LYRSKQKKK	NKI-----	-----	1200
Chicken 1	1151	TTSTPSSSDS	DNRASQGDQ	INLKSROSKA	NEKKFYFPGD	SSSSGSSSSS	1200
Chicken 2	1151	ANKTR-----	-----	-HPKNRPSKK	GNTVLAEEGT	EPDAKTSSSS	1200

	1210	1220	1230	1240	1250		
PMVG-1	1201	-----	-----	-----	-----	1250	
PMVG-2	1201	SSSRSSVSSK	SSSSSSSRVT	SKATDVAARK	-----SRN	SRSSSSITSSS	1250
Fundulus 1	1201	SSSESRSSRS	SSSSSSSSRS	SRKIDLAART	NSSSSSSSR	SRSSSSSSSSS	1250
Fundulus 2	1201	GSSRSRRSRS	SSSSSSSSSS	S-----SSRS	SSSSSRSSSS	LRNRSKMLDL	1250
Trout	1201	-----	-----SSSSSS	S-----SSRS	SSSRSRSRKS	-----	1250
Sturgeon	1201	-----	-----	-----	-----TQDS	TLRGFKRRSS	1250
Lamprey	1201	SSSSSSSSSS	SSSSSSDKS	GKKTPRQGST	VNLAAKRASK	KQRGKDSSSS	1250
Xenopus A2	1201	-----	-----H	NRRLDAE---	-VVEARKQSS	SLSSSSSSSS	1250
Chicken 1	1201	SSSSSSSSDS	SSSRSSSSSS	DSSSSSSSS	SSSSSKKSS	SRSSKSNRS	1250
Chicken 2	1201	SSASSTATSS	ASSSASSPNR	KKPMDIEEND	QVKQARNKDA	SSSSRSKSS	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
PMVG-1	1251	-----	-----	-----	-----	-----	1300
PMVG-2	1251	SSSGSSSSRR	SSSSSSSSSS	SRSSSRSSR	-----	-----	1300
Fundulus 1	1251	SSSSSSSSSS	SSRRSSSSSS	SSSSSSSR	-----	-----	1300
Fundulus 2	1251	ADPLNITSKR	SSSSSSSSSS	SSSSSSSS	-----	-----	1300
Trout	1251	-----	-----ESSSSSS	SSSRISKR	-----	-----	1300
Sturgeon	1251	SSSSSSSSSS	SSSSSSSSSS	SQQSRMEKRM	EQDKLTENLE	RDRDHMRGKQ	1300
Lamprey	1251	SSSSSSSSDS	SKSPHKHGA	KRQHAGHGAP	HLGPQSHSS	SSSSSSSSSS	1300
Xenopus A2	1251	SSSSSSSSSS	SSSSSSSS	SSSSSSSR	KRREHNPHQ	RESSSSSSO	1300
Chicken 1	1251	SSSNKDSSS	SSSKSNKGS	SSSSSKASGT	RQKAKKQSKT	TSFPHASAAE	1300
Chicken 2	1251	NSSKRSSSKS	SNSSKRSSSS	SSSSSSSSRS	-----SSSS	SSSSNSKSS	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
PMVG-1	1301	-----	-----	-----	-----	-----	1350
PMVG-2	1301	-----	-----	SSSSSSRS	VSSSSSRSS	ASS-----	1350
Fundulus 1	1301	-----	-----	SSRVNSTR	SSSSSRSS	ASS-----	1350
Fundulus 2	1301	-----	-----	SSSKTKWQ	LHE-----	-----	1350
Trout	1301	-----	-----	DGPDOPYN	PND-----	-----	1350
Sturgeon	1301	SKNKKQEWKN	KQKHHKQLP	SSSSSSSSSS	SGSNSSSSSS	SSSSSSSS	1350
Lamprey	1301	SASKSFSTVK	PPMTRKPRPA	RSSSSSSSD	SSSSSSSSSS	SSSSSSSSSS	1350
Xenopus A2	1301	EQNKRNLOE	NRKHGQKGM	SSSSSSSSSS	SSSSSSSSSS	SSSSSSSEEN	1350
Chicken 1	1301	GERSVHEQKQ	ETQSSSSSS	RASSNSRST	SSTSSSSSS	GVSHROWKQD	1350
Chicken 2	1301	SSSKSSSSSS	RSRSSKSSSS	SSSSSSSSSS	SKSSSSRSS	SSSKSSSSSS	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
PMVG-1	1351	-----	-----	-----	-----	-----	1400
PMVG-2	1351	-----	-----	LAS	LF-----	-----	1400
Fundulus 1	1351	-----	-----	LAS	FF-----	-----	1400
Fundulus 2	1351	-----	-----	-----	-----	-----	1400
Trout	1351	-----	-----	-----	-----	-----	1400
Sturgeon	1351	RSHNHRN	NRTLSS	-----	-----K	-----SKRYQN	1400
Lamprey	1351	SSSESLS	-----	-----EW	-----LAVKDN	Q-----	1400
Xenopus A2	1351	RPHKNRQ	HDNKQA	-----	-----KMSNQ	HQKKKNKFSE	1400
Chicken 1	1351	REAEIKRVKS	QFNSSSSYDI	PNEWETYLPK	VYRLRFRSAH	THNHSGHRTS	1400
Chicken 2	1351	HSHHSGHNG	SSSSSS	-----	-----SSRS	HSHHEHSGH	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
PMVG-1	1401	-----	-----	-----	-----	-----	1450
PMVG-2	1401	-----SASSS	SSRSSARVSK	RVAYPHKPK	DHKQALTSQ	AALLSKSRSS	1450
Fundulus 1	1401	-----SDSSS	SSSSSDRRSK	EVM--EKFOR	LHKK-----	-----MVASGSS	1450
Fundulus 2	1401	-----	-----	-----RNITK	DHTHSHSVSK	E--RLNSKSS	1450
Trout	1401	-----	-----	-----RKFKK	NHKDSQSTSN	V--ISRSKSS	1450
Sturgeon	1401	NNNSSSSSGS	SSSSEEIQKN	PETIFAYRFRS	HRDKLGFQNK	RGRVSSSSSS	1450
Lamprey	1401	-----	-----	SAFYNFKYVP	QRKPL--TSR	RHTPASSSSS	1450
Xenopus A2	1401	SSSSSSSSSS	SEMWNKKKHH	RNFYDLNER	TARTKGT EHR	GSRLSSSSES	1450
Chicken 1	1401	SSSSSSSSSS	SSSHNSSSS	DSSSRSHMS	DSSSSSSSHR	HGEKAAHSSR	1450
Chicken 2	1401	LEDDSSSSSS	SSVLSKIWGR	HEIYQYRFRS	AHRQ---EFP	KRKLPGDRAT	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
PMVG-1	1451	-----	-----	-----	-----	-----	1500
PMVG-2	1451	AASF-----	-----ALTT	QNKFLGNEAP	DAFATIVRAV	RADNKMVGQ	1500
Fundulus 1	1451	ASSVE-----	-----AIYK	EKKYLGEBA	VV-AVILRAV	KADKRMVGQ	1500
Fundulus 2	1451	ASSFE-----	-----SIYN	KITYLSNIVS	PVIVLVRAL	RADHKNOGYQ	1500
Trout	1451	ASSFH-----	-----AIYK	QDKFLGNKLA	PMVITLFRLV	RADHKTEGYQ	1500
Sturgeon	1451	SSSSSSQSTL	NSKQDA--K	---FLGSSP	PIFAFVARAV	RSDGLQGGYQ	1500
Lamprey	1451	SSSSSSSSSS	SSSSSDMTV	SAESFEKHSK	PKVIVLRAV	RADGKQGGYQ	1500
Xenopus A2	1451	SSSSSESA--	-YRHK--K	---FLGDKEP	PVLVVTFAV	RNDNTKOGYQ	1500
Chicken 1	1451	RPTSRRAASA	HHRPGSSLTR	ERNFLGDVIP	PGITIVAQAV	RSDNRNOGYQ	1500
Chicken 2	1451	SRYSSSTRSSH	DTSRAASWPK	---FLGDIKT	PVLAFLHGI	SNNKKTGGLQ	1500

	1510	1520	1530	1540	1550		
PMVG-1	1501	-----	-----	-----	-----	1550	
PMVG-2	1501	LAVYLD-KPS	TR--IQIILA	ALAADNNWKL	CADGALLSKH	KVTAKIGWGA	1550
Fundulus 1	1501	LGFYLD-KPN	AR--VOIIVA	NISSDSNWRI	CADAVVLSKH	KVITTKISWGE	1550
Fundulus 2	1501	IAVYD-KLT	TR--VOIIVA	NLTEDDNWRI	CSDSMMLSHH	KVMTRVTVGI	1550
Trout	1501	VTAYLN-KAT	SR--LOIIMA	ALDENDNWKL	CADGVLLSKH	KVTAKIANGA	1550
Sturgeon	1501	VAAVTD-NRV	SRPRVQLLAT	EIEIKSRWQI	CADATLASNY	KAMALMRWGE	1550
Lamprey	1501	TTLYYGLTSN	GLPKAKIVAV	ELSDLVWKL	CAKFRLSAHM	KAKAATGWGK	1550
Xenopus A2	1501	MVVYQE-YHS	SKQIQIAYVM	DI-SKTRWAA	CFDAVVVNP	EAQASLKWGQ	1550
Chicken 1	1501	ATAYVR-SDA	AKVDVQLVVV	QLAE-TNWKA	CADAVIT-PL	KACARMRWGK	1550
Chicken 2	1501	LVVYAD-TDS	VRPRVQVFWT	NLTDSKWKL	CADASVRNAP	QAVAVYKWGW	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
PMVG-1	1551	-----	-----	-----	-----	1600	
PMVG-2	1551	ECKQYDIMIT	AETGLVGPSP	AARVRVAVND	LPS---AIKH	YAKKMYDLIP	1600
Fundulus 1	1551	QCRKYSTNVT	GETGIVSSSP	AARLRVSWER	LPS---TLKR	YGMVVKYVVP	1600
Fundulus 2	1551	GCKQYNTITIV	AETGRVEKEP	AVRVKLAWAR	LPTY---TRD	YARRVSRVTS	1600
Trout	1551	ECKDYNTFIT	AETGLVGPSP	AVRLRLSWDK	LPKVPKAVWR	YRIVSEFIP	1600
Sturgeon	1551	ECQDYKVAVS	AVTGRLASHP	SLOIKAKWSR	IPR---AAKQ	TQNILAEYVP	1600
Lamprey	1551	NCQQRAMLE	ASTGNLQSHP	AARVDIKWGR	LPS---SLQR	AKNALLEKA	1600
Xenopus A2	1551	NCQDYKINMK	AETGNFGNQP	ALRVITANWPK	IPS---KWK	TGQVVGYYVP	1600
Chicken 1	1551	ECRDYRIAL	ATTGOMARKL	AVQLKQVWGI	IPS---WIKK	TSTALMRYVP	1600
Chicken 2	1551	DCRDYKIVSTE	LVTGRFAGRP	AAQVKLEWPK	VPS---NVRS	VVEWFYEFVP	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
PMVG-1	1601	-----	-----	-----	-----	1650	
PMVG-2	1601	ANM---LPL	IK-GKDEMSA	NQLSMTVIAT	SDRTIDFIWK	SPTRTIFYKLA	1650
Fundulus 1	1601	VKI---LSDL	IH-TKRENS	RNLSVIATAT	SEKTIIDITK	TPMSSVYVNT	1650
Fundulus 2	1601	RVAE---DNG	VNRTKVASKP	KEIKLTVAVA	NETSLNVLN	TPKNTFFKLG	1650
Trout	1601	GYIPYLLADL	VPMQKDKNNE	KQTOFTVVAT	SERTLDVILK	TPKMTLYKLG	1650
Sturgeon	1601	G-AAFMLG--	FSQKEQRNPS	KQKTIILAVT	SPNTIDTLIK	APKITLFKQJ	1650
Lamprey	1601	PVIASKLEME	IMGKKNQK--	HQVSVILAAM	TPRRNNITVK	LPKVTYFQQG	1650
Xenopus A2	1601	G-AMVMG--	FQGEYKRNSQ	ROVKLVFALS	SPRTCQVWIR	IPRLTVYYRA	1650
Chicken 1	1601	G-VALLVLG--	FSEAHQRNPS	RELTVRAVAT	SPRSIDTVIK	VPGVTLYYQG	1650
Chicken 2	1601	G-AAFMLG--	FSERMDKNPS	RQARMVVALT	SPRTCQVVK	LPDIILYQKA	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
PMVG-1	1651	VGLPVNMPFG	DTAAE--LEA	YQD---NWAD	KISFMLTKAH	AAECAMVKDT	1700
PMVG-2	1651	LDLPLYPLPD	GIKG---LTP	FDG---LAD	QVHYLFAKAA	AAECSFNRDA	1700
Fundulus 1	1651	MHLPMCIPIID	EIKG---LSP	FDE---VID	KIHFVMSKAA	AAECSFVEDT	1700
Fundulus 2	1651	WVLPPEYLPIN	NTAAE--LQA	FQG---RWM	QVTYMLTKSA	AAECTVVEDT	1700
Trout	1651	VNLPCSLPF-	ESMTD--LSP	FDD---NIVN	KIHYLFSEVN	AVKCSMVRTI	1700
Sturgeon	1651	VQIPYQIPME	PSDAER--RS	-PGL-ASIMN	EIPFLTEEAT	KSKCVAQENK	1700
Lamprey	1651	ILLPFTFPSP	RFWDRPEGSQ	SDSLPAQIAS	AFSGIVQDPI	ASAGELNEQS	1700
Xenopus A2	1651	LRLPYPIPVG	HHAKENVLOT	-PTW--NIFA	EAPKLTMDSI	QGECKVAQDQ	1700
Chicken 1	1651	LRLPETLALG	ASSSSYETRD	ITAW--NFLP	EIASQLAQED	QSTCEVSKGD	1700
Chicken 2	1651	VRLPLSLPVG	PRIPASELOP	-PIW--NVFA	EAPSAVLENL	KARCSVSYNK	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
PMVG-1	1701	LVTFNNRKRFR	SDMPHSCYQV	LAQDCTPELK	FIVLLKR-DQ	TOEQNQINVK	1750
PMVG-2	1701	LTFNNGRKYK	NEMPLSCYQV	LAQDCTNELK	FMVLLKK-DH	I-EQNHINVK	1750
Fundulus 1	1701	LYTFNNRSYK	NKMPPSSCYQV	AAQDCTDELK	FMVLLRK-DS	S-EQHHINVK	1750
Fundulus 2	1701	VVTFNNRKYK	TETPHSCHQV	LAQDCTSEIK	FIVLLKR-DQ	TAEERNEISIK	1750
Trout	1701	LTFNNGRKYK	INMPLSCYQV	LAQDCTTELK	FMVLLKK-DH	ASEQNHINVK	1750
Sturgeon	1701	FITFDGVKFS	YOMPGGCYHI	LAQDGRSKVR	FMVMLKQASM	SKNLRAVNAK	1750
Lamprey	1701	LTFNGAFEN	YDMPESCYHV	LAQECSSRPP	FIVLILK--D	SERRISLELQ	1750
Xenopus A2	1701	ITTFNGVDLA	SALPENCYNV	LAQDCSPEMK	FMVLMRNSKE	SPNHKDIVNK	1750
Chicken 1	1701	FKTFDRMSFT	CSFNKSCNVV	VAQDCTEHPK	FITTRKVDH	QSLSREHVHN	1750
Chicken 2	1701	IKTFNEVKFN	YSMPANCYHI	LVQDCSSELK	FLVMMKSAQE	ATNLKAINIK	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
PMVG-1	1751	IADIDVDMYP	-KDSVVMVKV	NGVEIPISNL	PYHHPA-GKI	QIRQRGEGIA	1800
PMVG-2	1751	IADIDIDLYP	-KNTDVIKVK	NGMEIPIINL	PYQHPT-AKI	QIRPKGEGIS	1800
Fundulus 1	1751	ISEIDIDMFP	-KDDNVTVKV	NEMEIPPPAC	LTATQQ-LPL	KIKTKRRGLA	1800
Fundulus 2	1751	IENIDVDMYP	-KDNNAVVKV	NGVEIPLTNL	PYQHPT-GNI	QIRQREEGIVS	1800
Trout	1751	ISDIDVDLYT	-EDHGVIVKV	NEMEISNDNL	PYKDPG-GSI	KIDRKGKGVG	1800
Sturgeon	1751	IYNKDTDILP	TTKGSVRLLI	NNNEIPLSQL	PFTDSS-GNI	HUKRADEGVG	1800
Lamprey	1751	LDDKVKIVS	RND----IRV	DGEKVPRLRL	S----QKNQY	GFLVLDAGVH	1800
Xenopus A2	1751	LGEYDIDMY-	YSADAFKMKI	NNLEVSEEH	PYKSFNYPTV	ETKKGNGVGS	1800
Chicken 1	1751	TSSANITICP	AADSSL-LVT	CNKESVLSDS	GVSEYEKDN	KIYKNGKTVI	1800
Chicken 2	1751	TGSHEIDMHP	-VNGQVLLV	DGAESEPTANI	SLISAG-ASL	WHNENQGF	1800



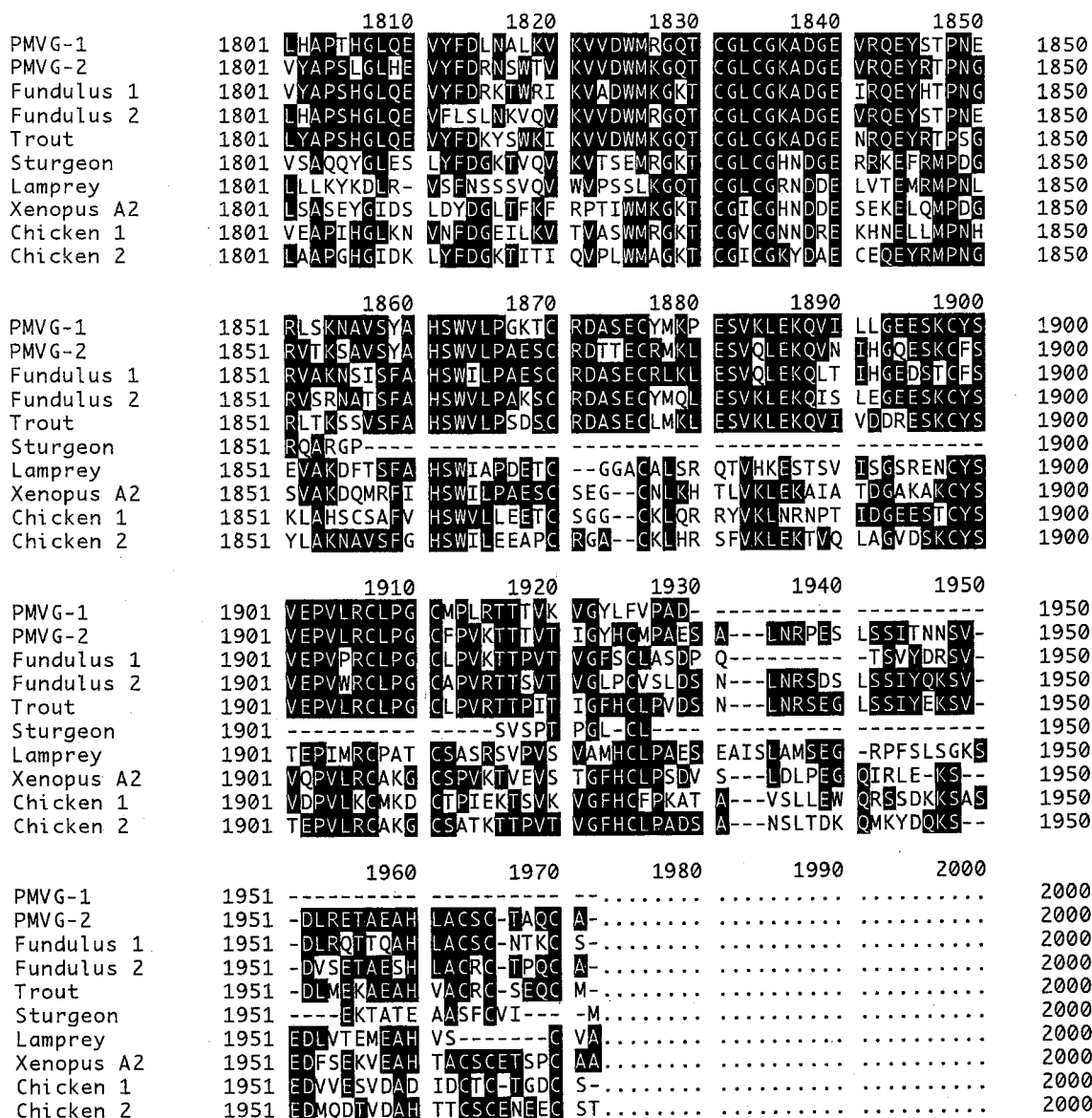


Fig. 4-9. Amino acid sequence alignments of red sea bream (PMVG-1 and PMVG-2), *Fundulus* (VTG I, Accession No. U07055; VTG II, Accession No. U70826), trout (rainbow trout, Accession No. X92804), sturgeon (white sturgeon, Accession No. U00455), lamprey (Accession No. M88749), *Xenopus* (VTG A2, Accession No. M18061), and chicken vitellogenins (VTG I, Accession No. D89547; VTG II, Accession No. M18060).

と推察され、本章で取り上げた他生物 6 種 (マミチヨグ、ニジマス、シロチョウザメ、ヤツメウナギ、アフリカツメガエル、ニワトリ) のビテロジェニン cDNA (5,139~5,976 bp) とも一致した。しかし、より長いクローンの取得を目的とした cDNA ライブラリーからのクローニングも、得られた最長のクローン PMVG-2 は 3,539 bp であり、(1)mRNA の最上流に位置すべき非翻訳領域やシグナルペプチドが見あたらないこと (2)PMVG-2 の塩基配列から推定したタンパク質の分子量は 124 kDa であり、第 2 章で述べたマダイビテロジェニンタンパク質の SDS-PAGE 上での分子量 (183 kDa) よりも小さいこと等から、PMVG-2 は、5' 末端

近傍を欠損していると考えられた。他生物のビテロジェニン遺伝子とのホモロジープロットから、欠損部分は約 1.8 kbp であると推定される (Fig. 4-7)。

本章でクローニングした 2 つの cDNA 断片から推測されるアミノ酸配列を、これまでに報告されている脊椎動物のビテロジェニンのアミノ酸配列と比較した結果を Fig. 4-9 に示す。なお、以下に示すアミノ酸残基の位置 (position) は、便宜上 Fig. 4-9 上に示した位置を表す。脊椎動物のビテロジェニンタンパク質の構造を大別すると、アミノ末端より lipovitellin I, phosvitin, lipovitellin II の 3 つの領域に分けることが出来る (van het Ship *et al.* 1987)。その中で、セリン残基を多量に含む (ニワト

り VTG II 56.2%, マミチヨグ VTG I 64.8%, ニジマス 52.6%) phosvitin 領域は, 線虫 (Accession No. M11497; Spieth *et al.* 1985) には見当たらず, 高等な生物ほど長くなる傾向が示唆されている (Nardelli *et al.* 1987)。この3つの領域の中間に位置する phosvitin 領域は, 糖鎖結合部位であるアスパラギンから始まり, lipovitellin II のアミノ末端には KFCKNH あるいはそれに似た配列が存在するという特徴がニジマス, ニワトリおよびアフリカツメガエルで見出されている (Mouchel *et al.* 1996)。これらの結果を PMVG-2 に当てはめると, 19番目 (position 1,098) または20番目のアスパラギンが phosvitin のアミノ末端であり, lipovitellin II は, KFQKDH (position 1,372) から始まると推測される。しかし, 各卵黄タンパク質のアミノ酸配列に関する情報の無いマダイの各領域の境界を厳密に規定することは困難であるため, 便宜上セリン残基が5個以上連続することを phosvitin 領域の開始および終了の指標とし, それよりアミノ末端側を lipovitellin I, カルボキシル末端側を lipovitellin II として生物間の比較を試みた。

この場合, phosvitin 領域の長さは, ニワトリ VTG I (303 aa), ヤツメウナギ (211 aa), ニワトリ VTG II (193 aa), アフリカツメガエル VTG A2 (191aa), シロチョウザメ (175 aa), マミチヨグ VTG I (125 aa), PMVG-2 (112 aa), マミチヨグ VTG II (82 aa), ニジマス (35 aa) の順となり, 特に進化上の規則性は見当たらなかった (Fig. 4-10)。なお, マダイの phosvitin 領域は, 長さおよび領域内のセリン残基数ともにマミチヨグ VTG I の同領域と最も近似していた。

PMVG-2 の lipovitellin I 領域は, ニジマスおよびマミチヨグ VTG I とアミノ酸配列で各々63.1%および62.0%の高い類似性を示したが, 他のビテロジェニン遺伝子との類似性は32.6~48.9%と, 比較的低い値となった。Lipovitellin I は, 全ての種 (PMVG-2 を除く) でほぼ同じ長さ (1,080~1,130 aa) であり, ヤツメウナギにのみ見られる配列が4箇所 (position 305~306, 711~726, 788~791, 963~967) 存在する等, 種による特異性も見られるが, 硬骨上目共通 (GAAAS/TAFYINDAA, position 650~663等) あるいは全種共通 (N/SL/MQV/LA/LSF, position 587~593等) のモチーフも散在している。これらの共通配列が何を意味するかを, 今後解明する必要がある。

PMVG-2 の lipovitellin II 領域は, ニジマス, マミチヨグ VTG I およびマミチヨグ VTG II とアミノ酸配列で各々61.4, 57.3および53.6%の高い類似性を示したが, 他のビテロジェニン遺伝子との類似性は30.8~36.5%と若干低く, 総体的に lipovitellin I よりもやや低い値を示した。マダイを含む6種の lipovitellin II は, ほぼ同じ長さ (482~536 aa) であったが, シロチョウザメだ

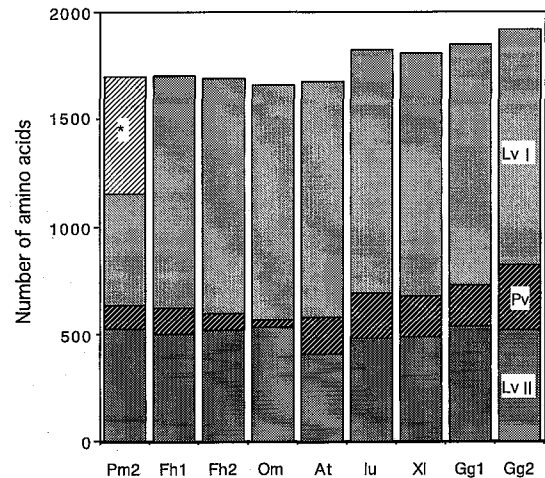


Fig. 4-10. Size of lipovitellin I (Lv I), phosvitin (Pv), and lipovitellin II (Lv II) domains in vertebrate vitellogenins.

PMVG-2 (Pm2) was estimated to be missing about 600 of amino-terminal amino acids (asterisk). Abbrev.: Pm2, *Pagrus major* (red sea bream); Fh1, *Fundulus heteroclitus* VTG I; Fh2, *Fundulus heteroclitus* VTG II; Om, *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout); At, *Acipenser transmontanus* (white sturgeon); Iu, *Ichthyomyzon unicuspis* (silver lamprey); XI, *Xenopus laevis* VTG A2; Gg1, *Gallus gallus* (chicken) VTG I; Gg2, *Gallus gallus* VTG II.

けが 406 aa と短く, カルボキシル末端近傍の欠落が示唆された (Fig. 4-9)。本領域の特徴として, Mouchel *et al.* (1996) は, プロリン, システインおよび芳香族アミノ酸の位置が生物間で良く保存されており, ペプチド鎖の正確なフォールディングに関係していることを示唆している。また彼らは, 本領域内の CGLC モチーフ (position 1,831~1,834) が, Mayadas and Wagner (1992) が von Willebrand factor で示した複合体形成に必須の配列と一致することから, ビテロジェニンタンパク質の2量体化に関与していると推測している。これらの配列は, PMVG-2 にも良く保存され, ビテロジェニンの2量体化には, lipovitellin II 領域の関与が示唆された。

本章でクローニングした PMVG-1 と PMVG-2 は, 高い類似性を示したが, 完全には一致しなかった (Fig. 4-8)。複数のビテロジェニン遺伝子の存在は, ニワトリ (I, II, III) やアフリカツメガエル (A1, A2, B1, B2), マミチヨグ (I, II) でも知られており, DNA データバンクにも登録されている (ニワトリ III およびアフリカツメガエル A1, B1, B2 は部分配列)。また, 複数のビテロジェニンの存在は, タンパク質レベルでは, その他の魚類でも報告されていることは, 第1章で既に述べた。ビテロジェニンは, 初期発生における主要な栄養源であり, その量および質が種苗の良否を大きく左右すると考

えられるが、ピテロジェニンあるいは卵黄タンパク質の機能に関する知見は乏しい。ピテロジェニン遺伝子は、肝細胞における翻訳後修飾（リン酸化、糖鎖および脂質の付加、2量体化等）、血液中への放出、レセプターを介した卵母細胞への取り込み、卵黄タンパク質への解裂、卵黄球の形成等、種を超えた共通の特徴を有しており、上述のようにアミノ酸配列にもいくつかの保存された領域が存在している。今後、PMVG-1 および PMVG-2 の全配列を決定し、第2章で述べた2種類のピテロジェニンとの関係を明らかにするとともに、ポイントミューテーション等によるピテロジェニンおよび卵黄タンパク質の構造と機能の関連を解明する必要がある。

## 第5章 ピテロジェニンによるベステルの成熟度判定

チョウザメ資源は、生息水域の環境悪化、産卵場の減少、および過剰の漁獲により急激に減少している（Steffens *et al.* 1990）。天然チョウザメを有するロシア、アメリカ、イラン、中国等では、資源回復のために種苗放流を行っているが、その全てを天然親魚に依存している。そのため、放流種苗の質や量は水温等の自然環境に左右され、年によって大きな差異が出ている。また、チョウザメは成熟までに長い年月を要し、特に雌では10年以上かかることも珍しくない（Nikolsky 1982）。従って、チョウザメ資源を回復させるためには、環境の改善、漁獲の適正化とともに、安定した放流種苗の生産技術が求められている。

一方、世界のチョウザメ総生産量が9,603 t（1993年）にまで減少した中で、欧米を中心にチョウザメ養殖が注目されており、イタリアでは年間養殖生産量が300 t以上に達している（FAO 1995）。近年、我国においても業者レベルでのチョウザメ養殖が始まっており、魚肉として出荷されている。その種苗を安定供給するためには、養殖チョウザメを親魚とした種苗生産技術の確立、即ちチョウザメの完全養殖技術の確立が不可欠である。しかしながら、チョウザメの飼育環境下での自然産卵は未だ報告例がなく、成熟卵を得るためには、ホルモン投与によって人為的に成熟を促進する必要がある。ロシアやアメリカ等で行われている種苗生産には、産卵のために河川を遡上中の天然親魚を用いているが、一部の例外（Czeskleba *et al.* 1985）を除き、最終成熟および排卵を誘導するために、親魚へのホルモン投与が行われている（Steffens *et al.* 1990）。天然親魚の場合とは異なり、養殖チョウザメは、同じ環境下で飼育した同年齢の魚であっても成熟度のばらつきが極めて大きい。従って、種苗生産の成否は、最適親魚が選別出来るか否かにかかっている（Doroshov *et al.* 1997）。特に日本国内では、親魚として種苗生産に使えるチョウザメの数は限られてお

り、より効率的な種苗生産技術の確立が求められている。

本章は、効率的な養殖チョウザメの種苗生産技術の確立を目的とし、雌親魚選別のための成熟度判定法について検討した。

### 材料と方法

供試魚：1980年5月、1981年4月、1982年4月および1983年4月にソビエト連邦（現ロシア共和国）カスピ海北部沿岸のベルチュリスキーチョウザメふ化場より受精卵で導入され、養殖研究所玉城分室でふ化、飼育されたベステルを用いた。

ピテロジェニンの定量：第2章に準じ、魚体重1 kg 当たり1 mg の  $E_2$  を雄ベステルの腹腔内に注射した。 $E_2$  投与後7日目に血液を採取し、分離した血清（ $E_2$  処理魚血清）を家兎に免疫した。免疫後2週間目に家兎から採血し、抗  $E_2$  処理魚血清（a-S）を分離した。a-S に同量の正常ベステル雄血清を添加し、4°C で1晩放置後、抗原抗体反応による沈澱を遠心分離（4°C, 10,000 rpm, 30分間）で除去し、その上清を抗チョウザメピテロジェニン血清（a-Vg）とした。

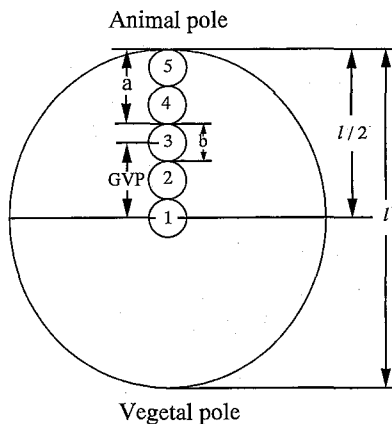
血清ピテロジェニン量は、第3章に準じ、a-Vg を用いた放射免疫拡散法により測定した。定量に用いた標準ピテロジェニンは、Hara and Hirai (1978) に従い、卵黄形成期の雌ベステル血清から水沈澱法およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

卵黄形成に伴う血清ピテロジェニン量の変化：1980年産ベステルが満8才になった1988年3月から6月にかけて、血清中にピテロジェニンが検出された雌50尾（平均体重9.5 kg）を取り上げ、卵巣卵の卵径を測定した。

卵核胞位置の測定：Lutes *et al.* (1987) の方法を若干修正し、以下のように卵核胞の位置を数値化した。200 ppm のオイゲノール中で魚に麻酔を施し、概ね Doroshov *et al.* (1983) に従って生検により卵巣卵の一部を採取した。採取した卵を沸騰水中に約5分間浸漬して卵黄を凝固させた後、動植物両極の軸に沿って切断した。切断面を実体顕微鏡下で観察し、卵径 (l)、動物極と卵核胞の最短距離 (a) および卵核胞の直径 (b) を測定した。卵核胞の位置 (germinal vesicle position, GVP) は、Fig. 5-1 に示す式により求めた。この式から求めた GVP は、卵核胞が卵の中心に位置すれば1、中心と動物極との中間で3、動物極に接すると5となる。

### 結 果

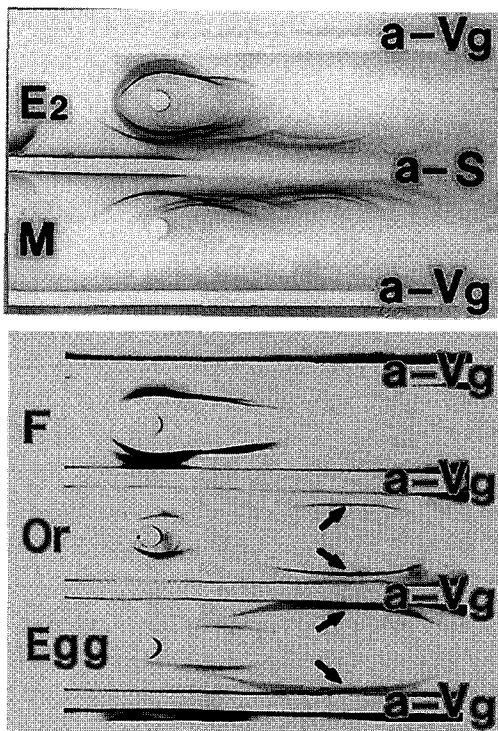
抗血清の特性： $E_2$  処理魚血清、雄血清、卵黄形成期の卵巣卵を有する雌の血清（卵黄形成雌血清）、過熟の卵巣卵を有する雌の血清（過熟雌血清）および卵抽出液を用いた免疫電気泳動（第2章参照）により、抗血清 a-S および a-Vg の特性を調べた（Fig. 5-2）。a-S は、雄血



**Fig. 5-1.** Schematic view of a baster oocyte sectioned along the animal pole and the vegetal pole. Germinal vesicle position (GVP) is calculated by following formula.

$$GVP = \frac{4(l-2a-b)}{(l-b)} + 1$$

a, b, and l represent the shortest distance between the animal pole and germinal vesicle, germinal vesicle diameter, and oocyte diameter, respectively. Each number shows GVP value of each position.

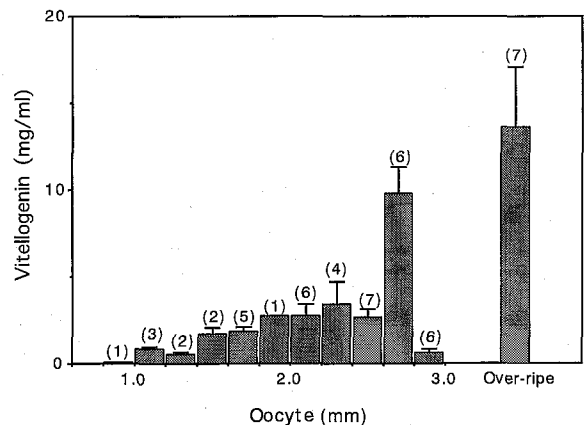


**Fig. 5-2.** Immunoelectrophoresis of serum and egg extracts in baster. Abbrev.: a-S, antiserum against E<sub>2</sub>-treated fish serum; a-Vg, absorbed a-S with male serum; E<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>-treated fish serum; M, male serum; F, vitellogenic female serum; Or, over-ripe female serum; Egg, egg extracts. Arrows show precipitine lines observed only in over-ripe female serum and egg extracts.

清および E<sub>2</sub> 処理魚血清の両方と反応し、10本以上の沈降線を形成した。また、雄血清には見られず、E<sub>2</sub> 処理魚血清にのみ見られる強い沈降線が試料穴付近に観察された。a-Vg は、雄血清とは全く反応せず、卵黄形成雌血清および E<sub>2</sub> 処理魚血清とは試料穴付近に2本の沈降線を形成した。過熟雌血清の a-Vg による免疫電気泳動像は、卵抽出液の像と類似し、卵黄形成雌血清や E<sub>2</sub> 処理魚血清には見られない陽極側に長く伸びる沈降線が観察された。

卵巣卵の成長と血清ビテロジェニン量の関係：チョウザメの卵巣卵は部分同時発生型であり、卵黄形成期以降の卵母細胞群は、同一個体内では卵形成の進行が揃っていた。しかし、ここで調べた50尾の雌ベステルは、卵黄形成初期の卵巣卵を有する個体から過熟卵を有する個体まで、同一年齢でありながら個体間の成熟度は差が極めて大きかった。

卵巣卵の直径と血清ビテロジェニン量の関係を Fig. 5-3 に示す。血清中にビテロジェニンが検出された50尾の中で、最も成熟度が低かった個体の卵巣卵の直径は 0.9 mm であり、同個体の血清ビテロジェニン量は 0.1 mg/ml であった。血清ビテロジェニン量は、卵径の増大に伴って増加し、2.7 mm で最大 (平均 9.8 mg/ml) となった。しかし、卵径が 2.9 mm に達すると、血清ビテロジェニン量は急減 (平均 0.6 mg/ml) した。過熟卵の卵径は、3 mm を越えるものから、小さくいびつなものまで様々であり、それらの過熟卵を有する雌の血清ビテロジェニン量も多様であった (2.0~27.6 mg/ml)。



**Fig. 5-3.** Relationship between serum vitellogenin level and oocyte diameter in baster. Each value is the mean  $\pm$  SE. Numbers in parentheses show number of fish.

卵径、卵核胞位置および血清ビテロジェニン量の関係：卵径 2.5~3.1 mm の卵巣卵を持つ雌ベステル24尾の、卵巣卵径と血清ビテロジェニン量、卵径と卵核胞位置および卵核胞位置と血清ビテロジェニン量の関係を調べ

た。なお、各データ集団間の有意差検定は、t-検定により行った。

各卵径毎の血清ピテロジェニン量は、卵径 2.9 mm で最低値 (平均 3.7 mg/ml) を示した (Fig. 5-4)。卵径 2.6 mm および 2.7 mm の卵巣卵を持つ個体が各 1 尾であったため、厳密な比較は出来ないが、前項の結果と考え合わせると、卵径 2.5~2.7 mm の間は卵径の増大と共に増加し、2.7~2.9 mm では逆に減少、2.9~3.1 mm では再び増加するという傾向が再確認された。

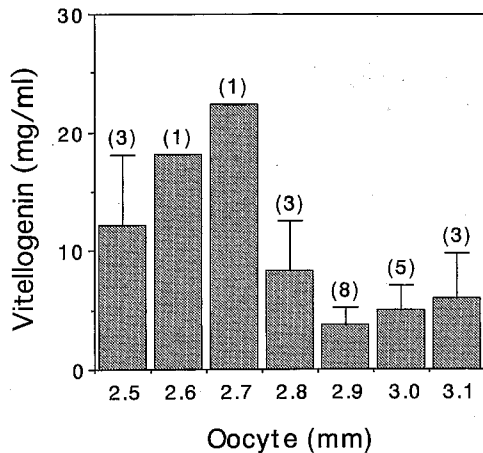


Fig. 5-4. Relationship between serum vitellogenin level and oocyte diameter in bester. Each value is the mean  $\pm$  SE. Numbers in parentheses show number of fish.

卵核胞は、卵径の増大と共に動物極に近づき、卵径 2.5~2.7 mm の卵巣卵では GVP が 2.5 以下、2.8 mm の卵巣卵では GVP が約 3 (卵の中心と動物極の中間)、卵径 2.9 mm 以上の卵巣卵では GVP は 3 以上であった (Fig. 5-5)。

また、血清ピテロジェニン量は、卵核胞が動物極に近い (GVP 値が大きい) 卵巣卵を有する個体ほど少なくなる傾向を示した (Fig. 5-6)。GVP が 2~2.5 の卵巣卵を有するベステルの平均血清ピテロジェニン量は、15.4 mg/ml であり、GVP が 2.5~3.0 では 9.8 mg/ml、GVP が 3.0~3.5 では 4.9 mg/ml、GVP が 3.5~4.0 では 1.0 mg/ml、GVP が 4.0~4.5 では 0.6 mg/ml であった。

#### 考 察

本章では、チョウザメの種苗生産に不可欠な雌の成熟度判定の指標として、血清ピテロジェニン量および卵巣卵の卵核胞位置について検討した。

Amiri *et al.* (1996) は、ベステルの卵黄形成過程における血清中のピテロジェニン量やステロイドホルモン量の変化を調べ、血清ピテロジェニン量および血清 E<sub>2</sub>

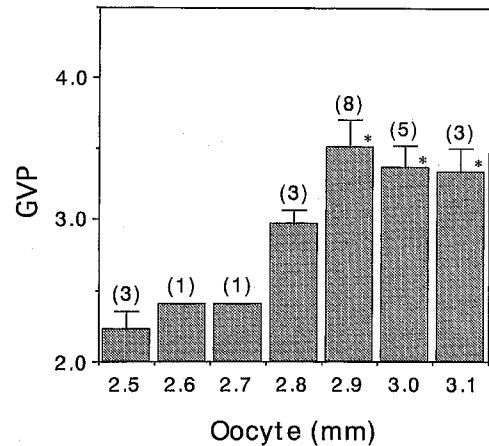


Fig. 5-5. Relationship between germinal vesicle position (GVP) and oocyte diameter in bester. Each value is the mean  $\pm$  SE. Numbers in parentheses show number of fish. Asterisks show significant difference from the value of 2.5 mm oocyte ( $p < 0.05$ ).

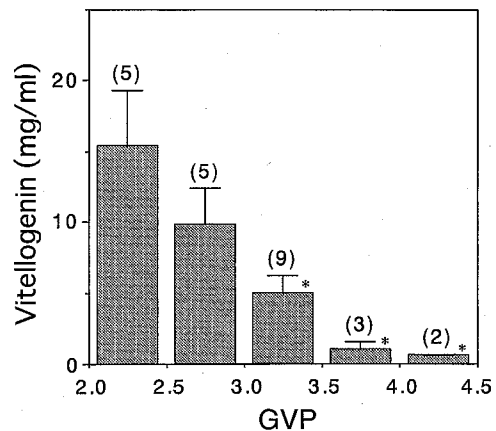


Fig. 5-6. Relationship between serum vitellogenin level and germinal vesicle position (GVP) in bester. Each value is the mean  $\pm$  SE. Numbers in parentheses show number of fish. Asterisks show significant difference from the value of 2.0-2.5 GVP ( $p < 0.05$ ).

量は第 3 次卵黄球期に最大となり、卵核胞移動期に入ると減少すると述べており、本章の結果と良く一致した。今回の実験で、ピテロジェニンが検出された雌ベステルは何れも卵径 0.9 mm 以上の卵巣卵を有しており、それ以下の発達段階の卵巣卵を有する雌の血清ピテロジェニン量は、放射免疫拡散法の検出限界 (第 3 章参照) 以下であった (Fig. 5-3)。ベステル雌の血清ピテロジェニン量は、卵径 0.9 mm に達した時点で検出され始め、卵径の増大とともに増加し、卵径 2.9 mm に達した時点で一旦急減した後、再度増加した (Figs. 5-3, 5-4)。産卵期に向かう過程における血清ピテロジェニン量の変化は、ブラウントラウト (Crim and Idler 1978)、サケ (Ueda *et*

al. 1984), スナヤツメ, カワヤツメ (Fukayama *et al.* 1986), マダイ (第4章) 等で調べられており, 卵黄形成の進行とともに増大することは明らかである。ピテロジェニンの産生は  $E_2$  に依存していることは既に第1章で述べた。 $E_2$  の産生については, サケ科魚類やメダカで詳細に調べられており, 卵濾胞組織の莢膜細胞と顆粒膜細胞により卵黄形成期特異的に生成され (Kagawa *et al.* 1982a, 1982b, 1983, Sakai *et al.* 1987, 1988), 卵成熟期に入るとステロイド産生系が卵成熟誘起ホルモン生成系へとシフトするために急激に減少する (Kagawa *et al.* 1983, Young *et al.* 1983a, 1983b, Kanamori *et al.* 1988)。このような血中  $E_2$  量の変動が, ピテロジェニン量の増減を左右していると考えられる。また, 卵径が 2.9 mm に達した後の再度の増加は, 過熟による卵黄タンパク質の再吸収が原因であると推察された。ピテロジェニンは, 卵黄タンパク質の前駆物質であり, 免疫学的には共通の抗原性を有すため, 放射免疫拡散法では両者の区別は困難である。しかし, a-Vg を用いた免疫電気泳動像を比べると, 過熟卵を有する雌の血清は, 卵黄形成期の卵巣卵を有する雌の血清には見られない沈降線を形成するため, 両者の区別が可能であることが明らかとなった (Fig. 5-2)。ピテロジェニンは, 卵母細胞に取り込まれた後に分子解裂を受け, 脂質に富んだ lipovitellin とリン及びセリンを多く含む phosvitin に分かれることが知られている (Selman and Wallace 1989)。ベストルのピテロジェニンも, 卵母細胞内で同様の分子解裂を受けて低分子化するため, ピテロジェニンと卵黄タンパク質とは異なった免疫電気泳動像を示すこと, および過熟雌血清中にはピテロジェニンではなく, 卵巣卵から再吸収された卵黄タンパク質が存在することが強く示唆された。チョウザメの卵形成過程を, 過熟の進行まで経時的に調べた報告は見あたらず, 今後, 卵径, 血清 Vg 量, 血清中の卵黄タンパク質量, 卵巣卵の組織学的変化等について, 経時的に調べる必要がある。

Doroshov *et al.* (1983) は, 卵径 3 mm 以上のシロチョウザメ卵巣卵 (最大約 4 mm) の成熟度を, 卵径の増大および卵核胞の位置により, 3段階に分類している。また, Lutes *et al.* (1987) はシロチョウザメ卵巣卵の卵核胞の位置を卵の中心から動物極に向かって 1~5 までの 5段階に分類している。本研究ではまず, 卵核胞の位置をより客観的且つより詳細に数値化し (Fig. 5-1), 卵径および血清ピテロジェニン量との関係を調べた。その結果, 卵径が 2.9 mm 以上に達した時点で, GVP も 3 を超える値となり (Fig. 5-5), 同時に血清ピテロジェニン量が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 5-6)。これらの結果は, ベストルの卵黄形成が卵径 2.9 mm で完了することを示唆している。魚類卵巣卵の卵核胞は, 卵黄形成終了後, 最終成熟に向かって動物極側に

移動することが知られている (長浜 1991)。ベストルの卵黄形成が卵径 2.9 mm で完了すると仮定した場合, 2.9 mm に達する前の卵核胞が卵母細胞の中心から動物極に近づく (GVP が 1 以上となる) 現象は, 少なくとも卵巣卵の中心と動物極の間 (GVP=3) までは, 最終成熟に向けての卵核胞の移動ではなく, 蓄積した卵黄の植物極側への偏在によるものと考えられる。

以上の結果と考察から, 卵核胞の位置や血清ピテロジェニン量は, 雌ベストルの成熟度を反映することが明らかとなり, 雌親魚選別の指標となることが予想されたため, 次章でさらに検討した。

## 第6章 ピテロジェニンを指標としたベストルの種苗生産

ベストルは, 1952年に Nikolyukin *et al.* によって作出された雑種チョウザメであり (Burtsev 1972), 近年では養殖対象種としてロシアやヨーロッパでも飼育されている (Steffens *et al.* 1990)。我国には, 1974年にロシア (当時のソ連) から東海大学海洋科学博物館へ20尾が導入されたのが最初であり, 1978~83年には, 日ソ漁業科学技術協力協定に基づき250尾の稚魚と合計約21万粒の受精卵が, 養殖研究所を中心に導入された (Fujii and Maruyama 1997)。近年, 国内で生産され始めた養殖チョウザメの大部分は本種である。

前章では, 血清ピテロジェニン量と卵核胞の位置により, 雌ベストルの成熟度判定が可能であることを明らかにした。本章では, 効率的な養殖チョウザメの種苗生産技術の確立を目的とし, 血清ピテロジェニン量や卵核胞の位置に加え, 魚体重の変化や卵巣卵のプロゲステロン感受性を雌親魚の選別指標として検討するとともに, 催熟方法等についても検討した。

### 材料と方法

供試魚: 1980年5月, 1981年4月, 1982年4月および1983年4月に, ソビエト連邦 (現ロシア共和国) カスピ海北部沿岸のベルチュリスキーチョウザメふ化場より受精卵で導入され, 養殖研究所玉城分室でふ化, 飼育されたベストルを用いた。

催熟ホルモンの調整: 生殖線刺激ホルモン放出ホルモン (Sigma; des-Gly<sub>10</sub>[D-Ala<sub>6</sub>]-LH-RH ethylamide, LH-RHa) を含むコレステロールペレットは, 廣瀬・新井 (1988) に準じて以下の方法で作成した。(1) 1 mg の LH-RHa を 0.2 ml の 50%エタノールに溶解 (2) 150 mg のコレステロール (Sigma) を添加し, ペースト状に攪拌 (3) 35~40°C で乾燥させた後, 温浴上で溶解したココアバター (不二製油) 50 mg を添加して攪拌 (4) 内径 2 mm のステンレス管に混合物 20 mg を詰め, 外径 2 mm のステンレス棒で圧縮した後, 押し出してペレット

状に成型し、使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

注射用の LH-RHa およびヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (三共, HCG) は、1尾当たりの投与量が 0.5 ml 程度となるように 0.9% 塩化ナトリウム溶液 (生理食塩水) で溶解した。

コイ *Cyprinus carpio*, サケ *Oncorhynchus keta* およびレンギョ *Hypophthalmichthys molitrix* の脳下垂体は、アセトンで脱脂した後に乾燥させ、すりつぶして粉末状にした。この脳下垂体粉末に、1尾当たりの投与量が 0.5 ml となるように生理食塩水を加えて更にホモジナイズし、遠心分離後 ( $4^{\circ}\text{C}$ , 3,000 rpm, 30分間) の上清を脳下垂体抽出液とした。

卵質および精子活性の判定: 排卵された卵は、直径約 3 mm で、動物極以外は均一の色彩 (灰色から黒褐色) を呈し、弾力性のあるものを正常卵と判定した。また、弾力性が無く、崩壊しやすい卵を過熟の目安とした。過熟 (卵黄物質の再吸収) の進行度によって卵径および色彩が不均一となる等の変化が見られたが、明確な分類が出来なかったため、ここでは全て過熟卵として一括して扱った。

精液は、水で200倍に希釈して光学顕微鏡下で観察し、活発な前進運動を示す精子割合が高い精液ほど精子活性が高いものと判断した。

プロゲステロン感受性の測定: 生検により取り出した卵巣の一部を、プロゲステロン 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む Leibovitz's L-15 培地中にて  $15^{\circ}\text{C}$  で培養した。培養開始後24時間目に、10粒の卵巣卵の卵核胞位置を第5章で述べた手法で調べるとともに、卵核胞が崩壊 (Germinal vesicle breakdown, GVBD) した卵の割合を求めた。

催熟試験1: 本試験は、1988年8月に水温約  $12^{\circ}\text{C}$  の条件下で行った。まず、ベステル8年魚50尾の血清ピテロジェニン量を測定し、種々の濃度 (0.1~27.9 mg/ml) を示した15尾を雌親魚として、LH-RHa 1mg を含むコレステロールペレットを背部筋肉中に埋め込んだ。ピテロジェニンが検出されず、比較的小さな12尾を雄親魚とし、各4尾に HCG 5,000単位、サケ脳下垂体5個分の抽出液あるいはレンギョ脳下垂体5個分の抽出液を背部筋肉中に注射した。

催熟試験2: 本試験は、1991年10月に水温約  $16^{\circ}\text{C}$  の条件下で行った。ベステル8~11年魚の中から外観および触診によって腹部の肥大している48尾を選別し、それらの血清ピテロジェニン量を測定した。ピテロジェニンが低値 (1 mg/ml 以下) で、比較的大型の個体17尾を雌、ピテロジェニンが検出されず、比較的小型の個体9尾を雄として実験に供した。

雌は、2尾にコイ脳下垂体 4 mg/kg・体重、5尾に HCG 1,000単位/kg・体重、5尾に LH-RHa 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重を背部筋肉中に注射し、残る5尾には LH-RHa 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重をコレステロールペレットとして

背部筋肉中に埋め込んだ。なお、注射は全て2回に分けて行い、10%量を投与した12時間後に残りの90%量を投与した。

雄9尾には 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重の LH-RHa をコレステロールペレットとして埋め込んだ。

催熟試験3: 本試験は、1992年7月に水温約  $14^{\circ}\text{C}$  の条件下で行った。催熟試験2で選別した48尾の中から、体重の増加、腹部の膨満、および血清ピテロジェニン量の減少を指標として4尾の雌魚を選別し、卵巣卵の卵核胞位置を調べた後、LH-RHa 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重を注射した。

雄魚は、催熟試験2で雄であることが確認された3尾に、25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重の LH-RHa を注射した。

催熟試験4: 本試験は、1992年6月から9月にかけて水温  $14\sim 18^{\circ}\text{C}$  の条件下で行った。雌魚6尾の血清ピテロジェニン量、卵巣卵の卵核胞位置およびプロゲステロン感受性を調べ、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ・体重の LH-RHa をコレステロールペレットとして埋め込んだ。

親魚のピテロジェニンと卵仔魚の特性: 1.0, 1.8, 7.8 mg/ml の血清ピテロジェニン量を示した3尾のベステル8年魚から、LH-RHa 1 mg を含むコレステロールペレットの投与により排卵を誘導し、成熟卵を採取した。精液は雄1尾から採取し、精子活性を確認した後、人工授精に用いた。使用直前に水で200倍に希釈した精液を卵に等量 (容量/重量) 添加し、5分間手で穏やかに攪拌しながら媒精した。300~500粒の受精卵を、卵の粘着性を利用してプラスチック板 (A4サイズ) に付着させ、流水中でふ化させた。途中、卵割の有無で受精率を求め、ふ化率は全卵数に対する割合として求めた。また、体型や遊泳行動などの異常なふ化仔魚を奇形とし、全ふ化仔魚に対する割合を奇形率とした。なお、実験期間中の水温は  $14^{\circ}\text{C}$  であった。

## 結 果

催熟試験1: 催熟試験1の結果を Table 6-1 に示す。LH-RHa の投与後 55~63時間目に、3尾から正常卵、5尾から過熟卵の排卵が確認された。血清ピテロジェニン量は、正常卵を排卵した雌が  $0.4\pm 0.3$  mg/ml (平均値および標準誤差) であり、過熟卵を放出した雌 ( $18.5\pm 3.8$  mg/ml) よりも有意に低かった ( $p>0.05$ )。LH-RHa に反応を示さなかった雌の血清ピテロジェニン量は、それらの中間値 ( $7.0\pm 2.3$  mg/ml) であった。

雄は、HCG を投与した4尾中2尾、サケ脳下垂体を投与した4尾中1尾から、投与後2日目に精子活性の高い精液が採取出来た。

催熟試験2: 催熟試験2の結果を Table 6-2 に示す。ホルモン投与後1日目には、LH-RHa コレステロールペレットを投与した5尾中3尾の排卵が確認され、その全てが正常卵であった。2日目には、コイ脳下垂体を注射

Table 6-1. Results of the artificial propagation test 1 in bester

Individual number	Length (cm)	Weight (kg)	Vitellogenin* <sup>1</sup> (mg/ml)	Response* <sup>2</sup>	Remarks
1	118	9.7	27.9	+	Over-ripe* <sup>3</sup>
2	121	9.9	27.6	+	Over-ripe
3	114	9.1	14.9	-	
4	119	10.0	14.0	-	
5	126	9.7	13.2	+	Over-ripe
6	121	9.9	12.5	+	Over-ripe
7	119	7.8	11.5	+	Over-ripe
8	116	9.4	10.3	-	
9	131	13.7	5.5	-	
10	115	7.9	3.5	-	
11	130	13.0	1.0	+	
12	123	9.9	0.5	-	
13	130	11.7	0.3	-	
14	120	9.6	0.2	+	
15	122	9.2	0.1	+	

\*<sup>1</sup> concentration of vitellogenin or reabsorbed egg yolk protein in serum.\*<sup>2</sup> +, ovulation; -, no ovulation.\*<sup>3</sup> discharge over-ripened eggs.

Table 6-2. Results of the artificial propagation test 2 in bester

Hormonal treatment* <sup>1</sup>	Weight (kg)	Length (cm)	Condition factor* <sup>2</sup>	Vitellogenin (mg/ml)	Sex	Response
CCP (4 mg/kg · BW)	10.7±1.0* <sup>3</sup>	123± 4	6.4±0.5	0.12±0.08	Female	2/2* <sup>4</sup>
HCG (1,000 U/kg · BW)	10.6±1.0	121± 4	5.9±0.4	0.14±0.03	Female	0/5
INJ (100 µg/kg · BW)	12.2±3.2	126±10	5.9±0.6	0.04±0.03	Female	3/5
PLT (100 µg/kg · BW)	11.0±3.5	121±11	6.0±0.5	0.08±0.08	Female	4/5
PLT (50 µg/kg · BW)	8.2±2.0	113± 9	5.6±0.4	—	Male	2/3

\*<sup>1</sup> CCP, injection of carp pituitary; HCG, injection of HCG; INJ, injection of LH-RHa; PLT, implantation of LH-RHa cholesterol pellet.\*<sup>2</sup> 1000×body weight (g)/total length (cm)<sup>3</sup>.\*<sup>3</sup> mean±S.E.\*<sup>4</sup> number of fish induced ovulation or spermiation/total number of fish.

した2尾中2尾, LH-RHaを注射した5尾中3尾, LH-RHa コレステロールペレットを埋め込んだ残り2尾中1尾の排卵が確認された。しかし, この日に排卵した卵は, 何れも過熟であった。3日目には, 新たな排卵個体は現れなかったため, 生検により未排卵個体の生殖腺を調べたところ, HCGを投与した5尾およびLH-RHaを注射した残り2尾の卵巣卵は, 全て卵核胞が崩壊した成熟卵であった。残るLH-RHaペレット投与1尾の卵巣卵は, 再吸収がかなり進行した過熟卵であった。

雄は, LH-RHaペレット投与後1日目に9尾中2尾が排精した。これらの精液は, 何れも活性の高い精子を含んでいた。2日目にも同じ2尾から採精出来たが, 1尾の精子活性は低下していた。残り7尾の生殖腺を生検により調べたところ, 6尾は未熟な雌であり, 1尾が雄であった。

催熟試験3: 本試験では, LH-RHaを注射した雌4尾中3尾から採卵できた (Table 6-3)。最も早く排卵が確認されたNo. 34の個体からは, LH-RHa注射後47時間目に1,435 g (体重の9.9%)の正常卵が得られた。No. 24からは, 49時間後目に756 g (体重の4.7%)の正常卵が採取され, 50時間目に開腹した結果, さらに540 g (体重の3.4%)の排卵された正常卵および587 g (体重の3.6%)の未排卵卵巣卵が確認された。No. 4からは, 54時間目に50 gの正常卵が採取され, 73時間目に採取された卵は過熟であった。血清ピテロジェニン量が最も多く(8.1 mg/ml), GVPが3.3と最も低い値を示した個体No. 37は, 排卵を誘導できなかった。

LH-RHaを注射した雄からは, 注射後48時間目に3尾全てから精子活性の高い精液が得られた。

催熟試験4: 本試験では, LH-RHa コレステロールペ



Table 6-3. Results of the artificial propagation test 3 in bester

Individual number	Weight (kg)	Vitellogenin (mg/ml)	Oocyte diameter (mm)	GVP* <sup>1</sup>	Sex	Response* <sup>2</sup>
4	11.7 (+0.6)* <sup>3</sup>	0.3 (-13.1)	3.0	3.6	Female	+
6	6.6 (-0.5)	—	—	—	Male	++
18	6.7 (-0.4)	—	—	—	Male	++
24	16.1 (+3.0)	3.5 (- 0.9)	2.9	3.7	Female	++
34	14.5 (+1.4)	0.3 (-12.5)	2.8	4.1	Female	++
35	9.7 (+0.4)	—	—	—	Male	++
37	16.7 (+2.6)	8.1 (- 4.5)	2.9	3.3	Female	-

\*<sup>1</sup> germinal vesicle position (see Fig. 1).\*<sup>2</sup> ++, complete ovulation or spermiation; +, incomplete ovulation; -, no ovulation.\*<sup>3</sup> annual change in parentheses.

Table 6-4. Results of the artificial propagation test 4 in bester

Individual number	Spawning date	Weight (kg)	Vitellogenin (mg/ml)	GVP*	GVBD (%)	Response*
1	Jun. 3	3.1	1.4	3.3	100	++
2	Jun. 3	5.2	2.2	3.6	80	+
3	Jun. 15	2.8	2.5	3.3	100	++
4	Aug. 18	6.5	8.9	4.0	0	-
5	Sep. 4	10.0	3.5	4.2	100	++
6	Sep. 16	7.5	2.6	4.0	100	++

\* same as in Table 2.

レットを投与した雌6尾中5尾から採卵できた (Table 6-4)。排卵が誘導されなかった1尾 (No. 4) は、血清ビテロジェニン量が最も多い個体であった (8.9 mg/ml)。また、その卵巣卵は高い GVP 値 (4.0) にも拘らず、唯一プロゲステロン感受性を示さなかった。採卵量は、卵巣卵のプロゲステロン感受性が100%を示した4尾からは体重の10%前後、同感受性が80%の No. 2 からは体重の約3%であった。

親魚のビテロジェニンと卵仔魚の特性：血清ビテロジェニン量の最も多い雌 (7.8 mg/ml) が排卵した卵は、崩壊しやすい過熟卵が多く含まれていた。それらの中から、正常卵を選び分け (材料と方法「卵質および精子活性の判定」参照)、人工授精に用いたが、受精率 (21.7%)、ふ化率 (19.1%) とともに低く、ふ化仔魚の奇

形率 (32.2%) は高かった (Table 6-5)。他の2尾から得られた卵は何れも正常と判定されたが、卵質は多少異なり、血清中のビテロジェニンが最も少ない雌 (1.0 mg/ml) から得た卵が、最も高い受精率 (92.0%)、ふ化率 (79.6%) を示し、奇形率 (5.1%) は最も低かった。

#### 考 察

雌バスデルの排卵を誘導する催熟ホルモンとして、コイ脳下垂体抽出液および LH-RHa は有効であったが、HCG は今回の使用方法、用量では効果が認められなかった (Table 6-2)。Lutes (1985) は、*in vitro* での各種ホルモンによるシロチョウザメ卵巣卵の成熟誘起能を調べ、シロチョウザメ、コイおよびシロサケの脳下垂体は GVBD を誘導したが、HCG を含む精製生殖腺刺激ホルモンは効果が認められなかったと述べている。また、Doroshov and Lutes (1984) は、天然のシロチョウザメを用いた排卵誘導において、シロチョウザメやコイの脳下垂体および LH-RHa の何れもが有効であったと述べている。一方、廣瀬 (1982) は、異種タンパクの投与による親魚へのストレスを警告し、同種の魚のホルモンを使用することが最良の方法であることを示唆している。従って、同種のチョウザメの脳下垂体が得にくい場合には、構造が簡単で種特異性が低い LH-RHa が、

Table 6-5. Relationship between vitellogenin level in mother fish serum and fertilization rate, hatching rate, and deformity rate of descendants in bester

Vitellogenin (mg/ml)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)	Deformity rate (%)
1.0	92.0	79.6	5.1
1.8	69.8	64.9	6.4
7.8	21.7	19.1	32.2

催熟ホルモンとして最適であると考えられた。LH-RHaの投与方法に関しては、コレステロールペレットと注射の2種類の投与方法を試み、両法はほぼ同程度の効果を示した (Tables 6-2, 6-3, 6-4)。コレステロールペレットは、含有する LH-RHa を長期間にわたり徐々に放出することから、投与時期が多少早過ぎても成熟促進、排卵誘導効果が期待された (廣瀬と新井, 1988)。しかし、本章で同ペレットを投与した雌バステルは、数日内に排卵する個体と、いつまでも排卵しない個体に分かれた。このことは、同投与方法でも、効果が短時間しか持続しないとされている注射法 (Crim and Cluett 1974) と同程度に、投与するタイミングが重要であることを示している。注射法は、簡便性の面で優れており、効果も期待できる (Tables 6-2, 6-3)。今後、さらに投与量等の検討が必要であろう。

バステルの雄は、同一年級群の雌と比較して体長および体重が小さいため (藤井他 1987a)、血清中にビテロジェニンが検出されない個体の中から体型が比較的小さいことを指標として雄親魚を選別した。しかし、この手法だけでは未熟な雌が混入する可能性があり (催熟試験 2)、生検により確実に雄を選別する必要がある。また、1尾の雄から約200~600万粒の卵が媒精可能な量 (100~300 ml) の精液が採取できること、催熟試験 2 で採精出来た個体は、翌年に行った催熟試験 3 でも採精できたこと (Table 6-3)、同一雄魚から1~2カ月の間隔で繰り返し採精することが可能であること (藤井他 未発表) 等から、種苗生産にはそれほど多くの雄親魚を必要としないと考えられる。一度採精を確認した複数の雄を、タグ等によるマーキングあるいは隔離飼育することにより、必要時に必要量の採精が可能となり、種苗生産の効率が高まるものと思われる。

血清ビテロジェニン量は卵巣卵の成熟度を反映し、(1)卵黄形成の進行とともに増加し、卵黄形成の終了 (人為催熟の最適時) とともに急減すること、(2)卵黄形成が終了しても排卵されない卵巣卵は過熟となり、卵黄物質の再吸収により血清中に卵黄タンパク質のピークを形成すること、(3)ビテロジェニンと卵黄タンパク質は、免疫電気泳動により識別が可能であること、等については第5章で述べた。ただし、本章で用いたビテロジェニンの定量法 (放射免疫拡散法) では、ビテロジェニンと卵黄タンパク質との見分けが困難であり、血清中のビテロジェニン (あるいは再吸収された卵黄タンパク質) 量の低い個体は、卵黄形成開始直後の未成熟雌、種苗生産に最適な成熟雌、あるいは過熟の進んだ再吸収末期の卵巣卵を持つ雌である可能性がある。従って、ビテロジェニンのみを指標として雌親魚を選別するためには、経時的に血清ビテロジェニンを定量すると同時に、免疫電気泳動により定性的にも調査する必要がある。

催熟試験 2 では、血清ビテロジェニン量が低いこと、腹部の膨大および肥満度を指標として選別し、高い確率 (17尾中16尾) で好適雌親魚が選別された (Table 6-2)。加藤 (1974) は、ニジマスの卵巣重量と体重の間に、直線的な関係が見られると述べている。バステルは、卵黄形成終了時には卵巣重量が体重の10~20%にも達し、ニジマスと同様に卵成熟に伴い体重が増加するため (藤井他 未発表)、魚体重の変動は雌の性成熟の有力な指標となると考えられた。

Lutes *et al.* (1987) は、シロチョウザメの卵巣卵の GVP を 1~5 までの 5 段階に分類し、コイ脳下垂体投与による排卵誘導率を GVP 別に調べている。その結果、GVP が 1 の卵巣卵を有する雌の排卵誘導率は 0%、GVP が 2 では 15.9%、GVP が 3 では 21.4%、GVP が 4 では 51.1%、GVP が 5 では 90.0% であったと述べている。しかし、催熟試験 3 および 4 で選別した雌親魚候補卵巣卵の卵核胞の位置は、排卵誘導成功率との相関は認められなかった (Tables 6-3, 6-4)。ただし、これら供試魚の卵巣卵の GVP は、3.3~4.2 の狭い範囲にあり、3 以下あるいは 5 に近い値を示す個体は含まれていない。従って、GVP が 5 (卵核胞が動物極に接する) に達した場合には、高い確率で排卵が誘導される可能性は残されているが、それ以外の場合には他の指標を併用して雌親魚を選別する必要がある。

Lutes *et al.* (1987) は、シロチョウザメ卵巣卵の *in vitro* におけるプロゲステロン感受性が *in vivo* での排卵誘導成功率と良く一致し、GVP とプロゲステロン感受性により雌親魚の選別が可能であると結論している。本章の催熟試験 4 では、選別した 6 尾の卵巣卵のプロゲステロンの感受性を調べ、GVBD 誘起率が 100% を示した 4 尾は、LH-RHa 投与によりほぼ完全に排卵を誘導できた (Table 6-4)。また、GVBD 誘起率が 80% の個体は、卵巣卵の一部 (体重の約 3%) を排卵するに留まり、GVBD 誘起率が 0% の個体は、全く排卵しなかった。このように、卵巣卵のプロゲステロン感受性は排卵誘導成功率と極めて良く一致し、雌親魚選別の極めて有効な指標であることが示された。ただし、プロゲステロン感受性と排卵誘導の成否が一致しない例も報告されている (Lutes *et al.* 1987)。また、プロゲステロン感受性を調べるためには、腹部を最低でも 2~3 cm 切開して卵巣卵を取り出す必要があり、供試魚に多大のストレスをかけている恐れがある。従って、本指標の調査は必要最小限にとどめ、魚に与えるストレスが比較的小さいと思われるビテロジェニン等の他の指標との併用が望ましいと考えられる。

本章の実験結果から、親魚の血清中のビテロジェニン (あるいは再吸収された卵黄タンパク質) の多寡が卵の受精率、ふ化率およびふ化仔魚の奇形率とも関係してい

ることが示唆された。Table 6-5 の中で、血清ピテロジェニン量が最も多かった個体が排卵した卵の中には、一見して過熟とわかるものが多く混じっていた。これらの過熟卵から再吸収された卵黄タンパク質により、血清ピテロジェニン量が見かけ上の高い値を示したものと考えられる。人工授精には、過熟卵を取り除き正常と思われる卵のみを使用した。卵質が劣化していたことは低い受精率、ふ化率およびふ化仔魚の高い奇形率が示している。種苗生産に適した良質の卵を得るためには、血清ピテロジェニン量が 1 mg/ml 以下まで減少した雌を用いることが望ましいと考えられた。

以上の結果および考察から、(1)生検による雌雄確認および生殖腺の成熟度判別、(2)供試魚の魚体組成(体重、体長等)の定期的測定、(3)雌の血清ピテロジェニン量の定期的測定、(4)雄への LH-RHa 投与による排精の確認、(5)体重の増加および血清ピテロジェニン量の急激な減少(1 mg/ml 以下)が卵黄形成の終了を示唆した雌の卵巣卵のプロゲステロン感受性試験、(6)プロゲステロン感受性の高い卵巣卵を持つ雌が出現した時点での雄への LH-RHa 投与、(7)雌への LH-RHa 投与、(8)採精、採卵、および人工授精、という手順ならびに手法が、現時点での最良のチョウザメの種苗生産法であると考えられた。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始暖かいご指導と適切なるご助言を賜った宮崎大学農学部動物生産学科の村田寿教授ならびに川津浩嗣名誉教授に、心より感謝の意を表します。

また、本論文を完成するにあたり鹿児島大学水産学部の林 征一教授、田中淑人教授、宮崎大学農学部の飯田貴次教授、境 正教授にはご校閲の労を賜り、有益なご助言をいただいた。養殖研究所環境管理部技術第 1 研究室の白石 学元室長(現中央水産研究所資源増殖研究官)および丸山為蔵元室長(現共和コンクリート工業(株)水産研究部長)には、終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜った。北海道大学水産学部の原 彰彦教授には、ピテロジェニンに関する多くのご教示を賜り、中央水産研究所生物機能部の廣瀬慶二元部長(現(社)日本栽培漁業協会参与)には、人為催熟に関する貴重なご助言をいただいた。養殖研究所繁殖部繁殖生理研究室の香川浩彦室長には、マダイのサンプリング等で便宜を図っていただいた。養殖研究所遺伝育種部細胞工学研究室の荒木和男室長には、遺伝子のクローニングに関する貴重なご助言、ご指導を賜った。養殖研究所日光支所の織田三郎技官、玉城分室の井上和樹技官および前田弘也元技官にはチョウザメの飼育をお手伝いいただいた。これらの方々に、深く感謝いたします。

## 要 約

1. 成熟マダイ雌血清中に、雄血清中には見られない 2 種類のタンパク質の存在が確認され、E<sub>2</sub> 投与による発現誘導、分子量、卵黄タンパク質との共通抗原性等から、何れもがピテロジェニンであると考えられた。
2. マダイのピテロジェニンを、pH9.0 のリン酸カリウム緩衝液を用いたヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。
3. マダイピテロジェニンの定量法として、放射免疫拡散法を確立した。本法では、プレートに添加する抗血清の濃度を調整することにより、ピテロジェニン濃度 10.4 μg/ml~42.4 mg/ml の範囲で定量が可能であった。
4. エストロゲン (E<sub>2</sub>) 投与によるマダイのピテロジェニン産生を調べた。E<sub>2</sub> 投与後 1 日目から検出された血清中のピテロジェニンは、経時的に濃度が増加し、10 日目には 84.1 mg/ml に達した。
5. マダイの卵黄形成過程における血清ピテロジェニン量の変化を調べた。血清ピテロジェニンは、卵母細胞が第一次卵黄球期の後期あるいは第二次卵黄球期の初期に達した時点(12月中旬から1月下旬)から検出され始めた。血清ピテロジェニン量は、卵黄形成の進行に伴い増加し、自然排卵が確認された 4 月上旬には 2.75 mg/ml に達した。
6. E<sub>2</sub> を投与したマダイの肝臓から、855塩基対 (PMVG-1) および3,539塩基対 (PMVG-2) の 2 種類のピテロジェニン cDNA をクローニングし、その構造を解析した。
7. ベステルの血清ピテロジェニンは、卵巣卵径が 0.9 mm に達した時点から検出され始め、卵径 2.7 mm までは増加し、2.9 mm で一旦減少した後、再度増加した。ベステルの卵黄形成は卵径 2.9 mm で終了し、以後の増加は過熟卵の再吸収による血清中の卵黄タンパク質によることが強く示唆された。
8. ベステルの卵巣卵の卵核胞位置 (GVP) を 1~5 までに数値化し、卵径や血清ピテロジェニン量の変化に伴い、値が有意に変化することを明らかにした。また、GVP が 3 以上に達した時点で卵黄形成期が終了し、成熟に向かう卵核胞移動期に入ることが示唆された。
9. ベステルの種苗生産において、体重の増加、卵巣卵のプロゲステロン感受性および血清ピテロジェニンを指標とすることで、種苗生産に好適な雌親魚を選別出来ることが明らかとなった。卵黄形成を終了し、血清ピテロジェニン量が 1 mg/ml 以下に急減した雌から得られた卵を種苗生産に用いた場合に、最も高い受精率およびふ化率を示した。

## 文 献

- Aida, K., P. V. Ngan, and T. Hibiya, 1973a. Physiological studies on gonadal maturation of fishes-I: Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 1091-1106.
- Aida, K., K. Hirose, M. Yokote, and T. Hibiya, 1973b. Physiological studies on gonadal maturation of fishes-II: Histological changes in the liver cells of ayu following gonadal maturation and estrogen administration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 1107-1115.
- Amiri, B. M., M. Maebayashi, A. Hara, S. Adachi, and K. Yamauchi, 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. *J. Fish Biol.*, **48**, 1164-1178.
- Ando, S., T. Takeyama, and M. Hatano, 1986. Transport associated with serum vitellogenin of carotenoid in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 557-563.
- Ando, S. and M. Hatano, 1986. Carotenoids in an egg yolk protein of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1043-1044.
- Ando, S., 1995. Affinity of fish plasma lipoproteins for dextran sulfate cellulose. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **44**, 23-30.
- Ando, S. and Y. Mori, 1995. Calcium ion induces proteolysis of vitellogenin from tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **44**, 31-38.
- Bergink, E. W. and R. A. Wallace, 1974. Precursor-product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2897-2903.
- Bidwell, C. A. and D. M. Carlson, 1995. Characterization of vitellogenin from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *J. Mol. Evol.*, **41**, 104-112.
- Bradley, J. T. and J. M. Grizzle, 1989. Vitellogenin induction by estradiol in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **73**, 28-39.
- Burtsev, I. A., 1972. Progeny of an intergeneric hybrid of beluga and sterlet. In "Genetics, selection, and hybridization of fish" (ed. by Y. Sobel) Keter press, Jerusalem, 211-220.
- Cadbury, D., 1998. メス化する自然 (古草秀子), 集英社, 東京, pp. 161-277.
- Chan, S. L., C. H. Tan, M. K. Pang, and T. J. Lam, 1991. Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). *J. Exp. Zool.*, **257**, 96-109.
- Choi, C. Y., Y. J. Chang, and A. Takemura, 1995. Purification of vitellogenin and egg yolk protein, and changes of vitellogenin concentration during the ovulation period in elkhorn sculpin, *Alcichthys alcicornis*. *J. Korean Fish. Soc.*, **28**, 753-760.
- Copeland, P. A., J. P. Sumpter, T. K. Walker, and M. Croft, 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **83B**, 487-493.
- Copeland, P. A. and P. Thomas, 1988. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 17-23.
- Covens, M., D. Stnen, F. Ollevier, and A. de Loof, 1988. Concanavalin a reactivitu of vitellogenin and yolk proteins of the threespined stickle back *Gasterosteus aculeatus* (Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 227-233.
- Craik, J. C. A., 1978. Plasma levels of vitellogenin in the elasmobranch *Scyliorhines canicula* L. (Ledder spotted dogfish). *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 9-18.
- Crim, L. W. and D. M. Cluett, 1974. Elevation of plasma gonadotropin concentration in response to mammalian gonadotropin releasing hormone (GRH) treatment of the male brown trout as determined by radioimmunoassay. *Endocr. Res. Commun.*, **1**, 101-110.
- Crim, L. W. and D. R. Idler, 1978. Plasma gonadotrophin, estradiol, and vitellogenin and gonad phosvitin levels in relation to the seasonal reproductive cycles of female brown trout. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 1001-1005.
- Cuisset, B., P. C., F. Le Menn, and J. Nunez Rodriguez, 1991. ELISA for Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) vitellogenin, In "Acipenser" (ed. by P. Williot), CEMAGREF Publ., Bordeaux, pp. 107-111.
- Czeskleba, D. G., S. AveLallemant, and T. F. Thuemler, 1985. Artificial spawning and rearing of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, in Wild Rose State Fish Hatchery, Wisconsin, 1982-1983, In "North American sturgeons: biology and aquaculture potential" (eds. by F. P. Binkowski and S. I. Doroshov), Dr W. Junk Publ., Dordrecht, pp. 79-85.
- de Vlaming, V. L., H. S. Wiley, G. Delahunty, and R. A. Wallace, 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67B**, 613-623.
- Deeley, R. G., K. P. Mullinix, W. Wetekam, H. M. Kronenberg, M. Meyers, J. D. Eldridge, and R. G. Goldberger, 1975. Vitellogenin synthesis in the avian liver. *J. Biol. Chem.*, **250**, 9060-9066.
- Denison, M. S., J. E. Chambers, and J. D. Yarbrough, 1981. Persistent vitellogenin-like protein and binding of DDT in the serum of indecticide-resistant mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **69C**, 109-112.
- Ding, J. L., P. L. Hee, and T. J. Lam, 1989. Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **93**, 363-370.
- Doroshov, S. I., W. H. J. Clark, P. B. Lutes, R. L. Swallow, K. E. Beer, A. B. McGuire, and M. D. Cochran, 1983. Artificial propagation of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. *Aquaculture*, **32**, 93-104.
- Doroshov, S. I. and P. B. Lutes, 1984. Preliminary data on the induction of ovulation in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson). *Aquaculture*, **38**, 221-227.
- Doroshov, S. I., G. P. Moberg, and J. P. Van Eenennaam, 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, In "Sturgeon

- biodiversity and conservation" (eds. by V. J. Birstein, J. R. Waldman, and W. E. Bemis), Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 265-278.
- Emmersen, B. K. and I. M. Emmersen, 1976. Protein, RNA and DNA metabolism in relation to ovarian vitellogenic growth in the flounder *Platichthys flesus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**, 315-321.
- Emmersen, B. K. and I. M. Petersen, 1976. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17- $\beta$ , of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **54B**, 443-446.
- FAO, 1995. Yearbook of Fishery Statistics. Vol. 76, FAO, p. 156.
- 藤井一則・廣瀬慶二・原 彰彦・丸山為蔵, 1987a. ベステル (チョウザメ雑種 F<sub>1</sub>) の雌雄判別. 養殖研報, **11**, 21-25.
- 藤井一則・原 彰彦・廣瀬慶二・丸山為蔵, 1987b. ベステル (チョウザメ雑種 F<sub>1</sub>) におけるエストロゲン投与により血清中に誘導される特異蛋白. 養殖研報, **12**, 17-24.
- Fujii, K., A. Hara, M. Shiraishi, and T. Maruyama, 1991. Use of vitellogenin level as a maturational indicator for artificial spawning of cultured hybrid sturgeon, In "Acipenser" (ed. by P. Williot), CEMAGREF Publ., Bordeaux, 1991, pp. 381-388.
- Fujii, K. and T. Maruyama, 1997. Introduction of nonindigenous species for aquaculture in Japan. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture supplement* **3**, 53-58.
- 藤本明子, 1991. Oligo (dT)-Latex 粒子を用いたポリ (A) + RNA 精製法, 「細胞工学実験プロトコール」(東京大学医科学研究所制癌研究部編), 秀潤社, 東京, pp. 34-36.
- Fukayama, S., H. Takahashi, T. Matsubara, and A. Hara, 1986. 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.*, **84A**, 45-48.
- Ghosh, P. and P. Thomas, 1995. Binding of metals to red drum vitellogenin and incorporation into oocytes. *Mar. Environ. Res.*, **39**, 165-168.
- 原 彰彦, 1978. サケ血清蛋白の性差ならびにメス特異蛋白の精製. 日本誌, **44**, 689-693.
- 原 彰彦・松原孝博・実吉峯郎・高野和則, 1984. アメマスのビテロジェニンと卵黄蛋白. 北大水産彙報, **35**, 144-153.
- 原 彰彦, 1985. 卵黄形成, 「実験生物学講座11 発生生物学」(金谷晴夫・山上健次郎編), 丸善, 東京, pp. 22-30.
- 原 彰彦・竹村明洋・松原孝博・高野和則, 1986. 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, **37**, 101-110.
- 原 彰彦, 1987. マダイ血清中の雌特異蛋白 (ビテロジェニン) および関連の卵黄蛋白の検索. 養殖研報, **12**, 25-35.
- Hara, A., 1976. Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 549-557.
- Hara, A. and H. Hirai, 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **59B**, 339-343.
- Hara, A., K. Yamauchi, and H. Hirai, 1980. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 315-320.
- Hara, A., K. Takano, and H. Hirai, 1983. Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (Teleosts). *Comp. Biochem. Physiol.*, **76A**, 135-141.
- Hara, A., 1987. Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts: immunochemical, physicochemical and structural studies. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **34**, pp. 1-59.
- Hara, A., C. V. Sullivan, and W. W. Dickhoff, 1993. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.*, **10**, 245-256.
- Heesen, P. T. and W. Engels, 1973. Electrophoretic studies on vitellogenesis in *Brachydanio rerio*. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.*, **173**, 46-59.
- 廣瀬慶二, 1982. 卵の成熟と産卵, 「水産学シリーズ41 魚類の成熟・産卵の制御」(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 50-63.
- 廣瀬慶二・新井 茂, 1988. LH-RH コレステロールベレットによるアユの成熟促進. 養殖研報, **13**, 11-16.
- Hori, S. H., T. Kodama, and K. Takahashi, 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgen. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **37**, 306-320.
- Hori, R., P. V., and L. T. J., 1991. Accumulation of vitellogenin in the egg of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Zool. Sci.*, **8**, 1070.
- 市野素英, 1991. ノーザンプロットティング, 「細胞工学実験プロトコール」(東京大学 医科学研究所制癌研究部編), 秀潤社, 東京, pp. 149-151.
- 池田和夫, 1977. ニジマス血清総蛋白定量法について. 淡水研報, **27**, 27-34.
- Johnson, L. L., E. Casillas, M. S. Myers, L. D. Rhodes, and O. P. Olson, 1991. Patterns of oocyte development and related changes in plasma 17- $\beta$  estradiol, vitellogenin, and plasma chemistry in English sole *Parophrys ventulus* Girard. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **153**, 161-185.
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi, and Y. Nagahama, 1982a. Estradiol-17 $\beta$  production in isolated amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) follicles and its stimulation by gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**, 361-365.
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi, and Y. Nagahama, 1982b. Estradiol-17 $\beta$  production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **47**, 440-448.
- Kagawa, H., G. Young, and Y. Nagahama, 1983. Relationship between seasonal plasma estradiol-17 $\beta$  and testosterone levels and in vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biol. Reprod.*, **29**, 301-309.
- Kanamori, A., S. Adachi, and Y. Nagahama, 1988. Developmental changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**, 13-24.
- Kanungo, J., T. R. Petrino, and R. A. Wallace, 1990. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. 6. Establishment and verification of conditions for vitellogenin incorporation by oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.*, **254**, 313-321.
- 加藤禎一, 1974. 再生産関連形質の特性, 「水産学シリーズ6 魚類の成熟と産卵—その基礎と応用」(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 31-40.

- 川崎 力, 1990. 吸着クロマトグラフィー, 「新化学実験講座 1 タンパク質 I」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp. 194-208.
- Kishida, M., T. R. Anderson, and J. L. Specker, 1992. Induction by  $\beta$ -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **88**, 29-39.
- Kishida, M. and J. L. Specker, 1994. Vitelligenin in the surface mucus of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Possibility for uptake by the free-swimming embryos. *J. Exp. Zool.*, **268**, 259-268.
- Komatsu, M., W. Matsumoto, and S. Hayashi, 1996. Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **113B**, 561-571.
- Komatsu, M. and S. Hayashi, 1997. Pharmacological dose of estradiol-17 $\beta$  induces vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes of immature eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **63**, 989-994.
- Krauel, K. K. and G. J. Ridgway, 1963. Immuno-electrophoretic studies of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) serum. *Int. Archs. Allergy. appl. Immun.*, **23**, 246-253.
- Kroll, K. J. and S. I. Doroshov, 1991. Effects of various hormone implants on vitellogenin synthesis and ovarian development in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, , In "Acipenser" (ed. by P. Williot), CEMAGREF Publ., Bordeaux, pp. 389-399.
- Kwon, H. C., S. Hayashi, and Y. Mugiya, 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **104B**, 381-386.
- Kwon, H. C. and Y. Mugiya, 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **93**, 51-60.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LaFleur, G. J. J., K. L. Hoch, N. Denslow, B. M. Byrne, and R. A. Wallace, 1995a. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.*, **41**, 505-521.
- LaFleur, G. J. J., K. L. Hoch, N. Denslow, B. M. Byrne, and R. A. Wallace, 1995b. Liver-derived cDNAs: Vitellogenins and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). *Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, **5**, 336-338.
- Lancaster, P. M. and C. R. Tyler, 1994. Developmental expression and modulation of the vitellogenin receptor in ovarian follicles of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.*, **269**, 458-466.
- Lazier, C. B. and M. E. Mackay, 1993. Vitellogenin gene expression in teleost fish, In "Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 2" (eds. by P. W. Hochachka and T. P. Mommsen), Elsevier Sci. Publ., Vancouver, pp. 391-405.
- Le Bail, P. Y. and B. Breton, 1981. Rapid determination of the sex of puberal salmonid fish by a technique of immunoagglutination. *Aquaculture*, **22**, 367-375.
- Le Guelllec, K., K. Lawless, Y. Valotaire, M. Kress, and M. Tenniswood, 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 359-371.
- Le Menn, F., 1979. Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: *Gobius niger* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62A**, 495-500.
- Lutes, P. B., S. I. Doroshov, F. Chapman, J. Harrah, R. Fitzgerald, and M. Fitzpatrick, 1987. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. *Aquaculture*, **66**, 43-52.
- Lutes, P. B., 1985. Oocyte maturation in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*: some mechanisms and applications, In "North American sturgeons: biology and aquaculture potential" (eds. by F. P. Binkowski and S. I. Doroshov), Dr W. Junk Publ., Dordrecht, pp. 87-92.
- Mananos, E., S. Zanuy, F. Le Menn, M. Carrillo, and J. Nunez, 1994a. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I-Induction, purification and partial characterization. *Comp. biochem. Physiol.*, **107B**, 205-216.
- Mananos, E., J. Nunez, S. Zanuy, M. Carrillo, and F. Le Menn, 1994b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, **107B**, 217-223.
- Mancini, G., A. O. Carbonara, and J. F. Hermans, 1965. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**, 235-254.
- 丸山為藏・藤井一則・木島利・前田弘也, 1987. 外国産新魚種の導入経過 (水産庁研究部資源課, 養殖研究所編), 水産庁研究部資源課, 東京, pp. 129-131.
- Markert, J. R. and W. E. Vanstone, 1971. 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. Board Can.*, **28**, 1853-1856.
- 松原孝博・澤野敬一, 1992. ビテロジェニンを指標としたドットブロットティングによるオヒョウ (*Hippoglossus stenolepis* Schmidt) の雌雄判別法. 北水研報, **56**, 17-26.
- Matsubara, T., T. Wada, and A. Hara, 1994. Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 545-555.
- Matsubara, T. and K. Sawano, 1995. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.*, **272**, 34-45.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama, and S. Mathuura, 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. *Aquaculture*, **73**, 357-372.
- Mayadas, T. N. and D. D. Wagner, 1992. Vicinal cysteines in the prosequence play a role in von Willebrand factor multimer assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3531-3535.
- Moberg, G. P., S. I. Doroshov, F. A. Chapman, K. J. Kroll, J. Van Eenennaam, and J. G. Watson, 1991. Effects of various hormone implants on vitellogenin synthesis and ovarian development in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, , In "Acipenser" (ed. by P. Williot), CEMAGREF Publ., Bordeaux, pp. 389-399.

- Monosson, E., W. J. Fleming, and C. V. Sullivan, 1994. Effects of the planar PCB 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovarian development, plasma levels of sex steroid hormones and vitellogenin, and progeny survival in the white perch (*Morone americana*). *Aquat. Toxicol.*, **29**, 1-19.
- Mouchel, N., V. Trichet, A. Betz, J.-P. Le Pennec, and J. Wolff, 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, **174**, 59-64.
- Murakami, M., I. Iuchi, and K. Yamagami, 1991. Partial characterization and subunit analysis of major phosphoproteins of egg yolk in the fish, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**, 587-593.
- Nagahama, Y., H. Kagawa, and G. Young, 1982. Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 56-64.
- 長浜嘉孝, 1991. 生殖: 配偶子形成の制御機構, 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生 功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 243-286.
- Nagler, J. J., F. Murrin, and D. R. Idler, 1993. Localization of vitellogenin-related protein in the developing oocytes of winter flounder (*Pleuronectes americanus*) by protein A-gold immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.*, **271**, 567-570.
- 中村 弘, 1985. 沈降反応, 「実験生物学講座14 免疫生物学」(村松 繁, 増田 徹, 桂 義元編), 丸善, 東京, pp. 71-83.
- 中村 弘・杉浦 勉, 1986. 沈降反応, 「続生化学実験講座5 免疫生化学研究法」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp. 38-50.
- Nardelli, D., F. D. van het Schip, S. Gerber-Huber, J.-A. Haefliger, M. Gruber, G. AB, and W. Wahli, 1987. Comparison of the organization and fine structure of a chicken and a *Xenopus laevis* vitellogenin gene. *J. Biol. Chem.*, **262**, 15377-15385.
- Nath, P. and B. I. Sundararaj, 1981a. Isolation and identification of female-specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**, 184-190.
- Nath, P. and B. I. Sundararaj, 1981b. Induction of vitellogenesis in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch): effects of piscine and mammalian hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **43**, 191-200.
- Nikolsky, G. V., 1982. 系統魚類学 (高 昭宏訳), たちばな書房, 東京, pp. 87-106.
- Norberg, B. and C. Haux, 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two salmo species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 869-876.
- Norberg, B. and C. Haux, 1988. An homologous radioimmunoassay for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.*, **5**, 59-68.
- Norberg, B., 1995. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: induction, isolation and partial characterization. *Fish Physiol. Biochem.*, **14**, 1-13.
- 法橋尚宏, 1991. AGPC 法, 「細胞工学実験プロトコール」(東京大学医科学研究所制癌研究部編), 秀潤社, 東京, pp. 28-33.
- Nunez Rodriguez, J., O. Kah, M. Geffard, and F. Le Menn, 1989. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 741-746.
- 太田博巳・神力義仁・本間正男・原 彰彦・松原孝博・東谷隆幸・山内皓平, 1984. 卵黄蛋白抗血清を用いた池産サクラマスの早期雌雄判別. 水産孵化場研報, **39**, 67-74.
- Okumura, H., A. Hara, F. Saeki, T. Todo, S. Adachi, and K. Yamauchi, 1995. Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, **61**, 283-289.
- Pan, M. J., W. J. Bell, and W. H. Telfer, 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, **165**, 393.
- Pelissero, C., B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, and J. Dunogues, 1991. Estrogenic activity of certain phytoestrogens on vitellogenin synthesis in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **38**, 293-299.
- Petersen, I. and B. Korsgaard, 1989. Experimental induction of vitellogenin synthesis in eel (*Anguilla anguilla*) adapted to sea-water or freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.*, **93B**, 57-60.
- Plack, P. A., D. J. Pritchard, and N. M. Fraser, 1971. Egg proteins in cod serum. *Biochem. J.*, **121**, 847-856.
- Povlsen, A. F., B. Korsgaard, and P. Bjerregaard, 1990. The effect of cadmium on vitellogenin metabolism in estradiol-induced flounder (*Platichthys flesus* (L)) males and females. *Aquat. Toxicol.*, **17**, 253-262.
- Sakai, N., T. Iwamatsu, K. Yamauchi, and Y. Nagahama, 1987. Development of the steroidogenic capacity of medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicles during vitellogenesis and oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **66**, 333-342.
- Sakai, N., T. Iwamatsu, K. Yamauchi, N. Suzuki, and Y. Nagahama, 1988. Influence of follicular development on steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicles in response to exogenous substrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 516-523.
- Selman, K. and R. A. Wallace, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.*, **6**, 211-231.
- Sharrock, W. J., T. A. Rosenwasser, J. Gould, J. Knott, D. Hussey, J. I. Gordon, and L. J. Banaszak, 1992. Sequence of lamprey vitellogenin. Implications for the lipovitellin crystal structure. *J. Mol. Biol.*, **226**, 903-907.
- Silversand, C. and C. Haux, 1989. Isolation of turbot (*Scophthalmus maximus*) vitellogenin by high-performance anion-exchange chromatography. *J. Chromatography*, **478**, 387-397.
- Silversand, C., S. J. Hyllner, and C. Haux, 1993. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. *J. Exp. Zool.*, **267**, 587-597.
- So, Y. P., D. R. Idler, and S. H. Hwang, 1985. Plasma vitellogenin in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* Ouananiche): isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 63-71.
- 副島正美・正木武治, 1984. リシルエンドペプチダーゼ. 蛋白質核酸酵素, **29**, 1532-1537.

- Spieth, J., K. Denison, S. Kirtland, J. Cane, and T. Blumenthal, 1985. The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5283-5295.
- Steffens, W., H. Jahnichen, and F. Fredrich, 1990. Possibilities of sturgeon culture in central Europe. *Aquaculture*, **89**, 101-122.
- Stifani, S., R. George, and W. J. Schneider, 1988. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor. *Biochem. J.*, **250**, 467-475.
- Tam, W. H., J. N. Fryer, B. Valentine, and R. J. J. Roy, 1990. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity, and plasma levels of estrogens and vitellogenin, in brook trout exposed to low environmental pH. *Can. J. Zool.*, **68**, 2468-2476.
- Tao, Y., A. Hara, R. G. Hodson, L. C. Woods, III, and C. V. Sullivan, 1993. Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.*, **12**, 31-46.
- 寺西哲夫・原 彰彦・高橋裕哉, 1981. ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* の生殖周期に伴うピテロジェニンの変動. 北大水産彙報, **32**, 281-292.
- Tinsley, D., 1985. A comparison of plasma levels of phosphoprotein, total protein and total calcium as indirect indices of exogenous vitellogenesis in the Crusian carp. *Comp. Biochem. physiol.*, **80B**, 913-916.
- Ueda, H., O. Hiroi, A. Hara, K. Yamauchi, and Y. Nagahama, 1984. Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **53**, 203-211.
- Urist, M. R. and A. O. Schjeide, 1961. The partition of calcium and protein in the blood of oviparous vertebrates during estrus. *J. Gen. Physiol.*, **44**, 743-756.
- Vaillant, C., C. Le Guellec, F. Pakdel, and Y. Valotaire, 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **70**, 284-290.
- van Bohemen, C. G., J. G. D. Lambert, and J. Peute, 1981. Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **44**, 94-107.
- van het Schip, F. D., J. Samallo, J. Broos, J. Ophuis, M. Mojet, M. Gruber, and G. AB, 1987. Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein. *J. Mol. Biol.*, **196**, 245-260.
- Van Weerd, J. H., A. B. Bongers, M. Van Donk, H. P. Oosterbosch, R. Schulz, and C. J. J. Richter, 1991. Male-induced shifts in pattern of vitellogenesis during puberty and recrudescence of female african catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*, **94**, 99-120.
- Vanstone, W. E. and C. W. Ho, 1961. Plasma proteins of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, as separated by zone electrophoresis. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **18**, 393-399.
- Wallace, R. A., 1970. Studies on amphibian yolk IX. *Xenopus* vitellogenin. *Biochem. Biophys. Acta*, **215**, 176-183.
- Wiegand, M. D. and D. R. Idler, 1984. Accumulation of vitellogenin derivative and triglyceride during early ovarian development in landlocked Atlantic salmon: Requirement for carbohydrate-rich gonadotropin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **78B**, 545-548.
- 吉田 浩, 1990. イオン交換クロマトグラフィー, 「新化学実験講座 1 タンパク質 I」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp. 194-208.
- Young, G., H. Kagawa, and Y. Nagahama, 1983a. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. *Biol. Reprod.*, **29**, 310-315.
- Young, G., L. W. Crim, H. Kagawa, A. Kambegawa, and Y. Nagahama, 1983b. Plasma  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **51**, 96-105.