

ウナギ卵黄タンパクの生化学

— 分子動態と浮遊性調節への関与 —

松原孝博*・安藤 忠*・大久保信幸*・澤口小有美*

Biochemical characteristics of yolk proteins in Japanese eel - involvement of selective yolk proteolysis in modulation of egg buoyancy -

Takahiro MATSUBARA*, Tadashi ANDOH*, Nobuyuki OHKUBO*,
and Sayumi SAWAGUCHI*

Abstract Maturation-associated hydration via controlled proteolysis of yolk proteins is the main event in cytoplasmic maturation of oocytes in marine pelagic egg spawning teleost. Failure of such the event likely reflects low fertilizability of eggs and high mortality of embryos. To improve "egg quality" of Japanese eel, we tried to elucidate biochemical characteristics of yolk proteins and their molecular alterations during oocyte maturation. Three forms of vitellogenin (Vg) appear to exist in Japanese eel, including two types of complete Vg (Vg 1 and Vg 2) and phosvitinless Vg (PvIVg). These classes of yolk protein which are derived from the Vgs play distinct roles in regulation of oocyte hydration through selective proteolysis in oocytes undergoing oocyte maturation. The regulation system of oocyte hydration in Japanese eel is unique and completely different from those in teleost members of higher taxa, eg. Acanthopterygii. We discussed here the characteristics of yolk proteins and their possible roles in regulation of egg buoyancy, with respect to improvement of egg quality in the Japanese eel.

Key words: Japanese eel, vitellogenin, yolk protein, egg buoyancy, egg quality

ウナギは水槽内での飼育下で自発的に成熟・産卵が起こらないことから、養殖用の種苗を生産するためには、現在行われているようなホルモン投与による人為的な催熟は避けて通れない。こうして催熟された雌から得られた卵は、受精率や孵化率が低かったり、あるいは孵化後の仔魚の生残に問題があったりする場合が多い。このような現象は「卵質が悪い」と表現されている。しかし、その原因を考えた場合、1) 卵に蓄積される栄養物質に関する問題、2) 卵黄形成や最終成熟に

関する問題、3) 排卵後の時間経過に関する問題（過熟）といった点があげられるが、実際に各々の場合に何が原因で受精、孵化、生残に影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。我々はこの中から 2) に着目して、卵黄タンパクの性状と利用動態を調べることで卵質低下要因を探索する試みを行った。

一般に、硬骨魚類の卵内には卵黄タンパクと脂質が主要な栄養として蓄積されている。これらのうち卵黄タンパクは、卵巢で合成されるエストラジオール

17 β (雌性ホルモン) の作用によって、肝臓で前駆タンパクのビテロジェニン (Vg) として合成され、血液にのって卵巣に運ばれて発達中の卵母細胞に取り込まれる。卵母細胞に取り込まれたVgは卵黄形成期を通じてカテプシンDによる限定的な分解を受けて卵黄タンパクとなり蓄積されていく。魚類の卵黄タンパクは脂質タンパクのリポビテリン (Lv), リンタンパクであるホスピチン (Pv), β' 成分 (βc) などからなることが知られている。近年の遺伝子解析から、棘鱗上目や側棘鱗上目に属するいわゆる高等な魚類であるマミチョグ *Fundulus heteroclitus*, マツカワ *Verasper moseri*, ハドック *Melanogrammus aeglefinus* などでは2種類のVg (VgA, VgB) をコードする遺伝子が見出されており、鳥類や両生類に続いて魚類も多型の

Vgをもつことが明らかになってきた (Matsubara *et al.*, 2003)。

魚類の卵の性質を見ると、生息する水の中で浮くもの (浮遊性卵) と沈むもの (沈性卵) に大別される。特に棘鱗上目, 側棘鱗上目の海産魚には、マダイ, ヒラメ, クロマグロ, ブリ, スケトウダラをはじめ、浮遊性卵を生む種類が多数見られる。これらの卵の浮力は、主に卵内部に含まれる90%を超える水分によって生み出され、その水は最終成熟期に起こる劇的な「吸水」によって母体から取り込まれる。我々の先の研究から、マツカワではVgAとVgBに由来する卵黄タンパクを一定の比率で卵母細胞内に蓄積し、最終成熟期に異なる分解を経て、一定量の遊離アミノ酸を産生することが分かっている。これらの遊離アミノ酸は吸水の

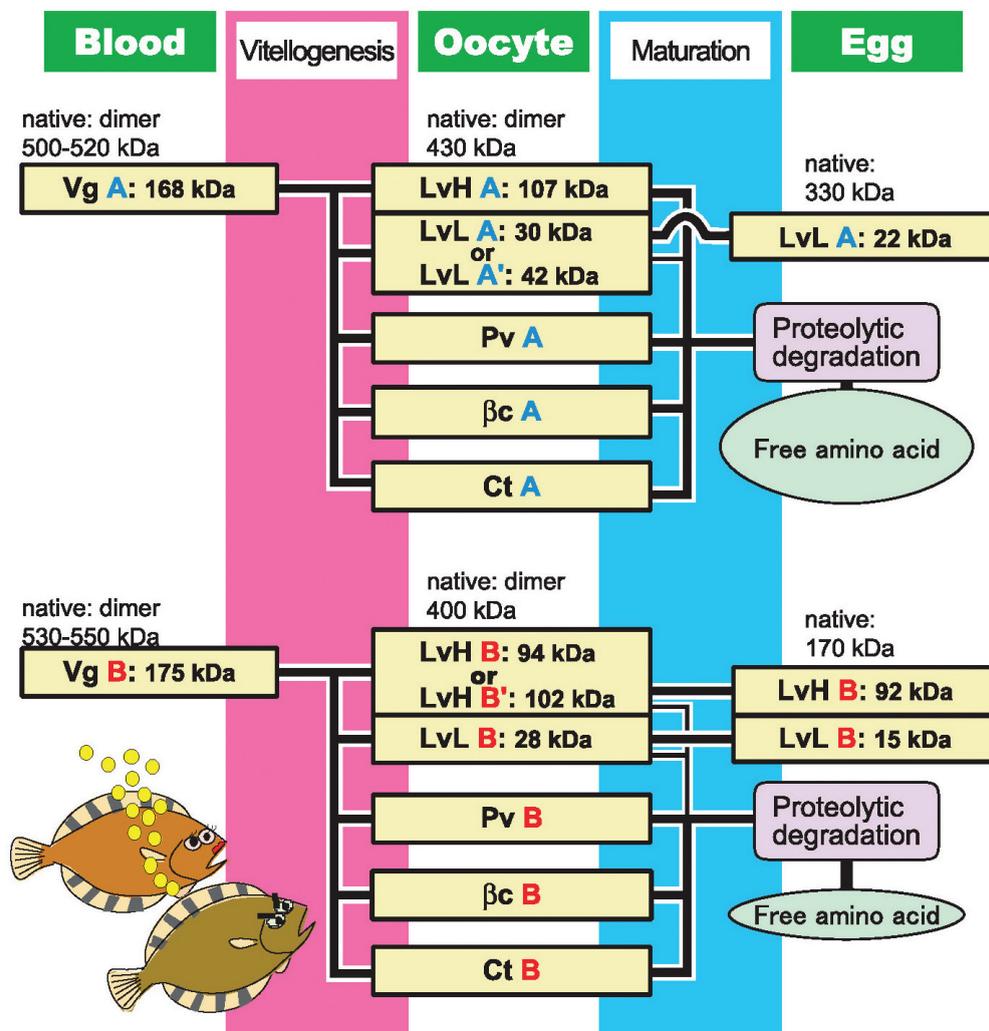


Fig. 1. Flowchart describing molecular alterations of vitellogenins and vitellogenin-derived yolk proteins during vitellogenesis and oocyte maturation in barfin flounder, *Verasper moseri* (modified from Matsubara *et al.*, 1999). Vg: vitellogenin, LvH: lipovitellin heavy-chain, LvL: lipovitellin light-chain, Pv: phosvitin, βc : β' -component, Ct: C-terminal component.

原動力として用いられ、Vg の多型を利用した巧妙な浮遊調節といえる (Fig. 1)。こうした浮遊性調節に関与するメカニズムには極めて複雑なプロセスを含んでおり、いずれかのプロセスの不調は直ちに卵質に影響すると考えられる。

多型Vgによる卵の浮遊性調節は、マダイ、スケトウダラ、ホワイトパーチでも認められ、魚に広く共通する。一方、より原始的な魚とされるカライワシ上目のウナギも浮遊性卵を生むが、同様の浮遊性調節を行うか否かについては全く明らかにされていない。そこで、本研究では、ウナギの卵質を左右する要因を見出し、将来的に卵質の評価マーカーとするため、卵黄タンパクを生化学的、分子生物学的に調べると共に、最終成熟に伴ってそれらが分解され、浮力獲得に利用されているか否かを明らかにすることを目的とした。

ウナギの卵黄タンパクの種類と性状

これまでに、ウナギにおいても、少なくとも2種類のVg遺伝子が存在していることが明らかにされている。

これらのVg遺伝子はVg 1 (GenBank:AY423445) と Vg 2 (GenBank: AY423444) と名付けられており、Vg 1 遺伝子はシグナルペプチドを含む1734残基のアミノ酸をコードする。また、Vg 2 は5'末端が未決定であるものの、その配列は1759残基のアミノ酸をコードしている。それぞれの遺伝子から推定されたアミノ酸配列と、既知のVgA、VgBの遺伝子から推定されたアミノ酸との間で相同性を調べたところ、ウナギVg 1 と Vg 2 はカダヤシやマツカワなど高等な魚類に見られるVgA、VgBのいずれかに属するというような傾向は示さなかった。これまでに遺伝子解析が行われたマミチョグVgI (GenBank: U07055, LaFleur *et al.* 1995, VgAに相当) および Vg II (GenBank: U70826, LaFleur *et al.* 2005, VgBに相当)、ハドックVgAおよびVgB (GenBank: AY423445, AY423445, Reith *et al.*, 2001)、ニジマスVg (GenBank: X92804, Mouchel *et al.*, 1996) は、Vgタンパクの内部に将来卵黄タンパクとなるドメイン構造が見られ、その配置はN末端側からLv重鎖 (LvH)、Pv、Lv軽鎖 (LvL)、βc、C末端成分 (Ct) の順となっている (Hiramatsu

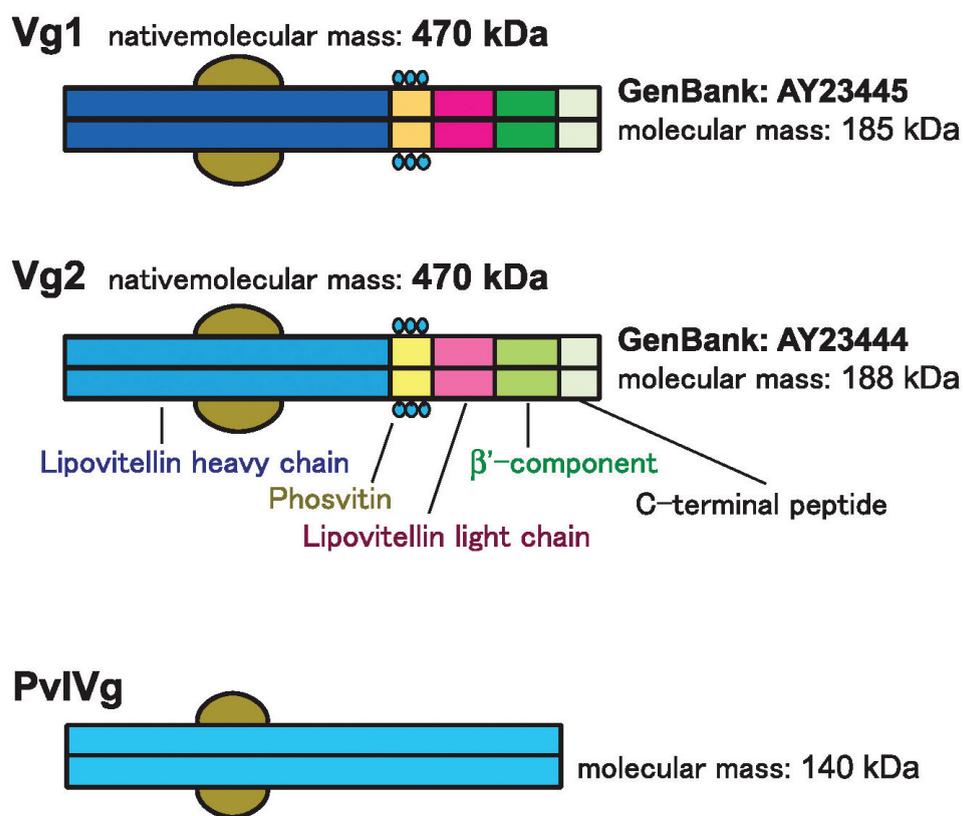


Fig. 2. Three forms of vitellogenin genes and their deduced protein structures in Japanese eel. Vg: vitellogenin, PvlVg: phosvitinless vitellogenin.

et al., 2002a; b)。ウナギのVg 1, Vg 2 もこうした一般的な型のVgに属している (Fig. 2)。これらに対して、近年、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* でPv領域がなく、LvL-βc-Ctの部分が極めて短い新規のVgが見出された (Wang *et al.*, 2000)。このVgはその特徴からPv欠損型Vg (PvIVg) と呼ばれている。PvIVgはその後マハゼ (Ohkubo *et al.*, 2003), カダヤシ (Sawaguchi *et al.*, 2005) で遺伝子とタンパク両側面からその存在が確かめられている。これら既知のPvIVg遺伝子の塩基配列から相同性の高い部分を選び、プローブを作製して、ウナギPvIVg遺伝子のクローニングを行ったところ、全長約4.7 kbpのcDNAが得られた (Fig. 2)。この遺伝子から推定されるVgタンパクはVg 1, Vg 2 に比べて小さく、その内部には明瞭なPv領域を含んでいないことからウナギPvIVg遺伝子であると考えられた。これら3種の遺伝子産物であるVgタンパクが血中に放出され卵母細胞に取り込まれているか否か、生化学的分析を行った。人為催熟雌血清、卵黄形成期の卵母細胞および排卵卵抽出液のゲルろ過クロマトグラフィーによる分析から、血清中のVgの分子量は約470 kDaで、卵母細胞に取り込まれると主要な卵黄タンパクであるLvへと変化し、その分子量は低下する。また、ゲルろ過画分中のリンの測定および免

疫学的な検出からPv, βcが一部切除されることが示唆された。さらに最終成熟を経るとLvおよびPvの分子量はさらに小さくなることが示された。

主要な卵黄タンパク画分のSDS電気泳動と分離されたポリペプチドバンドのN末端および内部アミノ酸配列分析から、各卵黄タンパク構成ペプチドの分子量とVg遺伝子上でのポジションを明らかにした。また、LvHの内部シーケンスからVg 1, Vg 2 遺伝子より作られた2種類のVgがいずれも含まれていることが示唆された。しかしながら、遺伝子が見つかったPvIVgはゲルろ過においても主要なピークを形成せず、またSDS電気泳動分析からもそれに相当すると思われる明瞭なバンドは見つかっておらず、Vg 1 およびVg 2 タンパクと比較して卵母細胞に蓄積されている量が極めて少ないと考えられる。現在、その量的な比率を明らかにするため、PvIVg由来の卵黄タンパクを精製して抗血清を作製し、免疫学的な分析を進めている。

卵黄タンパクの役割と卵質への影響

最終成熟を経て、受精可能な卵になる際に、それぞれの卵黄タンパクはどのように分解され、卵の浮遊性を獲得しているか調べるため、排卵された卵内に含まれ

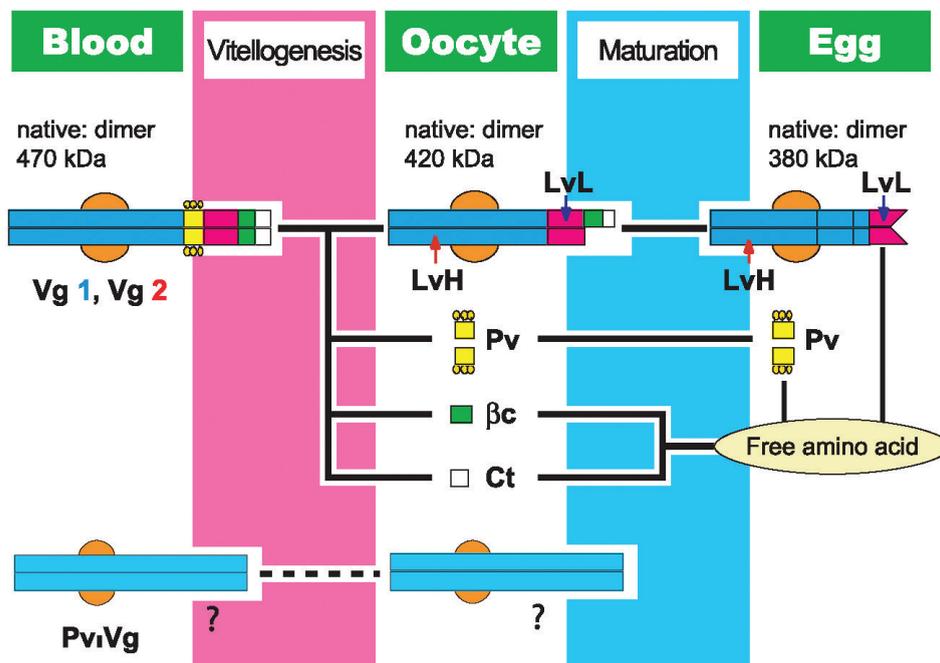


Fig. 3. Flowchart describing molecular alterations of vitellogenins and vitellogenin-derived yolk proteins during vitellogenesis and oocyte maturation in Japanese eel. Abbreviations are same as Figure 1 and 2.

る卵黄タンパクを生化学的に分析し、その結果をFig. 3に取りまとめた。ウナギの場合も既知のマツカワ (Matsubara *et al.*, 1999) やホワイトパーチ (Hiramatsu *et al.*, 2002a) といった浮遊性卵を生む魚種と同じく最終成熟期に卵黄タンパクの分解が引き起こされる。しかしながら、マツカワなどの場合は、VgAとVgBに由来する卵黄タンパクを巧みに分解し分けることで卵の吸水量を決定して浮力を調節しているが、ウナギの場合はそれとは大きく異なっていることが明らかになってきた。マツカワやスケトウダラなどの卵では、吸水のための浸透圧上昇因子としてVgA由来の卵黄タンパクの大部分をアミノ酸まで分解し、一方で胚発生後半の栄養源としてVgB由来の卵黄タンパクを温存する。これに対してウナギではVg1とVg2に由来する卵黄タンパクの間で分解され方に大きな違いは見られず、いずれもLvLとPvの一部および βc が分解の対象となっていると考えられる (Fig. 3)。このモデルから分解産物の遊離アミノ酸量を予想した場合、実際の測定結果とよく一致する。このことから、ウナギでも最終成熟の際に卵黄タンパクを分解し、遊離アミノ酸の増加による浸透圧の上昇を利用して吸水の駆動力の一部としているが、2種類のVgを遊離アミノ酸

量の調節に用いない点が本種の特徴といえる。このことは、ウナギで用いられている卵の浮遊性調節システムが、高等な魚で広く用いられているVgA, VgBによる「Dual-Vg system」の原型を留めたものである可能性を強くうかがわせる。

マツカワの卵母細胞の最終成熟期には、1) 卵黄タンパク分解酵素の活性化に必要な卵母細胞内の酸性化、2) カテプシンBなどのタンパク分解酵素による卵黄タンパクの遊離アミノ酸への分解、3) 遊離アミノ酸を浸透圧上昇因子とする卵母細胞内への吸水、4) 吸水によって変化したイオンバランスの調整、5) 卵母細胞内の容積増大に伴う卵黄球の融合、6) 卵母細胞内の中性化とタンパク分解酵素の不活性化といった、「核の最終成熟」と同期して起こる「細胞質の最終成熟」にかかわるきわめて複雑な現象が見られる (Fig. 4)。ウナギにおいても、本研究で最終成熟期に卵黄タンパクが分解し、遊離アミノ酸が増加することが確認されたことから、卵母細胞内では類似の細胞質の最終成熟が起きているものと考えられる。このプロセスのそれぞれには、数多くの遺伝子や、それらの産物であるタンパクが働いている。従って、それらの中のいずれかがうまく機能しなければ、あるいは機能するタイミングが狂えば

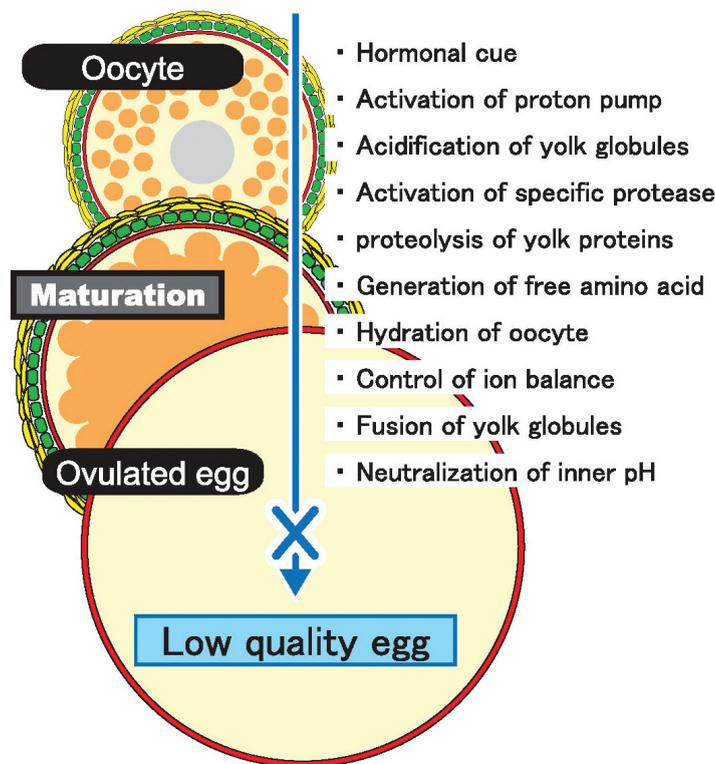


Fig. 4. Possible degradation mechanism of egg quality caused by incomplete cytoplasmic maturation of oocytes

卵の質は低下することになる。ウナギで行われている現行のホルモンによる人為的な催熟では、自発的な成熟・排卵の場合と異なり、ホルモン投与のタイミングは高度の経験によって、個体毎の状況を見ながら推し量られている。今後そうした操作の手助けとなる、卵質低下を防ぐ技術の研究開発が急務となろう。

おわりに

本研究から、ウナギの卵に含まれている卵黄タンパクの性状と、卵が機能を果たす上でそれらがどのような役割を担っているのかが明らかになってきた。最終成熟期に起こる卵黄タンパクの分解を制御するメカニズムについては現在研究を進めており、そうしたメカニズムの失調と卵質低下との関連もやがて明らかになると考えている。ここでは卵黄タンパクに焦点を当てて卵質の問題に取り組んできたが、卵質を低下させる要因には、卵内外を含めてまだ多くの事柄が候補として考えられる。今後、それらの検討を含めて良質卵獲得技術の確立に資する研究に発展させていく必要がある。

文 献

- Hiramatsu N., Matsubara T., Hara A., Donato D. M., Hiramatsu K., Denslow N. D., and Sullivan C. V., 2002a: Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, **26**, 355-370.
- Hiramatsu N., Matsubara T., Weber G. M., Sullivan C. V., and Hara A., 2002b: Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, **68**, 694-699.
- LaFleur G. J. Jr., Byrne B. M., Kanungo J., Nelson L., Greenberg R. M., and Wallace R. A., 1995: *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. Jr., Gary J., Raldua D., Fabra M., Carnevali O., Denslow N., Wallace R. A., and Cerda J., 2005: Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, in press.
- Matsubara T., Nagae M., Ohkubo N., Andoh T., Sawaguchi S., Hiramatsu N., Sullivan C. V., and Hara A., 2003: Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 295-299.
- Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C. V., and Hara A., 1999: Two form of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.*, **213**, 18-32.
- Mouchel N., Trichet V., Betz A., Le Pennec J. P., and Wolff J., 1996: Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, **174**, 59-64.
- Ohkubo N., Mochida K., Adachi S., Hara A., Hotta K., Nakamura Y., and Matsubara T., 2003: Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 353-364.
- Reith M., Munholland J., Kelly J., Finn R. N., and Fyhn H. J., 2001: Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.*, **291**, 58-67.
- Sawaguchi S., Koya Y., Yoshizaki N., Ohkubo N., Andoh T., Hiramatsu N., Sullivan C. V., Hara A., and Matsubara T., 2005: Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.*, **72**, 1045-1060.
- Wang H., Yan T., Tan J. T. T., and Gong Z., 2000: A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, **256**, 303-310.