

ブリ養成親魚からの卵黄前駆体タンパク (ビテロジェニン) の検出

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2025-06-25
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 浜田, 和久, 虫明, 敬一, 征矢野, 清, 原, 彰彦
	メールアドレス:
URL	所属:
	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014777

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



ブリ養成親魚からの卵黄前駆体タンパク（ビテロジェニン）の検出

浜田和久^{*1}・虫明敬一^{*2}・征矢野 清^{*3}・原 彰彦^{*4}

（*1 養殖研究所栽培技術開発センター古満日分場, *2 養殖研究所栽培技術開発センター,
*3 長崎大学, *4 北海道大学大学院）

放流用あるいは養殖用を問わず、人工種苗を計画的かつ安定的に生産するための基本は、健全な卵を大量かつ安定的に確保することにある。そのため、良質卵を大量に採卵するための親魚養成技術が特に重要な意義を持っている。採卵用親魚の養成においては、日常の管理はもとより定期的な成熟状況の把握が、採卵適期を把握する上でも重要な要素となる。これまで親魚の成熟状況の把握では、カニューレーションによる卵巣卵径の観察・測定が最も一般的で多用されてきている。しかし、この手法はある程度成熟した親魚にしか使用できないこと、ハンドリングに伴い親魚に過度のストレス負荷をかけて成熟の阻害要因となること、あるいはハタ類で認められるような産卵を阻害する卵塊形成の要因になること等が指摘されている¹⁾。このため、親魚の成熟状況を判定する新たな技術が必要とされている。

本研究では、卵黄形成期の雌親魚の血中に特異的に出現する卵黄前駆体タンパク（ビテロジェニン、以下VTG）に着目し、このタンパク質濃度を定量して生殖腺の発達段階との関連を調査することにより、親魚の新たな成熟の指標として活用が可能か否かを検討した。対象種には、我が国の代表的な養殖対象種であるブリ *Seriola quinqueradiata* を用いた。

材 料 と 方 法

供試親魚 2000年11月に長崎県内の養殖業者から購入したブリ成魚（2歳魚）を五島栽培漁業センターの海面小割生簀（直径10m×深さ8m）に収容して養成した。2001年12月11日に養成親魚群のうち22尾（♂：♀=11：11）を別の小割生簀（5m×5m×深さ5m）に収容して本試験を開始した。飼料には市販の配合飼料（ハマチソフトドライペレット、坂本飼料製）を週に3回の頻度で毎回総魚体重の約3%を目安に給餌した。この間、体表に寄生する単生虫類（特に *Benedenia seriola*）は、定期的な網生簀の交換の際に約5分間の淡水浴により駆虫した。なお、各供試親魚にはあらかじめ親魚の背部筋肉内に装着したピットタグ（MPR製、長さ18mm×直径2.1mm）を装着して個体識別した。

成熟調査と採血 成熟調査は、雌親魚については生

殖孔からカニューレを挿入して卵巣卵の一部を採取し、万能投影機（V-12、ニコン製）により最大卵径を有する30粒を測定して平均値を求め、その値をその個体の平均卵巣卵径とした。また、採血は、尾柄部（尾静脈）から20Gの注射針を装着したディスプレイリングを用いて約2mL採取した。得られた血液は試験管に移し、4℃で1晩静置した後、遠心分離（3,000rpm, 15分, 4℃）により血清を分離し、測定に供するまで-80℃で凍結保存した。調査は2001年12月11日からほぼ1ヵ月間隔で2002年12月まで継続した。

ブリのVTG精製および検出系 まず、五島栽培漁業センターの海面小割生簀で養成中の天然魚由来のブリ養成親魚（5歳魚）を用いて、ブリのVTGに対するウサギ抗体（以下単に抗体）の作製に必要な高濃度のVTGを入手するため、ブリ体内でVTGを誘導させることに着手した。すなわち、ブリ親魚にプロピレングリコールで溶解したエストラジオール-17 β （以下、E₂）を10mg/g・BWとなるように背部筋肉内に注射した。E₂投与は3日間隔で計3回繰り返し、最終投与から3日目に全量採血した。得られた血液は直ちに遠心分離（3,000rpm, 15分, 4℃）して血漿を分離し、精製を行うまで-80℃で保存した。次にこれらの血漿を用いて、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびセファロース6Bゲル濾過クロマトグラフィーを用いてVTGの分離精製を行い、高濃度のVTGを作製した²⁾。その後、外注（タカラバイオ）によりブリVTGに対するウサギの抗体を作製した。

VTGの検出にはオクタロニー法（寒天ゲル内二重拡散法）を用いた³⁾。すなわち、アガロースA（Pharmacia社製）をPBS緩衝液で加熱溶解してゲルプレート（ゲルの厚さが約1.2mm）を作製し、このプレートに直径約2mmの穴を開け、中央の穴には抗体を2 μ L、周りの穴にはそれぞれサンプルとなるブリの血清を個体別に約2 μ L添加した。その後、室温で約18時間反応させ、血清と抗体との抗原抗体反応により生じた沈降線の有無を肉眼で確認した（写真1）。また、オクタロニー法でのVTG濃度の定量化を試みるため、0.9%生理食塩水を用いてブリ血清を256倍まで希釈した2倍希釈系列を作製した。そして、ゲル中の沈降線の有無を肉眼で確認し、沈降線が確認された最高希釈倍率から逆算して元の血中VTG濃度を算出した。

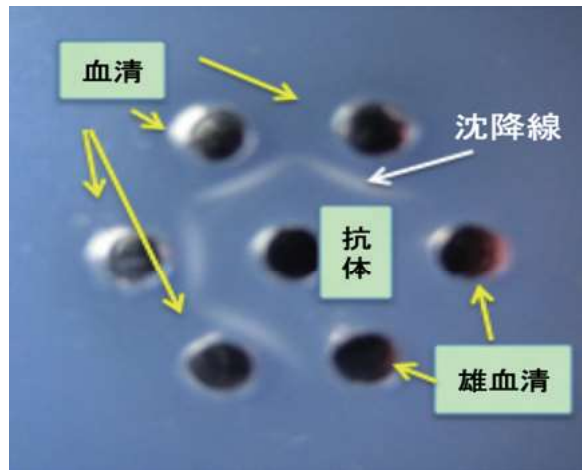


写真1 オクタロニー法での VTG 検出

結 果

成熟調査 ブリ養成親魚の卵巢卵径は、1月から徐々に増大し始め、4月の調査では平均卵巢卵径 $700.9 \pm 41.9 \mu\text{m}$ の最大値を示した。その後、排卵が認められるとともに、退行変性卵が出現して卵巢卵径は小型化し、その傾向は年末まで継続した(図1)。卵巢卵径の変動傾向は、ブリ養成親魚の産卵期とよく一致した。

VTGの検出 試験を開始した2001年12月では、試験に供した各個体の平均卵巢卵径は $120 \sim 150 \mu\text{m}$ (周辺仁期)であったが、その時点で得られた血清をオクタロニー法によりブリ VTG と抗体との交叉性を調べることで VTG の検出を試みたが、いずれの個体でも抗原抗体反応の副産物である沈降線は認められなかった。

その後、1月から4月までの調査においては、いずれの個体でもオクタロニー法による沈降線の形成が認められ、親魚体内での VTG の分泌が確認でき、雌親魚における卵黄形成の開始を示唆していることが判明した。排卵あるいは卵巢卵が退行変性した5月では、雌11尾中6尾から VTG が検出されたが、その後、6月以降12月まで全ての雌の個体で VTG は検出されなかった。また、試験開始から終了までの間、雄親魚ではいずれの個体からも VTG は検出されなかった。

次に、3月(平均卵巢卵径: $465.2 \pm 79.9 \mu\text{m}$)および4月(同: $700.9 \pm 41.9 \mu\text{m}$)の調査で得られた VTG を含む血清の2倍希釈系列を作製し、オクタロニー法で VTG 濃度を推定した結果、ある程度の個体差は認められるものの、平均卵巢卵径が小さい3月の方が4月と比較して、高い希釈倍率でも検出される、すなわち、元の血中 VTG 濃度が高い結果が得られた(図2)。

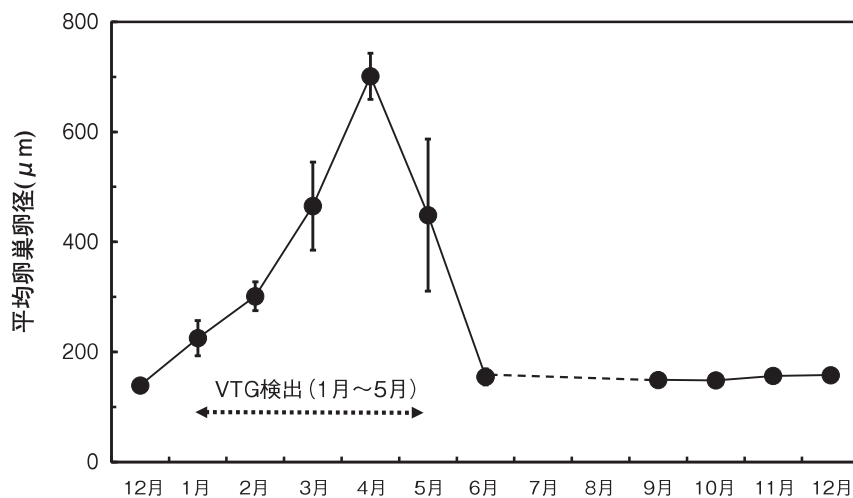


図1 ブリ養成親魚の卵巢卵径の変動と VTG 検出

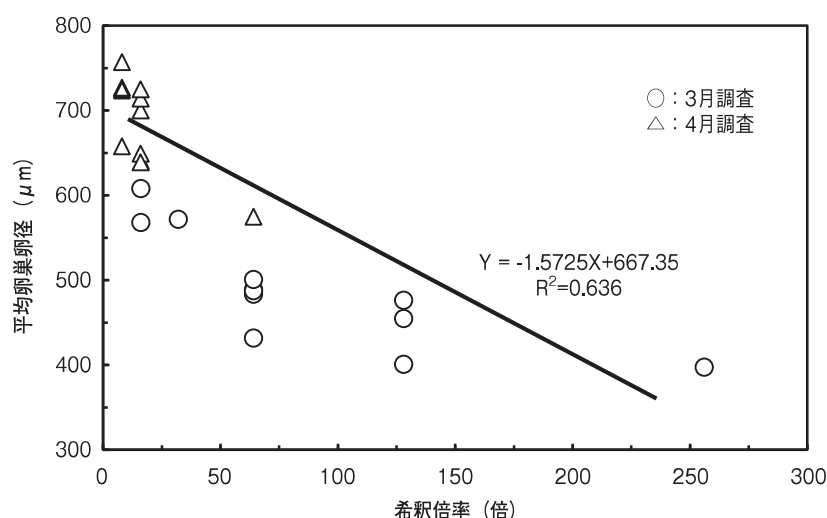


図2 プリ養成親魚の卵巣卵径と VTG 濃度

考 察

卵巣卵径の増大傾向とともにプリの血中からも VTG が検出されるようになり、プリにおいても VTG 濃度は親魚の卵成熟の進行に伴って増加することが確認された。卵の発達段階および生殖周期に伴う血中 VTG の変化に関しては、これまでサケ科魚類等の淡水魚を中心に多くの研究や調査がなされてきた⁴⁻⁷⁾。プリ養成親魚においても血中ステロイドホルモンと VTG の相関性について報告されており⁸⁾、本研究においても卵黄形成の開始により卵黄胞期の卵母細胞が出現し、血中より VTG が検出されるようになり、その一方で排卵や退化変性卵の出現により VTG が検出される個体が減少した。これらの結果は既報の結果⁸⁾と一致した。また、平均卵巣卵径が $465.2 \pm 79.9 \mu\text{m}$ の3月と同 $700.9 \pm 41.9 \mu\text{m}$ の4月において、平均卵巣卵径が小さい3月の方が平均卵巣卵径の大きい4月よりも血中の VTG 濃度が高い結果が得られた。VTG は成熟が進行している、すなわち、卵黄形成が活発に行われている時に血液中に多量に分泌され、卵内に取り込まれると言われており⁴⁾、卵巣卵径が $500 \mu\text{m}$ 前後は、第2次卵黄球期ならびに第3次卵黄球期の卵の発生段階であり、最も卵黄形成が活発な時期である。一方、卵巣卵径 $700 \mu\text{m}$ 前後では、第3次卵黄球期と完熟期の卵の発生段階であり、卵黄形成はほぼ終了していると考えられる。従って、プリにおいても平均卵巣卵径の小さな3月が平均卵巣卵径の大きい4月よりも多くに血液中に分泌しており、VTG 濃度が高かったものと考えられた。以上の結果より、VTG 濃度の動態変化はプリの性成熟や産卵期を繁殖生理学的に裏付ける上で重要な指標になり得ると考えられた。

今回 VTG 検出に用いたオクタロニー法は、操作が

簡便で特別な設備等を必要とせず、現場サイドには大きなメリットを有するが、定量的な VTG の測定には不向きである。そこで、定量的な測定が可能なマンシーニ法（寒天ゲル内一元放射免疫拡散法）や微量の濃度でも検出可能でデータが客観的に数値化できる酵素抗体法（enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA）による測定系の開発が必要である。また、ELISA を活用することでオクタロニー法では検出不可能であった微量な VTG 濃度でも検出することが期待できるため、より早い成長段階での雌雄判別にも効力を発揮するものと思われる。さらには、ステロイドホルモン等の分析により魚類の卵形成機構ならびに性成熟過程を総合的に把握できると考えられる。今後、親魚から採血することなく、例えば、体表粘液中にも存在する VTG の検出が可能になれば、より親魚にストレス負荷をかけない成熟判定あるいは早期の雌雄判別手法の開発も可能となるであろう。

文 献

- 1) 堀田卓朗・今泉 均・河野一利・山崎哲男 (2003) クエ卵巣内に残留した卵塊の摘出と成熟への影響. 栽培漁業技術開発研究. **31**, 1-4
- 2) 原 彰彦・松原孝博・実吉峯郎・高野和則 (1984) アメマスのビテロゲニンと卵黄蛋白. 北大水産彙報. **35**, 144-153.
- 3) 原 彰彦 (1998) 魚の血液で環境ホルモン汚染をみる. 科学. **68**, 591-596
- 4) 原 彰彦 (2001) 魚類の卵形成と雌特異蛋白質 ビテロジェニン. 化学と生物. **39**, 29-36
- 5) Copeland, P. A. and Thomas, P (1988) The measurement of plasma vitellogenin levels in a

- marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 311-314.
- 6) Takemura, A., Hara, A. and Takao, K (1991) Immunochemical identification and partial characterization of female specific serum protein in white-edged rockfish. *Sebastes taczanowskii*. *Envir. Biol.Fish.*, **30**, 49-56.
- 7) Matsubara, T., Satoshi, H., Wada, T., Soyano, K. and Hara, A (1995) Seasonal changes in serum levels of vitellogenin and estradiol-17 β related to sexual maturation in rearing female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst.*, **59**, 19-29.
- 8) 大池数臣・原 彰彦・足立伸次・有元 操・水田 洋之介・長浜嘉孝 (1989) ブリの卵黄形成期における血中ステロイドホルモン並びにビテロゲン量の変動. 南西水研研報, **22**, 1-11.