

2次元電気泳動法による3倍性ギンブナ卵の タンパク質解析

土方 誠・梶島孝雄

信州大学理学部生物学科
(1984年3月21日 受理)

緒 言

ギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* は一般に性比が雌に傾くことが知られており、関東地方のようにほとんど雄個体が認められない地域もある (NAKAMURA, 1969)。このように異常な性比をもつギンブナは染色体数がキンギョやギンブナと同じ $2n=100$ ではなく、156あるいは206の倍数性を示すことが明らかとなり (KOBAYASHI, *et al.*, 1970)、受精過程の細胞学的観察から雌性発生によって繁殖することが報告されている (KOBAYASHI, 1971, OJIMA and ASANO, 1977)。3倍性ギンブナの雌性発生は卵形成過程の減数分裂過程において第一分裂を省略し、同型核分裂を一度だけ行うため卵はすべてその母親と同一のゲノム構成からなる3倍性卵となるという (KOBAYASHI, 1976)。さらにその卵が近縁種の精子によって付活された後卵細胞質に侵入した精子が凝縮したままで膨潤せず、雄性前核も形成しないうえで雌性前核と融合することがないと報告されている (KOBAYASHI, 1971)。したがって3倍性ギンブナにおいては、一個体の雌から生じる子孫はすべてその母親と同一のゲノム構成をもつクローンであると考えられている。

しかし3倍性ギンブナ雌と両性生殖によって繁殖する2倍性フナ雄、あるいはシュブンキン雄との間で人工媒精実験を行い、受精後の卵の組織学的観察を行った結果、卵を用いた3倍性ギンブナ雌の個体によっては卵細胞質に侵入した精子核が膨潤する場合があることが観察された (NAKAKUKI, *et al.* 1983, 1984)。用いた精子が2倍性フナ雄の精子であった場合においても、シュブンキン雄であった場合においても卵を媒精実験に使用した3倍性ギンブナ雌個体の相違によって、精子核の膨潤活性に相違が認められるため、このような相違は卵細胞質側の何らかの要因により生じるものと思われる。したがって3倍性ギンブナには受精過程において精子核が膨潤し前核化する活性をもつ卵を形成する個体と、その活性をもたない卵を形成する個体が存在すると思われる。さらに3倍性ギンブナ雌を用いた人工媒精、あるいは自然交配によって得た F_1 個体に4倍性個体が認められ (NAKAKUKI, *et al.*, 1983, 1984)、このことから3倍性ギンブナ卵の精子核膨潤活性は、通常の両性生殖を行う2倍性フナの卵のもつ精子核膨潤活性と本質的に同一のものである可能性が高いと思われる。

受精過程における卵細胞質内の侵入精子核の膨潤、前核化の過程に関する研究は、ウニ *Arbacia punctulata* (LONGO, 1978)、*Strongylocentrotus purpuratus* (KUNKLE, *et al.*, 1978b)、*Lytechinus variegatus* (ENG and METZ, 1980) やヒトデ *Asterias furbesi* (SCHUETZ

and LONGO, 1981) といった無脊椎動物の他に, メダカ *Oryzias latipes* (IWAMATSU and OHTA, 1978, 1980) やカエル *Bufo bufo* (KATAGIRI and MORIYA, 1976), そして種々のホニュウ類, 例えばマウス (IWAMATSU and CHANG, 1972) やラット (THADANI, 1979) などでは受精時の電子顕微鏡観察, 精子の卵へのマイクロインジェクション実験, あるいは *in vitro* における卵ホモジェネート中で脱細胞膜精子をインキュベートする実験が行なわれており, それらの結果から, 卵に侵入した精子核の膨潤, 前核化は卵細胞質の環境によって支配されると考えられている。ウニ *Strongylocentrotus purpuratus* の精子核を未受精卵のホモジェネートや, 他の細胞の細胞質として種々の塩類溶液中でインキュベートすると卵ホモジェネートにおいてのみ, 精子核の膨潤活性が観察され卵細胞質に精子核のクロマチンを拡散, 膨潤させる因子が存在することが指摘されている (KUNKLE, *et al.*, 1978 b)。ENG and METZ (1980) のウニ卵のホモジェネートを用いた生化学的な実験結果から, ウニ卵の場合侵入精子核の膨潤, 前核形成能は熱に不安定であることから, これら精子核膨潤, 前核形成能には何らかのタンパク質性因子が関与する可能性が高いと思われる。

ENG and METZ (1980) の卵ホモジェネート中で精子核をインキュベートする方法をフナ卵に応用した実験では, 2 倍性フナの産卵期における十分に成長した卵母細胞ホモジェネートには精子核膨潤活性が存在したが, 3 倍性ギンブナ卵には, どの段階の卵にもこのような活性は存在しなかった (MATSUMURA and KAJISHIMA 1984)。このことから 3 倍性ギンブナ卵と 2 倍性フナ卵の卵細胞質環境は明らかに異なることが予想される。そこで本研究では, 特にフナ卵の受精過程における精子核膨潤機構を明らかにし, 3 倍性ギンブナの雌性発生の機構を解析する目的でそれぞれ精子核膨潤能の異なる 3 倍性ギンブナ卵, および 2 倍性フナ卵のホモジェネートを 2 次元電気泳動法を用いそのタンパク質構成を分析し比較を行った。また同時に卵の発生過程における卵のタンパク質構成の変化も観察した。

材料と方法

材料は, 諏訪湖産のギンブナ *Carassius auratus langsdorfii* とナガブナ *Carassius auratus bürgeri* を用いた。種の判別は NAKAMURA (1969) の方法により, また倍数性は各材料魚から採血した赤血球核をフォイルゲン染色し (RASCH, *et al.*, 1970), オリンプス社製顕微分光光度計 MMSP により DNA の相対量を求め判別した。2 倍性と判定した材料魚は, 外部形態的にギンブナとナガブナの判別が困難なためここでは一括して 2 倍性フナとした。

材料魚は水槽で飼育した後 MS222 により麻酔し採卵を行った。冬の成長期卵母細胞 (growing oocyte) は直接卵巣から採取した。摘出後の卵巣塊を 3 倍量の PBS⁻ (NaCl 8.00g, KCl 0.20g, NaHPO₄-2H₂O 1.44g, KH₂PO₄ 0.20g/1000ml D.D.W.) 中で十分に切断した後ステンレスメッシュ120番で濾過し, 濾液を 1,000 r.p.m. で10分間遠心して得た沈殿を PBS⁻ で10回洗浄し, 最終的に得られた沈殿を卵形成過程初期の卵母細胞 (卵径 300 μ m 以下) 試料とした。産卵期における成長した卵母細胞 (full-grown oocyte) も卵巣から直接採取した。成熟未受精卵は産卵期に材料魚の腹部を圧迫し放出させて採取した。受精卵 (fertilized egg) は成熟未受精卵を 2 倍性フナ雄, あるいはシュブンキン雄の

精子を岩松塩類溶液 (IWAMATSU and OHTA, 1978) で希釈したもので人工媒精し、約10分後の卵を用いた。それぞれの試料卵は直ちに -30°C で冷凍保存した。

各試料卵は冷凍保存後室温で解凍し、試料溶液 (8.5M Urea, 2% Nonidet P-40, 2% Ampholine pH 3.5-10, 5% β -mercaptoethanol) 中で軽く洗浄した後、卵形成過程初期卵母細胞および成長期卵母細胞は0.1g, 成長した卵母細胞と成熟未受精卵と受精卵はそれぞれ50個の卵を用い、0.5mlの上記試料溶液と共にテフロンホモゲナイザーによりホモゲナイズした。得られたホモジェネイトは 60°C の湯浴中で10分間インキュベートした後 (MILLER and ELGIN, 1974), あるいは室温で2時間放置した後に1.5000 r.p.m., 20°C 30分間遠心し、その上清を電気泳動用試料とした。

受精卵は保存試料とは別に受精後15分から5分毎に35分後までbouin氏液により固定し、通常のパラフィン切片法によって精子核の動態を組織学的に観察し試料卵の精子核膨潤活性の有無を判別した。

2次元電気泳動はO'FARRELL (1975) の方法をマイクロ化したMIKAWA, *et al.*, (1981) のマイクロ2次元電気泳動法を一部変更して用いた。1次元目の電気泳動は等電点電気泳動 (IEF) を行った。内径0.85mm長さ35mmのヘマトクリット管中に作製した長さ30mmの4.5%ポリアクリルアミドゲル上に試料を添加し、陽極液に0.01 H_3PO_4 , 陰極液に0.1M NaOHを用いて電気泳動を行った。通電は50Vで15分間次に100Vで120分間次に200Vで30分間定電圧で行った。等電点電気泳動終了後1次元目のゲルを直ちにヘマトクリット管から押し出し、ゲル平衡化溶液 (2% SDS, 5% β -mercaptoethanol を含む0.125M Tris-HCl pH6.8溶液) 中で10分間インキュベートして平衡化を行った。

2次元目は、LAEMMLI (1970) の不連続緩衝液法を用いたSDS電気泳動を行った。平衡化した1次元目のゲルはSDSを含む平板ポリアクリルアミドゲル (分離ゲル: $0.9 \times 88 \times 53\text{mm}$ ・濃縮ゲル: $0.9 \times 88 \times 7\text{mm}$, 4.5% アクリルアミド) 上へのせ、アガロースゲル (1% Agalose, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.0625 Tris-HCl pH 6.8) で固定した。泳動用緩衝液は0.25 M Tris, 1.92 M Glycin 1% SDS (pH 8.4) をD.D.W.で10倍に希釈して使用した。電気泳動は陰極緩衝液槽に1% B.P.B.を数滴滴下した後ゲルプレート当たり10mAの定電流で通電を開始し、マーカー色素であるB.P.B.が分離ゲルに達した時点からゲルプレート当たり20mAの定電流で行った。B.P.B.が分離ゲル上端から35mm移動した時点をもって電気泳動を終了した。

2次元電気泳動法によってポリアクリルアミドゲル中に分離したポリペプチドは、OAKLEY, *et al.*, (1980) の方法により銀染色を行い検出した。染色後ゲルを写真撮影しトレーナーのD.D.W.中に保存した。なお1次元目の等電点電気泳動における泳動ゲル内のpI勾配は、オリエンタル酵母社製pIマーカープロテイン (pI値: 10.6, 9.7, 8.3, 6.4, 4.9, 4.1) を用い推定した。2次元目のSDS電気泳動における泳動ゲル内の各スポットの分子量は、シグマ社製SDS分子量マーカー (MW-SDS 70 Kit) を標準試料として用い決定した。

結 果

それぞれの卵試料の2次元電気泳動の結果をFig. 1~5に示した。同一の材料魚から得

た試料卵は2~4回の電気泳動実験を行ったが再現性は良好であった。それぞれのゲルにおいて1次元方向（横軸方向）はほぼ pH4.5~8.0 の範囲でポリペプチドが分離しており、2次元方向（縦軸方向）は分子量15,000~70,000の範囲において直線的な分離をしていることを標準試料により確認した。ゲル上部（高分子量領域）でスポットの乱れが認められるが、これは2次元目の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約20,000~130,000までを効果的に分離できるとされる10%ポリアクリルアミドゲルを用いたため、それ以上の高分子量領域で分離能が低下したのが原因と思われる。以下各卵試料の2次元電気泳動パターンにおいて卵形成の段階によって変化のあったスポット、および3倍性ギンブナ卵と2倍性フナ卵の間で差異のあったスポットを総スポット数が最も多くなった成長した卵母細胞（full-grown oocyte）、もしくは成熟未受精卵（matured egg）の2次元電気泳動パターンを標準として、S1, S2, S3...のように命名した。

1. 卵形成過程初期卵母細胞

Fig. 1 は3倍性ギンブナの卵形成過程初期卵母細胞の2次元電気泳動パターンで、ゲル内に約200前後のスポットが確認できた。しかし個々のスポットの染色濃度は低く、各々

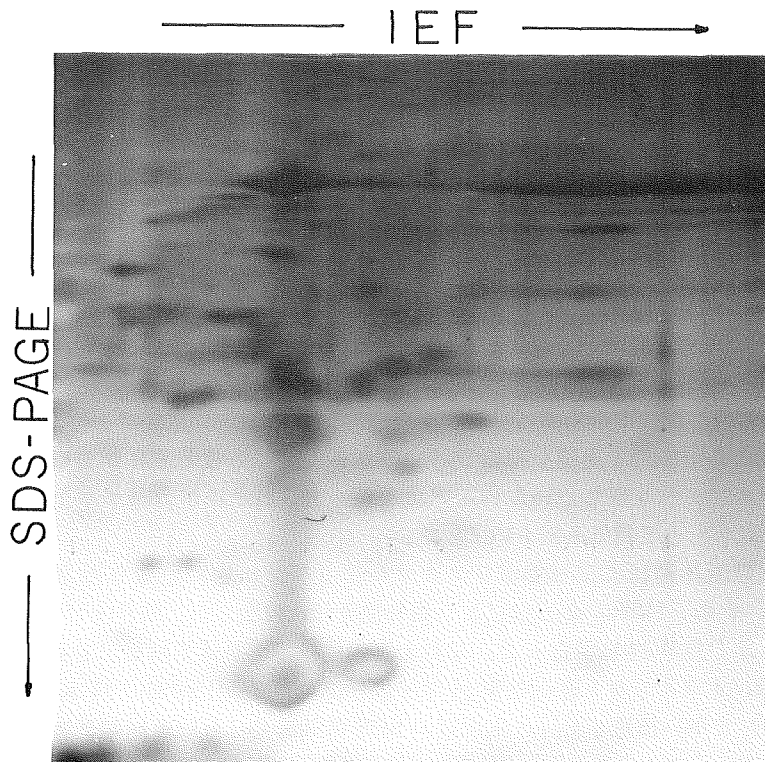


Fig. 1 The two-dimensional polypeptide pattern of early developmental stage of oocytes of triploid ginbuna. The first dimension was isoelectric focusing (IEF) between approximately pH 8.0 (left) and 4.5 (right). The second dimension was sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) from top to bottom.

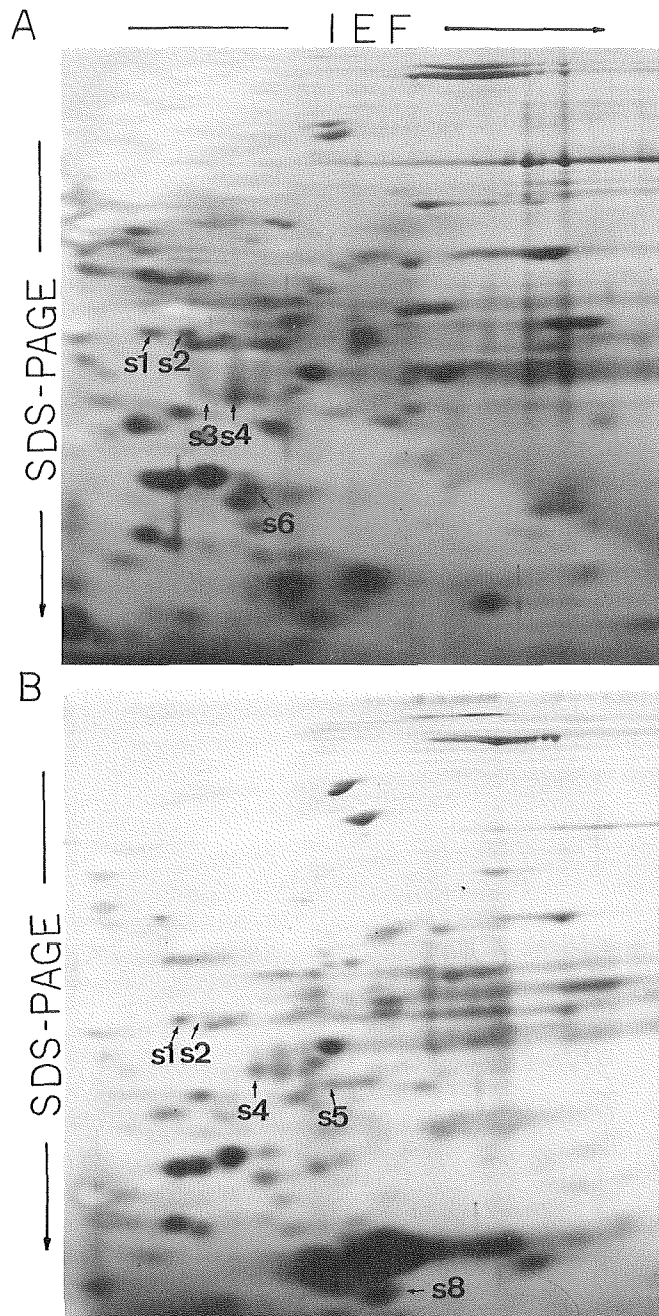


Fig. 2 The two-dimensional polypeptide pattern of growing Oocytes of triploid ginbuna (A) and diploid funa (B). The significance of notations on these patterns is discussed under results. Nomenclature is the same as in Fig. 3.

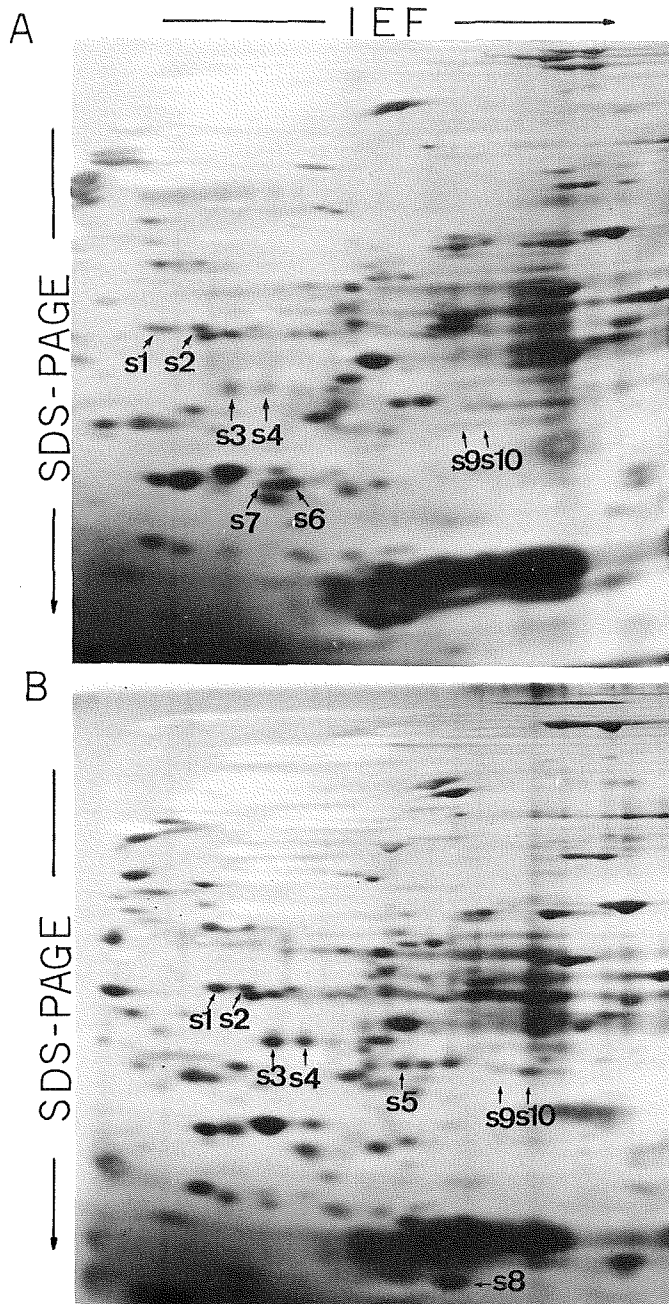


Fig. 3 The two-dimensional polypeptide pattern of full-grown oocytes of triploid ginbuna (A) and diploid funa (B). Arrows indicate the characteristic polypeptides in comparison between (A) and (B) or in development. The significance of notations on these patterns is discussed under results.

のポリペプチドが量的に少ないと思われる。また低分子量領域に量的に豊富なスポットが存在するため、2次元方向にストリークが生じ、この領域のスポットが確認できなかった。

2. 成長期卵母細胞

3倍性ギンブナ(A)および2倍性フナ(B)の成長期卵母細胞 (growing oocyte) の2次元電気泳動パターンを Fig. 2 に示した。ゲル内に約400前後のスポットが確認できた。Fig. 1 の卵形成過程初期卵母細胞の電気泳動パターンと比較すると、スポット数が約2倍に増加し、各スポットの染色濃度が高く各ポリペプチドが量的にも増加していることがわかった。3倍性ギンブナ卵と2倍性フナ卵を比較すると、スポット S3, および S6 は3倍性ギンブナにのみ存在し、スポット S5 および S8 は、2倍性フナにのみ存在した。しかしスポット S6 は用いた3倍性ギンブナの個体の相違によって、存在する場合と存在しない場合があった。2倍性フナ卵の2次元電気泳動パターンには用いた個体による相違は認められなかった。

3. 成長した卵母細胞

3倍性ギンブナ(A)および2倍性フナ(B)の成長した卵母細胞 (full-grown oocyte) の2次元電気泳動パターンを Fig. 3 に示した。Fig. 2 の成長期卵母細胞の2次元電気泳動パターンと比較すると、3倍性ギンブナ卵の場合スポット S7, S9, S10 が出現し、スポット S3, S4 の染色濃度が相対的に増加した。またスポット S5 の存在する個体もあった。スポット S6, S7 は3倍性ギンブナ卵にのみ存在するが、用いた3倍性ギンブナ個体によって相方が存在する場合とどちらか一方だけが存在する場合があった。2倍性フナの場合スポット B3, S9, S10 が出現し、スポット S4 の染色濃度が相対的に増加した。スポット S8 は2倍性フナにのみ存在した。

4. 成熟未受精卵

3倍性ギンブナ(A)(B)および2倍性フナ(C)の成熟未受精卵 (matured egg) の2次元電気泳動パターンを Fig. 4 に示した。(A)は試料卵の媒精実験において、組織学的観察から精子核膨潤活性を示さなかった個体 (Sperm Condensing type: SC タイプ) であり、(B)は同様の観察から精子核膨潤活性を示した個体 (Sperm Decondensing type: SDC タイプ) である。Fig. 3 の成長した卵母細胞の2次元電気泳動パターンと比較すると、3倍性ギンブナ卵の場合 SC タイプ、SDC タイプともにスポット S1, S6, S7 が消失し、スポット S2, S4 の染色濃度が低下した。スポット S3 は SC タイプではわずかながら存在する個体と存在しない個体があり、SDC タイプではわずかながら存在した。また SDC タイプでは新たに S11 が出現した。2倍性フナの場合スポット S1, S3, S4, S8 が消失し、他には変化は認められなかった。3倍性ギンブナ卵 SC タイプおよび SDC タイプと2倍性フナ卵を比較すると2倍性フナ卵で消失したスポット S3, S4 が3倍性ギンブナ卵ではわずかに存在する場合があり、2倍性フナ卵で変化の少なかったスポット S2 が3倍性ギンブナ卵では染色濃度が低下した。スポット S5 は2倍性フナに依然として存在するが、スポット S11 は存在しなかった。3倍性ギンブナ卵 SC タイプと SDC タイプを比較すると SDC タイプには SC タイプに存在しないスポット S5 および S11 が認められた。

5. 受精卵

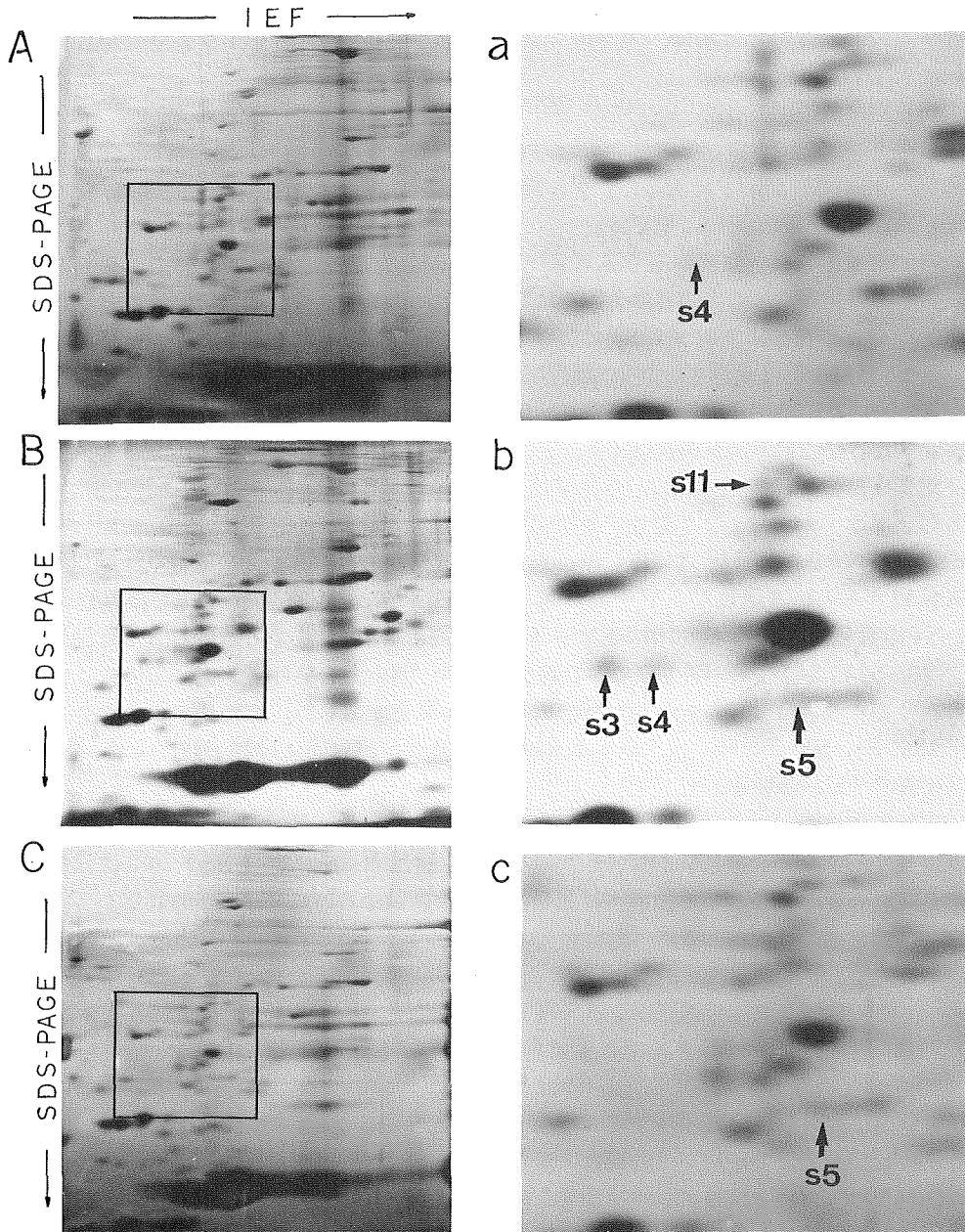


Fig. 4 The two-dimensional polypeptide pattern of matured eggs of triploid ginbuna (A), (B) and dipliod funa (C). (B) is the pattern of exceptional triploid ginbuna eggs which have the ability to decondense the penetrated sperm chromatin as diploid funa ones. The areas of (a), (b) and (c) are delineated by squares in (A), (B) and (C), respectively. A full discription of notations is discussed under results.

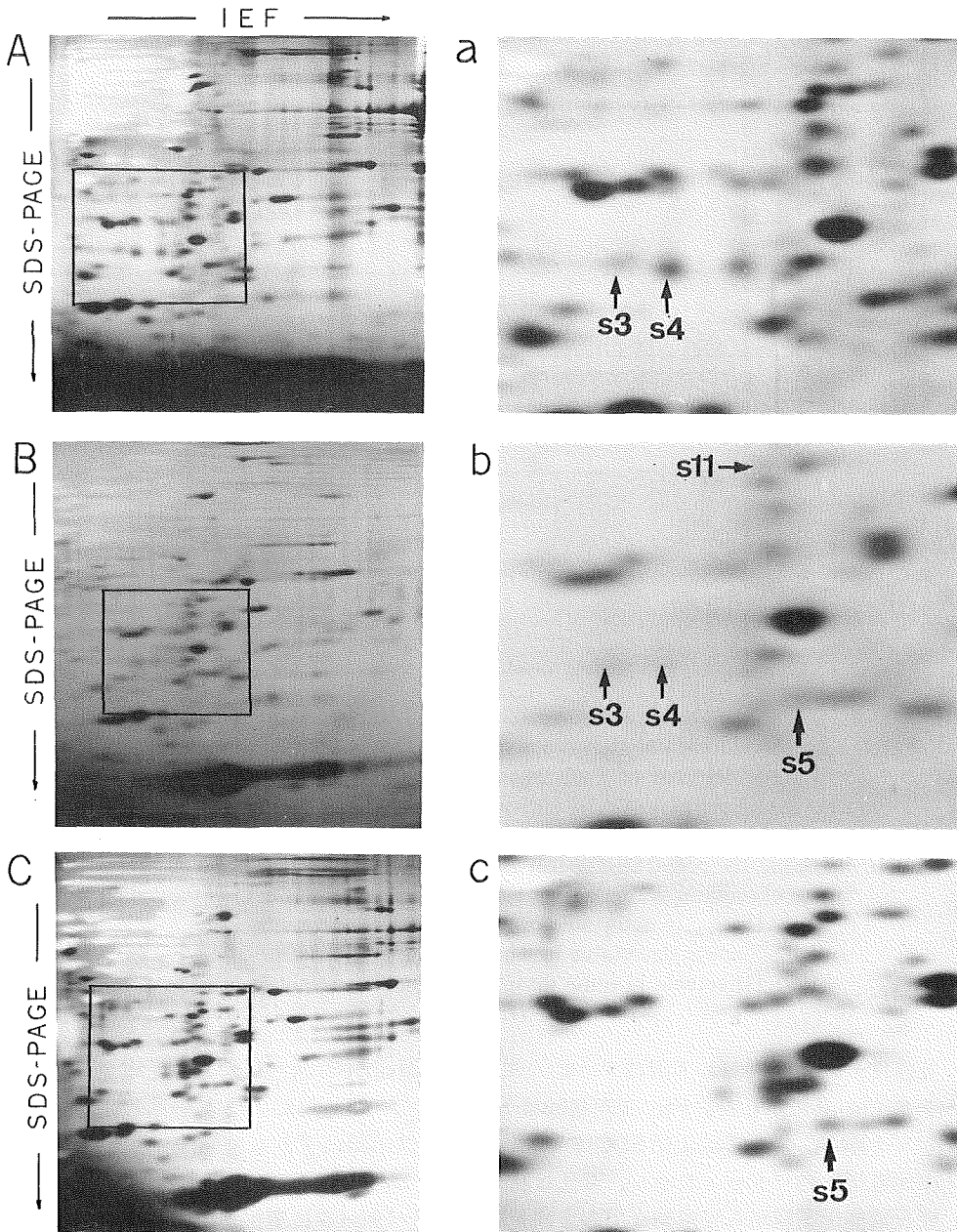


Fig. 5 The two-dimensional polypeptide pattern of fertilized eggs of triploid ginbuna (A), (B) and diploid funa (C). The details of this figure are the same as in Fig. 4.

ploidy	spot	growing oocyte	full grown oocyte	matured egg	fertilized egg
2 n	S 1	—————	—————	—————
	S 2	—————	—————	—————
	S 3	—————	—————	—————
	S 4	—————	—————	—————
	S 5	—————	—————	—————
	S 6	(3 n)	—————	—————
	S 7	(3 n)	—————	—————
	S 8	—————	—————	—————
	S 9	—————	—————	—————
	S 10	—————	—————	—————
	S 11	—————	—————	—————
3 n	S 1	—————	—————	—————
	S 2	—————	—————	—————
	S 3	—————	————— (SC type)	—————
	S 4	—————	————— (SDC type)	—————
	S 5	—————	————— (SDC type)	—————
	S 6	—————	—————
	S 7	—————	—————
	S 8	(2 n)	—————	—————
	S 9	—————	—————	—————
	S 10	—————	—————	—————
	S 11	—————	————— (SDC type)	—————

Fig. 6 The developmental alterations of eleven characteristic polypeptides (S1-S11) which are detected on two-dimensional polypeptides pattern of oocytes and eggs in triploid ginbuna (3n) and diploid funa (2n). S6 and S7 are detectable only in triploid ginbuna. S8 is detected only in diploid funa. SC type and SDC type represent the penetrated sperm chromatin condensing type and the penetrated sperm chromatin decondensing type, respectively.

—————; Distinctly detectable in whole sample individuals.

.....; Slightly detectable in whole sample individuals.

-----; Detectable in some sample individuals and not in others.

3倍性ギンブナ(A)(B)と2倍性フナ(C)の受精卵 (fertilized eggs) の2次元電気泳動パターンを Fig. 5 に示した。Fig. 4 同様(A)は SC タイプ, (B)は SDC タイプを示した。3倍性ギンブナ卵 SC タイプおよび SDC タイプ, 2倍性フナ卵いずれも成熟未受精卵と同様の2次元電気泳動パターンを示し, 変化は認められなかった。

成長期卵母細胞から受精卵までの2次元電気泳動パターンに変化のあったスポット, および3倍性ギンブナ卵と2倍性フナ卵で相違のあったスポットは, S1~S11の11スポットであった。それぞれのスポットの分子量はS1およびS2が約70,000, S3およびS4が約60,000, S5が約55,000, S6およびS7が約45,000, S8が約20,000, S9およびS10が約53,000, S11が約75,000であった。各スポットの成長期卵母細胞から受精卵までの変化は

Fig. 6 に示した。

考 察

今回卵細胞質に侵入した精子核が雄性前核化し一般的な両性生殖を行う2倍性フナ、精子核が凝縮したままで膨潤・雄性前核化しない雌性発生3倍性ギンブナ、および組織学的に精子核の膨潤が観察された3倍性ギンブナの成熟未受精卵、そして受精卵のホモジェネートを2次元電気泳動法によって分離、解析した結果、2倍性フナ卵と精子核の膨潤が観察できた3倍性ギンブナ卵には存在するが、精子核が膨潤しない3倍性ギンブナ卵には存在しないスポットS5が確認できた。

魚類の受精過程において卵細胞質内に侵入した精子核が雄性前核化する過程は、IWAMATSU and OHTA (1978) によってメダカ卵を用いた電子顕微鏡観察が行なわれている。それによると卵細胞質内に侵入した精子核はまずその核膜が消失し、次にクロマチンが膨潤拡散する。その拡散したクロマチンにそって胞状構造がのび互いに融合して核模を再構成し雄性前核が構成されるとしている。精子核は精子形成過程でその核タンパク質を体細胞型のヒストンからプロタミンあるいはクルペインに代表されるアルギニン含量の多い塩基性タンパク質(鈴木, 岩井 1967)に置換した後凝縮して形成されるが、おそらく卵細胞質に侵入した精子核の雄性前核化はこの逆の反応を含むものと考えられる。事実ウニでは精子核、雄性前核、雌性前核、接合核の各々のタンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果、雄性前核と雌性前核と接合核の核タンパク質はほとんど相違がなく、精子核の核タンパク質のみが他と異っていると報告されている(KUNKLE, *et al.*, 1978a)。したがって精子核の膨潤・雄性前核化には形態的变化とともに分子レベルでの変化が存在し一連の複雑な反応系によって構成されるものと思われる。

当研究室において3倍性ギンブナ雌と2倍性フナ雄およびシュブンキン雄との交配実験を行い、その受精過程の組織学的観察を行った結果、精子核の膨潤の有無は精子側の要因ではなく、用いた3倍性ギンブナ個体の相違によることが確かめられた(NAKAKUKI *et al.*, 1983, NAKAKUKI and KAJISHIMA, 1984)。また2倍性フナの十分に成長した卵母細胞のホモジェネート中で脱細胞膜精子をインキュベートする実験において精子核の膨潤が観察された(松村, 梶島, 1984)ことから、フナ属においても精子核を膨潤させる因子が卵細胞質中に存在するものと思われる。したがってスポットS5は精子核を膨潤させる因子のうちの1つであるか、または1つの因子を構成するポリペプチドの1つである可能性が考えられる。しかし、ENG and METZ (1980)の実験のように活性物質としての分子量を測定したものではないので、ウニとフナという種の相違もあり、単純に比較することはできない。

雌性発生3倍性ギンブナの受精過程において卵細胞質中に侵入した精子核が膨潤しない原因には、3倍性ギンブナの卵細胞質に1)精子核膨潤に関する因子が欠除しているか、あるいは微量しか存在しない。2)精子核膨潤に関する因子は存在するがこれに阻害的に働く活性が存在する。という2つの場合が考えられる。もしスポットS5を精子核の膨潤に関係する因子の1つ、またはそれを構成するポリペプチドの1つと仮定するならば、雌性発生3倍性ギンブナの受精過程において精子核の膨潤が行なわれないことは、このスポット

S5 が欠除しているか、あるいは量的に微量しか存在しないために生じると考えられる。3 倍性ギンブナにおいて冬の成長期卵母細胞や春の十分に成長した卵母細胞の 2 次元電気泳動パターンに、スポット S5 が存在する個体と存在しない個体があったことは、3 倍性ギンブナの中に精子核の膨潤活性を示す個体と示さない個体が存在する (NAKAKUKI *et al.*, 1983, NAKAKUKI and KAJISHIMA, 1984) ことに関係しているように思われる。

精子核の膨潤活性を示す 3 倍性ギンブナの成熟未受精卵および受精卵には、スポット 11 が特徴的に存在している。GVBD (卵核崩壊) 後に出現したのはただ 1 つこのスポット S11 だけであった。スポット S11 が精子核の膨潤に関係するかどうかは不明であるが、このスポットの存在は 3 倍性ギンブナの卵成熟に 2 倍性フナの場合とは質的な相異が存在することを示しているように思われる。またスポット S3, S4 は 2 倍性フナにおいては成熟未受精卵以降消失するが、3 倍性ギンブナにおいては成熟未受精卵以降も存在していた。3 倍性ギンブナではその卵の精子核膨潤活性の有無を問わずこのスポットは存在するため、精子核膨潤活性には直接関係ないものと思われる。しかしながら 2 倍性フナにおいて GVBD 以降卵成熟の完了している成熟未受精卵で、これらのスポットが消失しているにもかかわらず、3 倍性ギンブナにおいては卵成熟を完了した成熟未受精卵で存在していることも、2 倍性フナと 3 倍性ギンブナの卵成熟に質的な相異が存在することを示しているものと思われる。3 倍性ギンブナの卵成熟以前の卵母細胞に 3 倍性ギンブナに特徴的なスポット S9, S10 が存在することも、このことと何らかの関係があるかもしれない。

卵の精子核膨潤および雄性前核形成能の獲得に関する研究は、種々の動物によって行なわれており、一般に卵内に侵入した精子核が膨潤し雄性前核形成を行うためには GVBD を含む正常な卵成熟が必要であると考えられている (HIRAI, 1976, MORIYA and KATAGIRI 1976, KATAGIRI 1980, HIRAI, *et al.*, 1981)。2 倍性フナの卵の場合精子核膨潤・前核形成能の獲得に GVBD を含む卵成熟が必要であるかどうかは不明であるが、メダカの卵の場合 GV 内容物は直接精子核膨潤・前核形成には関与せず、卵割時におけるクロマチンの染色体形成に GV 内容物と卵細胞質の混合が必要であると報告されている (IWAMATSU and OHTA, 1980)。このように正常な卵成熟は精子核の膨潤・前核形成のみならず雌雄両前核の融合、卵割などその後の発生に関係すると思われる。前述したように精子核の膨潤能をもつ 3 倍性ギンブナ雌と 2 倍性フナ雄、あるいはシュブンキン雄との交配により生じた子孫の倍数性が 3 倍性の場合と 4 倍性の場合があり必ずしも卵細胞質内で膨潤した精子核が、雄性前核化し、雌性前核と融合して接合核を形成するわけではないと思われる。このことも 2 倍性フナと 3 倍性ギンブナの卵成熟に質的な相異が存在することを示すものと思われる。以上のように雌性発生を行う 3 倍性ギンブナの特徴的な受精過程は、卵細胞質に侵入した精子核が膨潤しないという形態的な問題だけでなく、何らかの生理学的な問題を含むものと考えられる。

今回 2 倍性フナと 3 倍性ギンブナの卵の 2 次元電気泳動パターンを各々の発生段階を追って比較したところ、卵母細胞の成長過程および GVBD 前後に変化がみられ、受精前後には変化がなかった。卵母細胞の成長過程における変化は、スポット数の増加および既存のスポットの染色濃度の上昇であった。一般に卵母細胞の成長過程は卵黄蓄積期に相当し、種々の RNA、およびタンパク質の合成、蓄積そして卵細胞からの生産物移動が行

なわれていると考えられており、今回の結果もこのことを示しているものと思われる。GVBD前後における変化は先に述べたS11以外、2倍性フナの場合も3倍性ギンブナの場合も既存のスポットの消失あるいは相対濃度の低下であった。このような変化が生じる原因にはこれらのスポットが(1)卵以外の要素、例えば胞細胞に関するポリペプチドであったこと、(2)GVBDに直接必要であった要素に関するポリペプチドであったこと、(3)GVBD以降何らかの生理学的な変化を受けたことが考えられる。スポットS3, S4については、3倍性ギンブナの成熟未受精卵に存在するため、(1)の可能性は考えられない。しかし他のスポットに関しては今回の実験では不明である。(3)の場合成熟未受精卵の2次元電気泳動パターンに新しいスポットが出現する可能性があるが、今回新たに出現したスポットはS11だけであった。

マウス (SCHULTZ and WASSARMAN, 1977 a, b, RICHTER and MCGAUGHEY, 1981) やブタ (MCGAUGHEY and VAN BLEKOM, 1977) やウサギ (VAN BLEKOM and MCGAUGHEY, 1978) などのホニュー類においては、GVBD以降タンパク質合成に変化が生じ、新たに合成が開始されるポリペプチドの存在が報告されている。しかしカエル *Xenopus laevis* ではGVBD以降新たに合成されるポリペプチドはなく、むしろGVBD以降合成されるポリペプチド数は減少すると報告されており (BALLANTINE, *et al.*, 1979), 今回の2倍性フナおよび精子核膨潤活性をもたない3倍性ギンブナと同様の傾向を示している。したがってスポットS11の場合も新生されたポリペプチドというよりは、既存のポリペプチドが何らかの修飾を受け生じたスポットである可能性が高いかもしれない。

受精前後において変化が認められなかったことは、受精卵試料が受精後約10分に凍結保存したものであり、たとえ新しいポリペプチドが合成され始めたとしても量的な蓄積が不十分であったためとも考えられる。しかしウニの卵母細胞 (BRANDHORST, 1976) やマウスの卵母細胞 (CASCIIO and WASSARMAN, 1982) の受精前後におけるポリペプチド合成の比較を行った研究によれば、ポリペプチド合成に大きな変化が認められず今回の結果とほぼ一致している。一方、HAMANO (1957) や OHI (1962) は魚類の卵タンパク質に関する生化学的研究を行い、受精時に卵タンパク質に変化が生じると報告している。今回の実験では受精前後に変化が認められなかったが、それは卵タンパク質を変性剤を用いて可溶化した試料を用いポリペプチド単位の比較を行ったため、上記の研究結果を否定するものではない。

今回の実験では試料作製時に試料をホモゲナイズした後、通常60°C 10分間のインキュベーションを行ったが、室温で2時間放置した試料ホモジェネイトを用いた場合においても、2次元電気泳動パターンには変化はなく、卵細胞質に含まれるプロテアーゼやジペプチターゼ (HAMANO 1957), 及びリン酸化酵素の2次元電気泳動パターンへの影響はないものと思われる。2次元電気泳動法においては分子量200,000以上の高分子量領域および分子量10,000以下の低分子量領域、あるいは極酸性域および極塩基性域に存在するポリペプチドの比較はできないため、これらの領域においてポリペプチドに何らかの相異あるいは変化が存在することは否定できない。しかしそのことは今回の結果を否定するものではない。雌性発生における受精の機構についてはいまだに不明な点が多いが、これらを解明していくことは一般の受精現象の解明に大きな役割を果すものと思われる。

References

- BALLANTINE, J. E. M., WOODLAND, H. R. and STURGESS, E. A. (1979) *J. Embryol. exp. Morph.*, **51**, 137-153.
- BLERKOM, J. V. and MCGAUGHEY, R. (1978) *Develop. Biol.*, **63**, 139-150.
- BRANDHOST, B. P. (1976) *Develop. Biol.*, **52** 310-317.
- CASCIO, S. M. and WASSERMAN, P. M. (1982) *Develop. Biol.*, **89**, 397-408.
- ENG, L. A. and METS, C. B. (1980) *J. Exp. Zool.*, **212**, 159-167.
- HAMANO, S. (1957) *Mem. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **2**, 91-143.
- HIRAI, S. (1976) *Bulletin of the marine biological station of Asamushi.*, **15**, 4.
- ' NAGAHAMA, Y., KISHIMOTO, T. and KANATANI, H. (1981) *Develop., Growth and Differ.*, **23**, 465-478.
- IWAMATSU, T. and CHANG, M. C. (1972) *J. Reprod. Fert.*, **31**, 237-247
- ' and OHTA, T. (1978) *J. Exp. Zool.*, **205**, 157-180.
- ————— (1980) *Gamete Research.*, **3**, 121-132.
- KATAGIRI, C. and MORIYA, M. (1976) *Develop. Biol.*, **50**, 235-241.
- (1980) *Develop., Growth and Differ.*, **22**, 237-245.
- KOBAYASHI, H. (1971) *Zool. Mag.*, **80**, 316-322.
- (1976) *Japan, J. Ichthyol.*, **20**, 7-12.
- KUNKLE, M., LONGO, F. J. and MAGUN, B. E. (1978 a) *J. Exp. Zool.* **203**, 371-380.
- ————— (1978 b) *J. Exp. Zool.*, **203**, 381-390.
- LAEMMLI, U. K. (1970) *Nature.*, **227**, 680-685.
- LONGO, F. J. (1978) *Develop. Biol.*, **62**, 271-291.
- MATSUMURA, K. and KAJISHIMA, T. (1984) *Journal of the Faculty of Science, Shinshu University*, **19**,
- MCGAUGHEY, R. W. and BLERKOM, J. V. (1977) *Develop. Biol.*, **56**, 241-254.
- MIKAWA, T., TAKEDA, S., SHIMIZU, T. and KITaura, T. (1981) *J. Biochem.*, **89**, 1957-1962.
- MILLER, D. W. and ELGIN, S. C. R. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 142-148.
- MORIYA, M. and KATAGIRI, C. (1976) *Develop., Growth and Differ.*, **18**, 349-356.
- NAKAKUKI, M., SAWANO, K., TOYA, H. and KAJISHIMA, T. (1983) *Zool. Mag.*, **94**, 510.
- and KAJISHIMA, T. (1984) *Journal of the Faculty of Science, Shinshu University*, **19**,
- NAKAMURA, M. (1969) Cyprinid fishes of Japan. Research institute for national resources, Tokyo.
- OHI, Y. (1962) *Embryologia.*, **7**, 208-222.
- OJIMA, Y. and ASANO, N. (1977) *Proc. Jap. Acad.*, **53**, 138-142.
- O'FARRELL, P. H. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
- OAKLEY, B. R., KIRSCH, D. R. and MORRIS, N. R. (1980) *Anal. Biochem.*, **105**, 361-363.
- RASCH, E. M., PREHN, L. M. and RASCH, R. W. (1970) *Chromosoma*, **31**, 18-40.
- RICHTER, J. D. and MCGAUGHEY, R. W. (1981) *Develop. Biol.*, **83**, 188-192.
- SCHUETS, A. W. and LONGO, F. J. (1981) *J. Exp. Zool.*, **215**, 107-111.
- SCHULTZ, R. M. and WASSERMAN, P. M. (1977 a) *J. Cell Sci.*, **24**, 167-194.
- ————— (1977 b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 538-541.
- 鈴木紘一, 岩井浩一 (1967) 蛋白質・核酸・酵素, **12**, No 13, 1156-1163.
- THADANI, V. M. (1979) *J. Exp. Zool.*, **210**, 161-168.

**Analysis of Egg Cytosol Proteins in the Polyploid
Ginbuna, *Carassius auratus langsdorffi*,
by Two-Dimensional Electrophoresis.**

MAKOTO HIJIKATA and TAKAO KAJISHIMA

Department of Biology, Faculty of Science,
Shinshu University, Matsumoto 390

(Received 21 March, 1984)

Abstract

To investigate the mechanisms of gynogenetic development of ginbuna, *Carassius auratus langsdorffi*, the protein constitution of growing oocytes, full-grown oocytes, matured eggs and fertilized eggs obtained from triploid ginbuna and diploid funa were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The results are as follows; (1) the one polypeptide which exists in bisexual diploid funa and exceptional triploid ginbuna is lacked in gynogenetic triploid ginbuna which does not decondense the penetrated sperm chromatin to male pronucleus; (2) the alteration of protein constitution following germinal vesicle breakdown in triploid ginbuna is different form that in diploid funa in quality; (3) number of polypeptides, distinctly detected in the polyacrylamide gel, slightly decreases after oocyte maturation in the diploid funa; (4) the protein constitution does not alter following fertilization. These results seem to suggest the hypothesis that the factor(s) of sperm chromatin decondensation is lacked in egg cytosol of gynogenetic triploid ginbuna and oocyte maturation in gynogenetic triploid ginbuna differ qualitatively from that in diploid funa.