

## 魚類の胚発生におけるオートファジーが関与する卵黄吸収機構

今村伸太郎\*・藪 健史\*・山下倫明\*

### Autophagy-Mediated Yolk Absorption during Fish Embryogenesis

Shintaro IMAMURA\*, Takeshi YABU\*, and Michiaki YAMASHITA\*

**Abstract** Proteolytic degradation of yolk proteins is essential process for embryogenesis, homeostasis in fish. Since two different major pathways, *i. e.* ubiquitin-proteasome system and autophagy, have been well known in the animal cells, their roles for the yolk protein proteolysis during embryogenesis were characterized in the embryos of zebrafish and other fish species. Ubiquitin-proteasome system regulates ATP-dependent protein degradation specific to ubiquitinated proteins by proteasome, while autophagy regulates a process of bulky protein degradation via lysosomal/vacuolar system. The proteolytic processing of yolk protein in fish embryogenesis has been identified to be undertaken by lysosomal proteases. In order to characterize the molecular mechanisms on the proteolytic degradation of yolk protein, we examined roles of autophagy during embryogenesis. We established transgenic zebrafish lines, which are expressed a marker protein of autophagosome, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) fused to green fluorescent protein (GFP), to visualize autophagosome formed by autophagy. The transgenic embryos were very useful to observe autophagic cells in embryos, and we detected the induction of autophagosome during early embryogenesis. The treatment of embryos with protease inhibitors, such as E-64 (inhibitor of cathepsins B and L) and proteasome inhibitor, effectively repressed yolk protein degradation and embryogenesis, suggesting that both autophagy and proteasome pathways are essential for degradation of yolk proteins.

**Key words :** Yolk absorption, proteolysis, autophagy, ubiquitin-proteasome pathway, zebrafish, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3)

#### 魚類の卵黄タンパク質の利用

魚類の受精卵・仔魚期は, 生活史のなかで死亡率が最も高い時期であり (Houde, 1987), 好適な栄養源を利用できるかが, その後の生残および成長に強く影響する。魚類は卵に蓄積された卵黄成分を分解し, エネルギー源および栄養源として利用している (Davis *et al.*, 2007; Matsubara *et al.*, 1999; Ohkubo *et al.*, 2006)。卵母細胞成熟期に卵黄タンパク質が蓄積されるが, 発生における卵黄吸収過程で卵黄タンパク質が特異的に分解されて, ペプチドおよび遊離アミノ酸が生成

される (Matsubara *et al.*, 1999)。マミチヨグやゼブラフィッシュの卵を研究材料として, 成熟誘導ステロイドホルモン (17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP) を卵母細胞の器官培養系に投与することによって成熟を人為的に誘導し, 卵黄タンパク質の分解過程を観察することができる (LaFleur *et al.*, 2005)。この培養系に各種プロテアーゼ阻害剤を添加することによって卵黄タンパク質の分解過程に関与するプロテアーゼが同定された。その結果, マミチヨグの卵成熟過程における卵黄タンパク質の分解にはカテプシン B が, ゼブラフィッシュの場合には, カテプシン B お

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

\* 中央水産研究所 236-8648 横浜市金沢区福浦 2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan) .

よびLが関与することが明らかにされた (Carnevali *et al.*, 2006; Raldua *et al.*, 2006)。また、サクラマス、イトウおよびヘダイでは、精製された卵黄前駆タンパク質ビテロジェニンに対して、プロテアーゼ源として卵母細胞の水溶性画分を反応させることによって、各種プロテアーゼ阻害剤を用いて卵黄タンパク質の分解の原因となる酵素として、カテプシンDが必須であった (Carnevali *et al.*, 1999; Hiramatsu *et al.*, 2002)。胚発生における卵黄タンパク質の分解には、酸性へのpH調節が重要であると考えられている (Cho *et al.*, 1999; Fagotto *et al.*, 1990; Fagotto *et al.*, 1994a, b; Nordin *et al.*, 1991; Selman *et al.*, 2001; Yamahama *et al.*, 2003)。すなわち、酸性条件下において、カテプシンB前駆体がリソソーム内において活性化することによって、リソゾームプロテアーゼ群のプロセッシング酵素として作用し、他の酵素を限定的に切断することによって、活性化させると考えられる。エンド型ペプチダーゼ活性を有するカテプシンL、ジペプチジルペプチダーゼ活性を有するカテプシンB、アミノペプチダーゼ活性を有するカテプシンH、カルボキシペプチダーゼ活性を有するカテプシンAなどのリソゾーム酵素が卵黄タンパク質を分解し、アミノ酸を生成すると考えられる。リソゾーム顆粒では、液胞型のH<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) によってpHが調節されるが、卵黄でもV-ATPaseが酸性顆粒の形成に重要な役割を果たしている (Fagotto *et al.*, 1994a, b; Raldua *et al.*, 2006)。V-ATPaseの阻害剤であるバフィロマイシンA1を卵に作用させることによって、pHの酸性化および卵黄タンパク質の分解が阻害されることが報告されている (Raldua *et al.*, 2006)。また、卵黄にはカテプシンBおよびLに対するタンパク性プロテアーゼインヒビターが含まれていることから (Yamashita and Konagaya, 1991; Yamashita and Konagaya, 1996)、これらプロテアーゼインヒビターが、卵成熟および卵黄吸収における卵黄タンパク質の分解過程を調節する可能性が考えられる。

マミチヨグ、ニジマス、マツカワ、ニホンウナギ、ゼブラフィッシュなどの魚種から少なくとも2種類のビテロジェニンをコードする遺伝子が見いだされ (Hiramatsu *et al.*, 2002a, b; LaFleur *et al.*, 1995; LaFleur *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2000)、魚類においても多型のビテロジェニンを持つことが明らかになった (Matsubara *et al.*, 2003)。Matsubara *et al.* (2006)は、マツカワ、ニホンウナギなどの海産魚の浮遊性卵を研究材料として、卵母細胞の最終成熟過程において、卵黄タンパク質の分解が誘導され、遊離アミノ酸が生成された結果、卵の浸透圧が上昇し、卵への吸水が生じ

ることを明らかにした。マツカワの場合は、2つのビテロジェニン (VgA, VgB) をそれぞれ目的に応じて使い分けている (Matsubara *et al.*, 1999)。吸水のための浸透圧上昇因子としてVgAが利用され、胚発生の過程ではVgBが分解される (Matsubara *et al.*, 1999)。このように、卵黄タンパク質の分解は、アミノ酸を栄養源として利用するだけでなく、浸透圧調節および浮遊適応に関与する重要な役割を果たしている。一般に海産魚の浮遊性卵は日周運動として垂直分布が変化することが知られており (Ito *et al.*, 1961; Tanaka *et al.*, 1989; Watabe *et al.*, 1970)、浮遊適応は、生存適応戦略に関わる重要な生理機能であると考えられる。

### 卵黄吸収で働くタンパク質分解機構

タンパク質の分解経路はユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーに分けられる。ユビキチン-プロテアソーム系は、分解されるべき個々のタンパク質に、8.6 kDaからなるユビキチン分子が複数結合することでプロテアソームにより選択的に分解される (Ciechanover *et al.*, 1981; Ciechanover *et al.*, 1982; Hershko and Ciechanover, 1992)。プロテアソームはタンパク質の分解を行う巨大な酵素複合体でありユビキチンリガーゼによってユビキチンが標識されたタンパク質を選択的に分解している。主に、細胞周期制御、免疫応答、シグナル伝達といった細胞中の様々な働きに関わっている (Rechsteiner *et al.*, 1993)。一方、オートファジーはリソソームを介した非特異的な分解経路である (Levine and Klionsky, 2004)。アミノ酸飢餓状態や異常タンパク質の蓄積が生じると、細胞質中で異常タンパク質を蓄積した細胞内顆粒オートファゴソームが形成される (Baba *et al.*, 1994)。オートファゴソームは脂質二重膜を有しており、さらにこの顆粒形成が成長していくことで細胞質成分やオルガネラなどを二重のリン脂質の膜で取り囲んだ小胞が形成される。次にオートファゴソームと細胞内のリソソームが膜融合を起こし、リソソームに由来するさまざまな加水分解酵素によって内容物が消化されて、標的となる異常タンパク質はペプチドおよびアミノ酸に分解される。この分解経路は個体発生や神経疾患の防御などに働いていることが報告されている (Qu *et al.*, 2007; Rubinsztein, 2006)。マツカワ (Matsubara *et al.*, 2006) およびマミチヨグ (Raldua *et al.*, 2006) で観察された卵黄吸収における卵黄タンパク質の分解には、リソソーム酵素が働いていること、バフィロマイシンA1で阻害されることなどから、卵母細胞の最終成熟過程における卵黄タンパク質の分解および卵の吸水現象

は、オートファジーの経路によって誘導されることが推定された。最終成熟のシグナルが引き金となって卵黄内でオートファジーが誘導される分子機構が推定される。

### 卵黄吸収における二つの分解経路の重要性

Amsterdam *et al.* (2004) は、ゼブラフィッシュの網羅的変異体スクリーニングにおいて、プロテアソームおよびユビキチンに関する変異体は胚発生致死であることを報告した。この変異体は灰色をした卵黄を持つことが記載されており、卵黄吸収過程の失調が疑われる。さらに、オートファジー関連因子である ATG 欠損体マウスは、ほとんど正常に生まれるが、一日以内に死に至ることが報告されている (Kuma *et al.*, 2004)。そこで、魚類胚の卵黄タンパク質の分解経路および発生への影響を調べるには、各酵素に対する特異的な阻害剤を魚類卵に投与することが最適であると考へ、プロテアソームおよびオートファジーに関連する阻害剤 (10 mM E-64, 10 mM ロイペプチン, 200  $\mu$ M Z-VAD-FMK, 100  $\mu$ M バフィロマイシン A1, 10 mM MG-132) をゼブラフィッシュ胚に注入 (1 nl/embryo) した。その結果、カテプシン B および L に対する阻害剤 E-64 およびロイペプチンを加えると卵黄タンパク質の分解が停止され、体節期以前で発生が停止した。さらにプロテアソームに対する阻害剤 MG-132 および V-ATPase の阻害剤バフィロマイシン A1 は卵黄タンパク質の分解を部分的に阻害し発生が遅延した。これらの結果は、プロテアソームやオートファジーを介したタンパク質分解によるアミノ酸生成がエネルギー恒常性を維持し、初期胚における飢餓状態を補償するために重要であることを示している。このようなオートファジーの誘導経路として、マツカワ (Matsubara *et al.*, 2006) およびマミチヨグ (Raldúa *et al.*, 2006) で観察された卵黄球の酸性化と卵黄タンパク質の分解と同様に、DHP による最終成熟のシグナルによって、受精前の排卵時に卵黄球におけるオートファジーが誘導されることが考えられる。上記の阻害剤を利用した分子の同定が重要な研究手段として他の魚種でも利用できる。

### オートファジーおよびユビキチン-プロテアソーム系の魚類胚での可視化

ゼブラフィッシュでは、遺伝子導入技術が確立されていることから、研究対象となる目的のタンパク質と緑色蛍光タンパク質 (GFP) とを連結したキメ

ラ分子の遺伝子発現系を設計し、その遺伝子を導入したトランスジェニック魚類系統を作製することができれば、生体内での目的の蛍光タンパク質の挙動を蛍光顕微鏡下で可視化して追跡することができる。オートファジーの誘導を生体内で可視化するために、Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (MAP1LC3) に対して蛍光タンパク質を連結したキメラ分子を発現する培養細胞株やトランスジェニックマウスが作出されている (Kabeya *et al.*, 2000)。MAP1LC3 は、オートファゴソームを構成する分子であり、リン脂質が集積して脂質二重膜を形成し、細胞質成分やオルガネラなどを二重のリン脂質の膜で取り囲んだ膜顆粒が形成される。MAP1LC3 と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (GFP-MAP1LC3) を発現するトランスジェニックフィッシュを作出し、生体内でのオートファジー活性化を観察した。初期胚の MAP1LC3 の発現を、抗 MAP1LC3 抗体を用いたウエスタンブロット法によって、受精直後から体節期に活性化が検出された。トランスジェニックフィッシュにおける GFP 発現は生体内でリアルタイムに観察することができなかった。しかし、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織学的観察によって、24 時間胚では卵黄囊の表面で陽性細胞を観察することができた。また、カテプシン L も免疫組織学的に卵黄囊に局在していた。マミチヨグの卵母細胞では、カテプシン L, B および F は卵黄の外縁部と卵黄小球で観察された (Raldúa *et al.*, 2006)。また、マミチヨグおよびゼブラフィッシュ胚では、カテプシン L のメッセンジャー RNA は卵黄囊の表面で発現していた (Tingaud-Sequeira and Cerda, 2007)。卵黄動脈と周辺静脈 / 腸下静脈は脊椎動物の胚で卵黄吸収血管として位置づけられているが、ゼブラフィッシュ仔魚は両血管を欠いていることが報告されている (Fujita *et al.*, 2006) ことから、卵黄で分解されたアミノ酸は心臓周辺の血管を通して血流に取り込まれていると推定している。さらに、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛍光タンパク質 (Ub-Y-YFP, YFP-CL1) (Menéndez-Benito *et al.*, 2005) を過剰に発現するトランスジェニックフィッシュも作製されている (Imamura *et al.*, 投稿準備中)。これらの蛍光タンパク質はユビキチン化部位が導入されており、プロテアソームによって特異的に分解されるため、蛍光タンパク質の消失する部位を観察することによって、分解系の分布を調べることができる。卵黄吸収過程におけるオートファジーおよびユビキチン-プロテアソーム系の重要性を調べることが可能になると考えられる。

卵母細胞におけるオートファジーおよびユビキチン

−プロテアソーム系の開始機構は成熟過程によって決定されるものと考えられる。オートファジーは栄養飢餓状態で活性化し、インスリン様増殖因子 (IGF), Target of rapamycin (TOR) /PI3 キナーゼ経路を介した内分泌系によって制御されていると考えられている (Noda *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2004; 藪ら, 2008)。一方、卵黄吸収におけるオートファジーの誘導は、成体における栄養飢餓状態とは異なり、細胞増殖および細胞分化を伴うことから、卵黄吸収特有のオートファジー経路が存在すると考えられる。本研究で開発された GFP-MAP1LC3 トランスジェニックフィッシュの成熟過程を観察することができる。

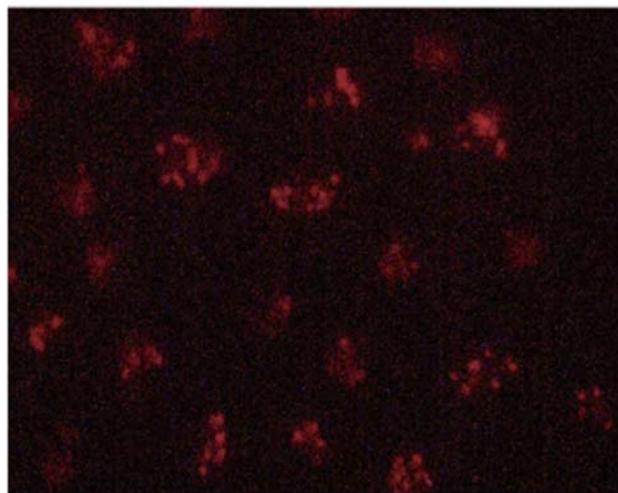
### 卵黄吸収に関わる課題

種苗生産技術における課題として、卵質の向上を図る必要がある。卵質を決定する要因の一つとして、受精卵・仔魚の栄養物質である卵黄タンパク質や脂質、ミネラルの組成と分解・利用を担うオートファジーの細胞内機構が重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。海産魚に見られる浮遊性卵の場合と淡水魚の沈性卵とは、卵黄タンパク質の分解およびオートファジーの誘導時期が大きく異なることから、各種酵素阻害剤を利用して卵黄吸収のメカニズムの共通性を魚種間で比較解析する必要がある。また、卵黄吸収過程にある胚では、オートファジーによるタンパク分解系が卵黄嚢および胚全体の細胞で生じているが、摂餌開始によって外部からの栄養源に切り替わる時期に代

謝系の大きな転換が生じることから (佐々木, 1989), このような代謝系の変化を生化学的に捉える研究が今後の課題である。環境水温の差違や運動の有無, 摂餌開始のステージなども卵黄吸収と成長に影響することから (Cavalli *et al.*, 1997; 西田・小林, 1971; 佐々木, 1989), これらの環境条件や生理条件によってオートファジーが調節されるものと推定される。

### 文 献

- Amsterdam A., Nissen R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S., Hopkins N., 2004: Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 12792-12797.
- Baba M., Takeshige K., Baba N., Ohsumi Y., 1994: Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.*, **124**, 903-13.
- Ciechanover A., Heller H., Katz-Etzion R., Hershko A., 1981: Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 761-765.
- Carnevali O., Carletta R., Cambi A., Vita A., Bromage N., 1999: Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.*, **60**, 140-146.



**Fig. 1.** Extensive induction of autophagy at surface of yolk-sac during zebrafish development. Zebrafish lines expressing autophagosome marker, EGFP-MAP1LC3 were generated. The red fluorescent dots indicate autophagic vesicle, *i.e.* autophagosome in a lot of cells of yolk sac. A embryo (24 hours after fertilization) was stained by anti-GFP antibody and visualized by anti-rabbit IgG labeling Alexa Fluor 594.

- Carnevali O., Cionna C., Tosti L., Lubzens E., Maradonna F., 2006: Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **146**, 195-203.
- Cavalli R.O., Kashiwagi M., Iwai T., 1997: Yolk utilization and growth of larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* at different temperatures. *Bull. Fac. Bioresources, Mie Univ.*, **19**, 13-20.
- Cho W.L., Tsao S.M., Hays A.R., Walter R., Chen J.S., Snigirevskaya E.S., Raikhel A.S., 1999: Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13311-13321.
- Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A., 1982: "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2537-2542.
- Davis L.K., Hiramatsu N., Hiramatsu K., Reading B.J., Matsubara T., Hara A., Sullivan C.V., Pierce A.L., Hirano T., Grau E.G., 2007: Induction of three vitellogenins by 17beta-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biol. Reprod.*, **77**, 614-625.
- Fagotto F., 1990: Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **14**, 237-252.
- Fagotto F., Maxfield F.R., 1994a: Yolk platelets in *Xenopus* oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. *J. Cell Biol.*, **125**, 1047-1056.
- Fagotto F., Maxfield F.R., 1994b: Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *J. Cell Sci.*, **107**, 3325-3337.
- Hershko A., Ciechanover A., 1992: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 761-807
- Hiramatsu N., Ichikawa N., Fukada H., Fujita T., Sullivan C.V. and Hara A., 2002: Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids, *J. Exp. Zool.*, **292**, 11-25
- Houde E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.*, **2**, 17-29.
- 伊東祐方, 1961: 日本近海におけるマイワシの漁業生物学的研究. 日水研報, **9**, 1-227.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T., 2000: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.
- Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N., 2004: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**, 1032-1036.
- LaFleur G.J., Jr, Raldúa D., Fabra M., Carnevali O., Denslow N., Wallace R.A., Cerdà J., 2005: Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, **73**, 815-824.
- Levine B., Klionsky D.J., 2004: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.*, **6**, 463-477.
- 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.
- Matsubara T., Nagae M., Ohkubo N., Andoh T., Sawaguchi S., Hiramatsu N., Sullivan C. V. and Hara A., 2003: Multiple vitellogenins and their unique role in marine teleosts. *Fish. Physiol. Biochem.*, **28**, 295-299.
- 松原孝博, 安藤忠, 大久保信幸, 澤口小有美, 2006: 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, 水産総合研究センター研究報告, 別冊第5号, 45-50
- Mallya S.K., Partin J.S., Valdizan M.C., Lennarz W.J., 1992: Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J. Cell Biol.*, **117**, 1211-1221.
- Menéndez-Benito V., Verhoef L.G., Masucci M.G., Dantuma N.P., 2005: Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2787-2799.

- 西田秀夫, 小林哲夫, 1971: サケの肝臓形成と卵黄吸収. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, 25, 35-43.
- Noda T., Ohsumi Y., 1998: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, **273**, 3963-3966.
- Ohkubo N., Sawaguchi S., Hamatsu T., Matsubara T., 2006: Utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish. Sci.*, **72**, 620-630.
- Qu X., Zou Z., Sun Q., Luby-Phelps K., Cheng P., Hogan R.N., Gilpin C., Levine B., 2007: Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, **128**, 931-946.
- Raldúa D., Fabra M., Bozzo M.G., Weber E., Cerdà J., 2006: Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked by an H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor: effects on the hydration mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **290**, R456-R466.
- Rechsteiner M., Hoffman L., Dubiel W., 1993: The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6065-6068.
- Rubinsztein D.C., 2006: The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*, **443**, 780-786.
- 佐々木正吾, 1989: サケの餌付け時期に関する検討. 魚と卵, **158**, 17-22.
- Scott R.C., Schuldiner O., Neufeld T.P., 2004: Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. cell*, **7**, 167-178.
- 田中 克, 1976: 卵・稚仔の離合集散に関する生態学的考察. 水産海洋研究会報, **28**, 79-89.
- Tanaka M., Goto T., Tomiyama M., Sudo H., Azuma M., 1989: Lunar-phased immigration and settlement of metamorphosing Japanese flounder larvae into the nearshore nursery ground. *Cons. Int. Explor. Mer.*, **191**, 303-310.
- Tingaud-Sequeira A., Cerdà J., 2007: Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (Ctsl) isoforms in zebrafish: Ctsla is the putative yolk processing enzyme. *Gene*, **386**, 98-106.
- Wang H., Yan T., Tan J.T., 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.
- 渡部泰輔, 1970: マサバの発育初期における形態・生態ならびに資源変動に関する研究 東海水研報, **62**, 1-283.
- 藪健史, 山下倫明, 2008: 魚類細胞におけるストレスによって誘発されるオートファジーの観察, 水産総合研究センター研究報告 投稿中
- Yamashita M., Konagaya S., 1991: Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J. Biochem.*, **110**, 762-766.
- Yamashita M., Konagaya S., 1996: A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1282-1284.