

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(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380103

研究課題名(和文) 魚類の卵黄球および油球形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms involved in formation of yolk granules and lipid droplets in fish

研究代表者

原 彰彦 (Hara, Akihiko)

北海道大学・・・名誉教授

研究者番号：40091483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は魚類の卵黄の主成分である「卵黄球」と「油球」の形成機構を解明しようとするものである。本研究の成果として、卵黄球の由来であるビテロジェニンの性状、並びに油球の由来となるリポ蛋白質群の性状が明らかになると共に、これら成分に対する受容体群(リポ蛋白質受容体)に関して多くの新知見が得られ、魚類卵黄成分の形成に関する複雑な新規モデルを構築し提唱するに至った。これらの成果は、今後、様々な増養殖対象魚の卵成長促進や卵質改善の手掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate mechanisms involved in the formation of "yolk granules/globules (YGs)" and "lipid droplets (LDs)", which are major components of fish egg yolk. Results revealed profiles of YG precursors (vitellogenins) and LD precursors (various lipoproteins), as well as their corresponding ovarian receptors (lipoprotein receptors); these findings resulted in constructing and proposing a novel and complicated model for fish yolk formation, which will also help to progressively regulate oocyte growth and improve egg quality in aquaculture fishes in future.

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：リポ蛋白質 魚類繁殖生理 ビテロジェニン リポ蛋白質受容体 蛋白質相互作用 卵黄形成 油球形
成 卵成長

1. 研究開始当初の背景

魚類の卵細胞は、母魚の血液中から蛋白質・脂質等を取り込む。取り込まれた物質は、「卵黄球」や「油球」として蓄積され、胚や稚魚が育つための栄養として消費される。一般に卵黄球の前駆体は、肝臓で合成されるビテロジェニン (Vg) と呼ばれる血清リポ蛋白質である。一方、油球の主成分は中性脂質で、その由来は Vg ではなく超低密度リポ蛋白質 (Vldl) 等の血清リポ蛋白質であると考えられている。

近年、魚類の「卵黄球」や「油球」は、多数の前駆リポ蛋白質の合成を起点として、受容体等の様々な機能分子を介した蓄積過程を経て形成される、極めて複雑な組成を持つ卵細胞内成分であることが理解されつつある。このような新たに提唱される魚類卵形成モデルを背景に、本研究は特に未解明かつ重要な卵黄ならびに卵脂質形成機構を解明しようとする着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は魚類卵細胞内の主要成分である「卵黄球」と「油球」の形成機構を明らかにすることを目的とした。特に両成分の由来と考えられる血清リポ蛋白質群の同定・定性を起点として、これらの卵への輸送・蓄積機構に関して解析を行った。本研究における当初の解析計画は、以下の様に大別される。

(1) 多型 Vg の合成：Vg の合成機構に関して新規知見を得るため、多型 Vg の転写調節に関与するプロモーター領域を解析する。

(2) 多型 Vg の分類：Vg の多型性について新規知見を得るため、原始的な魚類・円口類における Vg のクローニングと分類を行う。

(3) リポ蛋白質受容体蛋白質の局在：卵巣に発現する複数種のリポ蛋白質受容体の発現局在・性状を把握するため、免疫組織化学的解析を行う。

(4) リポ蛋白質受容体の機能：受容体のリガンド選択性について知見を得るため、組み換え培養細胞を用いたリガンド結合試験を行う。一方、酵母 two hybrid 系 (Y2H) を構築し、リガンド候補を網羅的に探索する。

(5) 卵黄球・油球前駆体候補の生体投与：卵黄球・油球の由来となるリポ蛋白質を同定するため、上記で同定されたアポ蛋白質を含むリポ蛋白質クラスを同定・精製し、実験魚に投与し、卵母細胞への運搬を確認する。

ここで、上記 (4) において計画した Y2H 解析による網羅的リガンド検索については、実際に行ったものの、試験初期段階で、同システムを用いた解析を進めることは困難であると判断した(4.研究成果参照)。上記(5)については、Y2H 解析に依存せず、代替アポリポ蛋白質のクローニングを独自に進め、精製リポ蛋白質クラスの同定を試みた。

3. 研究の方法

実験モデルとして主にカットスロートトラウトを用い、その他、実験に応じて、適宜複数の魚種を用いた。

(1) 魚類多型Vgの合成

カットスロートトラウト・ヌタウナギVg遺

伝子プロモーター領域のクローニング：カットスロートトラウト肝臓から、Vg全長配列をコードする2種のcDNAをクローニングし、各々As及びCタイプと同定した(雑誌論文業績9)。この配列を基にカットスロートの血球より得たゲノム DNA を鋳型に用いてゲノムウォーキング法により各プロモーター領域のゲノム DNA 断片をクローニングした。一方、ヌタウナギでも2種 (Vg1及びVg2) の完全長Vg cDNAをクローニングした(雑誌論文業績8)。これを基に、上記と同様にVg遺伝子プロモーター領域をクローニングした。

(2) 魚類多型 Vg の分類

トラザメ・チョウザメ・ドジョウ Vg の cDNA クローニング：トラザメ Vg と卵黄蛋白質の部分アミノ酸配列を決定し、これを参考にしてトラザメ Vg をコードする完全長 cDNA を得た(雑誌論文業績11)。ドジョウにおいては、成熟雌個体より肝臓試料を得、TA クローニング及び RACE 法を組み合わせた常法により、Vg をコードする完全長 cDNA を得た(雑誌論文業績7)。チョウザメにおいても、エストロジェン処理したアムールチョウザメ肝臓を試料に用い、ドジョウと同様の手法で完全長の Vg cDNA を得た。

(3) リポ蛋白質受容体蛋白質の局在解析

カットスロートトラウト卵巣に発現する3種のリポ蛋白質受容体の cDNA をクローニングした。このうち、2種はVLDL/Vg受容体(Vgr)及びLDL受容体(Ldlr)であり、TAクローニング及びRACE法を組み合わせた常法により完全長cDNAを得た(雑誌論文業績12,13)。また、スズキ科魚類において発見された(雑誌論文業績14)新規受容体(LRX+1タイプと命名)の配列を基に、カットスロートトラウト卵巣を試料として、上記同様の常法を用いてcDNAクローニングを行った。得られた新規受容体は、Lr13+1と命名した。

カットスロートトラウト卵巣に発現するリポ蛋白質受容体に対する抗体の作製：カットスロートトラウト Vgr および Ldlr の組み換え蛋白質を大腸菌発現系にて作製し、これらを抗原として家兔に免疫することで、a-Vgr 受容体及び a-Ldlr 受容体を得た。同様に、Lr13+1 受容体についても組み換え蛋白質の作製を行い、抗体(a-Lr13+1)を作製した。

カットスロートトラウト・マダイ・ヨウジウオ卵巣におけるリポ蛋白質受容体の局在：カットスロートトラウトの Vgr、Ldlr 及び Lr13+1 受容体抗体を用い、免疫組織化学的手法により、同種卵発達に伴う両受容体の局在変化を調べた。同様に、a-Vgr 及び a-Ldlr を用いて、マダイおよびヨウジウオの卵巣を試料として免疫組織化学的手法に供し、これら2種のリポ蛋白質受容体 (Vgr および Ldlr) の卵発達に伴う局在を調べた。

(4) リポ蛋白質受容体の機能解析

Y2H 解析によるリポ蛋白質受容体の網羅的リガンド解析：Y2H 解析は、Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System を用いて行った。卵黄形成中期のカットスロートトラウト雌個体より肝臓試料を得、逆転写産物を

pGADT7-Rec ベクターと共に Y187 酵母に共形質転換したものを Prey ライブラリー酵母とした。一方、カットスロートトラウト Vgr のリガンド結合リピートを pGBKT7 ベクターに挿入し、これを Y2H Gold 酵母に形質転換し、Bait 酵母とした。上記をメイティングし、2 段階で選抜した。得られた 20 クローンをシークエンスし、受容体結合陽性クローン候補を探索した。

組み換え培養細胞を用いたリポ蛋白質受容体の機能解析：以下の発現系を用いてカットスロートトラウト組み換え Vgr (完全長) を発現し機能解析を行った。

昆虫細胞 (Sf-9) での組み換え Vgr 発現では、Bac to Bac システムを用いた。ウイルスストックを感染させ、培養した後、細胞を回収し Vg 結合試験 (リガンドプロット又はバインディングアッセイ; Hiramatsu et al., 2002, Biol. Reprod.) に供した。哺乳類細胞 (293T) 細胞での組み換え受容体発現は pcDNA ベクターを用い、トランスフェクション・培養後に細胞を回収し、上記同様の Vg 結合試験を行った。大腸菌発現系は pMal-c5X ベクターを用い、組み換え受容体を精製した後、上記同様、リガンド結合試験を行った。

一方、マコガレイ Vgr に関しても pcDNA ベクターに導入し、哺乳類細胞 (293T) 及び魚類細胞 (HINAE 及び EPC) を用いて同様な解析を行った。

(5) 卵黄球・油球前駆体候補の生体投与

カットスロートトラウトアポリポ蛋白質 (ApoB 及び ApoE) の cDNA クローニング：カットスロートトラウト肝臓から常法により ApoE 及び ApoB cDNA をクローニングし、pQE 発現ベクターにライゲーションした。

カットスロートトラウト ApoE 及び ApoB 抗体の作製：大腸菌にて上記組み換え蛋白質を作製後、ウサギ抗 ApoE 血清 (a-ApoE) 及び同 ApoB 血清 (a-ApoB) を得た。

カットスロートトラウト血漿リポ蛋白質の精製・同定：カットスロートトラウトの血漿から超遠心法とゲル濾過法を用いて VLDL、Ldl、高密度リポ蛋白質 (Hdl) の分離を行った。各リポ蛋白質は、上記抗体を用いたウェスタンプロットに供し、含有するアポリポ蛋白質を同定した。また、各リポ蛋白質は LC-MS/MS に供した。

カットスロートトラウト血漿リポ蛋白質の標識・生体投与試験：精製リポ蛋白質の脂質部分を (BODIPY FL C₁₆) を用いて標識し、一方、蛋白質部分に Alexa594 を標識したものを用意した。これらを適宜培養カットスロートトラウト卵巣片へ添加し、培養後の蛍光物質の局在を組織学的に観察した。また、これに加え、標識 VLDL をゼブラフィッシュもしくはメダカに生体投与した。

4. 研究成果

(1) 魚類多型 Vg の合成

カットスロートトラウト・ヌタウナギ Vg 遺伝子プロモーター領域のクローニング：カットスロートトラウトにおいて、As タイプの

Vg では異なる 2 つのクローンが得られた。1 つ目は開始コドンより 1,288 bp 上流の塩基配列と開始コドン以降のエクソン・イントロン塩基配列が得られ、2 つ目は開始コドンより 1,114 bp 上流の塩基配列と開始コドン以降のと開始コドン以降のエクソン・イントロン塩基配列が得られた。2 つの VgAs プロモーター領域のうち、1 つには、estrogen responsive element (ERE) のコンセンサス配列と完全に一致する配列が確認されたが、もう 1 つの方には確認できなかった。また、ERE 様の配列は両プロモーターに見られた。さらに、ERE ハーフサイト (1/2ERE) も前者・後者で確認された。両者の相同性は 56.8% であった。

VgC では開始コドンより 1,336 bp 上流の配列、並びに開始コドン以降のエクソンが得られた (Fig. 11)。同プロモーター領域では ERE のコンセンサス配列と完全に一致する配列は確認されなかったが、ERE 様配列は認められ、さらに、1/2ERE も確認された。As タイプと C タイプ Vg のプロモーター間の相同性は 40% 弱であった。

ヌタウナギにおいて、Vg1 では開始コドンより 2,019bp 上流、Vg2 では 2,310bp 上流の配列が明らかとなった。両 Vtg のプロモーター領域は塩基配列において、38.9% の相同性を示した。両塩基配列には、ERE の保存配列は確認されなかったが、ERE 様の配列は認められた。また、本種 Vg の発現解析、さらに ER についてもクローニング・機能解析を進めた (雑誌論文業績 4, 8; 学会等発表業績 2, 6, 7, 9, 12, 17, 22)

(2) 魚類多型 Vg の分類

トラザメ・チョウザメ・ドジョウ Vg の cDNA クローニング：トラザメにおいて、完全長翻訳領域を含む Vg cDNA をクローニングした。(雑誌論文業績 11)。チョウザメにおいて、同様に Vg のクローニングを行った結果、完全長翻訳領域を含む少なくとも 2 タイプの Vg cDNA が得られた。ドジョウにおいて同様に Vg の cDNA クローニングを行った結果、完全長翻訳領域を含む少なくとも 7 種類の Vg cDNA がクローニングされ、これらは大別すると 2 つのサブタイプに分類された (Ao1 タイプと C タイプ) (雑誌論文業績 7)。

(3) リポ蛋白質受容体蛋白質の局在解析

カットスロートトラウト卵巣に発現するリポ蛋白質受容体の cDNA クローニング：cDNA クローニングを行った結果、これまで知見の多い、Vg 受容体 (Vgr)、低密度リポ蛋白質受容体 (Ldlr) の完全長翻訳領域を含む cDNA がクローニングされた (雑誌論文業績 3, 6, 12, 13, 14; 学会等発表業績 5, 13, 16, 19, 21)。これらの受容体はこれまでの知見同様、Vgr は N 末端領域に 8 つ (Lr8 型)、Ldlr は 7 つの同リピート (Lr7 型) を配置していた。また、これまで報告の無い、新規なリポ蛋白質受容体のクローニングに成功し、LrX+1 型と命名した (雑誌論文業績 2, 6, 14; 学会発表業績 5, 15, 20)。尚、今回完全長翻訳領域を含む形でクローニングされた新規受容体は、Lr13+1 と命名した。

カットスロートトラウト卵巣に発現する

リポ蛋白質受容体に対する抗体の作製：各受容体抗体 (a-Vgr, a-Ldlr, a-Lr13+1) を用いて、卵巣の細胞膜抽出物を検出したところ、3種の抗体で異なる免疫陽性パターンが観察され、このうち、a-Vgr 及び a-Lr13+1 で検出された蛋白バンドについては、リガンドプロットにおける VgAs 結合性バンドと一致した (学会発表業績 1, 3, 4)。

カットスロートトラウト・マダイ・ヨウジウオ卵巣におけるリポ蛋白質受容体の局在：カットスロートトラウトにおいて、Vgr は周辺期では卵母細胞質中に均一に分布し、油球期には徐々にその局在を卵母細胞周縁部に移した。卵黄形成期でも、引き続き同周縁部に局在した (雑誌論文業績 2, 3, 6, 13, 14; 学会発表業績 5, 13, 16, 19, 21)。一方、Ldlr は、周辺期で卵母細胞質中に均一に局在し、油球期および卵黄形成期では、卵母細胞膜周縁部、および顆粒膜細胞と卵膜の間 (卵膜周縁部) に局在し、卵膜中では放射状に局在していた。マダイやヨウジウオにおいても、ほぼ同様な局在が確認できた。

(4) リポ蛋白質受容体の機能解析

Y2H 解析によるリポ蛋白質受容体の網羅的リガンド解析：メイティング後、選抜した約 20 個のコロニーから得たプラスミドに、同受容体の既知リガンドである Vg の配列は含まれていなかった。また、リガンド候補と考えられるアポリポ蛋白質に関しても、全く得られなかった。このため、Y2H システムは、少なくとも魚類のリポ蛋白質受容体の網羅的リガンド検索には有効ではない事が明らかとなり、以降の研究手法として用いることを中止した。

組み換え培養細胞を用いたリポ蛋白質受容体の機能解析：本研究課題では、大腸菌・昆虫細胞・昆虫細胞の全ての組み換え受容体発現系にて、組み換え Vgr の発現は確認されたものの、Vg の結合性を持たないことが明らかとなった。また、魚類細胞では、発現量が極めて少ない、もしくは発現しないという結果が得られた。以上、4 種類の組み換え蛋白質発現系を用いたものの、機能的な Vgr の作製には至らなかった。

(5) 卵黄球・油球前駆体候補の生体投与

カットスロートトラウトアポリポ蛋白質 (ApoB 及び ApoE) の cDNA クローニング：カットスロートトラウト肝臓から、完全長の翻訳領域を含む ApoE の cDNA クローニングに成功した。また、ApoB をコードする部分配列を得た。

カットスロートトラウト ApoE 及び ApoB に対する抗体の作製：各リポ蛋白質をカットスロートトラウトから精製し、ウェスタンブロットに供した結果、a-ApoE を用いた場合、VLDL にのみ 25 kDa の位置に ApoE と思われる陽性反応が観察された。a-ApoB では明瞭な免疫陽性反応は確認できなかった。

カットスロートトラウト血漿リポ蛋白質の精製・同定：LC-MS/MS 解析の結果、VLDL ではカットスロート ApoE、LDL ではカットス

ロート ApoB、HDL ではニジマス ApoAI-1 が最も高い値を示した。

カットスロートトラウト血漿リポ蛋白質の標識・生体投与試験：カットスロートトラウトの培養卵濾胞に蛍光標識した各種精製リポ蛋白質を添加した結果、特に Vldl において、脂質部分が卵母細胞内へ顆粒状に取り込まれた。一方、同蛋白質の蛋白質部分は、卵母細胞には取り込まれなかった。更に、脂質部位と蛋白質部位を異なる蛍光物質でダブルラベルした Vldl をメダカとゼブラフィッシュに生体投与したところ、メダカではカットスロートトラウトの卵巣同様に、脂質のみが卵母細胞内に取り込まれた。一方、ゼブラフィッシュでは、脂質と蛋白質の両方が卵母細胞内に取り込まれた。

本研究の目的であった「卵黄球」と「油球」の形成機構について、両成分の由来と考えられる血清リポ蛋白質群の同定・定性、並びにこれらの卵への輸送・蓄積に関する受容体群について、数々の新規知見が得られた。特に、魚類の多型 Vg の転写調節に関するプロモーター領域の解析、原始的な魚類・円口類における Vg の多型性、卵巣に発現する新たなリポ蛋白質受容体の発見と発現局在・性状解析、卵黄球・油球の由来となるリポ蛋白質の同定については、これまで報告が無く、世界に先駆けた研究成果となった。これらの成果は学術的に高く評価され、学会賞受賞 (雑誌論文業績 1, 6) につながった。今後、更に同研究分野の知見を深めることで、良質な卵を作るメカニズムが明らかになり、より効率の良い種苗生産技術の開発に寄与すると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

< 査読無し >

原彰彦 (2013) 「魚類の卵形成タンパク質に関する免疫生化学的研究」、日本水産学会誌 79(3): 300-310.

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

Hiramatsu, N. 他 6 名 (1, 4, 7 番目) (2011). A novel class of ovarian lipoprotein receptor in cutthroat trout: molecular cloning and expression analysis. *Indian J. Sci. Technol.* 9th ISRPF Issue, 4 (S8): 157-158. <http://www.indjst.org/>.

Mizuta, H. 他 8 名 (2, 3, 8 番目) (2011). Molecular cloning and localization of two classical ovarian lipoprotein receptors in cutthroat trout *Oncorhynchus clarki*. *Indian J. Sci. Technol.* 9th ISRPF Issue, 4 (S8): 192-193. <http://www.indjst.org/>.

Nishimiya, O. 他 8 名 (3, 5, 9 番目) (2011). Molecular characterization and expression analysis of estrogen receptor and vitellogenins in inshore hagfish (*Eptatretus burgeri*). *Indian J. Sci. Technol.* 9th ISRPF Issue, 4 (S8):

194-195. <http://www.indjst.org/>.
Ryu, Y. 他 9 名 (7, 8, 10 番目) (2011). Expression of genes involved in oocyte lipidation in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*. Indian J. Sci. Technol. 9th ISRPF Issue, 4 (S8): 203-204. <http://www.indjst.org/>.
平松尚志 (2010) 「魚類の卵形成に關する卵黄前駆物質およびその受容体に關する研究」、日本水産学会誌、76(4): 613-616.
<http://www.miyagi.kopas.co.jp/JSFS/kaishi.html>.
< 査読あり >
Wu, M. 他 6 名 (5, 6, 7 番目) (2014). Molecular cloning and characterization of the expression profiles of vitellogenin transcripts in the Dojo loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) in response to 17 α -estradiol administration. Zool. Sci. 31(4): 202-212. DOI: 10.2108/zs130223.
Nishimiya, O. 他 5 名 (3, 5, 6 番目) (2014). Biochemical and immunochemical characterization of two discrete vitellogenin proteins and their derived lipovitellins in the inshore hagfish (*Eptatretus burgeri*). Zool. Sci. 31(4):251-257. DOI:10.2108/zs130234.
筵平裕次 他 8 名 (7, 8, 9 番目) (2013) 「カッスロートトラウト *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>.
Ryu, Y.W. 他 7 名 (5, 6, 8 番目) (2013). Molecular Cloning and Transcript Expression of Genes Encoding Two Types of Lipoprotein Lipase in the Ovary of Cutthroat Trout, (*Oncorhynchus clarki*). Zool. Sci., 39(2): 224-237. DOI: 10.2108/zsj.30.224.
Yamane, K. 他 9 名 (7, 8, 10 番目) (2013). Characterization of vitellogenin and its derived yolk proteins in cloudy catshark (*Scyliorhinus torazame*) Fish Physiol. Biochem., 39: 373-390. DOI: 10.1007/s10695-012-9706-1.
Luo, W. 他 8 名 (5, 6, 9 番目) (2013). Molecular cloning and characterization of an ovarian receptor with seven ligand binding repeats, an orthologue of low-density lipoprotein receptor in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). Comp. Biochem. Physiol. Part A 166(2):263-271. DOI:10.1016/j.cbpa.2013.06.026.
Mizuta, H. 他 8 名 (5, 6, 9 番目) (2013). Ovarian expression and localization of a vitellogenin receptor with eight ligand binding repeats in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). Comp. Biochem. Physiol. Part B 166(1): 81-90.

DOI: 10.1016/j.cbpb.2013.07.005.
Hiramatsu, N. 他 8 名 (1, 8, 9 番目) (2013). Multiple ovarian lipoprotein receptors in teleosts. Fish Physiol. Biochem. 39: 29-32.
DOI: 10.1007/s10695-012-9612-6.

[学会発表] (計 22 件)

筵平裕次 他 5 名 (4, 5, 6 番目) 「カッスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) の卵巣に発現するリポ蛋白質受容体とそのリガンドの探索」、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 27 日-31 日、北海道大学水産学部、函館
西宮攻 他 5 名 (4, 5, 6 番目) 「ヌタウナギの 2 種エストロジェン受容体の機能解析」H25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26-30 日、東京海洋大学、東京
筵平裕次 他 5 名 (4, 5, 6 番目) 「サケ科魚類のビテロジェニンに結合するリポ蛋白質受容体の探索と性状解析」H25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26-30 日、東京海洋大学、東京
Mushirobira, Y. 他 5 名 (4, 5, 6 番目) Ligand binding properties of ovarian lipoprotein receptors in the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). The 10th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, November 18-20, 2013, Jeju National University, Jeju, Korea.
Hiramatsu, N. 他 9 名 (1, 9, 10 番目) Yolk formation in fish: Multiple vitellogenins and their receptors. Diversification in Inland Finfish Aquaculture II (DIFAIL) September 24-26, 2013, University of South Bohemia, Vodnany, Czech Republic.
Nishimiya, O. 他 5 名 (4, 5, 6 番目) Molecular cloning and characterization of estrogen receptors from the most primitive vertebrate, the inshore hagfish *Eptatretus burgeri*. 17th International Congress of Comparative Endocrinology, September 15-19, 2013, Barcelona University, Barcelona, Spain.
Nishimiya O. 他 5 名 (4, 5, 6 番目) Molecular cloning and characterization of two estrogen receptor subtypes from a hagfish, *Eptatretus burgeri*. The 9th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, December 19-21, 2012, Tokyo, Japan.
Mushirobira Y. 他 8 名 (7, 8, 9 番目) 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, December 19-21, 2012, Tokyo, Japan.

西宮攻 他 5 名 (4, 5, 6 番目) 「ヌタウナギの 2 種ビテロジェニン遺伝子および 2 種エストロジェン受容体遺伝子の発現解析」、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 26 日-30 日、東京海洋大学、東京

水田紘子 他 3 名 (2, 3, 4 番目) 「カットスロートトラウトにおける常染色体劣性高コレステロール血症原因蛋白質 (ARH) の cDNA クローニング及び遺伝子発現解析」、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 26 日-30 日、東京海洋大学、東京

荻平裕次 他 7 名 (6, 7, 8 番目) 「カットスロートトラウト (*Oncorhynchus clarki*) における 2 型ビテロジェニン遺伝子の発現解析」、平成 23 年度日本水産学会北海道支部大会、2011 年 11 月 25 日-26 日、北海道大学水産学部、函館

西宮攻 他 5 名 (4, 5, 6 番目) 「ヌタウナギにおける 2 種エストロジェン受容体の cDNA クローニングおよび発現解析」、平成 23 年度日本水産学会北海道支部大会、2011 年 11 月 25 日-26 日、北海道大学水産学部、函館

水田紘子 他 4 名 (3, 4, 5 番目) 「カットスロートトラウト卵巣におけるリポ蛋白質受容体の局在解析」、平成 23 年度日本水産学会北海道支部大会、2011 年 11 月 25 日-26 日、北海道大学水産学部、函館

Mushirobira, Y. 他 7 名 (6, 7, 8 番目) Dual vitellogenins in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*): molecular cloning, structural characterization, and changes in hepatic expression during reproductive cycle. The 8th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea. October 27-29, 2011, Nagasaki, Japan.

Hiramatsu, N. 他 6 名 (1, 4, 7 番目) A novel class of ovarian lipoprotein receptor in cutthroat trout: molecular cloning and expression analysis. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, August 9-14, 2011, Cochin, India.

Mizuta, H. 他 8 名 (2, 3, 9 番目) Molecular cloning and localization of two classical ovarian lipoprotein receptors in cutthroat trout *Oncorhynchus clarki*. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, August 9-14, 2011, Cochin, India.

Nishimiya, O. 他 8 名 (3, 5, 9 番目) Molecular characterization and expression analysis of estrogen receptor and vitellogenins in inshore hagfish (*Eptatretus burgeri*). 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish,

August 9-14, 2011, Cochin, India.

Ryu, Y. 他 9 名 (7, 8, 10 番目) Expression of genes involved in oocyte lipidation in cutthroat trout, *Oncorhynchus clarki*. 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, August 9-14, 2011, Cochin, India.

Mizuta H. 他 4 名 (2, 3, 5 番目) Expression and localization of two ovarian lipoprotein receptor proteins in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*). The 10th Joint Seminar between Japan and Korea by Core Univ. Program on Fisheries Sciences, 2010, December 8-10, Hakodate, Japan.

Luo W. 他 5 名 (2, 3, 6 番目) Molecular cloning and expression analysis of a novel ovarian lipoprotein receptor in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). 7th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, November 17-19, 2010, Jeju National University, Jeju, Korea.

21 Mizuta H. 他 3 名 (2, 3, 4 番目) 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, November 17-19, 2010, Jeju National University, Jeju, Korea.

22 Nishimiya O. 他 5 名 (3, 5, 6 番目) Molecular characterization of hagfish (*Eptatretus burgeri*) estrogen receptor (ER). 7th International Meeting on Reproductive Biology of Aquatic Animals of the East China Sea, November 17-19, 2010, Jeju National University, Jeju, Korea.

〔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

原 彰彦 (HARA, Akihiko)
北海道大学・名誉教授
研究者番号: 40091483

(2) 研究分担者

東藤 孝 (TODO, Takashi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・
准教授
研究者番号: 60303111

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