

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 利環

クルマエビ類では、卵黄蓄積を終えて産卵直前になると、卵母細胞の周辺部に表層胞が形成される。このため、表層胞は完熟卵の有無を判別し、さらに産卵の可否を推定するための良いマーカーとなっているが、その化学的性質、構造や生成機構には不明な点が多い。そこで、まず第1章では、クルマエビの表層胞タンパク質 (CRP) を精製し、その化学的性質を明らかにするとともに、cDNA クローニングを行い、クルマエビ CRP の構造を明らかにした。第2章では、表層胞タンパク質の産生部位をノザン解析および *in situ* ハブリダイゼーション法により明らかにした。次に、クルマエビ類の成熟機構を理解するため、成熟に伴う卵巣の CRP mRNA および卵巣および肝臓のビテロゲニン (Vg) mRNA の動態を調べた。また眼柄切除によって成熟を誘起したクルマエビで、CRP および Vg mRNA 量の変化を合わせて検討した。第3章では、表層胞を形成しないオニテナガエビの卵巣に表層胞タンパク質が存在するか否かについて検討した。以上、本研究は、エビ類の卵巣の表層胞タンパク質に関する基礎的な知見を得ることを目的としたものである。

第1章 クルマエビ表層胞タンパク質の単離および構造解析

成熟クルマエビ卵巣からゲル濾過、逆相 HPLC により2つの CRP (28.6 kDa および 30.5 kDa 分子) を単離した。28.6 kDa 分子の 1-21 残基アミノ酸配列は 30.5 kDa 分子の 9-29 残基と一致した。次に、28.6 kDa 分子に対する抗血清を作成し、免疫染色を行ったところ、成熟期卵母細胞の周辺部に位置する表層胞に陽性反応が認められた。ウェスタンブロット解析では、28.6 kDa および 30.5 kDa の両分子は 28.6 kDa 分子抗血清に対して陽性反応を示した。次に N 末端アミノ酸配列をもとに CRP cDNA を単離し、その全塩基配列を明らかにした。2種類の cDNA の配列を比較した結果、シグナルペプチドのプロセッシング位置および配列が異なっていた。このことから、2種類の CRP は異なる遺伝子から生じるものと考えられた。両タンパク質には、ともに 1 ヶ所の糖鎖結合部位が存在した。両分子は表層胞の構成成分であり、受精後にゼリー層を形成すると考えられた。

第2章 クルマエビ卵形成における表層胞タンパク質およびビテロゲニン mRNA の発現動態

ノーザンブロット解析の結果、CRP 遺伝子の発現は卵巣でだけ認められた。*In situ* ハイブリダイゼーション法により、発達初期段階の卵母細胞に CRP mRNA が存在することが示さ

れた。さらに CRP mRNA 量は前卵黄形成期および内因性卵黄形成期に高い値を示すこと、Vg 遺伝子の発現の場が卵母細胞の発達に伴い卵巣から肝臓に移行することが示された。

眼柄切除後、生殖腺は徐々に発達した。卵巣の CRP mRNA 量は眼柄切除前に最も高い値を示し、眼柄切除後に、徐々に減少した。逆に眼柄切除前の卵巣の Vg mRNA 量は非常に低いレベルであったが、切除後には著しく増加した。一方、肝臓における Vg mRNA 量に眼柄切除に伴う変化は認められなかった。これらの結果から、卵巣における CRP 遺伝子の転写は眼柄切除前の未熟な状態ですでに進行しているが、タンパク質への翻訳は切除後に促進されることが推察された。

第3章 オニテナガエビの表層胞タンパク質の単離および構造解析

オニテナガエビの卵母細胞内には表層胞は出現しないが、本章では、その卵巣内にクルマエビ CRP 抗体に対して免疫陽性反応を示す 30 kDa タンパク質が存在することを明らかにし、この CRP 様タンパク質の cDNA を単離した。その演繹アミノ酸配列がクルマエビ CRP と高い相同性を示したことから、30 kDa タンパク質はオニテナガエビの CRP であると判断し、*mrCRP* とした。GSI が 0.2 の個体から摘出した卵巣で、*mrCRP* の発現が RT-PCR によって確認された。ウェスタンブロット解析では、GSI 1.6 の卵巣に CRP 抗体に対して免疫反応を示す 30 kDa のバンドが観察された。さらに免疫組織化学により、GSI 0.9 の卵巣に CRP 抗体と反応するタンパク質を検出した。以上のことより、表層胞を形成しないオニテナガエビにおいても、クルマエビ類に観察される表層胞タンパク質が卵母細胞で生産されることが始めて明らかとなった。

以上、本論文は、クルマエビの卵巣から表層胞タンパク質を単離し、構造を決定した後、成熟および眼柄切除に伴う発現動態を明らかにするとともに、表層胞を形成しないオニテナガエビから表層胞タンパク質を単離し、その構造を明らかにしたもので、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。