

魚類における卵黄の蓄積・分解・利用機構の解明

松原孝博^{*1}・大久保信幸^{*1}・澤口小有美^{*1}・玄 浩一郎^{*2}

Accumulation, degradation and utilization of yolk proteins in teleosts.

Takahiro MATSUBARA^{*1}, Nobuyuki OHKUBO^{*1},
Sayumi SAWAGUCHI^{*1}, and Koichiro GEN^{*2}

Abstract Vitellogenin (Vg) is the precursor of egg yolk proteins in teleost species. Three forms of Vg genes and their transcripts appear to exist in barfin flounder, mosquitofish, and red seabream consisting of two forms of complete Vg (VgA and VgB) and a smaller Vg lacking a phosvitin domain (PvIVg, VgC). From cDNA sequencing analysis of the Vg gene, we clarified that species belonging to higher taxa, including Acanthopterygii and Paracanthopterygii, express all three forms of VgA, VgB and VgC. Both VgA and VgB cleaved into three classes of yolk proteins: lipovitellin, phosvitin and β' -component when they are incorporated into oocytes. VgA and VgB play distinct roles in the regulation of egg buoyancy in barfin flounder through selective proteolysis of their derivative yolk proteins in oocytes undergoing final oocyte maturation. Involvement of a cathepsin B-like enzyme in this maturation associated proteolysis was demonstrated by protease specification procedures. Measurement of ooplasm pH at different stages of oocyte maturation revealed drastic acidification of the ooplasm accompanied with yolk protein proteolysis and activation of cathepsin B. With respect to oocyte hydration for acquisition of egg buoyancy, cytoplasmic maturation events appear to be controlled by changes in the pH in maturing oocytes.

Key words : teleost, egg, vitellogenin, yolk protein, oocyte maturation

卵生脊椎動物では、胚発生に必要な栄養を予め卵内に蓄積している。卵内の栄養は卵黄と総称され、その主な成分は卵黄タンパクである。魚類においても卵生魚およびほとんどの胎生魚の卵で、卵黄タンパクは胚発生に不可欠な要素であり、その合成、蓄積、利用に関する研究は、増養殖における種苗生産を効率的に進める上で重要な情報をもたらす。近年、多くの水産増養殖対象魚種において種苗生産の基盤技術が確立しつつあり、次の段階として、より効率的な生産や遺伝的多様性に配慮した高度な生産技術が求められている。その中で、「卵質」の問題が改めて浮上し、健康で遺伝的にも多様な種苗を効率的に作るためには良い卵を得ることが極めて重要であると再認識されている。

魚類の卵黄タンパクは前駆体であるビテロジェニン (vitellogenin) として成熟期の雌の肝臓で合成される (Fig. 1)。発達を開始した卵巣で合成される雌性ホルモン (estradiol-17 β) は肝細胞にあるエストロゲン受容体を仲介して、そこでビテロジェニン合成を誘導する。作られたビテロジェニンは血液によって卵巣に運ばれ、卵母細胞に取り込まれて卵黄タンパクとして蓄積される (Wallace, 1985 参照)。こうして蓄積された卵黄タンパクは胚発生のためのエネルギー源および胚を構築する原材料として用いられると考えられてきた。しかしながら、1980年代から90年代に海産魚の浮遊性卵で遊離アミノ酸含有量が著しく高いことや、最終成熟期に卵黄タンパクに変化が見られることが

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

^{*1} 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所, 〒085-0802 北海道釧路市桂恋 116 (Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 116, Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, Japan)

^{*2} 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所玉城庁舎 〒519-0423 三重県度会郡玉城町昼田 224-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, 224-1 Hiruta, Tamaki, Mie 519-0423, JAPAN)

示され (Craig and Harvey, 1987; McPherson *et al.*, 1989; Greeley *et al.*, 1991), 卵の浮遊性獲得への関与が浮き彫りになってきた。そのため, 我々はバイオデザイン計画の中で, これらの断片的な情報を統合し, 海産浮遊性卵における卵黄タンパクの合成から利用に至る全過程について研究を進めてきたことから, ここでは一連の成果を報告する。

硬骨魚類におけるビテロジェニンの多型

鳥類や両生類のビテロジェニンに多型が見られることは知られていたが (Wiley and Wallace, 1978; Wang and Williams, 1980; Wang *et al.*, 1983), 魚類では比較的最近まで多型の存在は不明であった。硬骨魚類のビテロジェニンに複数の型のものが存在することは, マミチヨグ *Fundulus heteroclitus* において VgI, VgII の 2 遺伝子が報告されたのが最初である (LaFleur *et al.*, 1995a; LaFleur *et al.*, 1995b; LaFleur *et al.*, 2005)。その後, 我々はマツカワ *Verasper moseri* でマミチヨグの VgI, VgII に対応するビテロジェニン (VgA と VgB) とその派生物である卵黄タンパクを見出した (Matsubara *et al.*, 1999)。また, マミチヨグやマツカワが属する棘鰭上目に加えて側棘鰭上目においてもスケトウダラ *Theragra chalcogramma* (Matsubara *et al.*, 2000) やハドック *Melanogrammus aeglefinus* (Reith *et al.*, 2001) で, VgA, VgB の遺伝子やタンパクが見ついている。それらに対して, ニジマス *Oncorhynchus mykiss* のビテロジェニン (Mouchel *et al.*, 1996) やニホンウナギ *Anguilla japonica* の Vg1 (Okumura *et al.*, 2002), Vg2 (GenBank: AY423444) では, 複数のビテ

ロジェニン遺伝子は見られるものの, VgA と VgB のような大きな違いが認められない。Figure 2 に示すように, これら VgA (=VgI) と VgB (=VgII) や, ニジマスやウナギのビテロジェニン遺伝子は, 大きさや内部の卵黄タンパクドメインの構造が類似しており, 一般的かつ完全な形のビテロジェニンと位置付けられる。一方, それらよりも小さく, また内部構造が不完全なビテロジェニン遺伝子がゼブラフィッシュ *Danio rerio* で発見された (Wang *et al.*, 2000)。これは内部にホスピチン (phosvitin) を持たないことからホスピチンレス (phosvitinless) ビテロジェニンと名付けられている。我々も, マハゼ *Acanthogobius flavimanus* で通常のビテロジェニン (Vg-530) とホスピチンレスビテロジェニン (Vg-320) の 2 種類の遺伝子と血中のタンパクが存在することを見出した (Ohkubo *et al.*, 2003; Ohkubo *et al.*, 2004)。棘鰭上目の魚類に, VgA と VgB に加えて, この 3 型目のビテロジェニン (VgC) が存在するか否かを検討し, ホワイパーチ *Morone Americana* (Hiramatsu *et al.*, 2002b) で 3 型のタンパクが, カダヤシ *Gambusia affinis* (Sawaguchi *et al.*, 2005), マダイ *Pagrus major* (Sawaguchi *et al.*, 2006a), ボラ *Mugil cephalus* (Amano *et al.*, 2007a) で 3 型の遺伝子とタンパクを検出した (Fig. 2)。分類群の異なる魚種から 3 型のビテロジェニンが見出されていることから, これらのビテロジェニンは棘鰭上目に広く共通して存在すると考えられる。魚類を含めた卵生脊椎動物のビテロジェニンに多型が生じた原因については, 染色体の倍加に起因する可能性が論じられている (Finn and Kristoffersen, 2007)。

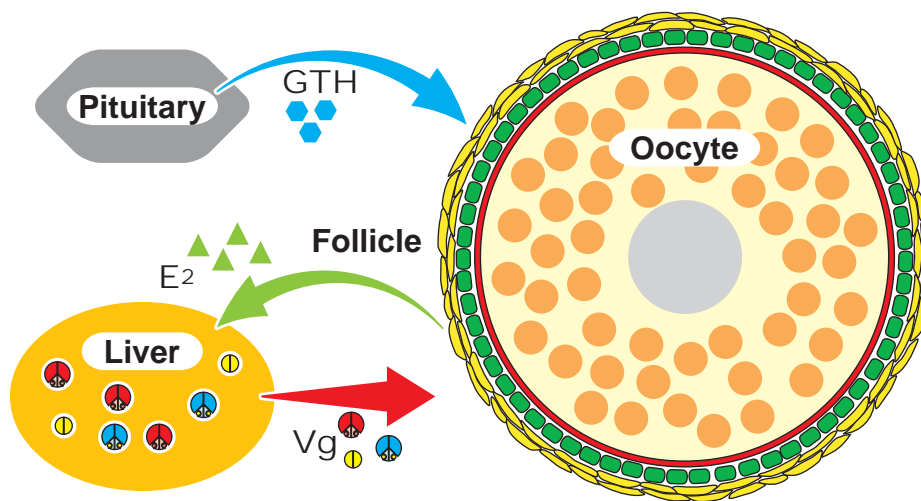


Fig. 1. Synthesis and accumulation of vitellogenin in major evolved teleosts. Vg: vitellogenin, E₂: estradiol-17 β, GTH: gonadotropic hormone.

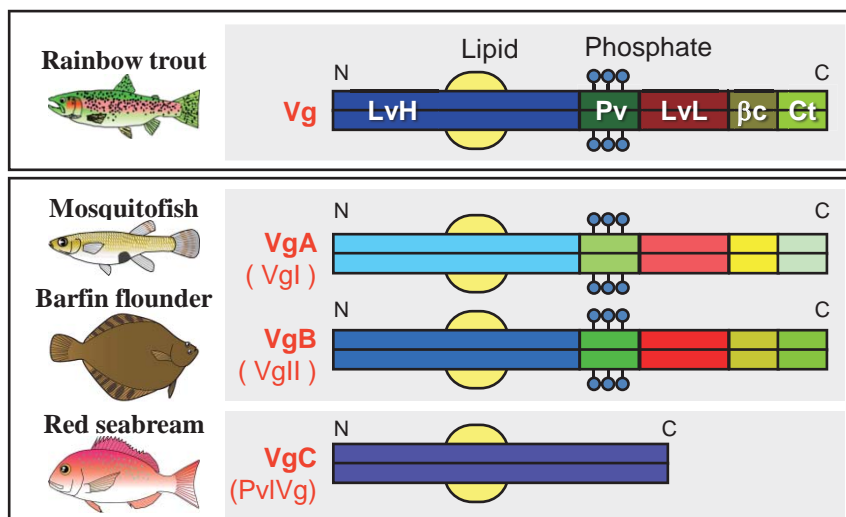


Fig. 2. Multi-forms of vitellogenin structure of teleosts. Vg: vitellogenin, PvIVg: phosvitinless Vg, LvH, lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, βc : β' -component, Ct: C-terminal component.

魚類ビテロジェニンの遺伝子分析結果と卵黄タンパクの電気泳動分析およびN-末端アミノ酸配列分析の結果から、ビテロジェニン内部の卵黄タンパクドメイン構造を明らかにした (Hiramatsu *et al.*, 2002a; Matsubara *et al.*, 2003)。Figure 2 に示したように VgA, VgB を含む通常のビテロジェニンはアミノ末端側から順にリポビテリン重鎖 (lipovitellin heavy chain: LvH) - ホスピチン (phosvitin: Pv) - リポビテリン軽鎖 (lipovitellin light chain: LvL) - β' -成分 (βc) - C-末端成分 (C-terminal component: Ct) を含む。このように類似した内部構造を持ちながらも VgA と VgB の間のアミノ酸の相同性は高くはなく、異なる種間であっても VgA 間あるいは VgB 間の相同性はそれに比べて高い。これは、後で述べる VgA と VgB の機能の分化と密接に関係しているものと思われる。VgA, VgB とは異なり、VgC の内部にはセリンを多く含んだホスピチンの領域が存在せず、LvL 以降の領域も短縮されている。全体のサイズもカダヤシを例にとると VgA がアミノ酸 1,695 残基 (シグナルペプチド 15 残基を含む), VgB がアミノ酸 1,675 残基であるのに対し、VgC はアミノ酸 1,242 残基と小さい。VgC はこのように内部ドメイン構造が他のビテロジェニンと大きく異なることやサイズが小さいことに加え、VgA, VgB に対するアミノ酸の相同性も低く、カダヤシでは VgA との間で 17%, VgB との間で 21%にしか満たない (Sawaguchi *et al.*, 2005)。

海産魚の卵の浮遊性調節への多型ビテロジェニンの関与

マツカワは浮遊性の大きな卵を生む海産魚で、雌は約 1 ヶ月の産卵期の中に 3 ~ 4 日周期で排卵をくり返す (Koya *et al.*, 1994)。マツカワの卵には肉眼で見えるような油球は存在しない。そのため卵の浮遊性は、卵黄タンパクを分解して生じた遊離アミノ酸による浸透圧上昇を利用して顕著な吸水を引き起こし、卵の比重を海水と同等まで下げることで獲得することが示唆された (Matsubara and Sawano, 1995; Matsubara and Koya, 1997)。さらに我々は、マツカワで最終成熟期に VgA と VgB に由来する卵黄タンパクを不均等に分解することで卵の浮力を調節する 2 型ビテロジェニンによる調節機構 (Dual-Vg control system, Fig. 3) を見出した (Matsubara *et al.*, 1999)。マツカワの卵母細胞は卵黄形成期に VgA と VgB を取り込み、卵黄タンパク (リポビテリン, ホスピチン, β -成分) を蓄積する。リポビテリンは質量の約 20% の脂質を含むリポプロテインで、分子量は VgA 由来のリポビテリン (LvA) では約 430 kDa, VgB 由来の LvB では約 400 kDa であり、それぞれ重鎖 (vLvH) と軽鎖 (vLvL) を各々 2 本ずつ含む。一方、ホスピチン (Pv) は内部にリン酸を結合したセリンの繰り返し配列を含む特殊なタンパクで、マツカワでは脱リン酸化した分子量は VgA 由来の PvA で 7 kDa, VgB 由来の PvB で 15 kDa と 8 kDa である (Sawaguchi *et al.*, 2006b)。また、 β -成分は SDS-電気泳動では VgA, VgB 由来のいずれも約 19 kDa の分子量を持つ (Matsubara and Sawano, 1995)。

マツカワの卵母細胞では、最終成熟期になるとこれ

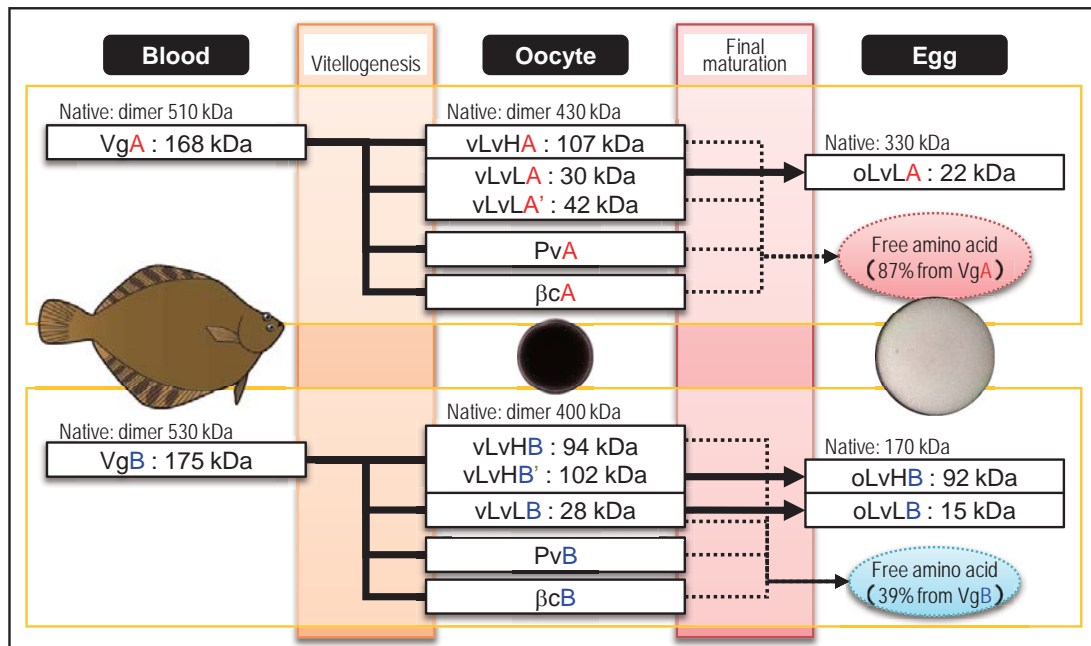


Fig. 3. Dual-Vg control system in barfin flounder *Verasper moseri* (modified figure from Matsubara et al., 1999). Vg: vitellogenin, LvH, lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, βc : β' -component, Ct: C-terminal component, v: component from vitellogenic oocyte, o: component from ovulated egg.

ら卵黄タンパクに著しい変化が見られる。Figure3に示すように、Pvと βc はVgA, Bいずれの由来のものも最終成熟期に分解され、排卵卵では見られなくなる。一方、Lvについては、LvAは重鎖全体と軽鎖の一部が分解され、22 kDaの軽鎖(oLvLA)のみが脂質と結合したまま残る。それに対して、LvBは重鎖、軽鎖共に一部分を失うにとどまり、それぞれ92 kDaのoLvHBと15 kDaのoLvLBに変化し、各々のポリペプチド鎖1本と脂質からなる構造へと変化する。これにより、ゲルろ過での分子量は最終成熟前の430 kDaから170 kDaへと半減する。このようにLvAとLvBが不均等な分解を受けることで、VgAからは全体の87%が、VgBからは39%が遊離アミノ酸へと分解される。卵黄タンパクの分解と、それによる遊離アミノ酸の増加は最終成熟中盤以降顕著に起こり、それと同期して卵母細胞内への水の移入が起こる。このことから、卵黄タンパクを限定的に分解し、それにより生じた一定量の遊離アミノ酸を主な浸透圧上昇因子として利用し、吸水を引き起こすことで卵の浮遊性を獲得、調節していることが明らかになった。最終成熟期の吸水の際に、アクアポリン(aquaporin)が水の通り道として利用されていることがヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* で最近明らかにされた(Fabra et al., 2005)。

こうした卵の浮遊性獲得機構はマダイ(Sawaguchi et al., 2006a)、ボラ(Amano et al., 2007b)、スケトウダラ

(Ohkubo et al., 2006)でも見られ、VgA, VgBを持つ高等な魚種に共通していると考えられる(Matsubara et al., 2003)。この機構で最も重要な点は、2種類のビテロジェニン(VgAとVgB)由来の卵黄タンパクを正確に一定の比率で卵母細胞内に蓄積する必要がある点であり、そのための調節機構が存在するものと推察される。

卵の浮遊性獲得の生理的調節機構

最終成熟期に起こる卵黄タンパク分解の複雑なプロセスには、限定的な分解を引き起こすプロテアーゼの活性化とその活性調節を行う卵内pHの制御が主として働く(Fig. 4)。種々のプロテアーゼ阻害剤を用いた実験およびシステインプロテアーゼに対する人工基質を用いて最終成熟期の卵黄タンパク分解に関するタンパク分解酵素の活性を調べた結果、カテプシンB(cathepsin B)と思われる活性が最終成熟期中盤以降の卵母細胞で高まることが示された。このカテプシンB様酵素の至適pHを調べたところpH 5.5付近であり(松原ら, 未発表)、ほ乳類などのカテプシンBの至適pHと近い値を示した。カテプシンBの活性化の引き金は明らかではないが、活性化と時期を同じくして卵母細胞内pHが5.9から5.0程度へと引き下げられ、酵素の至適pHに保たれている(Matsubara et

al., 2003)。ブラックシーバス *Centropristes striata* では最終成熟期の吸水に ATP- 依存性プロトンポンプが関与していることが示されている (Selman et al., 2001)。従って、マツカワで見られた卵母細胞内の pH 降下は、このプロトンポンプの働きによるものと推察される、カテプシン B の活性化が卵母細胞内部の pH のみで直接的に調節されているか否かは今後に残された課題である。

制御機構のもう 1 つの柱は VgA と VgB の一定比率での卵母細胞への取り込みにある。先に述べたようにマツカワをはじめ棘鱗上目の魚類では VgA, VgB に加えて VgC が存在する。マツカワで、これら 3 種のビテロジェニンそれぞれに由来するリポビテリンの定量的分析を行うため、各々の特異的免疫測定系を作製した。それらを用いて卵母細胞、血液、肝臓中のビテロジェニンまたはリポビテリンを測定したところ、卵母細胞中では VgA, VgB および VgC 由来のリポビテリンが一定比率で蓄積されているものの、血液、肝臓での比率は必ずしもそれと一致せず、合成・分泌および取り込みの複数箇所調節されていることがうかがわれた (澤口ら, 未発表データ)。

おわりに

このプロジェクトでは、マツカワで見られたような卵黄タンパクの機能が、魚類のどの分類群に共通し、どの群では異なるのか、多型ビテロジェニンの遺伝子解析と生化学的な分析からビテロジェニンの機能的進化を明らかにする試みも実施している。こうしたことが

わかることで、栽培漁業などで対象としている魚種の卵がどのような性質を持ったものか判断する基準となる。また、3つの型のビテロジェニンが卵母細胞に取り込まれる比率を一定に調節する機序については、明らかにするまでには至らなかったが、その個体群が利用する産卵場の塩分濃度などの環境で卵が適切な浮遊性を持つように、取り込み比率が遺伝的に決定つけられている可能性がある。こうした卵の物理的特性の遺伝性についても、今後、栽培漁業による遺伝的な攪乱を防ぐ上で明らかにすべき問題であると考えられる。

参考文献

- Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Sullivan, C., and Hara, A., 2007a: Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar. Biol.*, **152**, 1215–1225.
- Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Shimizu, M., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Kagawa, H., Nagae, M., Sullivan, C. V., and Hara, A., 2007b: Egg yolk proteins in grey mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J. Experiment. Zool. A*, **307A**, 324–341.
- Craik, J. C. A. and Harvey, S. M., 1987: The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *F. Mar. Boil. Ass. U. K.*, **67**, 169–182.
- Fabra, M., Raldua, D., Power, D. M., Deen, P. M. T.,

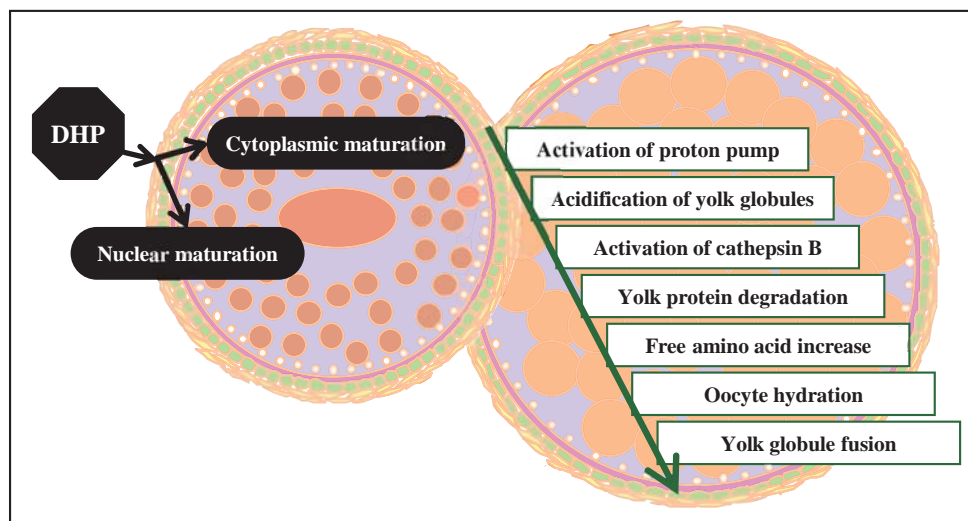


Fig. 4. Process of yolk protein digestion and hydration on oocyte maturation. DHP: 17 α , 20 β -dihydroxy- 4-pregnen-3-one.

- and Cerda, J., 2005: Marine Fish Egg Hydration Is Aquaporin-Mediated. *Science*, **307**, 545.
- Finn, R. N. and Kristoffersen, B. A., 2007: Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE*, **2**, e169.
- Greeley, M. S., Hols, H., and Wallace, R. A., 1991: Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus oocytetes in vivo*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **100**, 639-647.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Weber, G. M., Sullivan, C. V., and Hara, A., 2002a: Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, **68**, 694-699.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Hara, A., Donato, D. M., Hiramatsu, K., Denslow, N. D., and Sullivan, C. V., 2002b: Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, **26**, 355-370.
- Koya, Y., Matsubara, T., and Nakagawa, T., 1994: Efficient artificial fertilization method based on the ovulation cycle in barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.*, **60**, 537-540.
- LaFleur, G. J. J., Byrne, B. M., Haux, C., Greenberg, R. M., and Wallace, R. A., Liver-derived cDNAs: Vitellogenins and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). In: Goetz, F. W. and Thomas, P., Eds.), Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, University of Texas, Austin, U.S.A, 1995a, pp. 336-338.
- LaFleur, G. J. J., Byrne, B. M., Kanungo, J., Nelson, L., Greenberg, R. M., and Wallace, R. A., 1995b: *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., 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.*, **73**, 815-824.
- Matsubara, T. and Sawano, K., 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.
- Matsubara, T. and Koya, Y., 1997: Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.*, **278**, 189-200.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A., 1999: Two forms 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., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V., and Hara, A., Involvement of dual-vitellogenin system in the control mechanism of egg buoyancy in barfin flounder and walleye pollock. 6th international symposium on the reproductive physiology of fish, Bergen, 2000, pp. 305.
- 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.
- McPherson, R., Greeley, M. S. J., and Wallace, R. A., 1989: The influence of yolk protein proteolysis on hydration in the oocytes of *Fundulus heteroclitus*. *Develop. Growth Differ.*, **31**, 475-483.
- 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.
- Ohkubo, N., Andoh, T., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., and Matsubara, T., 2004: Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **137**, 19-28.
- Ohkubo, N., Sawaguchi, S., Hamatsu, T., and Matsubara, T., 2006: Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish. Sci.*,

- 72, 620–630.
- Okumura, H., Todo, T., Adachi, S., and Yamauchi, K., 2002: Changes in hepatic vitellogenin mRNA levels during oocyte development in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 9–16.
- 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.
- Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., and Matsubara, T., 2006a: Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 719–736.
- Sawaguchi, S., Ohkubo, N., and Matsubara, T., 2006b: Identification of two forms of vitellogenin-derived phosvitin and elucidation of their fate and roles during oocyte maturation in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zool. Sci.*, **23**, 1021–1029.
- Selman, K., Wallace, R. A., and Cerda, J., 2001: Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly or meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Experiment. Zool.*, **290**, 265–278.
- Wallace, R. A., 1985: Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Oogenesis" (ed. Browder, L. W.), Vol.1, Plenum Press, New York, pp. 127–177.
- Wang, S. Y. and Williams, D. L., 1980: Identification, purification, and characterization of two distinct avian vitellogenins. *Biochem.*, **19**, 1557–1563.
- Wang, S. Y., Smith, D. E., and Williams, D. L., 1983: Purification of avian vitellogenin III: Comparison with vitellogenins I and II. *Biochem.*, **22**, 6206–6212.
- 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.
- Wiley, H. S. and Wallace, R. A., 1978: Three different molecular weight forms of the vitellogenin peptide from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 153–159.