

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580243

研究課題名(和文) 魚類の卵母細胞を標的とする新たな物質輸送システムの開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic studies on development of a novel delivery system of materials into fish oocytes

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・准教授

研究者番号：10443920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：卵黄の素となる蛋白質(ビテロジェニン：Vg)は、卵表面にあるVg受容体と結合することで親魚の血液中から選択的に卵母細胞の中に入る。本研究は、1)異なる魚種から得たVgを親魚に注射すると、種に関わらずその卵や稚仔魚へ輸送されること、2) Vgの脂質部位を置換し、任意の脂質を卵や稚仔魚へ運搬できることを確認した。これにより、Vgを利用した物質輸送システムはどのような魚にも応用可能であること、また親魚から卵・稚仔魚へ世代を超えて有用脂質や脂溶性物質を運搬できることが確認され、同輸送システム開発に向けた研究が進展した。

研究成果の概要(英文)：A yolk precursor vitellogenin (Vg) is selectively incorporated from the maternal blood into oocyte following its binding to ovarian Vg receptor. This study demonstrated that Vg obtained from heterologous species, as well as Vg coupled with voluntary lipids, can be delivered to fish eggs and ofsprings by injecting them into broodstocks. This indicated a potential use of fish Vg as a transporter of bioactive materials; the system can be universal to any fish species. This study also confirmed that such system was found to be applicable for the delivery of bioactive lipids and/or hydrophobic materials to eggs and offsprings across generations.

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：魚類 受容体標的輸送 ビテロジェニン ビテロジェニン受容体 蛋白質相互作用 卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞又は組織特異的に発現する受容体を標的とした物質輸送システム(受容体標的輸送システム)は、これまで主に医学分野においてその実用化が図られてきた。受容体標的輸送システムは、その組織特異的な輸送性状により特定の細胞(例えばガン細胞等)を含む患部のみへ直接投薬できる等の利点を持つ。運搬される物質群(エフェクター)は、薬剤のみならず抗体・遺伝子ベクター・細胞増殖因子等の多様な物質群を含み、一方、運搬を担う輸送体には、標的受容体に特異的なリガンドや受容体に対する抗体が利用されている。

魚類を含む卵生脊椎動物において、性成熟期に入った雌は卵母細胞内への卵黄蓄積を開始する。卵黄の前駆物質はビテロジェニン(Vg)と呼ばれる肝臓由来の血清蛋白質であり、血流を介して卵巣に到達し、卵母細胞膜上に存在する受容体(Vg受容体:VgR)に結合した後、エンドサイトーシスにより卵母細胞内に取込まれる。取込まれたVgは限定的な分解を受け、卵黄蛋白質であるリポビテリン(Lv)、フォスピチン(Pv)及び成分として蓄積され、後に胚や稚仔魚の発生・成長に利用される。これまで申請者は、魚類の卵形成機構、特に蛋白質・脂質成分の卵への取込み・蓄積機構について詳細な研究を行ってきた(総説:Hiramatsu et al., 2005; Hiramatsu 2010)。その結果、数種の硬骨魚類においてVgRは卵母細胞で特異的に発現し、Vgにのみ極めて高い結合性を持つことを明らかにしてきた。

以上の背景を踏まえ、申請者は、VgとVgRの関係を利用することにより、魚類の卵母細胞に効率的且つ特異的に様々なエフェクター物質を導入することが可能となると考えた。このようなシステムを開発することで、例えば増養殖分野では卵質の改善や防疫能の獲得、基礎生物学分野では新たな遺伝子導入技術の開発など、様々な応用が期待できると考え、その実現に向けた基礎生理学的知見を集積することを目的とする本研究の発想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、魚類の卵・稚仔魚へ世代を超えて有用物質を輸送するシステムの開発を視野に入れ、そのための基礎的知見を得ることを目的とした。具体的には、卵母細胞に特異的な受容体(ビテロジェニン受容体)を標的とし、そのリガンド(ビテロジェニン又は抗受容体抗体)を輸送体として利用する。

目的達成のため、本研究は以下の4つの解析課題を中心とした。(1)蛍光標識輸送体(Vg及びVgR抗体)を生体投与し、組織学的に観

察することにより、輸送体の卵・稚仔魚への運搬生理性状を確認する。(2)モデルエフェクター(赤色蛍光蛋白質DsRed)とVg輸送体との複合体を作製し、その輸送性状を上記同様に確認する。(3)輸送体(Vg)と標的受容体(VgR)の結合部位を同定し、輸送システムの簡素化・普遍化に必要な知見を得る。(4)Vgの脂質部位を直接置換し、任意の脂質を卵や稚仔魚へ運搬できるか確認する。

3. 研究の方法

(1)「蛍光標識輸送体の卵・稚仔魚への運搬生理性状解析」

輸送体の標識:輸送体としてサケ目イトウの精製Vg及び抗カッツスロートトラウトVgR抗体(a-VgR)を赤色蛍光化学物質Alexa 594にて直接標識した(下記カレイVgとの同時投与の場合は、Alexa 488で緑色蛍光標識)。同様にカレイ目マコガレイVgをAlexa 594にて標識した。イトウVg精製法は、既法(Hiramatsu and Hara, 1996)に従い、カレイVgの精製は、ハイドロキシルアパタイトカラムとSuperose 6を用いたゲル濾過により行った。今回用いたa-VgRはMizuta et al. (2013)で作製した抗血清をIgGに精製したものをを用いた。

生体投与試験:ゼブラフィッシュをモデルホスト種として使用し、上記の標識輸送体を背部筋肉中に注射投与し、その後の蛍光動態・局在を組織学的に観察した。採取した卵巣・初期発生胚・仔魚は、PFA固定後に定法により凍結切片を作製、又はそのままの状態、蛍光実体顕微鏡・蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡により観察した。特に、各卵発達段階による取込み選択性、運搬後の卵濾胞における局在、胚体・稚魚への移行様式等について経時的に観察した。更に受容体標的輸送システムの普遍性を確認するため、ゼブラフィッシュ以外のホスト種(マダイ・メダカ・ヨウジウオ)にAlexa 594標識イトウVgを生体投与し、上記同様の解析を行った。

(2)「リンカーを介した輸送モデルシステムの開発」

リンカーを介した輸送体・エフェクター複合体の作製:精製イトウVgを輸送体とし、一方、エフェクターには赤色蛍光蛋白質(DsRed)を用いた。これら輸送体とエフェクターは市販のビオチン標識キットを用いてビオチン標識を施した。その後、市販のアビジン(ImmunoPure StreptAvidin)と共に混合し、モデル複合体を作製した。標識効率及び複合体形成の最適化を目的に、各構成成分の比率や反応時間等を変え(結果参照)

以下の投与実験に供した。

モデル複合体の生体投与試験：Vg-DsRed 複合体をゼブラフィッシュに投与した後、卵母細胞への輸送を上記同様の手法で組織学的に確認した。

(3)「Vg と VgR の結合部位の同定」

卵黄蛋白質の精製・標識及びその投与試験：受容体結合部位を持つ卵黄蛋白質を同定するため、イトウの卵から Vg 由来の卵黄蛋白成分(Lv 及び '成分)を既法(Hiramatsu and Hara, 1996)に従い精製した。これを上記と同様の標識・生体投与・観察に供した。

組み換え Lv 軽鎖(LvL)作製及びその投与試験：カットスロートトラウトの完全長 Vg cDNA を得た後(荏平ら、2013)これを鋳型として、Vg 配列上の受容体結合部位候補である LvL 領域を PCR 法により増幅し、これを pET32a ベクターにサブクローニングした。これを Rosetta-gami B に形質転換し、組み換え LvL 蛋白質(rLvL)を発現させた。rLvL は、巻き戻し処理後に Superdex 200 を用いたゲル濾過により精製した。精製 rLvL は上記同様の標識・生体投与・観察に供した。

(4)「任意の脂質を卵や稚仔魚へ運搬」

Vg への脂質成分の付加：蛍光脂肪酸による Vtg の脂質部位の標識は、Martin-Nizard *et al* (1987)の方法を改変して行った。まず 1 mg の BODIPYFLC₁₆ (蛍光パルミチン酸)をジエチルエーテルに溶解し、100 mg のガラスビーズを含むバイアルに注入した。その後、窒素ガスを吹き付けながら室温で1時間、溶媒が蒸発するまで混和し、ガラスビーズ表面に BODIPYFLC₁₆ を付着させた。次に精製イトウ Vg 溶液を上記バイアルに添加し、3時間反応させた後、反応溶液を Sephadex G-25 によるゲル濾過クロマトグラフィーに供し、未反応の蛍光脂肪酸を除去した。

蛍光脂質標識 Vg の生体投与試験：作製した蛍光脂肪酸標識 Vg は、上記同様の生体投与・観察に供した。

4. 研究成果

(1)「蛍光標識輸送体の卵・稚仔魚への運搬生理性状解析」

蛍光標識イトウVgのゼブラフィッシュ雌への生体投与試験

Alexa 594標識イトウVgをゼブラフィッシュに40µg/g体重で注射投与し24時間後に卵巣を採集した。作製した卵巣切片の蛍光観察の結果、標識Vg投与魚の卵巣では、卵黄形成期の卵母細胞内において、顆粒状に蛍光が確認された。一方、コントロールとして蛍光標識

ウシ血清アルブミン(BSA)を投与した魚の卵巣では、蛍光が確認できる卵母細胞は無かった。更に投与量及びVg取り込みに要する時間について詳細に検討を行ったところ、投与濃度依存的な卵母細胞内の蛍光シグナルの増大が確認された他、少なくとも投与後2時間で卵母細胞内にVgが取り込まれる事が明らかになった。

蛍光Vg投与雌個体から得た受精卵及び初期発生胚・仔魚について、経時的に蛍光観察を行った結果、卵黄・卵黄嚢とその伸長部位に蛍光が確認された他、頭部及び循環系に蛍光が確認された。

蛍光標識イトウVg及びマコガレイVgのゼブラフィッシュ雌への混合投与試験

Alexa 488 (緑色)標識イトウVg溶液(2 mg/ml)と、Alexa 594 (赤色)標識マコガレイVg溶液(2 mg/ml)を等量で混合した後、40 µg/g 体重の濃度で雌のゼブラフィッシュ背部に注射投与し、投与から4時間後に卵巣を採取した。作製した卵巣切片を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、卵黄形成期の卵母細胞周縁部に2種Vtg由来の小さな蛍光顆粒が確認された他、中心へ向かうにつれて大きめの強い蛍光顆粒が観察された。2種Vg由来の蛍光シグナルの局在の一致は明らかであった。

一方、両蛍光Vg混合投与個体から得た受精卵・初期発生胚を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、受精から1日後の胚体では卵黄全体で2種由来の蛍光シグナルが同様に確認された。

蛍光標識イトウVgのマダイ・メダカ・ヨウジウオ雌への生体投与試験

Alexa 594 標識イトウVgを上記3魚種に同様に注射投与した結果、全ての種の卵母細胞内に顆粒状の蛍光シグナルが確認された。

(2)「リンカーを介した輸送モデルシステムの開発」

精製イトウVg及び組み換えDsRedをビオチン標識し、これにリンカーとしてStrept avidinを添加し、様々な比率で混合(avidin:DsRed:Vg=1:1:1, 2:1:1, 1:2:2)することでVg-ABC-DSRed複合体を作製した。これをゼブラフィッシュに注射投与し、投与後3及び24時間後に卵巣を摘出した。卵巣切片の蛍光観察の結果、すべての混合比率において、卵母細胞内に蛍光シグナルは確認できなかった。

(3)「Vg と VgR の結合部位の同定」

蛍光標識卵黄蛋白質の投与試験

イトウ卵から得た2種の卵黄蛋白質成分(Lv及び'成分)を蛍光標識し、ゼブラフィッシュに各々10 µg/g 体重で注射投与し、上記同様に観察した。その結果、Lv投与魚では卵黄形成期の卵母細胞内で顆粒状に蛍光シグナルが確認された。一方、'成分投与魚では、そのような蛍光は確認できなかった。

rLvLの作製

カットスロートトラウトLvL cDNA断片(723bp)の増幅を目的としたPCRを行った結果、予想したサイズのPCR産物が得られた。このPCR産物を発現ベクターにサブクローニングし、Rosetta-gamiB大腸菌株に導入し、形質転換株を用いて組み換え蛋白質の発現誘導を行った結果、CBB染色において誘導前の菌体では観察されず、IPTG誘導後の菌体でのみ発現する約45 kDaのバンドが確認された。組み換えLvLは不溶性画分に検出されたため、LvLの巻き戻し(リフォールディング)を行った後、これをSuperdex 200によるゲル濾過クロマトグラフィーに供した。その結果、主要な2つの溶出ピークが得られ、両ピーク画分をSDS-PAGEへ供した結果、どちらのピークにも目的とする組み換えLvLが45 kDaの位置に検出された。ピーク周辺の画分をプール後、濃縮したものを精製LvLとした。これをAlexa 594で標識したものを投与試験に用いた。

rLvLの投与試験

標識LvLを40 µg/g体重の濃度でゼブラフィッシュに注射投与し、投与から24時間後に卵巣を採取した。卵巣切片を蛍光顕微鏡で観察した結果、卵母細胞内にかすかな蛍光シグナルが確認されたが、蛍光Vg投与個体の卵巣における蛍光シグナルと比較して極めて微弱であった。

(4)「任意の脂質を卵や稚仔魚へ運搬」

Vgへの脂質成分の付加

BODIPYFLC₁₆(蛍光パルミチン酸)を付着させたガラスビーズとイトウVgを混合した後、Sephadex G-25を用いたゲルろ過クロマトグラフィーに供し、得られた各画分の280 nm及び512 nmにおける吸光度を測定した。その結果、両波長に共通な位置にメインピークが得られ、蛍光脂肪酸をVgに付加することに成功した。

蛍光脂質標識Vgの生体投与試験

蛍光脂肪酸標識Vgを40 µg/g 体重の濃度でゼブラフィッシュに注射投与し、投与から24

時間後に卵巣を採取した。卵巣切片を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果、卵黄形成期の卵母細胞内において顆粒状に蛍光シグナルが観察された他、顆粒膜細胞層と思われる位置にも蛍光シグナルが観察された。

同様に蛍光脂肪酸標識したVgを投与した雌から受精卵及び仔魚を得た。受精から1日後、2日後の胚体、4日経過後の卵黄嚢を持つ孵化仔魚を採集し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、受精1日後の胚体では卵黄の部分で蛍光が観察された。受精2日後の胚体においても卵黄嚢で蛍光が観察され、さらに詳細に観察した結果、胚体の頭部に小さな蛍光顆粒が観察された。受精4日後の孵化仔魚では、卵黄嚢とその伸長部位で蛍光が確認されたほか、頭部と脊椎付近及び筋節に沿って強い蛍光が確認された。

本研究は、魚類の卵・稚仔魚へ世代を超えて有用物質を輸送するシステムの開発を視野に入れ、そのための基礎的知見を得ることを目的として詳細な解析を行った。初めにVgが輸送体として機能するかを確認するため、これを蛍光物質で標識してから生体投与し、卵・稚仔魚への運搬生理性状を解析した。その際、小型で飼育し易い、輸送体投与量が少なく済む、ストレスに強い、数日おきに産卵する、などの利点を持つゼブラフィッシュを主なホスト種として利用した。また、Vgのドナー種には、簡単に大量のVgが精製できるイトウを主に用いた。

解析の結果、先ずVgを輸送体とした場合、その輸送は早急かつ選択的であり、背部筋肉中に投与してから少なくとも2時間以内で卵黄形成期の卵母細胞のみに輸送された。この事は、有用物質をVgに付加し投与した場合、他の体組織へ運搬されず、血流から素早く卵母細胞内へ運ばれることを示唆している。また、卵母細胞内に蓄積された蛍光シグナルは、受精卵・初期発生胚・仔魚へ移行し、循環系を介して体全体へ分布した。このことは、有用物質をVgに付加し親魚に投与した場合、世代を超えて物質を輸送できる可能性を示している。

一方、ドナーとホストがサケ目とコイ目という異目間であっても、問題無く輸送性を示した。異種間における生体投与試験の追試では、サケ目イトウのVgは、少なくともスズキ目(マダイ)・トゲウオ目(ヨウジウオ)・ダツ目(メダカ)の卵へ輸送された。更に、カレイ目(マコガレイ)とサケ目(イトウ)のVgは、ほぼ同様の性状でコイ目(ゼブラフィッシュ)の卵母細胞へ取り込まれた。この様に、魚類のVgを輸送体に用いた卵母細胞への物質輸送システムは、魚種に関わらず普遍的に応用できる可能性が高い。今後、極めて原始的な魚類群(サメや肺魚など)や円口類(ヤツメ・ヌタウナギなど)あるいは爬虫類・

両生類・鳥類などにも応用可能か調べることは興味深い。

本研究では、第2の輸送体候補としてVgR抗体を挙げた。その投与試験のため、カットスロートトラウトVgRのリガンド結合リピート、即ちVgとの結合部を標的として組み換え蛋白質を作製し、これを抗原としてVgR抗体を作製した。この部位に注目した理由は、作製した抗体がVg同様にVgRのリガンド結合部位に結合し、卵母細胞内に取り込まれると予想したからである。結果として、同抗体の選択的取り込みは起こらず、輸送体としては使用できないと考えられた。同抗体はVgRと結合することが確認されている (Mizuta et al., 2013)。従って、本結果は、VgR抗体がVgと同様な部位でVgRに結合してもエンドサイトーシスが起らないということを示している。このことは、Vgが受容体への結合のみならず、Vg・VgR複合体のエンドサイトーシスを誘起する機能を持つ事を示唆しており、基礎生物学的な観点から興味深い。

実際に任意の物質を輸送するためには、Vgにリンカーを用いて物質を結合させる必要がある。本研究では、その様なリンカーを介した輸送複合体モデルとして、アビジン・ビオチン複合体 (ABCシステム) を利用した。ABCシステムは様々な物質同士を繋ぐリンカーとして用いられ、汎用性が高い。また、ビオチン標識は比較的容易で、ビオチン標識した有用物質を交換するだけで、多様な物質の輸送が可能となる。本研究では輸送される有用物質のモデルとして、蛍光追跡が可能な赤色蛍光蛋白質DsRedを用いて、Vg-ABC-DSRed複合体を作製した。これをゼブラフィッシュに注射投与した結果、卵母細胞内に蛍光シグナルは確認できなかった。この原因として、アビジンが4量体であるため、Vg-ABC-DSRed複合体が多量体化する可能性があること、また逆に何らかの理由で複合体を形成しなかったこと等が考えられた。リンカーを介した輸送複合体形成については、リンカーの種類、リンク様式、あるいは各コンポーネントの混合率について最適化を図る必要があり、今後の課題とされた。

本研究では輸送体であるVgの受容体結合最小部位を同定し、発現ベクターに組み込むことで、これを輸送タグ化し、任意の組み換え蛋白質とのキメラを作製し卵母細胞内へ輸送する、あるいは同輸送タグとアビジンとのキメラを作製し、ビオチン化エフェクターと直接結合させるシステムの開発を視野に入れ、これを達成するための最重要課題であるVg分子中の受容体結合部位の同定を試みた。同結合部位に関しては、これまで、幾つかの先行研究が行われているが、統一した見解は得られていない。

本研究では、まず蛍光標識卵黄蛋白質成分の生体投与実験を行い、Vg分子中のLv部位に

受容体結合部位が存在することを直接的に証明した。ここで魚類のLvは重鎖 (LvH) と軽鎖であるLvLから構成される。これまでの先行研究では、受容体結合部位はLvH上にあると報告されている (Li et al., 2003)。一方、当研究室では、同様の実験系を用いて、LvLを同結合部位候補とする実験結果を得た。また、Liら (2003) により結合部位とされた領域を含む組み換え蛋白質を作製し、これを蛍光標識してゼブラフィッシュに生体投与したが、卵母細胞には取り込まれなかった。このため、本研究課題では、組み換えLvLを作製し、これを蛍光標識してゼブラフィッシュに生体投与した。しかしながら、同組み換え蛋白質の卵母細胞への取り込みは確認できなかった。今後、組み換え蛋白質のリフォールディング条件の検討を試みることや発現系自体を大腸菌から昆虫・動物細胞系に移行するなど、機能的な組み換え体の作製に更なる検討課題が残された。

魚類の完全養殖を行うためには、親魚の育成と人為催熟を行い、卵子と精子を得、これを人工授精させ、次世代の種苗を得ることで再生産を繰り返す。この様な魚類の種苗生産現場では、一般に受精卵、あるいは孵化仔魚の質は不安定な場合が多い。魚類の卵質・種苗の質を決定する要因は明らかではないが、これまで、卵黄の脂質組成が卵質に影響することが報告されている。Vgは脂質を含む蛋白質である。このVgに含まれる脂質を、任意の脂質に置き換え、これを効率良く卵母細胞へ輸送することで、卵質の向上が見込まれると考えられる。本研究では、Vgの脂質部分に脂肪酸の一つであるパルミチン酸を付加し、これを生体投与することで、卵及び仔魚へ運搬できるか確認した。付加したパルミチン酸には蛍光標識が施されており、輸送経路・局在を上記同様の組織学解析で追跡できる。

まず、蛍光パルミチン酸は、ガラスビーズを用いた転移法により効率良くイトウVgへ付加された。ゲル濾過により遊離の蛍光パルミチン酸の除去を行った際も、その溶出パターンより、反応系に添加した蛍光パルミチン酸がVgに付加されたことが明らかになった。これをゼブラフィッシュへ生体投与した結果、卵母細胞や受精後の初期胚、及び仔魚へ輸送されることが明らかになった。仔魚では循環系と考えられる部分に局在が確認され、同経路により体全体へ運搬されると考えられた。

以上、本研究は魚類のVgを利用した物質輸送システムはどの様な魚にも応用可能であること、またVgを用いて親から卵・稚仔魚へ世代を超えて有用脂質や脂溶性物質を運搬できることが確認された。Vgを利用した受容体標的輸送システムは、これまでにない新しいアイデアであり、他に類似した研究は行われておらず、現時点ではパイオニア的

研究に位置付けられる。本研究自身及びその成果を含む研究結果の一部は、論文(論文業績1-3)・講演(発表業績3-5)として発表しており、これからも順次発表していく予定である(発表業績2,3)。例えば、本年度5月に開催される「魚類繁殖生理に関する国際シンポジウム:10thISRPF」にて、基調講演が決定しており、成果の一部を発表する予定である(発表業績1)。以上、本研究により得られた新知見は、Vgを利用した受容体標的輸送システム開発の進展に寄与するばかりでなく、基礎となる魚類の卵形成機構に関して新たな知見を加え、同機構の更なる理解も進んだ。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

(全て査読あり)

Hiramatsu N., Luo W., Reading B.J., Sullivan C.V., Mizuta H., Ryu Y.W., Nishimiya O., Todo T., Hara A. (2013). Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts, *Fish Physiology and Biochemistry* 39: 29-32.

DOI: 10.1007/s10695-012-9612-6.

Mizuta, H., Luo, W., Ito, Y., Mushiobira, Y., Todo T., Hara, A., Reading, B.J., Sullivan, C.V. and Hiramatsu, N. (2013). Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*), *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 166(1): 81-90.

DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.07.005.

筵平裕次、水田紘子、羅ブンシュ、盛田祐加、澤口小有美、松原孝博、平松尚志、東藤孝、原彰彦、(2013)、カッツスロートトラウト *Oncorhynchus clarki* における2型ビテロジェニン転写産物および蛋白質の卵発達に伴う発現変化、日本水産学会誌79(2): 175-189.

<http://www.miyagi.kopas.co.jp/JSFS/kaishi.html>.

[学会発表](計5件)

Hiramatsu, N., Todo, T., Sullivan, C.V., Reading, B.J., Matsubara, T., Ryu, Y.-W., Mizuta, H., Luo, W., Nishimiya, O., Mushiobira, Y. and Hara, A. Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and vitellogenin-derived yolk proteins. 10th International Symposium on

Reproductive Physiology of Fish (ISRPF), 2014年5月25-30日(基調講演として発表決定済), Olhao, Portugal.

Mushiobira, Y., Mizuta, H., Luo, W., Todo, T., Hara, A., Reading, B.J., Sullivan, C.V. and Hiramatsu, N. Ligand binding properties of ovarian lipoprotein receptors in the cutthroat trout. 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (ISRPF), 2014年5月25-30日(ポスター発表として発表決定済), Olhao, Portugal. Hiramatsu N., Mizuta H., Luo W., Nishimiya O., Wu M., Mushiobira Y., Reading B.J., Sullivan C.V., Todo T. and Hara A. Yolk formation in fish: Multiple vitellogenins and their receptors, Diversification in Inland Finfish Aquaculture II (DIFall), 2013年9月24-26日, University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic.

Mushiobira Y., Mizuta H., Luo W., Morita Y., Sawaguchi S., Matsubara T., Hiramatsu N., Todo T., Hara A. Dual vitellogenins in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*): purification and changes in serum protein level during reproductive cycle, The 9th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, 2012年12月19日~2012年12月21日, 東京.

櫻井秀之・川北奈央子・平松尚志・東藤孝・原彰彦、卵黄蛋白前駆物質ビテロジェニンの異種間投与とその運搬過程:イトウとゼブラフィッシュを用いたモデルについて、第5回サケ学研究会、2011年12月17~18日、北海道大学学術交流会館小講堂、札幌.

[その他]

ホームページ:<http://www.geocities.jp/hlaboratory/index.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・准教授

研究者番号: 10443920

(2)研究分担者

玄 浩一郎 (GEN, Koichiro)

独立行政法人水産総合研究センター・

西海区水産研究所・主任研究員

研究者番号: 80372051