

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19380106
研究課題名（和文） 多型ビテロジェニンモデルに基づく魚類卵黄形成機構の解明
研究課題名（英文） Studies of fish vitellogenesis based on the multiple vitellogenin model
研究代表者 原 彰彦（HARA AKIHIKO） 北海道大学・大学院水産科学研究院・教授
研究者番号：40091483

研究成果の概要（和文）：本研究は魚の卵黄の蓄積メカニズムを詳細に解明しようとするものである。本研究の成果として、複数の卵黄前駆物質（卵黄の由来となる血清蛋白質）を各々分離する技術や個別に検出または測定する技術を、モデル魚（ボラ）を始めに、複数の魚類において初めて開発したことは特筆される。同技術の開発に成功したことにより魚類の卵形成に関する理解が深まったことに加え、増養殖の課題である卵質の向上や女性ホルモン様化学物質汚染の調査技術の確立を行うために必要不可欠な基礎的知見と技術を提供した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to elucidate mechanisms involved in the yolk formation in fish oocytes. Results included development of novel technologies for separation and quantification of multiple subtypes of a yolk precursor (vitellogenin: Vg); such techniques were initially developed for the grey mullet, and thereafter applied for several other teleosts. Findings endow the better understandings on fish oogenesis, as well as improvement of fish egg quality in aquaculture and development of technologies for the surveys on the impacts of environmental xenoestrogenic chemicals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
20年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
21年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：比較生化学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ビテロジェニン・卵形成・卵黄タンパク質・エストロジェン・魚類・免疫測定法・

### 1. 研究開始当初の背景

魚類を含む卵生脊椎動物において、卵黄蛋白の前駆物質がエストロジェンの作用の下、母親の肝臓で合成されることが分かったのは約30年前である。本研究の代表者は国内外で初めて雌に特異的な鉄結合性蛋白を発見し、血清より分離精製を行い、ピテロジェニン (Vg) と同定した経験をもつ (A. Hara(1976): Biochim. Biophys. Acta, 427: 549-557)。その後、同代表者は魚類のVgが分子解裂し、数種の卵黄蛋白、即ちリポピテリン (Lv)、ホスピチン (Pv) 並びに $\beta'$ -コンポーネント ( $\beta'$ -c)を生ずる過程を明らかにしてきた。

近年、魚類の卵形成機構に関する基礎研究分野は、ピテロジェニンの多型性の概念に基づき新たな展開を見せている (N. Hiramatsu et al. (2005): Biochem. Mol. Biol. Fish., Vol. 6, pp. 431-471)。即ち、これまでの卵黄形成モデルは一種類のVgを想定して考えられていたが、実は多くの魚類は、一次構造並びに生理機能の異なる複数分子種のVgを有することが明らかになってきた (“多型” Vgモデル)。現在、多くの硬骨魚類では、通常3タイプのVg (VgA、VgB、VgC) が同定・分類されている。AタイプとBタイプは上述した全ての卵黄蛋白を構成成分とする。両者は抗原性が異なるが、分子性状が似ており分離することは難しい。最近新たに発見されたCタイプは、Lvのみから構成されるVgであり、他タイプとの相同性は著しく低い。この様に、各Vgタイプの構造的特性は明らかになってきたが、エストロジェン感受性や卵黄蛋白への分解過程等の生理・生化学的な特性に関する知見は非常に少ない。

一方、応用研究分野において、Vgは、これまで魚類の雌雄や卵巣発達段階を判断する指標蛋白質として利用されてきた。さらに環境毒性学分野において、魚類のVgは、化学物質のエストロジェン活性 (エストロジェン様内分泌攪乱物質: EEDC) を評価するための生体指標蛋白質として注目を集めている。しかしながら、この様な応用分野に用いられているVgの測定法は、依然としてこれまでの卵黄形成モデルに基づいて確立されている。

この様な背景を踏まえ、本研究グループは旧来の卵黄形成モデル (“単型” Vgモデル) に基づく研究技術・解析結果に疑問を持つに至った。即ち、分子タイプを無視したVgの検出・測定法、並びにそれらを用いた研究結果は、今後、本研究分野を進展する際に大きな混乱をもたらすと予想される。特に EEDC

による汚染調査等の応用研究を行う上で、異なる研究室間で得られた調査・解析結果を比較するためには、Vgの多型性を考慮すべきである。しかしながら、タイプ別Vgの精製・測定法は未だ確立されていないのが現状であり、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) 硬骨魚類の“多型”Vgを、タイプ別に測定する手法の開発を主要な目的とした。また、(2) 多型Vgの生理学的な特性を明らかにする事を目的として、多型Vgのエストロジェン誘導性並びに卵黄形成に伴う血中動態を観察すると同時に、生化学的・組織学的手法により卵黄蛋白への解裂・蓄積様式を解析した。さらに、(3) モデル魚 (ボラ) で確立された多型Vgの特異抗体・測定法を他魚種の多型Vg解析に応用することを試みると共に、(4) 異なる魚種から遺伝子クローニングしたVgの一次配列ライブラリーを構築し、魚類Vgの構造的な多様性を系統発生的な観点から解析することも目的とした。

### 3. 研究の方法

前述 (1) と (2) の目的には実験モデルとして主にボラを用い、(3) では、イトヨ・マコガレイ・メナダ・サンマ等の魚種を用いた。さらに前述 (4) の目的では、上記イトヨ・メナダに加え、トラザメ・ヌタウナギを対象に実験を行った。以下に各目的別に手法を記す。

#### <ボラを用いた多型Vgモデルの構築: 検出・測定系の確立および分子解裂機構の解明>

**Vg 遺伝子のクローニング:** エストロジェン処理を行ったボラの肝臓から cDNA ライブラリーを作製し、3型の完全長Vg (VgA、VgB、VgC) の cDNA を単離した。

**卵黄蛋白の精製:** ボラの卵巣は成熟雌魚から採取した。卵巣から得た卵抽出液を水沈殿法および硫酸塩析により分画した後、ハイドロキシルアパタイト、陰イオン交換、抗体をリガンドとしたアフィニティーおよびゲル濾過の各カラムを用いて7種の卵黄蛋白質

(YP1~YP7) を精製した。精製蛋白はN末端アミノ酸配列を解析し、先に得られたVg遺伝子の配列との相同性を確認した。また、精製蛋白を抗原として抗体を作製した。

**Vgの精製:** E2処理魚血清は、5mg/kg魚体重のE2を2回投与した個体から採取し、精製に用いた。精製に際してLvA、LvB、LvC

に対する抗体を用いて同血清中の Vg を検出した。3 型 Vg は、陰イオン交換、ハイドロキシルアパタイト、抗体をリガンドとしたアフィニティーおよびゲル濾過の各カラムを用いて精製し、N 末端アミノ酸配列を解析した。また、得られた VgA、VgB を抗原として抗体を作製した。

**3 型 Vg の分解様式**：雌魚にヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモンおよび生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログを投与して排卵卵を得た。卵巣卵と排卵卵それぞれの抽出液を作製し、ゲル濾過や電気泳動、免疫生化学的手法等により分子量の変化を解析した。

**各 Vg に対する化学発光免疫測定法 (CLIA) の確立**：各 Lv および Vg に対する抗体と精製 Vg を用いて CLIA を確立した。VgA CLIA では、固相化抗体に LvA 抗体、標識抗体に VgA 抗体を用いた。VgB CLIA では、固相に LvB 抗体、標識に VgB 抗体を用い、VgC CLIA では固相・標識ともに LvC 抗体を用いた。反応は 96 穴プレートを用いて、(1) 抗体の固相、(2) ブロッキング、(3) 固相化抗体と標準蛋白もしくはサンプルの反応、(4) 標準蛋白もしくはサンプルと標識抗体との反応、(5) 発光量の測定の順に行い、標準蛋白の検量線からサンプル中の各 Vg 濃度を算出した。また、反応時間は、固相化抗体とサンプル、サンプルと標識抗体ともに 2 時間とした。

**EE2 処理**：長崎県手熊川で捕獲した未成熟のボラ ( $5.3 \pm 0.3$  g,  $76.8 \pm 1.2$  mm) を用いた。EE2 が 0.4、40、4000 ng/g 魚体重となるようにエサに混ぜ、毎日、魚体重の 4% を与えた。処理から 1 週間後に採血し、血清を得た。血清中の各 Vg 量は、確立した CLIA および一元免疫拡散法 (SRID) を用いて測定した。

#### <ボラ以外の魚種における多型 Vg モデルの構築>

**他魚種における多型 Vg および関連する卵黄蛋白の検出**：ボラで作製した特異抗体を用いて、イトヨ、メナダ、サンマ、マコガレイの多型 Vg もしくはこれらに関連する卵黄蛋白を検索した。一方、トラザメ・ヌタウナギに関しては、ボラで用いた手法を応用し、これら魚種自身の血清や卵黄から作製した抗体を用いて、雌特異蛋白の検索を行った。

**他魚種における多型 Vg の精製および特異抗体の作製、並びに測定系の確立**：上記に検出された多型 Vg を、ボラにおいて使用した手法を応用して各魚種から精製し、各々について定性と同定を行うと共に、精製品を抗原とした特異抗体の作製や測定系 (Mancini または CLIA、並びに real-time PCR 等) の確立を行った。イトヨについては、体サイズが小さく精製用の試料を得ることが難しいモデル魚として、上記のような生化学的手法に加え、

各 Vg サブタイプの断片を cDNA クローニングにより得、同断片について、大腸菌を用いて組み換え蛋白を作製することにより抗原の調整を行った。

**多様な魚類 Vg の cDNA クローニング**：様々な魚種において、Vg の cDNA クローニングを試みた。イトヨはボラと同様な手法により、トラザメとヌタウナギは、精製 Vg または卵黄蛋白の N 末端あるいはペプチド断片アミノ酸配列を決定した後、これら情報を利用した PCR と RACE 法により、メナダはボラの配列を参考に PCR により、それぞれ多型 Vg をコードする cDNA のクローニングを試みた。

#### 4. 研究成果

##### <ボラを用いた多型 Vg モデルの構築・測定系の確立および分子解裂機構の解明>

**3 型 Vg 遺伝子のクローニング**：得られた 3 種のクローンは、他魚種における既知の Vg 推定アミノ酸配列との相同性から VgA、VgB および VgC に分類した。3 型 Vg のアミノ酸配列の相同性は、ボラとマダイ間で最も高かった (77-80%)。VgA および VgB の翻訳域はともにアミノ酸 1699 残基、VgC はアミノ酸 1272 残基から構成され、翻訳後の VgC は VgA・VgB より低分子であると予想された。

**卵黄蛋白の精製**：精製 YP1、YP2 および YP3 は脂質蛋白であり、分子量と N 末端の部分アミノ酸配列の相同性から、それぞれ VgA、VgB および VgC に由来した LvA、LvB および LvC と同定した。YP4 は LvA と同じ抗原性であったが、分子量が大きく、内部ペプチドのアミノ酸配列が VgA の Pv ドメインと一致したため、LvA と PvA の複合体であると考えられた。YP5 および YP6 は分子量や抗原性から、ボラの  $\beta^1$ -c であることが明らかになった。YP7 はリン蛋白であり、N 末端アミノ酸配列の相同性から、VgB に由来した PvB であることが示された。

**Vg の精製**：LvA、LvB および LvC 抗体に反応した雌特異血清蛋白をそれぞれ VgA、VgB および VgC とした。精製 Vg の分子量はゲル濾過では 570 kDa (VgA)、580 kDa (VgB)、335 kDa (VgC) であり、SDS-PAGE では 165 kDa (VgA)、160 kDa (VgB)、118 kDa (VgC) であった。VgA および VgB は糖、脂質、リン染色されたが、VgC はリン染色されなかった。一方、これら 3 つの Vg はそれぞれ異なる抗原性を持つことが示された。また、先に精製した YP5 は VgB 抗体のみ、YP6 は VgA 抗体および VgB 抗体に反応したため、YP5 は VgB 由来の  $\beta^1$ -cB、YP6 は  $\beta^1$ -cA と  $\beta^1$ -cB の混合画分であると考えられた。

**3 型 Vg の分解様式**：排卵卵において、LvA はその多くが遊離アミノ酸まで分解されていたのに対し、LvB は分子量約 150 kDa の

高分子ペプチドとして蓄積されていた。LvCは排卵前後で分子量にほぼ変化は見られなかった。同様に $\beta^{\prime}$ -cAおよび $\beta^{\prime}$ -cBは排卵後にペプチド分子として残存したが、Pvは遊離アミノ酸へ分解されると考えられた。これらと精製の結果から、VgAは卵母細胞に取り込まれた後、LvA-PvA複合体、LvA、PvAおよび $\beta^{\prime}$ -cAに分子解裂し、最終成熟時にはほとんどが遊離のアミノ酸に分解されること、VgBは卵母細胞でLvB、PvBおよび $\beta^{\prime}$ -cBに分子解裂し、排卵後LvBが低分子になること、一方、VgCは卵母細胞中でほとんど変化しないことが明らかになった。以上の多型Vgに由来した卵黄蛋白質の分解様式は、浮遊性卵に共通すると予想された。

**3型Vgに対するCLIAの確立：**確立した各測定系の測定範囲は、VgAおよびVgBの測定系では0.97~1000 ng/ml、VgCの測定系では0.48~1000 ng/mlであった。各CLIAは、それぞれのVgに対してのみ特異的に反応し、雌血清の希釈系列と平行性を示した。また、アッセイ内・間変動係数は10%以下、回収率は100%前後であった。これらのことから、確立した3型Vgに対する測定系は、高感度、広範囲かつ精度の高い測定系であることが示された。以上、魚類で初めて3型のVgサブタイプに特異的な免疫測定系が確立された。さらに、サクラマス、カッスロウトトラウト、メダカ、イトヨ、サンマ、マグロおよびメナダの血清を用いてこれらの測定系の免疫交叉性を観察した。ボラ科魚類であるメナダでは3型Vgすべて、メダカではVgBのみで交叉性が確認されたが、血中の各Vgを測定するためにはそれぞれの標準蛋白が必要であることが示された。

**EE2処理魚の血中Vg量：**コントロール群および0.4 ng群では、すべてのVgは測定限界以下であった。40 ng群では、VgAが $36.15 \pm 9.12 \mu\text{g/ml}$ 、VgBが $126.11 \pm 46.99 \mu\text{g/ml}$ 、VgCが $610.30 \pm 150.18 \mu\text{g/ml}$ であり、VgC量が最も高く、VgAが最も低い値を示した。一方、4000 ng群では、VgAが $3.07 \pm 0.57 \text{ mg/ml}$ 、VgBが $33.25 \pm 13.58 \text{ mg/ml}$ 、VgCが $11.14 \pm 1.33 \text{ mg/ml}$ であり、VgB量が最も多かった。以上の結果から、EE2によりボラの3型Vgが誘導されること、また、EE2の濃度によってVgBとVgCの誘導量が逆転することが示された。

#### <ボラ以外の魚種における多型Vgモデルの構築>

**多型Vg遺伝子のクローニング：**イトヨにおいては3タイプのVgが全て完全長でクローニングされ、ボラにおける解析結果と同様に、VgA、VgB、VgCに分類された。一方、メナダではボラの3型Vgに相同性の高いcDNA断

片がそれぞれクローニングされた。また、ヌタウナギでは2種の完全長Vgがクローニングされたが、ボラ類やイトヨの3型Vgのカテゴリーには分類されず、ヤツメウナギのVg配列と最も近い相同性を示した。さらにトラザメのVgをコードするcDNAが部分的に単離され、サメ類で初めてVgの一次構造に関する知見を得た。以上の知見から、魚類のVgは、原始的な魚種においても多型性を示す例はあるものの、構造的に3型のVg (VgA, VgB, VgC)へ分化した時期は、魚類の系統進化において比較的後期であることが明らかとなった。

**多型Vgまたは由来する卵黄蛋白の検出・精製および定量法の確立：**メナダにおいてボラの抗体を用いて3型Vgを検出した結果、VgBが最も主要なVgサブタイプであることを確認した。そこでメナダのVgBを精製し、CLIAおよびSRIDを確立した。また、メナダVgBの部分配列を参考に同種VgBのリアルタイム定量PCR法を確立した。

サンマでは、卵巣抽出液中に3種のLvを検出し、LvAB (LvAおよびLvBの混合画分)を得た。一方、マコガレイでは、血中の3型Vgおよび卵巣抽出液中の3型Lvを検出し、卵巣からLvA、LvB、LvCを精製した。また、以前に当研究室にて開発されていた同種のVg測定系は、VgB特異的な測定系であることを明らかにした。

イトヨにおいては、ボラおよびカダヤシのVgCに対する抗体を用い、血中にVgCおよび卵巣抽出液中にLvCを検出した。またボラと同様に各種クロマトグラフィーを用いて卵巣抽出液からLvCを精製し、これを抗原として本種のVgCを特異的に検出する抗体を作製した。また、本種のVgAおよびVgBの配列のうち、C末端側の一部を標的とした組み換え蛋白を作製した。このうち後者の組み換え蛋白のみが以前作製したイトヨ完全型Vgに対する抗体と反応したことより、この抗体はVgBに特異的であることが明らかとなった。また、各組み換え蛋白を抗原とし抗体を作製した結果、各々の抗体は、相対する抗原による吸収操作を施すことによって、各々の標的抗原に特異的に反応した。これにより、暴露試験等で良く用いられるイトヨの多型Vgに対しても、サブタイプ特異的な高感度測定系を確立する準備ができた。

以上、本研究により、目的であった複数のVgサブタイプを各々分離する技術や個別に検出または測定する技術をモデル魚であるボラで確立した。また、同技術・ツールを用いて、多型Vgの合成や蓄積の制御、さらに蓄積後の分子解裂機構を詳細に解析した。これを足掛かりとして、他の様々な魚種において同様の技術を供給し、多型Vgモデルをベ

ースとする卵形成機構が、種毎の多様性を維持しながらも魚類全般に存在することを明らかにしたことは、本研究の大きな成果として特筆される。これらの成果により、魚類の卵形成に関する理解がさらに深まり、特に多型 Vg の合成・蓄積・分解過程が、魚類の卵質を左右する可能性を強く示唆する新規な理論を導き出し、卵質判定あるいはその向上に役立つ基礎的知見を提供した。さらに魚類の Vg の多型性を考慮した結果、測定対象の Vg サブタイプが特定され、これまでよりも正確な環境評価法の構築が可能となった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線。特記した以外は全て査読あり。)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Shimizu M, Sawaguchi S, Matsubara T, Kagawa H, Nagae M, Sullivan CV, Hara A. (2007) Egg yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): purification and classification of multiple lipovitellins and other vitellogenin-derived yolk proteins and molecular cloning of the parent vitellogenin genes. *J Exp Zool* 307A: 324-341.
2. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Sawaguchi S, Matsubara T, Sullivan CV, Hara A. (2007) Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar Biol* 152: 1215-1225.
3. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Kagawa H, Matsubara T, Sullivan CV, Hara A. (2008) Multiple vitellogenin-derived yolk proteins in gray mullet (*Mugil cephalus*): disparate proteolytic patterns associated with ovarian follicle maturation. *Mol Reprod Develop* 75: 1307-1317.
4. Amano H, Kitamura M, Fujita T, Hiramatsu N, Todo T, Suyama S, Hara A. (2008) Purification and characterization of lipovitellin from Pacific saury *Cololabis saira*. *Fish Sci* 74: 830-836.
5. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Kagawa H, Sawaguchi S, Matsubara T, Sullivan CV and Hara A. (2008) Molecular alteration of three forms of vitellogenins and their product yolk proteins during oocyte growth and maturation in grey mullet (*Mugil cephalus*). *CYBIUM Int J Ichthyol* 32 (2) Suppl: 156-158.
6. Hiramatsu N, Inoue M, Ideuchi H, Fujita T, Amano H, Matsubara T, Sullivan CV and Hara A. (2008)

Differential production and uptake of dual vitellogenins in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *CYBIUM Int J Ichthyol* 32 (2) Suppl: 260.

7. Hong L, Fujita T, Wada T, Amano H, Hiramatsu N, Zhang X, Todo T, Hara A. (2009) Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity. *Comp Biochem Physiol* 149C: 9-17.
8. Amano H, Kitamura M, Fujita T, Hiramatsu N, Todo T, Hara A. (2009) Purification and classification of three lipovitellin subtypes in the marbled sole (*Pleuronectes yokohamae*). *Zool Sci* 26: 510-516.
9. Hiramatsu N, Luo W, Hong L, Soyano K, Aoki J, Amano H, Fujita T, Todo T, Matsubara T, Hara A. (2010) Development of evaluation systems for the detection of estrogenic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in aquatic environments using estrogen-inducible biomarkers. *Natl. Taiwan Mus. Spec. Pub.* 14: 61-69. (査読なし)

[学会発表] (計 15 件)

1. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Matsubara T, Sullivan CV, Hara A. Purification and classification of egg yolk proteins derived from multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, June 3-8, 2007, Saint-Malo, France.
2. Hiramatsu N, Inoue M, Ideuchi H, Fujita T, Amano H, Matsubara T, Sullivan CV, Hara A. Differential production and uptake of dual vitellogenins in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, June 3-8, 2007, Saint-Malo, France.
3. 洪 磊・和田竜典・藤田敏明・天野春菜・平松尚志・原 彰彦 (2007) Development of immunoassays for choriogenin and vitellogenin in red lip mullet, *Chelon haematocheilus*. 平成 19 年度日本水産学会秋期大会, 北海道大学水産学部, 9 月 25-28 日.
4. Amano H, Fujita T, Hiramatsu N, Matsubara T, Sullivan CV, Hara A. Multiple vitellogenins and their derived yolk proteins in grey mullet (*Mugil cephalus*): differential proteolytic patterns during oocyte growth and

- maturation. 4th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals, p.11, November 6-7, 2007, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.
5. Kunihiro Y, Amano H, Fujita T, Inagawa H, Hiramatsu N, Todo T, Hara A. Purification of vitellogenin and lipovitellin-like yolk protein in hagfish (*Eptatretus burgeri*). 4th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals, p.18, November 6-7, 2007, Nagasaki University, Nagasaki, Japan.
  6. Hiramatsu N, Todo T, Ito T, Massaki K, Kasahara A, Amano H, Reading BJ, Matsubara T, Sawaguchi S, Sullivan CV and Hara A. Yolk assembly in teleost: recent findings on the deposition of ovarian lipids and proteins. World Aquaculture, May 19-23, 2008, Busan, Korea.
  7. Kunihiro Y, Hiramatsu N, Fujita T, Amano H, Inagawa H, Todo T, Hara A. Molecular characterization of hagfish vitellogenin. 5th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, September 10-11, 2008, Jeju National University, Jeju, Korea.
  8. Takahashi M, Hiramatsu N, Fujita T, Amano H, Sawaguchi S, Matsubara T, Todo T, Hara A. Preparation of recombinant antigens encoding a C-terminal peptide of complete vitellogenin subtypes in three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. 5th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, September 10-11, 2008, Jeju National University, Jeju, Korea.
  9. Amano H, Kotake A, Fujita T, Hiramatsu N, Todo T, Soyano K, Hara A. Development of subtype-specific chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in grey mullet. The 7th International Symposium of the 21st COE programs "Innovative Marine Life Science for three Es, Edibles, Environment and Education, in 21st Century", November 17-19, 2008, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
  10. 國弘康之・天野春菜・藤田敏明・稲川裕之・平松尚志・東藤孝・原彰彦 (2008) ヌタウナギのビテロジェニンならびにその関連卵黄蛋白の検索および精製. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 東海大学海洋学部, 静岡市, 3月 27-31 日.
  11. 高橋美咲・天野春菜・藤田敏明・平松尚志・東藤孝・松原孝博・原彰彦 (2008) イトヨの多型ビテロジェニンの精製. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 東海大学海洋学部, 静岡市, 3月 27-31 日.
  12. Wu M, Aoki J, Hiramatsu N, Hara A, Soyano K, Zhong J. Estrogenic activities of coastal aquatic environments in China: evaluation using a model species, the red lip mullet (*Chelon haematocheilus*). 6th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, September 24-27, 2009, Nagasaki, Japan.
  13. 天野春菜・藤田敏明・平松尚志・東藤孝・原彰彦 (2009) マコガレイの卵黄蛋白リポビテリンの検索と精製. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京海洋大学品川キャンパス, 3月 27-31 日.
  14. 西宮攻・國広康之・天野春菜・藤田敏明・稲川裕之・平松尚志・東藤孝・原彰彦 (2010) ヌタウナギの 2 型ビテロジェニン遺伝子のプロモーター領域解析. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 日本大学藤沢校, 藤沢, 3月 26-30 日.
  15. ラ ブンジュウ, ゴ メイチン, ホンレイ, 平松尚志, 藤田敏明, 天野春菜, 東藤孝, 原彰彦, (2010). メナダを用いた水圏エストロジェン活性検出法の確立. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 日本大学藤沢校, 藤沢, 3月 26-30 日.
- [図書] (計 0 件)  
 [産業財産権]  
 出願状況 (計 0 件)  
 取得状況 (計 0 件)
- [その他]  
 ホームページ等  
<http://www.geocities.jp/hlaboratory/index.html>
6. 研究組織
    - (1) 研究代表者  
 原 彰彦 (HARA AKIHIKO)  
 北海道大学・大学院水産科学研究院・教授  
 研究者番号：40091483
    - (2) 研究分担者  
 松原 孝博 (MATSUBARA TAKAHIRO)  
 独立行政法人水産総合研究センター・海区水産業研究部・室長  
 研究者番号：60443389  
 (H19→H20:連携研究者)
- 征矢野 清 (SOYANO KIYOSHI)  
 長崎大学・東シナ海海洋環境資源研究センター・教授  
 研究者番号：80260735

(H19→H20:連携研究者)

東藤 孝 (TODO TAKASHI)  
北海道大学・  
大学院水産科学研究所・准教授  
研究者番号：60303111  
(H19→H20:連携研究者)

平松 尚志 (HIRAMATSU NAOSHI)  
北海道大学・大学院水産科学研究所・助教  
研究者番号：10443920  
(H19→H20:連携研究者)

(3)連携研究者（上記参照）