

機関番号：10101  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21780172  
 研究課題名(和文) サケ科魚類のビテロジェニンとその受容体に関するインターラクトーム解析  
 研究課題名(英文) Studies on vitellogenin and its receptor in salmonid using interactome techniques  
 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(和文)：

魚類の卵が作られる時に、卵黄の素となる血液中の蛋白質(ビテロジェニン：Vg)は、卵表面にある鍵穴となる蛋白質(Vg受容体)と結合してから卵の中に入る。本研究はサケ類 Vg (sVg) の分子上にある鍵となる部分(Vg受容体結合部)の一部を、最新の蛋白質相互作用解析を用い初めて同定した。また、最近発見された C タイプ Vg (VgC) の組換え蛋白質の合成に微量ながら成功し、これまで未知な VgC 受容体の発見に向けた研究進展の基礎を築いた。

## 研究成果の概要(英文)：

When fish grows ovaries, a yolk precursor vitellogenin (Vg) is incorporated from the blood into oocyte following its binding to ovarian Vg receptor (VgR). This study first identified a portion of VgR-binding region on salmon Vg (sVg) using cutting-edged interactome techniques. Further, a novel C-type Vg (VgC) was cloned and its recombinant protein was synthesized with a limited amount; this provided a basis for discovering the unrevealed VgC receptor.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：魚類繁殖生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：サケ科魚類、蛋白質相互作用、ビテロジェニン、ビテロジェニン受容体、卵形成

## 1. 研究開始当初の背景

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。

最近の研究において、申請者らは多様な魚種から2タイプ、もしくは3タイプ(VgA, VgB, VgC)のVgをクローニングし、各Vgの構造的特性に基づいた分類法を提唱した。このうちサケ科魚類は、同科魚類に特有なクラスターを形成するサケ型Vg(sVg)に加え、他科魚類のVgCに相当するホモログを有す

る。また一部の魚類では、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源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”ピ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*)。

一般に 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; VgR) を介したエンドサイトーシスにより起こる。最近、申請者はホワイトパーチの Vg (VgA/VgB) 分子中の受容体に結合する領域 (受容体結合領域) を生化学的な手法により一部同定した (Hiramatsu *et al.* [2002], *Biol. Reprod.*)。同様の受容体結合領域は、ティラピア VgB 分子においても酵母 two-hybrid 法 (Y2H 法) を用いて特定されている (Li *et al.* [2003], *J. Biol. Chem.*)。ティラピア VgB の受容体結合領域はその最小領域の同定には至っておらず、86 アミノ酸からなるペプチド鎖 (vitellogenin receptor binding peptide; VRBP) として特定されている。

このように魚類 Vg の受容体結合領域は、わずか 2 種の魚類において部分的に同定されているにすぎない。また、サケ科魚類の主要な Vg サブタイプである sVg は、系統発生上、さらに後期に分化した魚類に見られる Vg (VgA, VgB) のプロトタイプと考えられているが、その受容体結合領域が他魚種と同様に VRBP 領域内にあるか否かは明らかでない。さらに VgC に関しては、sVg や VgA および VgB と大きく構造が異なること、また卵内に取り込まれることは明らかであるものの、その受容体に関する知見は全くない。

硬骨魚類の卵形成において、母親由来の多様な Vg サブタイプに由来する蛋白質・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の必要不可欠な過程である。以上の背景に基づき、多型 Vg の卵母細胞内への取り込み機構について基礎的な知見を集積することは、将来魚類の卵質改善等に寄与すると考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、魚類の卵黄形成機構において特に未解明な、卵黄蛋白前駆物質 (ピテロジェニン: Vg) と Vg 受容体 (VgR) の結合関係を、分子生物学的・生化学的な手法を組み合わせた蛋白質相互作用解析 (インターラクトーム) により明らかにすることを目的とした。目的を達成するため、具体的には以下の 2 つの解析をサケ科魚類のカットスロートトラウトを用いて行った。

(1) sVg とその受容体 (VgR) のクローニングを行い、Y2H 法等のインターラクトーム解析に供することにより、sVg の受容体結合

部位および VgR のリガンド結合部位を特定する。VgC についても同様な解析を行う。

(2) 各種の生化学的手法を組み合わせた蛋白質間の相互作用解析により、サケ科魚類の新規 VgC 受容体の検索・定性および同定を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) sVg と VgC、並びに VgR の cDNA クローニング

各実験に先立ち、近縁種のニジマスやアマモスの既知配列を参考にして、カットスロートの肝臓または卵巣試料から、常法にて sVg、VgC、および VgR の完全長 cDNA を単離した。これらの cDNA を鋳型とし、以下の試験に必要な標的配列を得た。尚、標的配列の各種ベクターへのサブクローニングは、Infusion 法により、部位得的なライゲーションを行った。

### (2) sVg と VgR の結合解析

サケ科魚類の主要な Vg サブタイプである sVg と、その受容体として知られている VgR の結合関係を酵母 two hybrid (Y2H) 法および免疫共沈殿 (Co-IP) 法により解析し、sVg と VgR の結合に関与する領域の特定を試みた。

#### ① Y2H 法による結合解析

Y2H 解析は先行する報告 (Li *et al.* [2003], *J. Biol. Chem.*) とほぼ同様の手順で行った。即ち、Matchmaker Gold Y2H System (Clontech) を用い、VgR の推定受容体結合領域をコードするベイト (餌) ベクターに対し、3 つのプレイ (捕食) ベクターを用いてメイティングした。プレイは完全型 Vg (sVg) の全長配列に加え、リポビテリン重鎖 (LvH) 領域又はフォスピチン (Pv)・Lv 軽鎖 (PvLvL) 領域を含む配列を含むように構築した。各々のプレイをベイトとメイティングし、プレイとベイトの結合により発現する形質、即ちアミノ酸要求性、Aureobasidin A 耐性、およびガラクトシダーゼ産生の形質獲得について観察した。

#### ② Co-IP 法による結合解析

Co-IP 法による結合解析は、Matchmaker Chemiluminescent Co-IP System (Clontech) を用いて行った。試験には上記 Y2H 法と同じ配列を、プレイおよびベイトベクターに組み込んだ。プレイとベイトの間の結合は、免疫沈降後にベイトと共沈殿した Prolabel 標識プレイの発光量を測定することにより確認した。

### (3) VgC 組み換え蛋白質の作製

サケ科魚類の新型 Vg である VgC について、その受容体を生化学的に検索・同定するには、リガンドとなる精製 VgC が必要となる。しかしながら、VgC は sVg に比べ血中量が少なく、通常の前製により必要十分な量の試料を得ることが難しい。即ち、精製 VgC をリガンドに用いたクロマトグラフィーや、精製 VgC と抗 VgC 抗体を用いたリガンド依存免疫沈降法により、VgC に特異的な受容体の精製もしくは部分精製を行うためには、多量な精製 VgC が必要となる。そこで VgC 組み換え蛋白質の大量生産を試みた。以下に、本試験に使用したベクター&宿主菌の組み合わせを示す。

#### ① 組合せ 1 :

ベクター : pET302/NT-His (Invitrogen)  
宿主 : Origami (DE3)pLysS (Novagen)

#### ② 組合せ 2 :

ベクター : pNCM02 (TaKaRa)  
宿主 : Brevibacillus (TaKaRa)

#### ③ 組合せ 3 :

ベクター : pET302/NT-His (Invitrogen)  
宿主 : Rosetta-gamiB (DE3)pLysS (Novagen)

尚、上記①と②には、シグナル配列を含む完全長の VgC 配列を、③には同配列を含まない成熟 VgC 配列を組み込み、発現ベクターを構築した。

## 4. 研究成果

### (1) sVg と VgC、並びに VgR の cDNA クローニング

近縁種ニジマスの sVg および VgR の塩基配列を参考にして設計したプライマーを用い、PCR と TA クローニング法により pGEM-T Easy Vector 内にこれら各標的配列の全長を含む cDNA クローンを得た。得られたクローンの内部配列をシーケンスにより確認したところ、sVg および VgR は各々 1663 および 848 アミノ残基からなる全長翻訳領域を含んでいることが明らかとなり、またその配列は他魚種の Vg および VgR と高い相同性を示した。

同様な方法にて近縁種アメマスの VgC 配列を参考にしてプライマーを設計し、カットスロートの肝臓より VgC のクローニングを行った。得られた cDNA クローンは、1281 アミノ残基の全長翻訳領域を含んでいることが明らかとなり、その配列は他魚種の VgC と高い相同性を示した。

### (2) sVg と VgR の結合解析

#### ① Y2H 法による結合解析

得られた sVg および VgR 配列から標的とする部分配列を、In-Fusion Advantage PCR kit を用いて pGADT7 (プレイ) と pGBKT7 (ベイト) ベクターにサブクローニングした。これらを始めに大腸菌に形質転換し、寒天培地に接種しコロニーを得た。同コロニーを液体培地にて培養後、プラスミドを精製し、インサート配列のシーケンス解析を行った結果、標的とした配列を含むクローンが得られていた。

次に、S. C. EasyComp Transformation kit (Invitrogen) を用い、プレイプラスミドは Y187 酵母株へ、ベイトプラスミドは Y2H Gold 酵母株へ形質転換し、前者は Leu 欠損 (Leu-) SD 寒天培地、後者は Trp 欠損 (Trp-) SD 寒天培地に接種した。得られたコロニーを、さらに X- $\alpha$  gal 存在下あるいは X- $\alpha$  gal および Aureobasidin A (AbAr) の共存条件において、上記寒天培地に接種し培養したところ、選択したプレイクローンおよびベイトクローンは AbAr 存在下では増殖せず、その他の培地では増殖速度はキット付属のコントロールよりゆっくりであったものの、白色コロニーを形成した。このことより、各プレイおよびベイトクローンはインサート配列由来の致死毒性を持たず、レポーター遺伝子の自家発現をしないことが明らかとなり、メイティング試験への適用可能なクローンの作製に成功した。

得られた各プレイおよびベイト株を用い、メイティング試験を行った。メイティング後、SD (Leu-/Trp-) 寒天培地に接種し、プレイ・ベイト両ベクターを含む 2 n 株クローンを選択した。選択した 3 つのクローンにおいて、先ず結合によって起こるレポーター遺伝子の発現を、低度の選択性培地 : SD (Leu-/Trp-/X- $\alpha$  gal/AbAr) と高度の選択性培地 : SD (Leu-/Trp-/His-/Ade-/X- $\alpha$  gal/AbAr) を用いて観察した。その結果、低度の選択性培地では、全てのプレイ・ベイト間の組合せ (VgR-fullVg 株; VgR-LvH 株; VgR-PvLvL 株) で青色のコロニーが形成された。一方、高度な選択性培地では、VgR-PvLvL 株のみに青色コロニーの形成が確認された (図 1)。



図 1 選択性寒天培地を用いたメイティング試験。

さらに各組み合わせの株をβガラクトシダーゼ活性試験に供したところ、VgR+PvLvL株は、他株を用いた試験グループに対して約2倍のガラクトシダーゼ活性を示す傾向にあった(図2)。

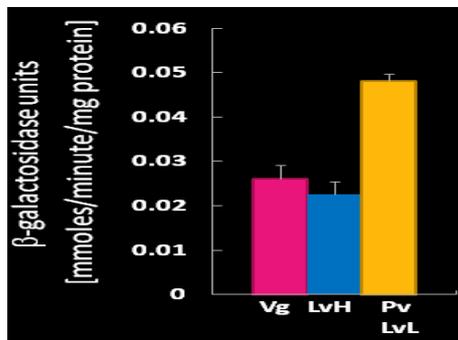


図2 メイティング後のプレイ・ベイト結合を示すβガラクトシダーゼ活性の測定。

## ② Co-IP 法による結合解析

Y2H法で得られた結果をCo-IP法で再確認した。まず、Infusion 法によりLvHおよびPvLvL領域の配列をpProLabel-C ベイトベクターに、一方、VgRのリガンド結合領域をpAcGFP1-C プレイベクターにサブクローニングした。上記Y2H法と同様に、この段階で大腸菌への形質転換とプラスミド精製、およびシークエンス解析を行い、標的とした配列の存在を確認した。

得られたプラスミドベクターをVgRとLvH (VgR+LvH株)、またはVgRとPvLvL (VgR+PvLvL株)の組合せで、Lenti-X 293T細胞へCalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech)を用いて導入し、プレイとベイトのインサート配列を共発現させた結果、ベイトベクターの導入に由来する緑色蛍光 (GFP) が両細胞株に確認されると共に、プレイベクターの導入に由来するProlabel発光についても確認された。

以上の様に、293T細胞にプレイとベイトの共発現が確認されたため、各組み合わせの細胞株を各々溶解し、細胞抽出液を得た。これを、抗GFP抗体標識ビーズを用いた免疫共沈殿に供した結果、VgR+PLL株がVgR+LvH株よりも高いProlabel発光を示し、Y2Hで得られた結果と同様な結合性状を再確認した(図3)。

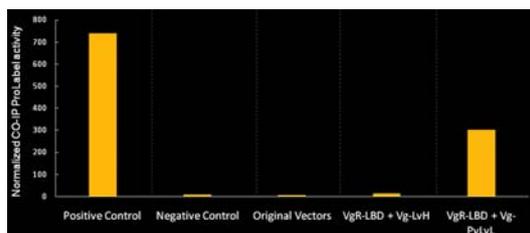


図3 プレイ・ベイト共感染 293T 細胞抽出液の免疫共沈殿後の Prolabel 発光量の測定

## (3) VgC組み換え蛋白質の作製

pET302 (ホストOrigami又はRosetta-gami B) 並びにpNCM02 (ホストBrevibacillus)を用い、組換えC型Vg (VgC) の発現を試みた。その結果、pET302とRosetta-gamiBの組合せで、成熟VgC配列を組み込んだものだけに微量ではあるが組換えVgCの発現が確認された(図4)。また、同組換えVgCは封入体画分に存在することが明らかとなった。

次に、組換えVgCの精製を試みた。組換えVgCを含む封入体画分を6M 尿素入りBinding bufferに溶かした後、Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen)を充てんしたカラムに供し、イミダゾール添加により溶出を行った。溶出画分をSDS-PAGE並びにウエスタンブロットにより確認した結果、Pass 画分を含む全てのフラクションにVgCに相当するバンドが確認できなかった。

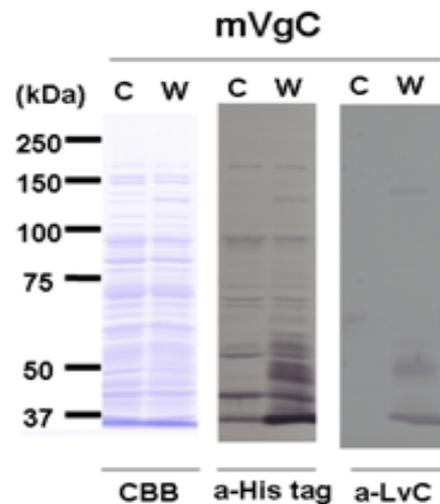


図4 組換えVgCの発現。CBB: クマシ染色; a-His tag: His タグ検出; a-LvC: 抗LvC抗体を用いたWestern blot; C: Control 大腸菌抽出液; W: 組換え大腸菌抽出液

以上、サケ科魚類で初めてsVgとVgRのY2H解析が行われた。その結果、sVg分子中の受容体結合部位がPvLvL領域上にある可能性が示唆された。同様のY2H法を用いたティラピアVgBとVgRとの結合解析では、VgBの受容体結合部位は、LvH上にあるという結果が得られていた。従って、Vgの受容体結合部位に関しては、同じY2H法を用いながらも、本研究で得られた結果とティラピアで得られた結果は一致した

かった。この理由として、1) 種差による違い、および2) Y2Hシステムの不具合が挙げられる。サケ科魚類はティラピアと比較すると比較的原始的な硬骨魚に属し、またサケ科魚類のsVgは進化的な魚類のVgAやVgBの祖先型と考えられている。しかしながら、これらの異なるVgサブタイプ間のアミノ酸配列は比較的良く保存されており、魚類の系統分化に伴うVgの分化に際して受容体結合領域の大きな転移があったとは考えにくい。一方、Y2H法は形質転換したプレイとベイト酵母をメイティングすることにより、各酵母株に形質転換された標的分子の結合関係をレポーターアッセイにより確認する手法であるが、擬陽性結合反応が出やすいことが知られている。今回、本研究で使用したY2Hキットは、結合に伴い誘導される4つのレポーター遺伝子の発現を基盤とした厳密な結合株の選択ができることが特徴である。実際、本実験で低度:SD

(Leu-/Trp-/X- $\alpha$  gal/AbAr) と高度:SD

(Leu-/Trp-/His-/Ade-/X- $\alpha$  gal/AbAr) の2つの選択性培地を用いたところ、低度選択性培地では、各株の生育や青色コロニーの発色に違いは見られなかったが、一方、高度選択性培地で唯一成長し青色コロニーを生じた株の組合せは、VgR-PvLvL株であった。この様に、Y2H法では、選択性の強弱により、擬陽性が生じる可能性が高く、このことがティラピアでの結果との違いに結び付いた可能性が高い。

さらに、本研究ではプレイ若しくはベイトベクター由来のインサート配列の発現は非常に微量であり、通常の色法を用いたウェスタンブロット等で確認することができなかった。一般に組換え蛋白質の発現においては、インサート配列がある程度長くなると、発現量は急激に減少する。今回のインサート配列はLvHが最も長く、これがLvHに結合性が見られなかった理由とも考えられる。しかしティラピアでの報告では、レポーター遺伝子の発現は完全長のVgでも観察されており、インサート配列の長さでレポーター遺伝子の発現に相関は無いと思われる。

この様に先行研究との結果の相違を受け、本研究では、当初、Y2H法のみを用いてVgの受容体結合部位の最小単位を特定し、VgCについても同様の解析をする予定であったが、これを変更し、Y2H法とは異なるインターラクトーム手法である免疫共沈降法 (Co-IP法) により、Y2H法で得た結果を精査することにした。結果的に、酵母ではなく動物細胞培養系を用いたCo-IP法においても、本研究のY2H法での結果を支持する成果が得られた。即ち、結合に依存したProlabel発光値は、VgR-PvLvL株が最も高い値を示し、これにより、サケ科魚類のsVgは、PvLvL領域内に受容体結合領域を含む可能性が再度強く示唆された。

本研究の代表者は、以前の研究でVg分子中

のLvが受容体への結合部位を含むことを、生化学的に明らかにしてきた。また、その際、Pvには結合能が無いことも確認してきた。従って、本研究の成果を考慮すると、PvLvL領域の中のLvL領域に受容体結合部位が存在することが予想された。今後、今回の様に複数のインターラクトーム解析を組合せ、同領域のVgR結合性を精査することで、その確実な証明が期待される。

VgCの受容体は未だに同定されておらず、同受容体に関する情報は全くない。従ってY2H法やCo-IP法を用いたインターラクトーム解析を行う前に、受容体探索に典型的な生化学的手法を用いて、VgCの受容体に関する知見を集積する必要がある。本研究では、VgC受容体の同定にはリガンドとして大量の精製VgCが必要となることを考慮し、組換えVgCの作製を試みた。その際、通常の大腸菌を用いた発現系に加え、分泌型の組換え蛋白質作製が可能なBrevibacillusを用いた組換え蛋白質の作製を試みた。その結果、1つの組合せで組換えVgCの発現は可能なものの、その大量生産は困難であると判断された。今後はこれまでに有効であったLvCの卵からの精製法を改善する等により、必要量の精製リガンドを確保してVgC受容体の探索を継続したい。

以上、本研究はこれまで未解明であったサケ科魚類の卵黄前駆体sVgとその受容体VgRの結合関係を、複数のインターラクトーム解析により一部明らかにした。また、その結合部位が魚種間で異なる可能性も示唆した。さらに、VgC受容体の同定に関して、結合解析に必要なリガンド作製の一助となる成果を得た。これらの成果は、魚類の卵形成機構に関して新たな知見を加えたばかりでなく、更なる理解に向けての基礎を提供した。

## 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)

[学会発表] (計5件)

- ①水田紘子、伊東優太、平松尚志、東藤孝、原彰彦、カッツスロートトラウト卵巣におけるピテロジェニン受容体 (VgR) の発現解析、平成22年度日本水産学会春季大会、2010年3月26-30日、日本大学藤沢キャンパス、藤沢
- ②平松尚志、魚類の卵形成に関する卵黄前駆物質およびその受容体に関する研究、日本水産学会春季大会、水産学奨励賞受賞講演、2010年3月26-30日、日本大学藤沢キャンパス、藤沢
- ③Hiroko Mizuta, Naoshi Hiramatsu, Takashi Todo, Hideaki Kudo, Akihiko Hara,

Characterization of ovarian lipoprotein receptor proteins in cutthroat trout: vitellogenin receptor and low-density lipoprotein receptor, 7th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2010, Jeju, Korea, November 17-18.

④Hiroko Mizuta, Naoshi Hiramatsu, Takashi Todo, Hideaki Kudo, Akihiko Hara, Expression and localization of two ovarian lipoprotein receptor proteins in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*), The 10<sup>th</sup> Joint Seminar between Japan and Korea by Core Univ. Program on Fisheries Sciences, 2010, Hakodate, December 8-10.

⑤Wenshu Luo, Naoshi Hiramatsu, Takashi Todo, Benjamin J. Reading, Craig V. Sullivan, Akihiko Hara, Molecular cloning and expression analysis of a novel ovarian lipoprotein receptor in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkia*), 7th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2010, Jeju, Korea, November 17-18.

[その他]

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/hlaboratory/top.html>

## 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