

短報

ヒラメ仔魚の発育におけるストレス蛋白(HSP90) 発現と
各種微細藻類餌料の効果

芦田貴行*1, 沖増英治*2,3, 雨村明倫*2,3

Expression of Heat Shock Protein (HSP) 90 Homologue
during Larval Development
of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*
under Various Feeding Conditions

Takayuki Ashida*1, Eiji Okimasu*2,3, and Akinori Amemura*2,3

Rep. Res. Inst. Mar. Biores., Fukuyama Univ., (9), 33-37 (1998)

Western blot analysis has been employed to demonstrate that heat shock protein (HSP) 90 are present during a larval stage of development of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. HSP90 homologue levels of Japanese flounder larvae fed on rotifers *Brachionus plicatilis*, secondary-cultured with *Nannochloropsis oculata* or *Euglena gracilis*, increased dramatically on day 10 after hatching. Those data raise a number of interesting questions regarding the function and regulation of the HSP in Japanese flounder fed on various diets.

Key words: Japanese flounder, heat shock protein (HSP) 90, development

多くの魚類受精卵は浮上卵であり、太陽からの紫外線をはじめとした周囲の環境による影響を直接的に受けやすい海水面で分化し孵化に至る。また、ヒラメの場合においては、特に他の魚類と比べ孵化後約一月の間に大きな形態変化を伴っている。その形態変化は、孵化後約 2 日令における卵黄の吸収後に生じる

*1福山大学大学院生命工学専攻博士後期課程 (Doctoral Programs in Life Science and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

*2海洋生物工学科 (Department of Marine Biotechnology, Fukuyama University, Fukuyama 729-0292).

*3内海生物資源研究所 (Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Innoshima 721-2101).

肛門の前方移動に始まる。更に 4 日令においては色素沈着が開始し, 6 日令においては背鰭前端部鰭条(きじょう)の原基の出現が見られ, その後の約 20 日間で鰭条の伸長が完了し, 体型の側偏及び右眼の移動が観察される¹⁾。このようなヒラメ受精卵の分化発生および, 仔魚初期に生じる短期間の急激な形態変化は, 個体に対して大きなストレスを与えているものと考えられる。また, このような一連の形態変化に伴う新生蛋白質合成の活性化, 各種ホルモンおよびそのレセプターの出現などによっても ストレス蛋白(HSP)の誘導される可能性が高いものと考えられる²⁾。

本研究では, このように仔魚期の短期間で大きな形態変化を行うヒラメを実験材料として用い, その仔魚期における HSP の発現動態を検索するとともに, 様々な微細藻類を用いて 2 次培養を行ったワムシ給餌によるヒラメ仔魚の HSP 発現動態への影響について検索した。

材料および方法

試験魚 ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)は, (有)まる阿水産から購入した受精卵を当研究所において孵化させた魚を用いた。

餌料 動物性プランクトンのシオミズツボワムシ(以下ワムシ) (*Brachionus plicatilis*) は, 社団法人広島県栽培漁業センターより分与して頂いた。植物性プランクトンの *Nannochloropsis oculata* は当研究所において培養, ドコサヘキサエン酸で栄養強化した *Euglena gracilis* はハリマ化成(株)より購入, *Synechocystis* sp. は因島近海より分離(以下SY-4), *Tetraselmis tetrathele* は当研究所において培養したものを使用した。

ワムシの一次・二次培養 ワムシの一次培養は 1,000 ℓ の透明パンライト水槽にヒーターを入れ, 水温を約 28℃ に保ち, 屋外培養した *T. tetrathele* を餌料として行った。SY-4, *N. oculata* および *E. gracilis* を海水 10 ℓ に 5.8 g 懸濁したものを, それぞれ 20 ℓ のパンライト水槽に収容し室温下でワムシを二次培養し, ヒラメ仔稚魚に給餌した。

飼育 飼育水槽には黒色 200 ℓ パンライト水槽を用い, SY-4 を用いて二次培養したワムシを給餌する SY-4 単独給餌区, *E. gracilis* を用いて二次培養したワムシを給餌する D. *Eug.* 単独給餌区, *N. oculata* を用いて二次培養したワムシを給餌する *N. ocu.* 単独給餌区の 3 区を設けた。ヒラメ受精卵は 1 試験区に 7,500 粒を収容し, 濾過海水 200 ℓ /min を給水した。仔魚への給餌は, 開口確認後より 1 試験区に 2×10^6 個体(給餌開始から 16 日目からは給餌するワムシを 1.5 倍に増やした)を 90 分おきに 1 日 4 回行った。試験期間中の海水温は 17.0℃~20.0℃であった。

細胞抽出液の調製 受精卵および, 給餌開始後 2, 7, 12, 22, 26 日目に各試験区からヒラメ仔魚 0.2 g をサンプリングし, 4 倍量(受精卵においては 2.5 g をサンプリングし 2 倍量)の 10mM KPi buffer (pH 7.4) を試料に加え, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), EDTA をそれぞれ, 終濃度 1mM となるように添加した。これを超音波処理(出力 40~60W, 0.5 秒のインターバルで 30 秒×4 回)を施した後, 100,000×g, 4℃, 30min の超遠心を行い, その上清を回収した。

蛋白質量の定量 BCA protein assay reagent (Pierce)を用いて細胞抽出液の蛋白質量を定量し, 0.2mg protein /ml となるように電気泳動用サンプルを調製した。

ヒラメ仔魚のストレス蛋白発現

SDS 電気泳動分析 (SDS-PAGE) 蛋白量 0.2mg protein / ml の試料を SDS 化溶液と 1:1 で混合し、沸騰水浴中で 3 分間、加熱処理し SDS-PAGE 用泳動サンプルとした。これを 10% 分離 gel (pH8.8) , 3% 濃縮 gel (pH6.8) の pH 不連続 gel の各ウェルに 20 μ l ずつ入れ (2 μ g protein/ lane), 泳動用 buffer を用い、電圧 250V, 電流 66mA で電気泳動を行った。

Western blotting 解析 電気泳動が終了した gel を 1 分間メタノール処理したのち、blotting buffer に数時間浸した polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane と blotting buffer をしみ込ませた filter paper 3 枚ではさみ、電圧 Max, 電流 250mA (0.8mA/cm²) で 1.5 時間 blotting を行い、gel 内の蛋白質を PVDF membrane に転写した。転写の終了した PVDF membrane は洗浄液で 10 分間 3 回の洗浄を行い SDS を除去した。これに 1% スキムミルクを用い、室温で一晩 blocking した。その後、洗浄液で 10 分間 3 回の洗浄を行いスキムミルクを除去し、室温で一次抗体 anti *Achlya ambisexualis* HSP90 mAb (mouse) を 1 時間反応させた。反応終了後洗浄液で 10 分間 3 回の洗浄を行い一次抗体を除去し、室温で二次抗体 peroxidase-labelled anti mouse IgG Ab (goat) を 1 時間反応させた。反応終了後洗浄液で 10 分間 3 回の洗浄を行い二次抗体を除去し、TMB membrane peroxidase substrate system を用いて発色させた。

結果および考察

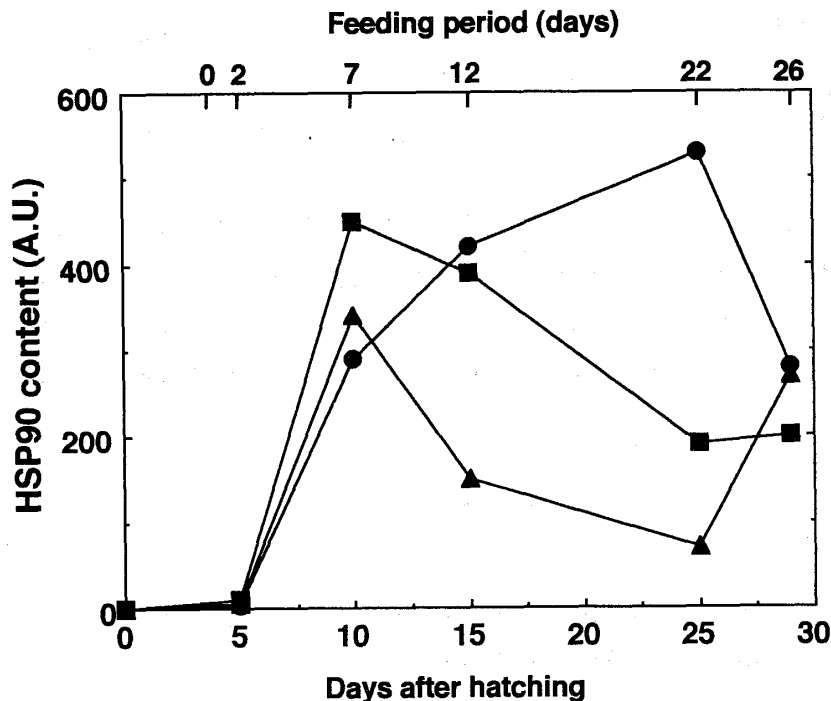


Fig. 1. Expression of heat shock protein 90 homologue in Japanese flounder after hatching.

Symbols: ●, SY-4; ▲, *N. oculata*; ■, *E. gracilis* enriched with docosahexaenoic acid.

ヒラメ仔稚魚のストレス蛋白 (HSP90) の発現動態を検索するために, 一次抗体を用いて Western blotting を行ったところ, その発現が認められ HSP 90 発現動態を Fig.1 に示した。HSP 90 は孵化後 10 日から 25 日後に発現のピークが存在し, その後いずれの実験区においても減少傾向にあった。このような HSP 90 の発現は, 各種の餌料試験区において時間的ずれが存在するが, ほぼ同様の動態を示していた。この結果は, SY-4 餌料, *N. oculata* 餌料 およびドコサヘキサエン酸で栄養強化した *Euglena gracilis* 餌料の餌料的栄養価値の違い³⁾に起因していることが推察された。また, この HSP 90 の誘導開始時期及び高濃度に発現している期間における, 各種の餌料によるヒラメ飼育実験の成長及び累積斃死数 との相関性について検討を行ったが, これらの結果についての相関性は認められなかった (結果は示さず)。

しかし, この HSP 90 発現がピークを迎える時期は, 細胞内の organelle の発達により呼吸, 生体防御機構で発生する superoxide を不均化するために誘導されると考えられる superoxide dismutase (SOD) が誘導される時期と一致し (芦田ら未発表), これらの事よりこの時期のヒラメにおいて細胞の分化, 器官の形成が急激に進行していることが推察された。また, この HSP 90, SOD のピークが出現する孵化後約 10 日のヒラメは, 鰭条の形成が開始され, その後の約 20 日間で右眼が移動し変態を完了する変態期に相当し, 本実験で確認された HSP 90 は, 短期間のうちに生じたヒラメの形態変化 (変態 stress) に対して誘導されたものと推察された。

ヒラメの変態は, 脳下垂体, 甲状腺系の調節で進行し, 変態前のヒラメに甲状腺ホルモンを与えると変態の誘導が生じたり, 実際の変態期には体内の甲状腺ホルモン濃度上昇, 下垂体ホルモンの甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌が認められ, 様々な組織や器官でも甲状腺ホルモン依存性の発達が起こっていると報告されている⁴⁾。この甲状腺ホルモンレセプター (THR) は, HSP 90 が活性化調節を行っているステロイドホルモンレセプター⁵⁾と同じく, 核内受容体と結合して作用していると考えられているホルモンレセプターであり, HSP 90 と複合体を形成しない THR の核内移行も HSP 90 と相互作用しこれらの情報伝達機構に間接的に関与しているものと考えられている。

また HSP 90 は, ホルモンレセプターの活性化に係わる以外に, 重合したアクチンに結合する性質を持ち, アクチン繊維の架橋に関与する事⁶⁾が示され, ヒラメの変態期に体側筋で生じる種々の筋原繊維蛋白質のアイソフォーム転換による筋組織の生体型への発達に HSP 90 がシャペロンとして機能しているものと考えられ, 本実験において確認された HSP 90 の誘導が, ヒラメの正常な変態を保証する要因の 1 つとなっている事が示唆された。

文 献

- 1) 松本正樹, 平田貴司, 神垣正宏, 沖増英治, 雨村明倫: 微粒子人工餌料で飼育したヒラメ仔稚魚の成長と形態変化について. 福山大内海研報, 3, 1-18 (1991).
- 2) S.L.Rutherford and S.Lindquist: Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 366, 336-342 (1998).
- 3) K.Sakamoto, E.Okimasu and A.Amemura: Dietary value of rotifer *Brachionus rotundiformis* cultured with *Synechocystis* sp. SY-4 for larvae of red sea bream *Pagrus major* and Japanese

ヒラメ仔魚のストレス蛋白発現

flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 64(5), 722-726 (1998).

- 4) 山野恵祐：ヒラメの変態の仕組みを探る - 変態期に甲状腺ホルモンレセプターの発現量が上昇 - 化学と生物, 33 (11), 699-701 (1995).
- 5) D.Picard, B.Khurshed, M.J.Garabedian, M.G.Fortin, S.Lindquist, and K.R.Yamamoto : Reduced levels of hsp 90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature*, 348, 166-168 (1990).
- 6) S.Koyasu, E.Nishida, T.Kadowaki, F.Matsuzaki, K.Iida, F.Harada, M.Kasuga.H.Sakai, and I.Yahara : Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8054-58 (1986).