

特集 魚類ビテロジェニン

魚類繁殖生理とビテロジェニン

松原孝博^{*1§}・大久保信幸^{*1}・澤口小有美^{*1,2}

Physiological Aspects of Vitellogenins in Teleosts

Takahiro Matsubara^{*1§}, Nobuyuki Ohkubo^{*1}, Sayumi Sawaguchi^{*1,2}

要約：内分泌攪乱化学物質の中で、とりわけ雌性ホルモン様の作用を持ち、脊椎動物の生殖に悪影響を与える物質が注目を集めてきた。こうした物質による環境水の汚染と魚類への影響実態を調べる新たな技術として、雄魚の血液中のビテロジェニンを測定する方法が開発され、世界各国の調査で使用されてきている。しかしながら、雄の血中ビテロジェニン濃度は、化学物質の水中濃度測定などとは異なり、対象とする魚種のビテロジェニンの特性や、その種の繁殖および生活様式などにより大きな差を生じ、それによる実態評価の不確実性を招く。本章では、影響実態調査に携わる方々のビテロジェニンに関する理解を深め、評価結果の適正化に資する目的で、1. 硬骨魚におけるビテロジェニンの多型の存在、2. ビテロジェニンの生化学的特性と遺伝子から推定される構造、3. ビテロジェニンの生殖生理学的な役割、4. 雌の成熟に伴う血中濃度の季節的変化、5. エストロジェン様内分泌攪乱化学物質によるビテロジェニン合成の誘導に関する化学物質の血中濃縮作用、6. 雄血中ビテロジェニンに基づく影響評価の際の留意点について論じた。

はじめに

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）は、ヒトをはじめ動物の内分泌系に悪影響を及ぼし、健康や生命現象に被害を与えることから新たな環境汚染として1990年代から世界的規模の社会問題としてクローズアップされるようになった。ホルモンは通常、極めて低い濃度で生理作用を引き起こす。そのため、内分泌攪乱化学物質も非常に微量で作用し、その影響も生命に支障をきたす毒性物質とは異なり、すぐに表立って現われない。こうした特性から内分泌攪乱化学物質の検査法や影響評価法には、従来なかった新たな視点からの手法が求められた。内分泌攪乱化学物質の中で、雌性ホルモン（エストロジェン）様の作用を持ち、ヒトをはじめ広く脊椎動物の生殖を脅かす物質が注目を

集めた（カーソン、1964；コルボーンら、1997参照）。これら雌性ホルモン様の内分泌攪乱化学物質（以下では環境エストロジェンと呼ぶ）による環境水のエストロジェン作用の強度を調べるために、雄魚の血液中のビテロジェニン（vitellogenin: Vg）を測定することによる影響評価技術がイギリスのブルネル大学サンプター教授のグループによりニジマスで開発された（Sumpter, 1997）。この方法は、イギリスの河川や下水処理施設での羊毛洗剤に由来するノニルフェノールなどの影響を調査する際に活躍したのを皮切りに世界中でその技術が利用されるに至った。

ビテロジェニンは卵黄タンパクの前駆タンパクで、本来は成熟期の雌の血液中には見られる。正常な状態では、発達を開始した卵巣で合成される雌性ホルモンが肝臓にあるエストロジェン受容体を仲介して、そこでビテロジェニン合成を誘導する。

(2008年1月21日受付, 2008年2月28日受理)

*1 独立行政法人水産総合研究センター北海道区水産研究所海区水産業研究部資源培養研究室
(〒085-0802 北海道釧路市桂恋116)

§ E-mail : sadachan@fra.affrc.go.jp

*2 独立行政法人日本学術振興会 特別研究員 (〒102-8471 東京都千代田区麹町5-3-1)

作られたビテロジェニンは血液を通して卵巣へ運ばれ、発達中の卵母細胞に取り込まれる。一方、雌性ホルモン様の環境エストロジェンの影響を受けた雄や未熟雌魚でも同様に、肝臓でのビテロジェニンの合成が見られる。血液中に放出されたビテロジェニンは、受け入れ先である卵母細胞がないため血液中に留まり、さらにビテロジェニンの分解が遅いことから血液中に蓄積される。この現象により、雄では合成に比して、見かけ上高い濃度で血液中に存在することから、これを測定することで環境エストロジェンの影響を鋭敏に検出することができる。

日本国内においても河川や海域の魚類を対象とした多くの影響実態調査で、雄血中ビテロジェニンの測定が行われてきた。水産総合研究センター北海道区水産研究所においても、沿岸域の海産魚類を中心にビテロジェニンの測定系の開発や、それによる野生の魚の雄血中ビテロジェニンの測定を実施してきた。また、我々は魚類の増養殖における種苗生産技術の向上の観点から、ビテロジェニンと卵黄タンパクに関する基盤的研究を続けている。この章では、そのような背景をもとに、内分泌攪乱化学物質の影響評価に携わる方々に理解を深めていただく一助として、魚類のビテロジェニンの性状と役割について、主に我々と共同研究グループの最近の研究成果を中心に記述した。

1. ビテロジェニンの多型

原ら (1984) はビテロジェニンの持つ特徴からこのタンパクを特定する条件として次の項目を挙げている。(1) 卵黄形成期の雌血清中に特異的に出現するタンパクである、(2) 雄および未熟雌にエストロジェンを投与することによって血中に誘導される、(3) カルシウム、鉄を結合する glycolipophosphoprotein で、高分子の複合タンパクである、(4) 魚卵抽出液を免疫して得られた抗血清と反応する卵黄タンパクの前駆物質である。この定義はビテロジェニンの検出や精製を行う際には極めて有用な指標となってきた。しかしながら、1990年代前半までは、魚類には1種類のビテロジェニンしか見いだされておらず、上記の定義も魚類に見られる主要なビテロジェニンを対象としている。鳥類 (Wang and Williams, 1980; Wang *et al.*, 1983) や両生類 (Wiley and Wallace, 1978) では1980年代までに複数のビテロジェニン遺伝子とその産物が見つかったが、魚類では10年以上遅れて

LaFleur らによってマミチヨグ *Fundulus heteroclitus* で VgI, VgII の2つの遺伝子が存在することが報告された (LaFleur *et al.*, 1995a; LaFleur *et al.*, 1995b; LaFleur *et al.*, 2005)。その後、我々はマツカワ *Verasper moseri* でマミチヨグの VgI, VgII に対応するビテロジェニン (VgA と VgB) とその派生物である卵黄タンパクを見出した (Matsubara *et al.*, 1999)。マミチヨグやマツカワは魚類の中で最も種類が多い棘鰭上目に属するが、タラの仲間を含む側棘鰭上目においてもハドック *Melanogrammus aeglefinus* (Reith *et al.*, 2001) やスケトウダラ *Theragra chalcogramma* (Matsubara *et al.*, 2000) で VgA, VgB の遺伝子やタンパクが見ついている。それらに対して、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* のビテロジェニン (Mouchel *et al.*, 1996) やニホンウナギ *Anguilla japonica* の VgI (Okumura *et al.*, 1995), Vg2 (GenBank: AY423444) では、VgA と VgB のような大きな違いが認められないビテロジェニンが複数見られるが、それらの位置づけは明瞭ではない。

これらマツカワなどの VgA (VgI) と VgB (VgII) や、ニジマスのビテロジェニンなどは、後で述べるように鳥類や両生類のビテロジェニンと類似したサイズと構造を持つのに対し、それらよりも小さく、また内部構造が不完全なビテロジェニン遺伝子がゼブラフィッシュ *Danio rerio* で発見された (Wang *et al.*, 2000)。これは内部にホスピチン (phosvitin) を持たないことからホスピチンレス (phosvitinless) ビテロジェニンと名付けられている。我々も、マハゼ *Acanthogobius flavimanus* で通常のビテロジェニン (Vg-530) とホスピチンレスビテロジェニン (Vg-320) の2種類の遺伝子と血中のタンパクが存在することを見出し (Ohkubo *et al.*, 2003a; 2004)、環境エストロジェンの影響評価では、それら双方を利用した酵素免疫測定法 (ELISA) により二重チェックを行い、信頼度の高い評価を実現している (Ohkubo *et al.*, 2003b)。棘鰭上目の魚類に、VgA と VgB に加えてホスピチンレスビテロジェニンとされる VgC の3型目のビテロジェニンが存在するか否かが検討され、ホワイトパーチ *Morone americana* (Hiramatsu *et al.*, 2002b) で3型のタンパクが、カダヤシ *Gambusia affinis* (Sawaguchi *et al.*, 2005)、マダイ *Pagrus major* (Sawaguchi *et al.*, 2006a)、ボラ *Mugil cephalus* (Amano *et al.*, 2007a) で3型の遺伝子とタンパクが検出された。

Acanthopterygii	VgA	VgB	VgC	
Barfin flounder <i>Verasper moseri</i>	●	●	●	VgA, VgB: Matsubara <i>et al.</i> , 1999 VgC: Matsubara <i>et al.</i> , unpublished data
Mosquitofish <i>Gambusia affinis</i>	●	●	●	Sawaguchi <i>et al.</i> , 2005
Mummichog <i>Fundulus heteroclitus</i>	●	●	-	LaFleur <i>et al.</i> , 1995a; 1995b; 2005
Red seabream <i>Pagrus major</i>	●	●	●	Sawaguchi <i>et al.</i> , 2006a
White perch <i>Morone americana</i>	●	●	●	Hiramatsu <i>et al.</i> , 2002b
Grey mullet <i>Mugil cephalus</i>	●	●	●	Amano <i>et al.</i> , 2007a
Japanese goby <i>Acanthogobius flavimanus</i>	●	-	●	Ohkubo <i>et al.</i> , 2003a

Paracanthopterygii				
Haddock <i>Melanogrammus aeglefinus</i>	●	●	-	Reith <i>et al.</i> , 2001
Walleye Pollack <i>Theragra chalcogramma</i>	●	●	●	VgA, VgB: Matsubara <i>et al.</i> , 2000 VgC: Matsubara <i>et al.</i> , unpublished data

	Vgs		VgC	
Rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	● ●	-	●	Mouchel <i>et al.</i> , 1996
Zebrafish <i>Danio rerio</i>	●	-	●	Wang <i>et al.</i> , 2000
Japanese eel <i>Anguilla japonica</i>	● ●	-	●	Okumura <i>et al.</i> , 1995 VgC: Matsubara <i>et al.</i> , unpublished data

Fig. 1 Classification of multiple forms of vitellogenin in teleost species. Vg: vitellogenin, VgC: phosvitinless vitellogenin, Vgs: vitellogenins with complete domain structure but not classified into VgA or VgB.

分類群の異なる魚種から3型のビテロジェニンが見出されていることから、これらのビテロジェニンは棘鱗上目に広く共通して存在すると考えられる。魚類のビテロジェニンの多型についてはFig. 1にまとめた。魚類を含めた卵生脊椎動物のビテロジェニンに多型が生じた原因については、染色体の倍加に起因する可能性が論じられている(Finn and Kristoffersen, 2007)。

2. ビテロジェニンの構造

魚類ビテロジェニンの遺伝子分析結果と卵黄タンパクの電気泳動分析およびN-末端アミノ酸配列分析の結果から、ビテロジェニン内部の卵黄タンパクドメイン構造が明らかにされている(Hiramatsu *et al.*, 2002a; Matsubara *et al.*, 2003)。カダヤシを例にFig. 2に示したようにVgA, VgBを含む通常のビテロジェニンはアミノ末端側から順にリポビテリン重鎖 (lipovitellin heavy chain: LvH) - ホスピチン (phosvitin: Pv) - リポビテリン軽鎖 (lipovitellin light chain: LvL) - β'-成分 (β'-

component: βc) - C-末端成分 (C-terminal component: Ct) を含む。このように類似した内部構造を持ちながらもVgAとVgB間のアミノ酸の相同性は高くはなく、例えばカダヤシでは46% (Sawaguchi *et al.*, 2005), マダイでは60% (Sawaguchi *et al.*, 2006a)である (Table. 1)。一方、異なる種間であっても、カダヤシとマダイのVgA間の相同性は61%, VgB間は62%と高い。これは、後で述べるVgAとVgBの機能の分化と密接に関係しているものと思われる。

VgA, VgBまたはニジマスなどのビテロジェニン (VgA, VgBと構造やサイズが類似するが、どちらにも分類できないビテロジェニン) とは異なり、VgCの内部にはセリンを多く含んだホスピチンの領域が存在せず、LvL以降の領域も短縮されている (Fig. 2)。全体のサイズもカダヤシを例にとるとVgAがアミノ酸1,695残基 (シグナルペプチド15残基を含む), VgBが1,675残基であるのに対し、VgCは1,242残基と小さい。VgCはこのように内部ドメイン構造が他のビテロジェニンと大

Table 1 Homologies between deduced amino acid sequences of 3 forms of vitellogenin.

		Mosquitofish			Red seabream		
		VgA	VgB	VgC	VgA	VgB	VgC
Mosquitofish	VgA		46%	17%	61%	51%	21%
	VgB			21%	52%	62%	22%
	VgC				20%	21%	58%
Red seabream	VgA					60%	21%
	VgB						22%
	VgC						

Modified from Sawaguchi *et al* (2005, 2006a).

Vg: vitellogenin, VgC: Phosvitinless Vg.

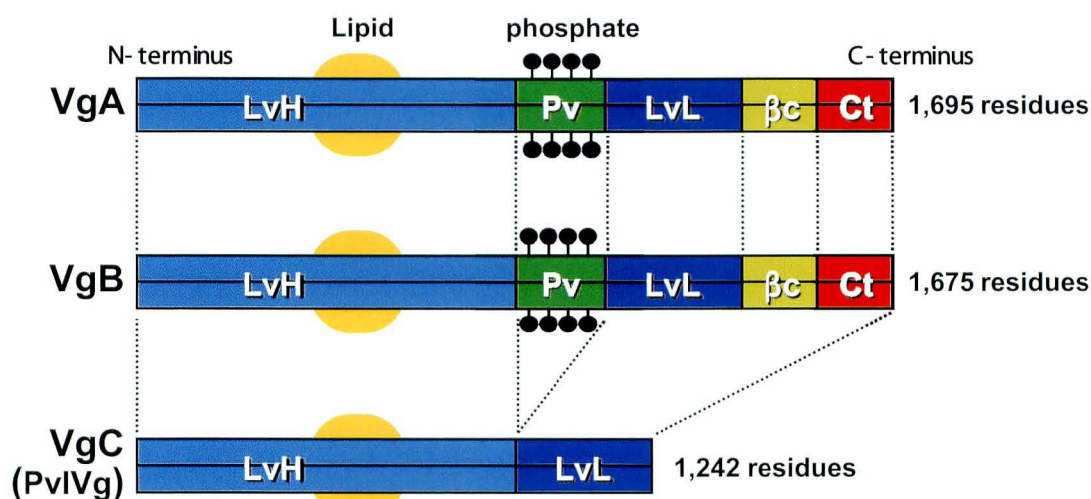


Fig. 2 Multi-forms of vitellogenin structure in mosquitofish *Gambusia affinis*. Vg: vitellogenin, LvH, lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, βc: β'-component, Ct: C-terminal component.

大きく異なることやサイズが小さいことに加え、VgA、VgBに対するアミノ酸の相同性も低く、カダヤシではVgAとの間で17%、VgBとの間で21% (Sawaguchi *et al.*, 2005)、マダイでもそれぞれ21%と22% (Sawaguchi *et al.*, 2006a) にしか満たない。

ビテロジェニンは一般的に、リン、脂質、糖などを含む複合タンパクであるとされている。実際、マツカワなどの主要なビテロジェニンであるVgAとVgBの脂質の含有量は重量比で18.7%に達し、その内訳はリン脂質11.8%、トリグリセリド3.0%、コレステロール2.9%であった (Matsubara and Sawano, 1995)。他のいくつかの魚種についても、一覧をTable. 2にまとめた。胚発生時における卵内の脂質の役割については、サケ科、ニベ科など

の魚種で調べられており (Heming and Buddington, 1988)、油球を持つ種では一般にトリグリセリドは発生のためのエネルギー源として、また、リン脂質はエネルギー源よりもむしろ細胞膜の原料として利用されていると考えられている。

ゲル濾過による分析から推定される血液中での主要なビテロジェニンの分子量はマツカワ500~550kDa (Matsubara *et al.*, 1999)、マハゼ540kDa (Ohkubo *et al.*, 2004)、カダヤシ600kDa (Sawaguchi *et al.*, 2005)、マダイ610kDa (Sawaguchi *et al.*, 2006a)、ボラ570~580kDa (Amano *et al.*, 2007a) である。一方、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によるビテロジェニン・ポリペプチド鎖の分析ではマツカワVgA、VgBがそれぞれ168kDa、175kDa

Table 2 Lipid contents of vitellogenin and lipovitellin.

	Barfin flounder ^{*1}			Mosquitofish ^{*2}		Japanese goby ^{*3}	
	VgA+ VgB	LvA+ LvB	oLvB	VgA+ VgB	LvC	LvA+ LvB	LvC
Total lipid	18.7%	20.7%	25.7%	16.2%	13.7%	16.9%	12.0%
phospholipid	11.8%	12.9%	14.6%	12.0%	10.4%	12.4%	9.3%
triglyceride	3.0%	3.2%	4.0%	1.7%	1.8%	1.6%	1.3%
cholesterol	2.9%	2.7%	3.0%	2.5%	1.5%	2.9%	1.4%

Modified from *1 Matsubara et al., 1995 *2 Sawaguchi et al., 2005 *3 Ohkubo et al., 2004.
Vg: vitellogenin, Lv: lipovitellin, oLv: ovulated lipovitellin.

(Matsubara et al., 1999), マハゼVg-530が178kDa (Ohkubo et al., 2004), カダヤシVgA, VgBが共に195kDa (Sawaguchi et al., 2005), マダイVgA, VgBが182kDa (Sawaguchi et al., 2006a), ホワイ トパーチVgAおよびVgBが180kDa (Hiramatsu et al., 2002b), ボラVgA, VgBが175~179kDa (Amano et al., 2007a) であり、遺伝子の解析結果からもほぼ同程度の分子量と推定される。ビテロジェニンの質量の16から18%を占める脂質 (Matsubara and Sawano, 1995; Ohkubo et al., 2004; Sawaguchi et al., 2005) を加算すると、これらの値はゲル濾過で推定される分子量の約半分になる。このことから血中では、ビテロジェニン分子は2本のポリペプチド鎖とそれに各々脂質、糖、金属などが結合した二量体となっていると考えられる。一方、最近になってVgCのタンパク分

析が行われ、血中での分子量とSDS-PAGEから推定された分子量は、それぞれマハゼ320kDaと127 kDa (Ohkubo et al., 2004), カダヤシ400kDaと14 2kDa (Sawaguchi et al., 2005), マダイ340kDaと137kDa (Sawaguchi et al., 2006a), ホワイ トパーチ426kDaと148kDa (Hiramatsu et al., 2002b), ボラ 335kDaと132kDa (Amano et al., 2007a) と報告されている。また、脂質の含有量はマハゼVgCでは12.0% (Ohkubo et al., 2004), カダヤシでは13.7% (Sawaguchi et al., 2005) と、VgA, VgBと比べて低いが、これらも脂質タンパクであり血中では二量体として存在すると考えられる。

脂質に加えてビテロジェニンの特徴として内部に多くのリン酸を含むことがあげられる。ビテロジェニンに結合しているリン酸の多くはホスビチン領域に含まれるセリンに結合している

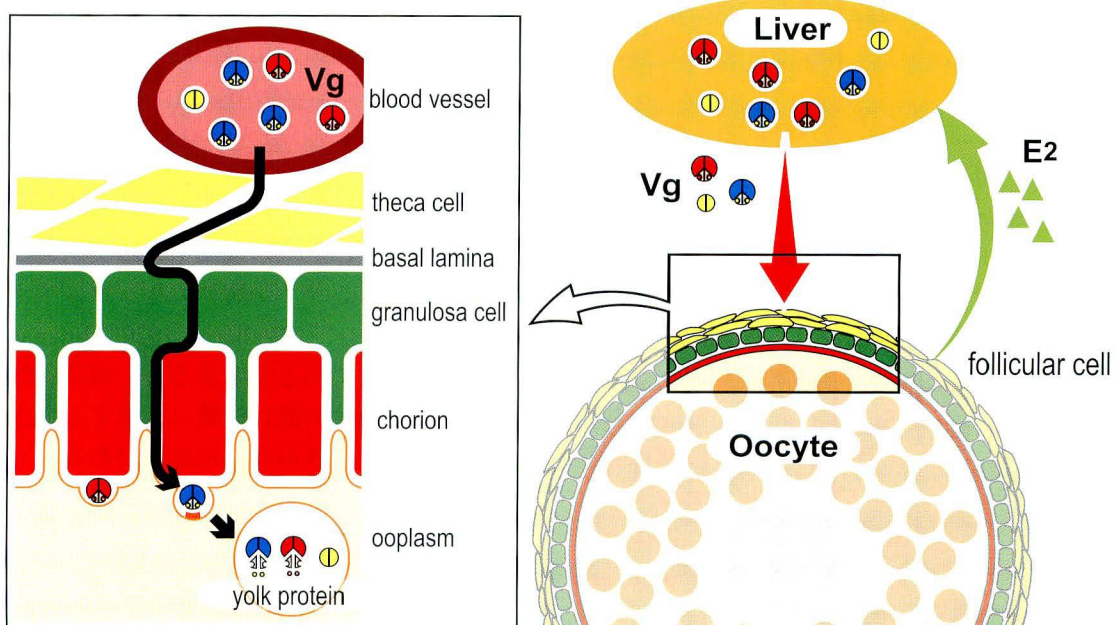


Fig. 3 Synthesis and accumulation of vitellogenin in teleosts. Vg: vitellogenin, E₂: estradiol-17β.

(Wallace and Begovac, 1985)。このセリンの連続配列に結合したリン酸は、さらにカルシウムやマグネシウム、鉄の二価イオンを結合し、ビテロジェニンの一般的な特徴であるカルシウムの結合能、鉄結合能の基になっている。しかしながら、VgCはセリン連続配列を含むホスピチン領域を持たないことから、リン酸の含有量が低いことがカダヤシで確かめられている (Sawaguchi *et al.*, 2005)。ビテロジェニンは、これまでに述べた脂質、糖、リン酸や金属イオンの他、脂溶性の色素であるカロチノイドやビタミンAなどを結合して卵内へと運ぶ。また、甲状腺ホルモンであるT3、T4の卵内への移送、蓄積にもビテロジェニンが関与している可能性が指摘されている (Specker and Sullivan, 1994)。その他に、雌親魚が体内に取り込んだカドミウム等の重金属 (Ghosh and Thomas, 1995) や内分泌攪乱物質のうち脂溶性の高いPCB (Ungerer and Thomas, 1996) 等もビテロジェニンを介して卵に取り込まれ、次世代で影響するメカニズムに関与している可能性がある。

3. ビテロジェニンの機能

ビテロジェニンの生理的な役割は胚発生に必要な栄養を母体から卵へ移送し、卵内に蓄積することにある。雌魚の肝細胞で合成されたビテロジェニンが、卵母細胞に卵黄タンパクとして蓄積されるまでには次のような段階を経ると考えられる (Fig. 3)。まず、肝臓から卵巣内に到達するのに次の (1) から (3) のように血管内に取り込まれ、また、放出されなければならない。(1) 肝細胞から細胞外への分泌、(2) 毛細血管から血液への取り込み、(3) 卵巣での毛細血管外への放出。Fig. 3に示したように卵母細胞の外側には血管側から莢膜細胞層 (theca cell layer)、基底膜 (basal lamina, basement membrane)、顆粒膜細胞層 (granulosa cell layer)、卵膜 (zona radiata, chorion) が位置している。そのため、毛細血管から出たビテロジェニンはこれらの間隙や卵膜の小孔を通して、(4) 卵母細胞の細胞膜表面に到達する (Wallace, 1985; Specker and Sullivan, 1994 参照)。その後、(5) ビテロジェニンは卵母細胞の細胞膜にあるビテロジェニンレセプター (VgR) に結合し、飲作用 (pinocytosis) によって卵母細胞内に取り込まれる (Mommensen and Walsh, 1988 参照)。卵母細胞に取り込まれたビテロジェニンは細胞質膜に包まれており、相互に

融合すると共に、(6) 多胞体 (multivesicular body) と呼ばれるライソゾーム様小器官と融合する (Wallace, 1985)。(7) この際に、多胞体内に存在するプロテアーゼによりビテロジェニンは卵黄タンパクへと分解されると考えられる。ビテロジェニンから卵黄タンパクへの分解にはカテプシンDが関与していることが魚類でも明らかになっている (Carnevali *et al.*, 1999b; Hiramatsu *et al.*, 2002a)。卵黄タンパクの蓄積が進む卵黄形成期 (vitellogenesis stage) では、その進行と共に卵黄球のサイズは次第に大きくなる。電子顕微鏡による観察では (8) 卵黄球内の卵黄タンパクは結晶構造をとっているといわれている (Wallace, 1985)。しかし、硬骨魚類の卵黄タンパクは魚類や両生類に比べて水溶性が高く、結晶構造が強固ではないと考えられている (LaFleur *et al.*, 1995 b)。

ビテロジェニン由来の卵黄タンパクとしてはリポビテリンとホスピチンが古くから見つかった (Wallace, 1985)。我々が調べたマツカワでは、リポビテリンの分子量はVgA由来のリポビテリン (LvA) で約430kDa、VgB由来のLvBで約400kDaであり (Matsubara *et al.*, 1999)、Lv全体で約20.7%の脂質を含んでいる (Matsubara and Sawano, 1995)。また、脱リン酸化したホスピチンの分子量は、VgA由来のPvAで7kDa、VgB由来のPvBで15kDa、8kDaと算出される (Sawaguchi *et al.*, 2006b)。他の魚類でのホスピチンのサイズは、メダカ *Oryzias latipes* で38と22kDa (Murakami *et al.*, 1990)、サケ科魚類のイトウ *Hucho perryi* で23kDa (Hiramatsu and Hara, 1996)、ボラで25kDa (Amano *et al.*, 2007a)、また陸上動物であるニワトリでは35kDa (Taborsky and Mok, 1967)、アフリカツメガエルでは33kDa (19kDaと13kDaのタンパクの複合体) (Wiley and Wallace, 1981) と報告されている。ホスピチンの機能が胚の骨形成のために必要なリン酸やカルシウムイオンなどを蓄積しておく (Wallace, 1970; Hiramatsu *et al.*, 2006) ことであると考ええると、海産魚類と異なり無機元素濃度の低い環境に生息する陸上動物や淡水魚類で機能性が高い可能性がある。

魚類ではリポビテリン、ホスピチンに加えてβ'-成分が検出される (Hara *et al.*, 1993)。β'-成分はビテロジェニン・ポリペプチド鎖の中ではC-末端近くに位置し、内部にシステインが多く見られる。β'-成分は水溶性が強く、ビテロジェニン分子の

表面に位置していると予想される。そのため、 β' -成分に対して作製した抗体は血中ビテロジェニンに対しても反応性が強く、 β' -成分抗体を一次抗体、Lv抗体を二次抗体とした免疫測定系を使用することで測定精度の向上が見込まれる (Fukada *et al.*, 2001)。また、 β' -成分は魚卵アレルギーの原因になりやすいことが指摘されている (久保ら, 2005)。さらに、ビテロジェニン遺伝子配列上で β' -成分の位置からC-末端までのアミノ酸の大きさを見積もると、実際の β' -成分の分子量 (19kDa, Matsubara and Sawano, 1995) より大きいことが分かった。これは、ビテロジェニンには β' -成分よりさらにC-末端側にもう1種類の卵黄タンパク (C-末端成分) が存在しているためと予想されるが、現在のところ明確な証拠は得られていない。

VgA, VgB といった一般的な構造のビテロジェニンに対してVgCは卵母細胞内に取り込まれた後もその分子に大きな変化は生じない。たとえばマハゼでは、ゲル濾過から算出される血中VgCの分子量は320kDaであり、卵内に取り込まれてもその分子量は変わらず、SDS-PAGE分析による結果からも何の変化も認められない (Ohkubo *et al.*, 2004)。一方、カダヤシやマダイでは卵母細胞への取り込み後、VgCポリペプチドは切断され、カ

ダヤシでは112kDaのLvHと26または33kDaのLvLに (Sawaguchi *et al.*, 2005), マダイでは分子量137kDaのビテロジェニンから70と41kDaのLvHと28kDaのLvLに (Sawaguchi *et al.*, 2006a) 変化する。しかし、ゲル濾過での分子量には変化が見られず、単に一部にニック (分子の刻み) が入ったに過ぎないことを意味している。従って、少なくとも棘鱸上目ではVgC由来の卵黄タンパクはリポビテリンのみ存在すると考えられる。

魚類を含めた卵生脊椎動物におけるビテロジェニン由来の卵黄タンパクの主たる役割は、胚発生のための栄養であることは先に述べた。近年まで、それ以外の機能はいずれの動物群でも見つかっていなかったが、1980年代から90年代に海産魚の浮遊性卵で遊離アミノ酸含有量が著しく高いことや、最終成熟期に卵黄タンパクに変化が見られることが示され (Craik and Harvey, 1987; McPherson *et al.*, 1989; Greeley *et al.*, 1991), 卵黄タンパクを分解して生じた遊離アミノ酸による浸透圧上昇を利用して最終成熟期の顕著な吸水を引き起こし、卵の比重を海水に近づけることで浮遊性を獲得することが示唆された (Matsubara and Sawano, 1995; Matsubara and Koya, 1997)。さらに我々は、マツカワで最終成熟期にVgAとVgBに由来する卵

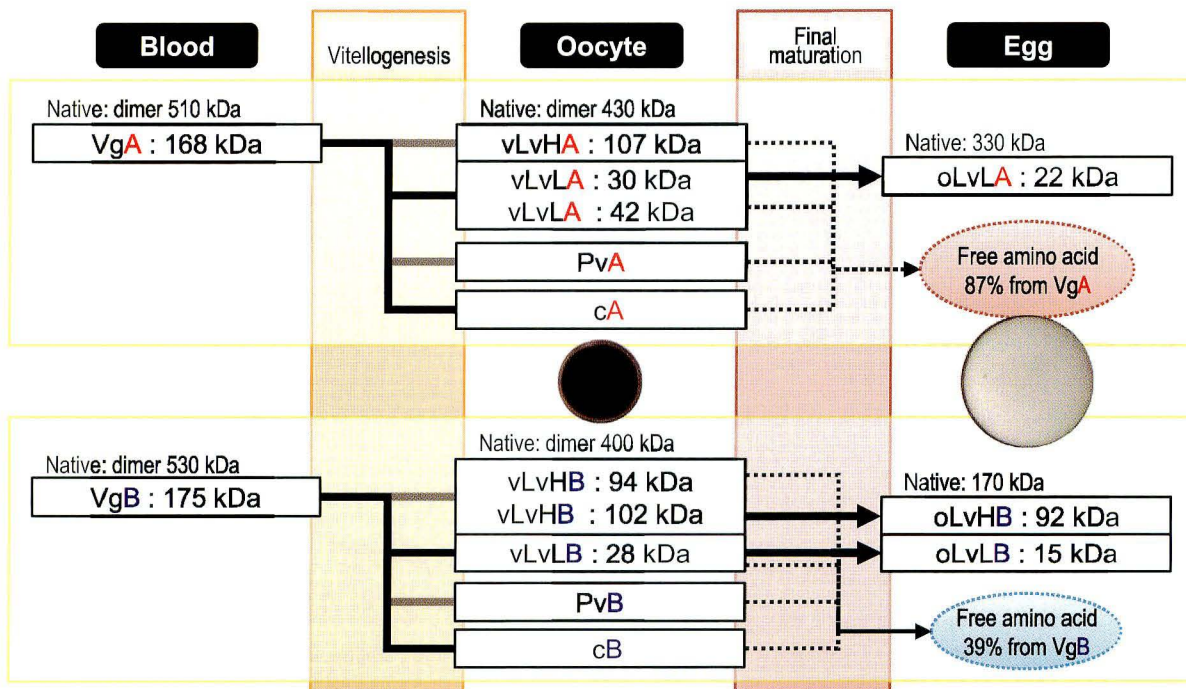


Fig. 4 Dual-Vg control system in barfin flounder *Verasper moseri* (modified from Matsubara *et al.*, 1999). Vg: vitellogenin, LvH: lipovitellin heavy chain, Pv: phosvitin, LvL: lipovitellin light chain, β c: β' -component, v: component from vitellogenic oocyte, o: component from ovulated egg.

黄タンパクを不均等に分解することで卵の浮力を調節する2型ビテロジェニンによる調節機構 (Dual-Vg control system, Fig. 4) を見出した (Matsubara *et al.*, 1999)。図に示すように、Pvと β cは全て最終成熟期に分解され、排卵卵では見られなくなる。一方、Lvの最終成熟期における分解についてみると、LvAは重鎖 (vLvHA) 全体と軽鎖 (vLvLA) の一部が分解され、軽鎖 (oLvLA) の一部のみが脂質と結合したまま残る。それに対して、LvBは重鎖 (vLvHB)、軽鎖 (vLvLB) 共に一部分を失うのみで、排卵卵には重鎖 (oLvHB) と軽鎖 (oLvLB) のそれぞれ一部分が結合した形でとどまっている。こうした調節機構はマダイ (Sawaguchi *et al.*, 2006a)、ボラ (Amano *et al.*, 2007b)、スケトウダラ (Ohkubo *et al.*, 2006) でも見られ、VgA、VgBを持つ高等な魚種に共通した卵の浮遊性獲得機構と考えられる (Matsubara *et al.*, 2003)。この機構で最も重要な点は、2種類のビテロジェニン (VgAとVgB) 由来の卵黄タンパクを正確に一定の比率で卵母細胞内に蓄積していることであり、そのためのビテロジェニン遺伝子の発現、肝臓での合成、卵母細胞の取り込み等の調節機構の解明が今後の研究の焦点といえる。

4. 雌血中ビテロジェニン濃度の季節変化

多くの硬骨魚類は1年のうちの特定の時期に産卵期をもつ。硬骨魚類では、年に一回短い産卵期を迎える種、半年を超える産卵期をもつ種など、魚種毎に異なる産卵様式が見られる。また、産卵期中に一度の産卵で終了する魚種もあれば、一産卵期中に複数回産卵を繰り返すものもある。これらのいずれの場合も産卵期に先立って約半年から一ヶ月程度前に卵母細胞の顕著な増重が見られる。この時期は卵黄形成期と呼ばれ、肝臓でビテロジェニンを合成し、卵母細胞でそれを取り込んで卵黄タンパクを蓄積する。マイワシ *Sardinops melanostictus* を例にとり卵母細胞の発達を見てみると、産卵期の約半年前に当たる9月以前では卵母細胞は周辺仁期 (perinucleolus stage) の未熟な状態である。卵母細胞はその後10から12月には表層胞期 (cortical alveolus stage) または油球期 (oil droplet stage) と呼ばれる卵黄蓄積以前の段階を経て、12月以降急速に卵黄形成を行う。卵黄形成期の卵母細胞は形態的に第一次卵黄球期 (primary yolk globule stage)、第二次卵黄球期

(secondary yolk globule stage)、第三次卵黄球期 (tertiary yolk globule stage) または卵黄球期前期 (early vitellogenic stage)、卵黄球期後期 (late vitellogenic stage) に分類される。マイワシ卵母細胞は1月から2月の二ヶ月かけて卵黄を蓄積し、以降の産卵期に最終成熟を迎え、続いて排卵、産卵する (Matsubara *et al.*, 1995)。こうした卵母細胞の発達は日長や水温の周年変化が基盤となり、内分泌要因によって調節されている (Matsubara, 1996)。その中で特に卵黄形成に関しては脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (gonadotrophic hormone, GTH) とGTHの刺激により卵細胞層で合成される雌性ホルモンのエストラジオール17 β (Estradiol-17 β , E₂) が主体的な役割を担っている (Nagahama *et al.*, 1995)。

Fig. 5にマイワシの血中E₂濃度とビテロジェニン濃度の季節変化を示した (Matsubara *et al.*, 1995)。血中E₂濃度とビテロジェニン濃度は共に12月から上昇し、産卵期に先がけてピークに達する。マイワシの血清中のE₂およびビテロジェニンのピーク値はそれぞれ約1.2ng/mlと2mg/mlである。ビテロジェニンの血中濃度のピーク値は魚種により差が見られ、サケ科魚類では9~22 mg/ml (Ueda *et al.*, 1984; 松原ら, 1993)、海産魚のマハゼやヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* では、それぞれ約0.9mg/ml (Ohkubo *et al.*, 2003a)、1.5mg/ml (Mosconi *et al.*, 1998) である。ビテロジェニンの血中濃度は、その魚種の卵母細胞の発達・産卵

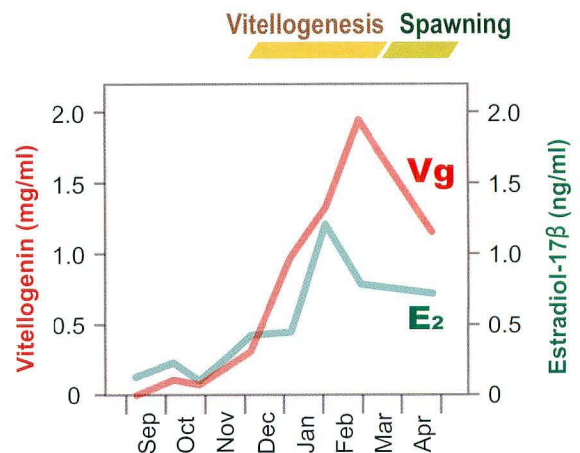


Fig. 5 Seasonal changes of concentrations of vitellogenin and estradiol-17 β in sera from captive Japanese sardine *Sardinops melanostictus* (modified from Matsubara *et al.*, 1995). Vg: vitellogenin, E₂: estradiol-17 β .

様式と関係しているものと思われる。

雌の血中に最初にビテロジェニンが出現するのは、卵母細胞が卵黄蓄積を開始する前の表層胞期または油球期の段階で、その時の E_2 およびビテロジェニン濃度はサクラマス*Oncorhynchus masou*でそれぞれ740pg/ml, 58 μ g/ml (松原ら, 1993), マイワシで223pg/ml, 59 μ g/ml (Matsubara *et al.*, 1995)である。すなわち、雌でビテロジェニン合成が開始される E_2 濃度の最低値は約200~700pg/ml程度であることを意味している。ビテロジェニン合成に必要な E_2 の最低血中濃度についてはほとんど解明されていないが、魚種によって大きく異なることも予想される。従って、内分泌攪乱物質の影響をより正確に評価するためには、対象とする種のビテロジェニン合成に必要な血中 E_2 の最低濃度を精査しておくことが重要な要素の1つと考えられる。

5. 環境エストロゲンによるビテロジェニン合成に関わる血中濃縮作用

我々が行ったマハゼを対象とした環境エストロジェンの評価に関する一連の研究結果から、雄魚や未成熟魚における血中ビテロジェニンの発現には興味深い現象が関わっていることが明らかになった (Ohkubo *et al.*, 2003b)。天然のマハゼ雌の卵黄形成初期の血中 E_2 濃度は400pg/mlで、先のマイワシ、サクラマスの場合と類似している。一方、環境水による E_2 暴露の試験結果からは、雄血中にビテロジェニンを誘導する最低有効濃度は10 ng/l (10pg/ml) と著しく低い。もし、血中濃度が水中と同じく10pg/mlであれば、ビテロジェニン合成は誘起されないはずである。しかし、例えば100ng/l (100pg/ml) の E_2 を含む水で飼育された雄血清中の E_2 濃度は約2,000ng/l (2ng/ml) とおよそ20倍の濃度に高まっていた。この血中での濃縮作用はエストロン (E_1) でも見られ、いずれの場合も活発なビテロジェニン合成を誘導した。すなわち、環境エストロゲンは血液中に濃縮されるために、低濃度の場合でもビテロジェニン合成を誘導してしまう。

この濃縮機構については、体表やエラあるいは飲水から取り込まれた E_2 が血中に存在する性ホルモン結合グロブリン (sex hormone binding globulin, SHBG) に結合し、一時的に蓄積することによると考えられる (Ohkubo *et al.*, 2003b)。コイのSHBG遺伝子の解析結果からは、この遺伝

子は約400残基のアミノ酸をコードし、ほ乳類SHBGとは高い相同性を示さないものの、ホルモン結合部位についてはよく似た配列を示している (Nagae *et al.*, 2003)。SHBGは本来、血液中に分泌された性ステロイドホルモンを標的器官へ運搬し、そこでの放出を調節すると考えられている。環境中の E_1 や E_2 に対しては、それらをSHBGに結合させることで、遊離の状態で存在するよりも作用を弱くし、分解や排出を待つ仕組みとして働いているものと思われるが、体外からの恒常的な流入に対しては体内濃縮を導いてしまう。一方、環境中のノニルフェノールやビスフェノールについても、前者では最大450倍、後者では50倍に達する血中濃縮が見られ、SHBGとは別のタンパクに結合している可能性が考えられている (Ohkubo *et al.*, 2003b)。従って、雄血中のビテロジェニン発現については、その背景にこうしたホルモンやホルモン様の働きを持つ化学物質の血中濃縮作用が関与していることを念頭に置いておく必要がある。

6. おわりに一環境エストロゲン影響評価の際の留意点一

環境エストロゲンは極めて微量であり、水質検査には大きな労力を必要とすることや、荒天による水の混合や、河川水の増加といった水の採取時以前の気象に影響される難点がある。また、原因物質の候補が多数存在することも水質分析を困難にする一因となっている。これに対して、長いスパンで暴露の総和を見ることができる雄血中ビテロジェニンを指標とした「環境水のエストロゲン作用強度の評価」は、おおまかではあるものの状況を迅速に判断できる非常に優れた評価法といえる。しかしながら、この方法には以下にあげるようないくつかの留意点が存在する。

- a) 硬骨魚類は分類学上多岐にわたっており、科レベルで異なる種ではビテロジェニン遺伝子の相同性も低い。そのため、測定系に用いる抗血清の交差反応性も十分ではなくなる。従って、測定系に使用できる抗血清は対象魚種ないしは同じ科に属する近縁種で作られたものに限られ、いずれの場合にもスタンダードには対象種から精製されたビテロジェニンを使用する必要がある。
- b) ビテロジェニンには複数のタイプがあることを念頭に置き、測定系に使用している抗血清がいずれのタイプのビテロジェニンを対象

としているか吟味しておく必要がある。また、2つの異なるタイプのビテロジェニンを個々に測定することで、二重チェックによる評価の精度向上が見込まれる。

- c) ビテロジェニン合成活性は、その種の生殖様式によって異なる。そのため、雌における生殖様式を考慮すると同時に、食性も考慮する必要がある。また、成熟期の雄と雌が群れで生活するか、別の群れを形成するか、単独で生活するかなど、生活様式によっても異なると予想される。すなわち、食性や生活様式によって環境エストロジェンとは無関係にビテロジェニンの合成の引き金がひかれるか、あるいはその直前の状態に達した場合と、そうでない場合とで、環境エストロジェンの暴露に対する反応が異なることを想定しておく必要がある。

以上の留意点は、対象とするビテロジェニンというタンパクの性質を十分に理解することで容易に解決できる。また、本章で記載した内容がその一助になれば幸いである。

ビテロジェニン合成に関わる一連の調節機構については、雄や未成魚における肝臓のエストロジェンレセプターの発現状態、SHBGなどによる血中エストロジェンの作用調節機構や代謝調節機構、タイプの異なるビテロジェニン遺伝子の発現機構など、まだ不明な点は山積している。今後、それらが少しずつ明らかになることで、より正確な環境エストロジェンの評価へと繋がるものと思われる。

引用文献

- Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Sullivan, C., and Hara, A. (2007a). Purification of multiple vitellogenins in grey mullet (*Mugil cephalus*). *Mar. Biol.* **152**, 1215-1225.
- Amano, H., Fujita, T., Hiramatsu, N., Shimizu, M., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Kagawa, H., Nagae, M., Sullivan, C.V., and Hara, A. (2007b). 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. Experiment. Zool. A.* **307A**, 324-341.
- Carnevali, O., Carletta, R., Cambi, A., Vita, A., and Bromage, N. (1999). Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* **60**, 140-146.
- レイチェル・カーソン, (1964). 沈黙の春 (邦訳). 新潮社.
- シーア・コルボーン, ダイアン・ダマノスキ, ジョン・ピーターソン・マイヤーズ, (1997). 奪われし未来 (邦訳). 翔泳社.
- Craik, J.C.A. and Harvey, S.M. (1987). The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *F. mar. boil. Ass. U. K.* **67**, 169-182.
- Finn, R.N. and Kristoffersen, B.A. (2007). Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE.* **2**, e169.
- Fukuda, H., Haga, A., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., and Hara, A. (2001). Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comp. Biochem. Physiol. A* **130**, 163-70.
- Ghosh, P. and Thomas, P. (1995). Binding of metals to red drum vitellogenin and incorporation into oocytes. *Mar. Env. Res.* **39**, 165-168.
- Greeley, M.S., Hols, H., and Wallace, R.A. (1991). Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **100**, 639-647.
- 原彰彦, 松原孝博, 実吉峰郎, 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.
- Hara, A., Sullivan, C.V., and Dickhoff, W.W. (1993). Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.* **10**, 245-256.
- Heming, T.A. and Buddington, R.K. (1988). Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In "Fish physiology" (eds. Hoar, W.S. and Randall, D.J.), Vol.XIA, Academic press, pp.

- 407-446.
- Hiramatsu, N. and Hara, A. (1996). Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* **115**, 243-251.
- Hiramatsu, N., Ichikawa, N., Fukada, H., Fujitam, T., Sullivan, C.V., and Hara, A. (2002a). Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *J. Exp. Zool.* **292**, 11-25.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Hara, A., Donato, D.M., Hiramatsu, K., Denslow, N.D., and Sullivan, C.V. (2002b). Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.* **26**, 355-370.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C., and Hara, A. (2006). Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Mar. Biol.* **149**, 35-47.
- 久保友和、渡辺一彦、原彰彦、清水裕、佐伯宏樹 (2005). シロサケ卵中に含まれる主要アレレグンの探索. 北大水産彙報. **56**, 55-59.
- LaFleur, G.J.J., Byrne, B.M., Haux, C., Greenberg, R.M., and Wallace, R.A., Liver-derived cDNAs: Vitellogenins and vitelline envelope protein precursors (choriogenins). In: Goetz, F.W. and Thomas, P., Eds.), Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, University of Texas, Austin, U.S.A, 1995a, pp. 336-338.
- LaFleur, G.J.J., Byrne, B.M., Kanungo, J., Nelson, L., Greenberg, R.M., and Wallace, R.A. (1995b). *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.* **41**, 505-521.
- LaFleur, G.J.J., Raldua, D., Fabra, M., Carnevali, O., Denslow, N., Wallace, R.A., and Cerda, J. (2005). Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.* **73**, 815-824.
- Matsubara, T. (1996). Vitellogenesis and its environmental control in the Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). In "Survival strategies in early life stages of marine resources" (eds. Watanabe, Y., Yamashita, Y., and Oozeki, Y.), Balkema, pp. 21-26.
- Matsubara, T. and Sawano, K. (1995). Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.* **272**, 34-45.
- Matsubara, T., Honda, S., Wada, T., Soyano, K., and Hara, A. (1995). Seasonal change in serum levels of vitellogenin and estradiol-17 β related to sexual maturation in rearing female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Bull. Hokkaido Nat. Fish. Res. Inst.* **59**, 19-29.
- 松原孝博、笠原昇、山内皓平、原彰彦 (1993). サクラマス *Oncorhynchus masou* の卵巣発達に伴う血中ビテロジェニンおよびエストラジオール-17 β 濃度の変化. 北水研報告. **57**, 33-42.
- Matsubara, T. and Koya, Y. (1997). Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* **278**, 189-200.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V., and Hara, A. (1999). Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* **213**, 18-32.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C.V., and Hara, A., Involvement of dual-vitellogenin system in the control mechanism of egg buoyancy in barfin flounder and walleye pollock. 6th international symposium on the reproductive physiology of fish, Bergen, 2000, pp. 305.
- Matsubara, T., Nagae, M., Ohkubo, N., Andoh, T., Sawaguchi, S., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., and Hara, A. (2003). Multiple vitellogenins

- and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* **28**, 295-299.
- McPherson, R., Greeley, M.S.J., and Wallace, R.A. (1989). The influence of yolk protein proteolysis on hydration in the oocytes of *Fundulus heteroclitus*. *Develop. Growth Differ.* **31**, 475-483.
- Mommsen, T.P. and Walsh, P.L. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. In "Fish physiology" (eds. Hoar, W.S. and Randall, D.J.), Vol.XI A, Academic Press, New York, pp. 347-406.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Carletta, R., Nabissi, M., and Polzonetti-Magni, A.M. (1998). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: Purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gen. Comp. Endocrinol.* **110**, 252-261.
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Penec, J.P., and Wolff, J. (1996). Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene.* **174**, 59-64.
- Murakami, M., Iuchi, I., and Yamagami, K. (1990). Yolk phosphoprotein metabolism during early development of the fish, *Oryzias latipes*. *Develop. Growth Differ.* **32**, 619-627.
- Nagae, M., Okunaga, M., Hidaka, R., Ohkubo, N., and Matsubara, T. (2003). Molecular cloning of sex hormone-binding globulin cDNA in carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* **28**, 215-216.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., and Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr. Top. Dev. Biol.* **30**, 103-145.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y., and Matsubara, T. (2003a). Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **131**, 353-364.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y., and Matsubara, T. (2003b). Estrogenic activity in coastal areas around Japan evaluated by measuring male serum vitellogenins in Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus*. *Fish. Sci.* **69**, 1135-1145.
- Ohkubo, N., Andoh, T., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., and Matsubara, T. (2004). Deduced primary structure of two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **137**, 19-28.
- Ohkubo, N., Sawaguchi, S., Hamatsu, T., and Matsubara, T. (2006). Utilization of free amino acids, yolk protein and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Fish. Sci.* **72**, 620-630.
- Okumura, H., Hara, A., Saeki, F., Todo, T., Adachi, S., and Yamauchi, K. (1995). Development of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* **61**, 283-289.
- Reith, M., Munholland, J., Kelly, J., Finn, R.N., and Fyhn, H.J. (2001). Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.* **291**, 58-67.
- Sawaguchi, S., Koya, Y., Yoshizaki, N., Ohkubo, N., Andoh, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A., and Matsubara, T. (2005). Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.* **72**, 1045-1060.
- Sawaguchi, S., Kagawa, H., Ohkubo, N., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., and Matsubara, T. (2006a). Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 719-736.
- Sawaguchi, S., Ohkubo, N., and Matsubara, T. (2006b). Identification of two forms of

- vitellogenin-derived phosvitin and elucidation of their fate and roles during oocyte maturation in the barfin flounder, *Verasper moseri*. *Zool. Sci.* **23**, 1021-9.
- Specker, J.L. and Sullivan, C.V. (1994). Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. In "Perspectives in comparative endocrinology" (eds. Davey, K.G., Peter, R.G., and Tobe, S.S.), National Research Council Canada, Ottawa, pp. 304-315.
- Sumpter, J.P. (1997). Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 25-31.
- Taborsky, G. and Mok, C.C. (1967). Phosvitin. Homogeneity and molecular weight. *J. Biol. Chem.* **242**, 1495-501.
- Ueda, H., Hiroi, O., Hara, A., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1984). Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**, 203-211.
- Ungerer, J. and Thomas, P. (1996). Transport and accumulation of organochlorines in the ovaries of Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Mar. Env. Res.* **42**, 167-171.
- Wallace, R.A. (1970). Study on amphibian yolk. IX. Xenopus vitellogenin. *Biochim. Biophys.* **215**, 176-183.
- Wallace, R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In "Oogenesis" (eds. Browder, L.W.), Vol.1, Plenum Press, New York, pp. 127-177.
- Wallace, R.A. and Begovac, P.C. (1985). Phosvitins in Fundulus oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analysis together with biological considerations. *J. Biol. Chem.* **260**, 11268-11274.
- Wang, H., Yan, T., Tan, J.T.T., and Gong, Z. (2000). A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene.* **256**, 303-310.
- Wang, S.-Y. and Williams, D.L. (1980). Identification, purification, and characterization of two distinct avian vitellogenins. *Biochem.* **19**, 1557-1563.
- Wang, S.-Y., Smith, D.E., and Williams, D.L. (1983). Purification of avian vitellogenin III: Comparison with vitellogenins I and II. *Biochem.* **22**, 6206-6212.
- Wiley, H.S. and Wallace, R.A. (1978). Three different molecular weight forms of the vitellogenin peptide from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 153-159.
- Wiley, H.S. and Wallace, R.A. (1981). The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins. *J. Biol. Chem.* **256**, 8626-8634.