

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780143
 研究課題名（和文）魚類多型ビテロジェニン及び超低密度リポ蛋白質の受容体結合特性に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on the specific binding of vitellogenin and very-low-density lipoprotein to ovarian lipoprotein receptor (s) in teleosts.
 研究代表者
 平松 尚志 (HIRAMATSU NAOSHI)
 北海道大学・大学院水産科学研究院・助教
 研究者番号：10443920

研究成果の概要：

本研究は、魚卵中の卵黄についての研究であり、特に卵黄の素となる血液中の前駆体（ビテロジェニンと超低密度リポ蛋白質）が、どの様に卵へ取り込まれるかを調べた。スズキ類とボラ類の魚を使いこれらの蛋白質や遺伝子を解析した結果、まずビテロジェニンには3種類のサブタイプがあることが明らかとなった。また各種ビテロジェニンと超低密度リポ蛋白質は、それぞれ異なる受容体と結合してから卵の中に取り込まれる可能性が初めて示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：農学

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、受容体、リポ蛋白、卵形成、魚類

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初の学術的背景を以下に述べる。

卵生脊椎動物の卵成長は、血液中に循環する蛋白質・脂質等を卵母細胞内に取り込むことにより急速に進行する。取り込まれた物質は、卵黄球や油球として蓄積し、受精後の発生過程において生体の形成・維持の材料として消費される。一般に卵黄球の主成分は、ビテロジェニン (Vg) と呼ばれる血清蛋白質に由来する。サケ科魚類では、卵構成成分(乾燥

重量)の約 80 %以上は、Vg由来であると報告されている。一方、サケ科魚類と異なり、多くの硬骨魚類の卵成長は、卵黄球の蓄積 (Vg由来) ばかりでなく油球の蓄積にも依存する。例えば、スズキ科魚類では卵体積の 50 %近くを油球が占める。油球の主成分はトリグリセリドやワックスエステル等の中性脂質であり、従って卵中の油球はこれら中性脂質を主要成分とする血清超低密度リポ蛋白質 (VLDL) に由来すると考えられているものの、この油球形成過程は直接的には証明されていない。

最近の研究において、申請者はスズキ科魚類のホワイトパーチ (*Morone americana*) から 3 タイプの Vg (VgA、VgB 及び VgC) を精製し、各 Vg の構造的特性に基づいた分類法を提唱した。また、Vg の“多型”性は、硬骨魚類に全般的な現象であることを確認した。さらに各タイプの Vg は、卵の浸透圧や浮遊性の調整ならびに受精後の胚体形成の栄養素として異なる生理機能を持つことを明らかとした。申請者は、以上の概念を魚類の“多型”ビテロジェニンモデルとして提唱している (Hiramatsu et al. [2005], Biochem. Mol. Biol. Fish.)。

Vg の卵母細胞内への取り込みは、卵原形質膜上にある受容体 (Vg受容体) を介したエンドサイトーシスにより起こる。最近、申請者はパーチ Vg 分子中の受容体に結合する領域 (受容体結合領域: VRBP) を一部同定した (Hiramatsu et al. [2002], Biol. Reprod.)。同様の受容体結合領域は、ティラピア (*Oreochromis mossambicus*) の Vg 分子においても特定されている (Li et al. [2003], J. Biol. Chem.)。一方、鳥類において Vg と VLDL は共通の受容体 (Vg/VLDL 受容体) に結合し、卵内に取り込まれるとの報告がある。従って魚類でも同様な機構が存在すると仮定されるが、現在まで統一した見解は得られていない。さらに、魚類 Vg の“多型”性は全く新しい概念であるため、3 タイプの Vg が 1 種の受容体を共有するか否かに関しては、これまで解析例が無い。

以上、多くの硬骨魚類の卵成長は、3 タイプの Vg 並びに VLDL を由来とする油球並びに卵黄球の蓄積に大きく依存すると考えられる。母親由来の血清蛋白質・脂質を卵内にバランス良く取り込み・蓄積することは、良質な卵を得るために必要不可欠な過程であり、その機構を解明することは将来魚類の卵質改善等に寄与すると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、魚類の卵黄球並びに油球形成に関して、その起源となる血液中の前駆蛋白質 (ビテロジェニン並びに超低密度リポ蛋白質) の、卵母細胞への取り込み機構を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、具体的には以下の 3 点について重点的な解析を行った。

- (1) 3 タイプの Vg 並びに VLDL をリガンドとし、粗受容体画分との結合特性を解析することにより、各リガンド蛋白質に

おける受容体の共通性又は相違性を明らかにする。

- (2) B タイプ Vg (VgB) の受容体結合領域をクローニングし、本領域に対する組換え蛋白質を作製後、受容体結合試験に供し、VgB の受容体結合領域を同定する。
- (3) 精製した上記組換え蛋白質に対する特異抗体を作製し、この抗体を用いて免疫化学的に受容体結合領域の保存性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Vg および VLDL の受容体結合特性

① Vg および VLDL の精製:

申請者が先にホワイトパーチで報告した方法 (Hiramatsu et al. [2002], Fish Physiol. Biochem.) を必要に応じて変更し、3 タイプの Vg を、エストロゲン処理したパーチ並びにボラ (*Mugil cephalus*) の血清から精製した。VLDL の精製は、同報告中に記載されている手法に準じた。また、Vg ならびに由来する卵黄蛋白質の SDS-PAGE やウェスタンブロットによる生化学的解析、cDNA クローニングと配列解析、卵成長や卵成熟に伴う分子変化の解析等を行い、これら Vg 蛋白質のサブタイプを同定した (手法の詳細は 5. 主な発表論文等、[雑誌論文]①~④に掲載)。サブタイプの同定された Vg (VgA, VgB, VgC) と VLDL を以下の結合実験に用いた。

② Vg および VLDL の受容体結合試験:

受容体結合試験 (受容体結合アッセイ及びリガンドブロット) は、申請者が先に報告した方法 (Hiramatsu et al. [2002], Biol. Reprod.) に従って行った。卵原形質膜はパーチの卵巣より調整し、可溶化後に粗受容体画分として実験に供した。精製した各タイプの Vg 及び VLDL は、トレーサーとしてジゴキシゲニン (DIG) を用いて標識した。各々の標識トレーサーに、過剰量の各未標識 Vg 及び VLDL を様々なコンビネーションで加えることにより、これらリガンドの受容体結合置換実験を行った。

- (2) VgB 受容体結合領域の同定

① 受容体結合領域のクローニング:

受容体結合領域のクローニングは、ティラピアで同定された本領域を標的として、上記

(1) に単離されたパーチ VgB の cDNA を鋳型とし、通常の PCR 法と TA クローニング法により行った。

② 受容体結合領域をコードする組換え蛋白質の作製：

クローニングされたパーチの受容体結合領域を、発現蛋白にS-tagの付加ができる蛋白質発現ベクターに組み込み、プロトコールに従い本領域をコードする蛋白質（受容体結合ペプチド）を発現した。発現した受容体結合ペプチドは、緩衝液の透析置換による巻き戻しを行った後、イオン交換クロマトグラフィー（POROS50）やゲル濾過（Superdex 75）を用いて精製した。

③ 組換え受容体結合ペプチドの結合試験：

精製した組換え蛋白質及び精製 Vgを用い、上記(1)と同様の受容体結合試験を行った。

(3) 受容体結合領域の種保存性

① 組換え受容体結合ペプチドに対する特異抗体の作製：

精製受容体結合ペプチドを家兔に免疫し、抗体を作製した。系統の異なる様々な魚種、即ち高等硬骨魚類群では、ストライプトバスを初めとする4種、比較的原始的な魚類群では、ニジマス等の6種、さらに原始的な魚類群では、チョウザメ等3種を選び、また、両生類としてゼノパスを選択し、エストロゲン処理後に血清試料を得た。作製した組換え受容体結合ペプチドに対する抗体を用い、エストロゲンにより各魚種の血清中に誘導された Vg との免疫交叉性をウェスタンブロットにて確認した。

4. 研究成果

(1) Vg および VLDL の受容体結合特性

実験対象種の血清より、3つの Vg サブタイプおよび VLDL を各種クロマトグラフィーおよび超遠心法を用いて精製し、分子量やN末端配列等の生化学的性状を解析した。また、ボラの卵黄蛋白質（リポビテリン：Lv、フォスピチン：Pv、β'コンポーネント：β'-c）を精製し同様の生化学的解析を行う一方、各々の Vg サブタイプとの関連性や卵成熟に伴う分解様式を明らかにした。これらの成果を図1にまとめた。さらに、ボラとパーチにおいて、3つの Vg サブタイプをコードする完全長 cDNA を単離し配列を決定した結果、他

の硬骨魚類の VgA, VgB および VgC と各々クラスターを形成した（図2）。以上により、パーチとボラでも3種の Vg が構造的・機能的に同定された。新たに得られた成果は、査読付き論文として国際誌4編（雑誌論文成果①～④）にまとめると共に、学会・研究会等（学会発表成果①～⑥）で発表した。

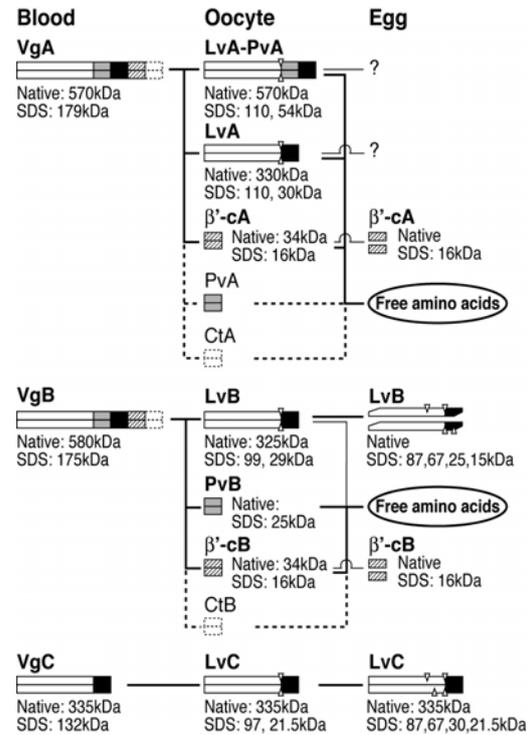


図1 ボラの多型Vgならびに関連卵黄蛋白の生化学的性状、サブタイプの同定、および卵成長・卵成熟に伴う分子解裂過程に関する模式図。

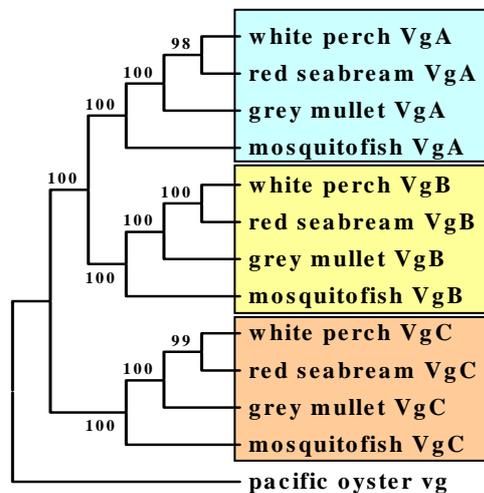


図2 ボラ(grey mullet)およびパーチ(white perch)の3型Vgならびに他魚種(red seabream: マダイ、*Pagrus major*; Mosquitofish: カダヤシ、*Gambusia affinis*)およびカキのVg配列を使用し作製したデンドログラム。各配列のGenbank Accession ナンバー (VgA; VgB; VgC の順) は、ボラ (AB288932; AB288933; AB288934)、パーチ (DQ020120; DQ020121; DQ020122)、マダイ (AB181838; AB181839; AB181840)、カダヤシ (AB181835; AB181836; AB181837)、カキ (AB084743)。

このようにして、サブタイプの同定されたVgを受容体結合試験に供した。この際、ボラのVgの調整は非常に煩雑な精製過程を必要としたため、結合実験は調整の比較的容易なパーチの試料を使用することとした。DIG標識した精製VLDLの卵巣細胞膜画分への結合を未標識のVLDLで置換した場合、50%の置換率を得るためには約2倍モル等量の未標識VLDLが必要であったが、未標識Vg(VgAとVgBの混合画分)では同様の置換率を得るためには約16,000倍モル等量の添加が必要であった(図3)。

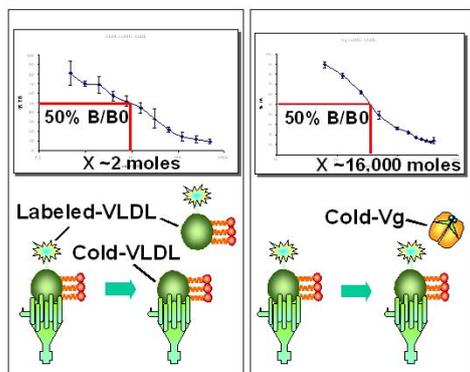


図3 VLDLおよびVgの卵巣細胞膜画分への結合試験。標識VLDLの結合を、未標識VLDL(左図)または未標識Vg(右図)を過剰量加えることにより置換した。

この結果により、パーチの卵巣細胞膜にVLDLと強い親和性を持つ受容体(VLDL特異受容体)の存在が示唆された。逆に標識Vgの結合を未標識VLDLで置換した場合、殆ど置換が確認されないことより、上述したVLDL特異受容体については、これまでに多くの知見が得られている典型的なVg受容体とは異なるものである可能性が示唆された。一方、一

般にリポ蛋白受容体分子中には、リガンド結合部位の繰り返し配列が含まれ、ティラピアでは繰り返し配列の1~3までがVgと結合することが明らかになっている(Li et al. [2003], J. Biol. Chem.)。従って、Vg受容体におけるVLDLの結合とVgの結合に係る繰り返し配列部位が異なるため、このような結果が得られた可能性も考えられた。

さらにサブタイプ別に精製されたパーチVgA, VgBおよびVgCを結合試験に供し、各々の結合性状を観察した。この際、VgAとVgBの混合画分(total Vg)を標識し、未標識の各精製Vgを添加することで置換した。その結果、VgAとVgB添加による標識total Vgの置換率は各々50%以内であり、一方VgCは全く置換しなかった。また、VgCを標識し卵巣細胞膜画分への結合を観察したが、これについても結合が確認されなかった。さらに各精製Vgサブタイプを標識し、卵巣細胞膜画分を試料としたリガンドブロッキングに供した結果、100 kDa付近にVgBと結合する2本のバンド、200 kDa以上にVgAと強く結合する一本のバンドが確認された。これらの結果により、パーチ卵巣にはVgAとVgBのそれぞれに特異的な受容体が存在することが強く示唆された。以上に記述した成果は学会・研究会等(学会発表成果①②③⑥)で発表した。

(2) VgB受容体結合領域の同定

組み換え受容体結合ペプチド(rVRBP)を大腸菌発現系にて発現した結果、封入体画分に殆どの標的蛋白が発現された。封入体を可溶化後、緩衝液の透析置換を2日間かけてゆっくり行うことにより還元剤を除去し、発現蛋白の巻き戻しを行った。これを2種のカラム(POROS 50とSuperdex 75)に供し精製を試みた結果、最終ステップのゲル濾過において一本の主要なピークが観察され、またこのピーク部をSDS-PAGEにて解析した結果、rVRBPは予想された位置(約30 kDa)に一本のバンドとして確認された。また、この精製蛋白はウェスタンブロットにおいてS蛋白に認識されることからS-tagを有していること、さらに抗パーチVg血清と反応することからVgと抗原性を共通することが明らかにされた。これらの結果は、作製標的とした蛋白が高度に精製されたことを示している。

この精製rVRBPを上記同様の受容体結合試験やリガンドプロットに供した。予想に反して、標識rVRBPの卵巣細胞膜画分への結合性が確認できず、また未標識rVRBPは標識VRBP

を置換できなかった。このことは、大腸菌発現系を用いたことにより、結合に必要な適切な修飾がなされていなかった可能性が原因の一つとして考えられる。また、リフォールディングの条件が適切でなく、機能的な構造を形成していない可能性も考えられる。酵母を用いた two hybrid アッセイでは、同受容体結合領域の in vitro での結合性が確認されているため (Li et al. [2003], J. Biol. Chem.), 機能的な VRBP を作製するためには、真核生物またはそれ由来の細胞等を用いた組み換え蛋白発現系の試行や巻き戻し条件の検討を詳細に行う必要があると考えられる。

(3) 受容体結合領域の種保存性

受容体結合領域に対する抗体 (抗 rVRBP 血清) を作製し、上述した様々な魚類または両生類のエストロジェン処理血清を試料としたウェスタンブロッティングに供した結果、14 種全ての動物種血清にビテロジェニンと推定される高分子バンド (約 200 kDa 前後) を認識した。このことより、Vg 分子中の受容体結合領域は魚類のみならず、卵生脊椎動物全般に渡り高度に保存されていることが示唆された。受容体結合領域の機能的保存性は、これまでパーチの標識 Vg を様々な魚類の精製 Vg で置換した受容体結合試験 (Hiramatsu et al. [2002], Biol. Reprod.) において確認されており、本研究の結果は同仮説を抗原性の相似、即ち構造的相似性の観点から追認した。

魚類の Vg は、これまで増養殖対象種の性判別や成熟度判定の指標として、さらに近年ではエストロジェン様環境ホルモン汚染評価に用いる指標蛋白として注目されている。本研究で作製した抗体は Vg を検出する際に動物種を選ばないユニバーサルな抗体として活用できる可能性がある。このような性質を持つ抗体はこれまで作製された例は無く、様々な対象種の Vg を同定・精製・定性し、さらに定量的な解析を可能にする有効なツールとして、特に増養殖分野ならびに環境毒性学分野の進展に大きく寄与すると考えられた。

参考文献:

1. Hiramatsu et al. 2002. Vitellogenin derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: purification, characterization, and vitellogenin receptor binding. Biol. Reprod.

67:655-667.

2. Hiramatsu et al. 2005. Vitellogenesis and endocrine disruption. In: Mommsen TP, Moon TW (eds) Biochemistry and Molecular biology of fishes, vol 6. Elsevier, Amsterdam, 562pp 431-471.
3. Li et al. 2003. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtgR) and vitellogenin (Vtg), implications on low density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. J. Biol. Chem. 278: 2799-2806.

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Kagawa Hirohiko, Matsubara Takahiro, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. Multiple vitellogenin derived yolk proteins in grey mullet (*Mugil cephalus*): disparate proteolytic patterns associated with ovarian follicle maturation. Mol. Reprod. Dev. 75(8): 1307-1317 (2008), 査読有り.
- ②Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Kagawa Hirohiko, Sawaguchi Sayumi, Matsubara Takahiro, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. Molecular alteration of three forms of vitellogenins and their product yolk proteins during oocyte growth and maturation in grey mullet (*Mugil cephalus*). Cybium, 32(2) suppl.: 156-158 (2008), 査読有り.
- ③Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Shimizu Munetaka, Sawaguchi Sayumi, Matsubara Takahiro, Kagawa Hirohiko, Nagaie Masaki, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. 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. Exp. Zool. 307A: 324-341 (2007), 査読有り.
- ④Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Sawaguchi Sayumi, Matsubara

Takahiro, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). Mar. Biol. 152:1215-1225 (2007), 査読有り.

〔学会発表〕(計6件)

- ①Reading J. Benjamin, Hiramatsu Naoshi, Sullivan V. Craig. Oogenesis in temperate basses (Genus *Morone*): Multiple yolk precursors (vitellogenins) and their receptors. 21st COE Program Special Lecture, 2009年1月27日, Hakodate, Hokkaido.
- ②平松尚志、魚類のリポ蛋白と受容体に関する研究、北海道海洋生物科学研究会シンポジウム、2008年11月7日、函館、北海道。
- ③Hiramatsu Naoshi, Todo Takashi, Ito Takahiro, Massaki Kiyohiro, Kasahara Ayumi, Amano Haruna, Reading J. Benjamin, Matsubara Takahiro, Sawaguchi Sayumi, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. Yolk assembly in teleost: recent findings on the deposition of ovarian lipids and proteins. The Annual International Conference and Exposition of World Aquaculture Society, World Aquaculture 2008. 2008年5月23日, Busan, Korea.
- ④Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Matsubara Takahiro, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. 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. 2007年11月6-7日, Nagasaki University, Nagasaki.
- ⑤Amano Haruna, Fujita Toshiaki, Hiramatsu Naoshi, Matsubara Takahiro, Sullivan V. Craig, Hara Akihiko. Purification and classification of egg yolk proteins derived from multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 2007年6月3-8日, St. Malo, France.
- ⑥Reading J. Benjamin, Hiramatsu Naoshi, Matsubara Takahiro, Hara Akihiko, Sullivan V. Craig. Yolk precursors in white perch (*Morone americana*):

deduced primary structures of three types of vitellogenin (Vg) proteins and disparate binding of the different Vgs to multiple ovarian receptors. 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. 2007年6月3-8日, St. Malo, France.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.geocities.co.jp/hlaboratory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 尚志 (HIRAMATSU NAOSHI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・助教

研究者番号: 10443920

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし