

特集 魚類ビテロジェニン

ビテロジェニン測定法—最新測定法の解説と開発動向の展望

1. HPLC 法

飯島憲章

New Methodology for the Determination of Fish Vitellogenin
and Future Problems

1. HPLC Method

Noriaki Iijima*

1. はじめに

魚類ビテロジェニン (VTG) の測定には, 特異性や検出感度が高く, また多検体試料の分析が可能であることから, サンドイッチ酵素免疫測定法が開発され, 血清中の微量VTGの測定に使用されている。一方, 本法は, 魚種に特異性が高いことから, 抗原 (血清VTG) の精製, 抗原のウサギへの免疫, 抗体の作成, 抗体の精製など多くの煩雑な操作が必要である。また, 本法は検出感度が高いことから卵黄形成期盛期の雌血清VTGのような高濃度試料の場合には高倍率で希釈する必要があるため, 測定誤差も生じやすくなる。このような点を補完する手段として, 高速液体クロマトグラフ (HPLC) などの機器分析手法を用いることが推奨される。Yamanaka *et al.* (1998) は, 陰イオン交換カラムを用い, NaClの濃度を段階的に増加させることによりVTGを溶出した後に, 280nmの吸光度を測定する手法を開発し, この方法を用いてマミチヨグとマダイ血清中のVTGを定量している。我々は, Yamanaka *et al.* (1998) の方法に基づいて, マコガレイ血清中のVTG濃度の測定法を確立すると共に, 瀬戸内海周防灘及び広島湾のマコガレイ血清中のVTG濃度を測定した (飯島ら, 2001)。ここでは, マコガレイ血清中のVTG濃度の測定法を確立する過

程でまとめた実験方法の詳細を紹介する。

2. 実験方法

1) 試薬

(ρ -アミジノフェニル) メタンсульフォニルフルオリド塩酸塩 (ρ -APMSF) は和光純薬工業株式会社の生化学用を, またウシ肺由来アプロチニン (Aprotinin) は宝酒造株式会社製のものを用いた。

2) 使用バッファー

- ① 100mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH 8.0) (冷蔵保存)
- ② 100mM ρ -APMSF水溶液 (冷凍保存)
- ③ Aprotinin溶液 (ウシ肺由来Aprotininを20mM Tris-HCl (pH 8.0) で2.5 mg/mLに調製したもの) (冷凍保存)
- ④ 血清希釈液 (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 1mM ρ -APMSF, 62.5 μ g/mL Aprotinin) (使用時に適宜作成) なお, EDTA, ρ -APMSF及びAprotininは血清中に存在するタンパク質分解酵素の阻害剤であり, VTGの分解を抑える目的で使用する。また, 血清希釈液100mLは, 上記①, ②, ③の溶液を1mL, 1mL, 2.5 mLずつ分取し, 20mM Tris-HCl (pH 8.0) で100mLに定容して作成する。

(2008年10月7日受付, 2008年10月23日受理)

* 広島大学大学院生物圏科学研究科 (〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4)
E-mail: noriij@hiroshima-u.ac.jp

3) 血清の採取

マコガレイ尾動脈より採血後、マコガレイ血液 1 mL に対し、Aprotinin 溶液を 25 μ L 加えて転倒混合した後、氷冷下で研究室へ持ち帰る。4 $^{\circ}$ C で一夜放置後、ミクロスパーテルを用い、チューブ内壁に付着している血餅をはがした後、低温室内にセットした小形遠心機 (Micro 6 CFM-100, Iwaki Glass Co. Ltd) を用いて 6,080 \times g, 5 min 遠心分離し、血清を得る。血清は、直ちに小分けし、 -80° C で保存する。

4) VTG の精製

VTG の精製は Yamanaka *et al.* (1998) に準拠する。すなわち、マミチヨグ VTG は保持時間が 10 分頃、NaCl の濃度が 1.0~1.2 M 付近で、またマダイ VTG も保持時間が 10 分頃、NaCl の濃度が 1.0~1.2 M 付近で溶出している (Yamanaka *et al.*, 1998)。したがって、魚類血清を陰イオン交換カラムで分離した場合、NaCl の濃度が 1.0~1.2 M 付近で溶出するタンパク質が VTG である可能性が高い。本研究においては、成熟期のマコガレイ雌血清 (GSI が 10~20 前後の個体) を選び、血清 0.4 mL に血清希釈液 1.6 mL を加えて軽く攪拌した後、0.45 μ m のメンブランフィルター (DISMIC-13cp, Cellulose Acetate, ADVANTEC TOYO) でろ過する。次いで、得られた血清の 5 倍希釈濾液を、陰イオン交換カラムを連結した HPLC に 300 μ L 注入し、下記の HPLC 分析条件に従って VTG を精製した。マコガレイ雌血清タンパク質のイオン交換 HPLC による溶出パターンを Fig. 1-A に示す。Fig. 1-A にみられるように、マコガレイ雌血清タンパク質は 5 本のピークに分離されるが、これら 5 本のピークのうち、保持時間が 12 分頃にみられるピークは、マダイ及びマミチヨグ血清の分析結果 (Yamanaka *et al.*, 1998) と同様に、1.2~1.5 M NaCl で溶出しており、雄血清には検出されなかった (データは示していない) ことから VTG と推定される。そこで、このピークを分取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、分子量が約 170 kDa であることが確認された (Fig. 1-B)。VTG は血液中では二量体として存在するが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では単量体分子 (170 kDa) が検出される。これらの結果より、Fig. 1-A でみられたピークは 340 kDa のタンパク質、すなわち VTG の分子量に相当することが認められた。なお、松原ら (2008) は、魚類には分子量の異なる複数の VTG、すなわち

分子量の大きい VgA あるいは VgB を含む通常の主要な VTG に加え、低分子量の VgC を含むホスピレンレス VTG が存在することを報告している。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では数魚種の VgA あるいは VgB が 168~195 kDa の範囲にあるのに対し、VgC は 127~148 kDa であることから、Fig. 1-A でみられたピークは VgA あるいは VgB を含む主要な VTG に相当するものと考えられる。

マコガレイ VTG のピークが確認されたことから、マコガレイ雌血清の 5 倍希釈液を 300 μ L ずつ HPLC に注入した後、VTG 画分をポリプロピレン製の容器に分取する。VTG 画分を分取後、直ちに 100 mM EDTA, 100 mM ρ -APMSF を 1/100 量ずつ加え、VTG 画分中の EDTA と ρ -APMSF の濃度が 1 mM になるように調製することにより、タンパク質分解酵素による VTG の分解を抑制する。VTG が溶出する時間の溶離液の比重を測定したところ、 $d=1.0323$ g/mL であることから、分取した VTG 画分の重量を測定した後、その重量を比重で割ることにより容量を算出し、100 mM EDTA, 100 mM ρ -APMSF をそれぞれ 1/100 量加えた。なお、記録計のチャートスピードと流速から VTG 画分の容量を求めても良い。この操作を数回繰り返して、VTG 画分を得る。著者は、血清 0.4 mL を用いて VTG 画分を約 8 mL 得た。VTG 画分中のタンパク質濃度は下記 6) 節に示す Lowry 法で求める。本実験で得られた VTG 画分のタンパク質濃度は 467 μ g/mL であった。精製 VTG 画分については直ちに

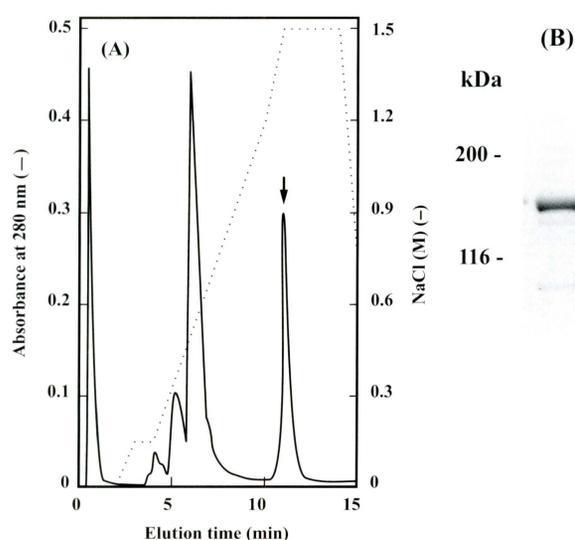


Fig. 1 Separation of serum proteins from female mature flounder, *Pleuronectes yokohamae*, collected in December by POROS-HQ column (A), and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified proteins (B).

Table 1 Gradient program

Time (min)	A sol.	B sol.
0	100	0
2	100	0
3	90	10
4	90	10
10	20	80
11	0	100
14	0	100
16	100	0
24	100	0

小分けし、 -80°C で保存する。残しておいた溶液(約1 mL)を用いてその日あるいは翌日までにタンパク質濃度を測定する。なお、一度解凍したサンプルは 4°C で保存し、 4°C では少なくとも1～2日間までは保存可能であるが、それ以上経過したサンプルは廃棄し、使用しない。

5) HPLCの分析条件

HPLCポンプ：コンピューターコントロールマルチポンプCCPM (TOSOH)

検出器：UVモニター UV8010 (TOSOH)

オートサンプラー：AS8010 (TOSOH)

記録計：クロマトコーダー12 (システムインストルメンツ社)

カラム：POROS-HQ/H (4.6 x 100mm, Perspective Biosystems)

プレカラムフィルター：A-316 (UPCHURCH SCIENTIFIC, INC.)

流速：2.5mL/min

検出波長：280nm

溶離液：A 20mM Tris-HCl (pH 8.0)

B 20mM Tris-HCl (pH 8.0) -1.5MNaCl

なお、溶離液A, Bを作成後、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した後、使用する。

6) タンパク質濃度の測定

タンパク質の濃度は、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いて検量線を作成し、DC-protein assay kit (Bio-Rad) により測定する。なお、測定法の詳細については、測定キットに添付されている説明書を参照されたい。

7) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

これまでに分子量マーカーとして、第一化学薬品株式会社製のタンパク質分子量マーカー「第一」・II (17.2～200kDaまでの6種類の標準タンパク質を含む)を用いていたが、販売中止になった

め現在は入手できない。そのため、Bio-Rad社製のSDS-PAGE分子量スタンダード(未着色)(6.5～200kDaまでの9種類の標準タンパク質を含む)など200kDaのタンパク質を含む分子量マーカーの使用を推奨する。SDS-PAGE分子量スタンダード(未着色)を使用する場合には、サンプル処理液[50mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10%グリセロール, 0.005%プロモフェノールブルー]で20倍に希釈した後、 -40°C に保存し、使用時5 μL を用いる。なお、精製VTG画分に等量の2倍濃度サンプル処理液[100mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20%グリセロール, 0.01%プロモフェノールブルー]を加えた後、沸騰水浴中で3分間加熱し、これを試料液とする。次いで、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(アクリルアミドゲル濃度6%)を行なった後、0.25% (w/v) クーマシーブリリアントブルーR250を含むエタノール-酢酸-水混液(9:2:9, v/v)中にゲルを1時間以上(通常約3時間)完全に浸して、タンパク質バンドの固定と染色を行う。次に脱色液I[エタノール-酢酸-水(25:8:65, v/v)]で4～8時間、次いで脱色液II[エタノール-酢酸-水(10:15:175, v/v)]でゲルのバックグラウンドが完全に脱色されるまで脱色する。なお、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の詳細については、宮崎ら(1988)の方法、向井(2001)の方法に加え、電気泳動法に関する成書を参照されたい。

8) VTGの検量線の作成

精製VTGを用い、2～150 μg までの濃度範囲のVTGをイオン交換カラムで分析し、各VTGの濃度と280nmでの吸光度の面積値から検量線を作成する。VTG画分(467 $\mu\text{g}/\text{mL}$)の場合には、5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μL ずつカラムに注入することにより、2.3～150 μg までの濃度範囲がカバーできる。なお、予備的にVTG画分を血清希釈液で段階的に2倍希釈した後、一定量をカラムに注入し、分析した結果、低濃度のVTG(1～4 μg)を注入するとピークが認められず、より高濃度のVTGサンプルの値も予想に反して低い値を示した。この原因としては、VTG画分を希釈する過程で、用いたチューブにVTGが非特異的に吸着する可能性が考えられる。牛血清アルブミン(BSA)を含む血清希釈液でVTGを希釈することが、VTGの非特異的吸着を防ぐための有効な方法と思われるが、本研究で用いたイオン交換HPLCの分析条件下ではBSAがVTGの前に溶出す

る。そのため、あまり高濃度のBSAを加えるとVTGのピーク付近にまでBSAのピークがテーリングしてくる恐れがある。今回の結果からすると、0.5mg/mL BSA濃度、最大1 mg/mLくらいであればVTG画分の希釈液として使用できるようなと思われる。今後はこの点についても検討することが必要であろう。本法の検討では、VTG画分の原液を希釈せず注入量を変えて分析を行った。その結果、Fig. 2に示す検量線が得られた。この結果から、VTG検量線には直線性がみられることから、上記の方法で得た検量線からマコガレイ血清中のVTG濃度を測定することが可能である。但し、150 μ gではやや直線からはずれる傾向が見られるので、これ以上の濃度の分析は行わなかった。また、一度に多量注入すると値が低くなったため、160、320 μ Lを注入する際には、80 μ Lずつ複数回に分けて注入した後、上記5) 節のHPLC分析条件に示すグラジエントプログラムに従って溶離液Bの割合を段階的に高め、混合溶離液中のNaClの濃度を高めることによりVTGを溶出した。そのため、検量線の作成(のため)にはオートサンプラーを使用せず、手動で注入した。

9) マコガレイ血清中のVTG濃度の測定

マコガレイ血清80 μ Lに血清希釈液を320 μ L加えて軽く攪拌した後、0.45 μ mのメンブランフィルター(DISMIC-13cp, Cellulose Acetate, ADVANTEC TOYO)でろ過し、濾液を直接オートサンプラー用のバイアルに取り、HPLC分析を行ない、検量

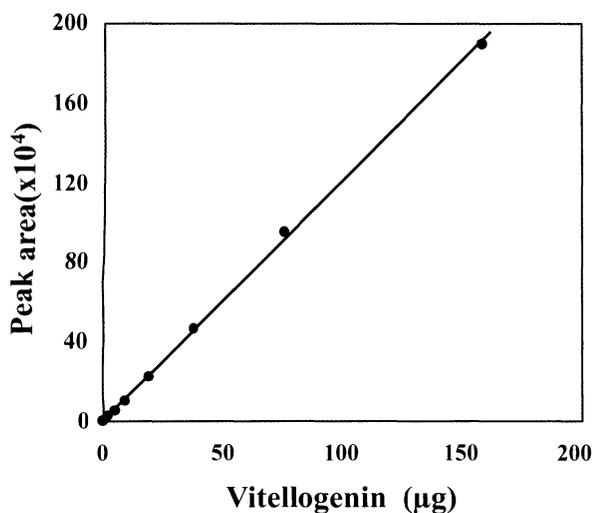


Fig. 2 Calibration curve of vitellogenin measurement of flounder, *Pleuronectes yokohamae*. Samples of purified flounder vitellogenin were chromatographed on a POROS-HQ column and the peak area of the vitellogenin was plotted versus amounts of injected vitellogenin.

線から血清中のVTG濃度を求める。血清量を40 μ Lとしても良い。また、血清中のVTG濃度を測定する上で、産卵期1ヶ月前の雌血清の場合には5倍希釈液を50~100 μ L(血清10~20 μ L)、産卵期の雌血清については25~50 μ L(血清5~10 μ L)をカラムに注入する。検量線からはずれた場合には再度血清希釈液を調製して分析する。マコガレイ雌血清VTG濃度とGSIとの相関関係をみたところ、Fig. 3に示すように、GSIが9以下の個体ではVTG濃度が3 mg/mL以下であるが、GSIが10を越えたあたりからVTG濃度が急激に上昇し、最も高い個体では28mg/mLの濃度を示した。GSIが10~20を示す個体においてVTG合成が活発に行われ、卵黄形成が進行しているものと考えられる。一方、GSIが30近くになるとVTG濃度が低下することから、卵黄形成が終了しているものと思われる。なお、マコガレイ卵巣中の卵はすべて同期して成熟することから、卵黄形成終了時にはGSIが30にも達する(卵巣重量が魚体重の30%を占める)までになる。したがって、成熟時期には卵成熟に必要なVTGを大量に必要とするために、VTG濃度が30mg/mL近くに達するものと考えられる(飯島ら, 2001)。

ELISA(化学発光法)(Hashimoto *et al.*, 1998, 2000)で得られたVTGの値とHPLC分析の結果得られた値を比較すると、VTG濃度が1 mg/mLまでは0.5~3倍くらいの間でやや相関する傾向が見られるが、VTG濃度が1 mg/mLを越えると全く相関関係が見られなかった(飯島ら, 2001)。ELISA(化学発光法)を用いる場合には、VTG濃度が1 mg/mL以下のサンプルに限定して使用することが

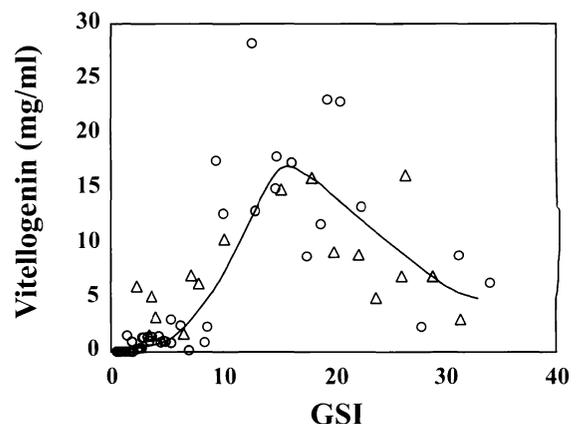


Fig. 3 Relationship between gonadosomatic index (GSI) and vitellogenin (A) in matured female flounder, *Pleuronectes yokohamae* from Suho Nada (○) and Hiroshima bay (△).

望ましいと考えられる。

3. 注意事項

1) 検量線の作成

2. 実験方法の9)節で述べたように、10 μ g以下の濃度でより正確な検量線を作成するためには、まず血清希釈液で牛血清アルブミン (BSA) の5 mg/mL、0.5mg/mL溶液をそれぞれ調製する。最初に5 mg/mL溶液100 μ Lを精製VTG画分900 μ Lに加えてBSAの濃度を0.5mg/mLに調製した後、0.5mg/mL溶液を用い順次段階的に2倍希釈して調製する。精製VTG画分にBSAを添加する理由は、用いる容器などへのVTGの非特異的吸着をできるだけ抑制することにある。

2) 試料量

血清中のVTG濃度を測定する上で、産卵期1ヶ月前の雌血清の場合には5倍希釈液を50~100 μ L (血清10~20 μ L)、産卵期の雌血清については25~50 μ L (血清5~10 μ L)をカラムに注入する。検量線からはずれた場合には再度血清希釈液を調製して分析する。

3) カラムの再調製

血清を4回注入し、分析した後はブランクラン (バッファーのみを注入してグラジエントを行う)を行い、カラムを再調製すると良好なクロマトグラムが得られる。

4) プレカラムフィルターの交換時期

検量線作成のため、精製VTG画分を複数回カラムに注入するとカラム圧が上昇する。この場合はプレカラムフィルターの目詰まりであるのでプレカラムフィルターのフィルターディスクを交換する。また、血清希釈液を10~20回注入・分析すると次第にカラム圧が上昇する。溶離液A液を2.5 mL/minで流した状態で80kg/cm²を越えた段階でプレカラムフィルターを交換する。それでもカラム圧が低下しない場合には、血清中のVTGを含め、リポタンパク質などの脂溶性成分等がカラムに非特異的に吸着しているので、以下に示すカラムのアルカリ洗浄に移る。

5) カラム洗浄法

①カラムを逆につなぎ、カラムの前にプレカラムフィルターを取り付けた後、サンプルループを1-2mLのものに代え、1N NaOH 0.5~1 mLをサンプルの代わりに何度も注入することにより、カラムに非特異的に吸着している脂質成分などを取り除き、カラム圧を下げ

る。この操作でカラム圧が低下しない場合には、下記の操作に移る。

②1N NaOHでポンプと配管を洗浄した後 (50 mL以上流す)、超純水でよく洗浄する (100 mL以上流す)。

③カラムを逆につなぎ、カラムの前にプレカラムフィルターを取り付けて1N NaOHを0.5 mL/minの流速で1~2時間洗浄する。次いで超純水に換え最初の30分間は流速0.5 mL/minで、次いで流速2 mL/minで30分間カラムを洗浄する。

④使用する溶離液をセットし、B液、次いでA液でそれぞれカラム容積の10倍量流し、グラジエントプログラムを2回繰り返した後、使用する。

なお、②~④の操作を行う理由は、以下の通りである。カラム、プレカラムフィルターを一旦はずし、ポンプと配管内を超純水で十分洗浄する (3~5mL/minで約15min)。1N NaOHから超純水に変えてそのまま洗浄操作を行うと、しばらくしてすぐに圧力が上昇する。恐らくポンプ及び配管内の汚れがアルカリによって遊離し、その汚れがプレカラムフィルターに蓄積されて圧力上昇を引き起こすものと思われる。圧力が上昇した後にフィルターを見ると黒く変色している。最も良い方法としては、カラムを洗浄する前に1N NaOHでポンプと配管を洗浄し、超純水でよく洗浄した後、カラム洗浄を行うのがベストであろう。

4. 参考

イオン交換クロマトグラフィーはタンパク質の表面荷電の差を利用して相互にタンパク質を分離する方法であり、陰イオン交換クロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーの2種類がある。前者は解離して陽イオンとなる性質の陰イオン交換体であり、後者はその逆である。Fig. 4に示すように、タンパク質の総電荷が0になるpHが等電点と定義され、タンパク質毎に等電点は異なる。等電点よりも高いpHの溶液中ではタンパク質の総電荷がマイナスになる。Fig. 5に示すように、プラスに荷電したタンパク質は陰イオン交換体に結合できないが、マイナスに荷電したタンパク質は陰イオン交換体に吸着される。Fig. 1-Aはマコガレイ雌血清の陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる分離を示している。マコガレイ雌血清中のタンパク質は5本のピークとして溶

出されるが、その中でも保持時間が1分のピークはカラムを素通りしていることから、プラスの電荷をもつ陽イオン性のタンパク質であり、陰イオン交換体に結合できない。次に、保持時間が4～12分に溶出する2～5番目のピークについてみると、0.1～1.5M NaClの存在下で溶出していることから、いずれのピークも総電荷がマイナスのタンパク質であり、陰イオン交換体に吸着しているが、荷電の程度が異なっている。つまり、2番目のピークは荷電の程度が最も低いので0.1M NaCl、すなわち低濃度のCl⁻イオンと交換されてカラムから溶出される。一方、5番目のピークであるVTGはマイナス荷電の程度が最も高いため、より高濃度(1.5M)のNaCl(すなわちCl⁻イオン)存在下ではじめて溶出されることになる。

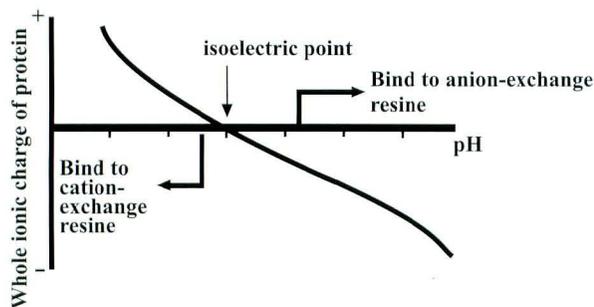


Fig. 4 Relationship between whole ionic charge of protein and pH.

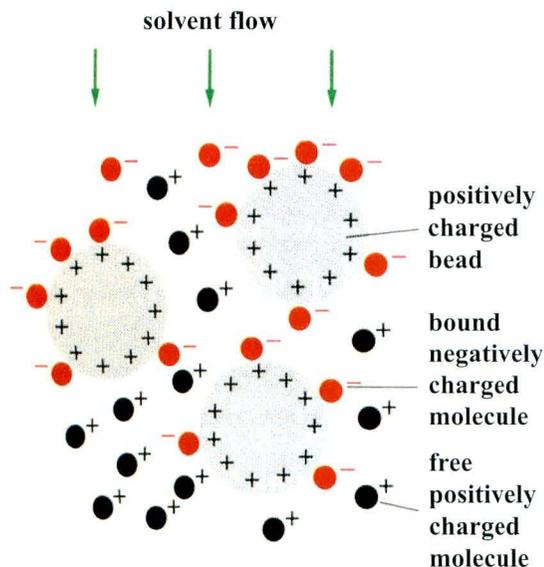


Fig. 5 Principle of ion-exchange chromatography (After Alberts et al., 2002).

引用文献

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. 4th ed., Garland Science, New York, pp.483-484.
- 飯島憲章・植松一眞・下川真理子・石井優子・大嶋雄治・藤井一則・橋本伸哉・原 彰彦・山田 久：瀬戸内海周防灘及び広島湾のマコガレイに対するエストロゲン様内分分泌攪乱物質の影響実態 日本環境毒性学会誌 **4** (1), 45-53 (2001)
- Hashimoto, S., Bessho, H., Sato, K., Hara, A. and Fujita, K. (1998) Vitellogenin in wild male flounder, *Pleuronectes yokohamae*, in Tokyo Bay, Japan. *Jap. J. Environ. Toxicol.*, **1**:75-85.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K. (2000) Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, **49**: 37-53.
- 松原孝博・大久保信幸・澤口小有美 (2008) . 魚類繁殖生理とビテロジェニン. 海生研研報, No. **11**, pp.19-31.
- 宮崎 香他 (1988) 6. ゲルスラブ電気泳動とSDSゲルスラブ電気泳動. 「実験生物学4 生化学的実験法」(金谷春夫、藤田善彦編), 丸善株式会社, 東京, pp.115-143.
- 向井邦晃 (2001). SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動, ウエスタンブロット法. 「基礎生化学実験法 第3巻 タンパク質 I. 検出・構造解析法」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, pp. 18-25.
- Yamanaka, S., Arizono, K., Matsuda, Y., Soyano, K., Urushitani, H., Iguchi, T. and Sakakibara, K. (1998) Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 1196-2000.