



Title	エストロジオール-17 β 投与によるウミネコ血中ピテロジェニンの動態
Author(s)	盛田, 祐加; MORITA, Yuka; 中田, 聖子 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 54(1-2), 21-28
Issue Date	2003-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21980
Type	departmental bulletin paper
File Information	54(1_2)_P21-28.pdf



エストラジオール-17 β 投与によるウミネコ血中ビテロジェニンの動態

盛田 祐加¹⁾・中田 聖子¹⁾・藤田 真紀子²⁾・小城 春雄¹⁾・原 彰彦²⁾

Changes in Plasma Levels of Vitellogenin in the Black-Tailed Gull, *Larus crassirostris*, after Treatment with Estradiol-17 β

Yuka MORITA, Seiko NAKATA, Makiko FUJITA,
Haruo OGI and Akihiko HARA

Abstract

Lipovitellin (Lv), the major vitellogenin (Vg)-derived yolk protein, was purified from egg yolk of the black-tailed gull, *Larus crassirostris*, by hydroxylapatite column chromatography followed by gel filtration. The apparent mass of native Lv was ~280 kDa, while its corresponding subunit mass estimated by SDS-PAGE was ~100 kDa. A specific antiserum against purified gull Lv (a-gLv) was generated in a rabbit. In Western blotting, a-gLv specifically reacted with a polypeptide (~220 kDa) present in blood plasma of female and estrogen-treated male gulls, but not normal males, suggesting that this polypeptide represents the primary subunit of gull Vg. A single radial immunodiffusion (SRID) assay was developed for gull Vg using the a-gLv. The assay was specifically targeted to gull Vg and plasma levels of Vg could be expressed as relative concentrations equivalent to Lv, when purified gull Lv was used as the assay standard. The time-course of changes in plasma Vg levels was assessed for up to 60 hours after a single injection of estradiol-17 β (E₂) was administered to male gulls. The effect of E₂ concentrations on plasma Vg induction appeared dose-dependent. Plasma Vg reached its maximum level (61.7 mg/ml) at 60 hr after E₂ administration (50 mg/kg body weight), while lower E₂ doses (0.05, 0.5 mg/kg body weight) resulted in earlier peak Vg levels (24 hr after injection). These results indicated that production of gull Vg was induced directly by estrogen within 24 hours. These developments in biochemical characterization of Lv and Vg, along with establishment of the SRID assay for Vg and knowledge of the endocrine regulation of Vg synthesis in the black-tailed gull, set the stage for the survey of endocrine disruption of avian reproduction in the wild.

Key words: Lipovitellin, Vitellogenin, *Larus crassirostris*, Estradiol-17 β , Plasma

緒 言

近年、環境汚染問題の1つとして化学物質による生物の内分泌機能の攪乱が取り上げられ、人や野生生物への影響が危惧されている。この外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の作用による現象として、雄ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の雌化 (Harries et al., 1997)、雄ワニ *Alligator mississippiensis* のペニスの萎縮化 (Guillette et al., 1996)、生殖障害が原因と考えられるゼニガタアザラシ *Phoca vitulina* の個体数激減 (Reijnders, 1986) など野生生物における生殖機能異常、生殖行動異常等が報告されている。これらの現象は貝類、魚類、爬虫類および哺乳類など広範囲に及んでおり、主に水棲生物や水辺に生息している生物で起こっている。鳥類においては、オオセグロカモメ *Larus schistisagus* およびセグロカモメ *Larus argentatus*

の性比の変化 (Fry et al., 1987) やセグロカモメの甲状腺異常 (Moccia et al., 1986) など海鳥に関する報告がある。高次栄養動物である海鳥類は食物連鎖の上位に位置し、生物濃縮を受け最も高濃度の化学物質の蓄積が起これと考えられる。さらにカモメ類はエストロゲン作用に高い感受性を示し、エストロゲン様作用を持つ催奇形物質に対してはニワトリ *Gallus gallus* やニホンウズラ *Coturnix coturnix japonica* 等、他の鳥類より10-50倍感受性が高いとされる (Fry et al., 1987)。これらのことから、カモメ類が環境汚染の指標生物として有効であることが推測される。

一方、魚類において環境エストロゲン(エストロゲン作用を持つ環境ホルモン)の影響を評価する上で有効な指標蛋白質としてビテロジェニン(vitellogenin, Vg)が注目されている。Vgは卵生脊椎動物において、エストラジオール-17 β (estradiol-17 β , E₂)の作用のもと肝臓におい

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科資源生態学講座
(Laboratory of Marine Bioresources Ecology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

²⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科生命機能学講座
(Laboratory of Comparative Physiology, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

て合成され、血液中に分泌される卵黄蛋白前駆物質である。血流を介して卵母細胞に運ばれた Vg は、一般に卵黄蛋白質のリポビテリン (lipovitellin, Lv) とホスピチン (phosvitin, Pv) に分子解裂する (Deely et al., 1975; Wallace, 1985)。最近、ニワトリにおいて YGP40 (yolk glycoprotein of 40 kDa) と呼ばれる新しい Vg 由来の卵黄蛋白質が報告された (Yamamura et al., 1995)。一方、魚類では Lv, Pv に加え、硬骨魚類に特有な存在である β' -component が知られている (Hiramatsu et al., 2002b)。本来、Vg は卵黄形成期の雌血中にもみ特異的に出現するが、通常これを合成しない雄動物においてもエストロジェン処理を行うことにより合成が誘導される。即ち、雄動物に Vg が検出されることは、環境中のエストロジェン様作用を有する化学物質、環境エストロジェンに曝されていることを示唆する。

これまで鳥類において Vg をバイオマーカーとし、環境汚染の影響を評価している報告はほとんどない。Vg を指標蛋白として用いるためには対象種の Vg に関する基礎的知見を得ることが必要である。しかしながら、鳥類において血中 Vg 量の動態は、ニワトリ、ウズラ、アヒルなどの家禽類においての報告 (van den Boogaart et al., 1981; Gibbins and Robinson, 1982; Gschwendt et al., 1982) のみで、野生鳥類への E₂ 処理による Vg の誘導性および Vg と卵黄蛋白に関する詳細な知見は得られてない。本研究では、カモメ類の一種ウミネコ *Larus crassirostris* を対象種とし Vg に関する基礎的知見を得ることを目的として、Vg の構成成分である卵黄蛋白の主成分 Lv の精製および Lv に対する特異抗血清の作製を行った。さらに作製した抗血清を用いて Vg の免疫測定法を確立し、E₂ 投与に伴う血漿中の Vg 量の変動を観察した。

材料と方法

試料

実験に用いたウミネコは、北海道利尻島に生息する繁殖期の雌雄成鳥を用いた。1998年6月14~19日(22個体)および1999年5月25~27日(9個体)に捕獲した全31個体より翼部血管から血液を採取した。卵は、1998年6月および1999年5月に同場所で採集した受精卵を用いた。

E₂ 投与実験は、1999年に捕獲した雄成鳥10個体(平均体重521.5±20.5g)を用い、propylene glycol に溶解した E₂ を0.05 (n=2), 0.5 (n=2), 5 (n=3), 50 (n=3) mg/kg 体重 (BW) の濃度で筋肉注射により1回投与した。投与直前(0時間)および投与18, 24, 48時間後に翼部血管より約0.5ml ずつ部分採血を行った後、60時間後に頸動脈より全採血をした。

血液は抗凝固剤 (EDTA-2Na) を用いて採血し、得られた血液を3,000 rpm, 20分間遠心分離して血漿を得た。血漿および卵は分析するまで-30°C で保存した。

ニワトリおよびニホンウズラの未受精卵はスーパー

マーケットで購入し、卵黄を抽出して使用した。

抗血清

家兎抗チヨウザメ (バステル *Huso huso x Acipenser ruthenus*) β' -component 血清 (a-バステル β')、抗バステル Vg 血清 (a-バステル Vg)、雄血清で吸収した抗エゾメバル (*Sebastes taczanowskii*) 雌血清 (a-エゾメバル FS)、抗エゾメバル卵抽出液血清 (a-エゾメバル egg) は、先に作製した (原ら, 1986; Hiramatsu et al., 2002a) ものを使用した。

また、家兎抗ウミネコ Lv 血清は精製 Lv を等量の Freund's complete adjuvant と混合し、1週間隔で4回家兎に免疫することにより作製した。この抗血清を等量のウミネコ雄血漿で吸収し、抗ウミネコ Lv 血清 (a-gLv) とした。抗血清は使用するまで-30°C で保存した。

カラムクロマトグラフィー

Pharmacia FPLC システムによるゲル濾過法は Superose 6HR 10/30 カラムを用い、0.02 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 (2% NaCl, 0.1% NaN₃ 含有) で溶出した。操作は室温で行い、流速は0.5 ml/min でチューブあたり0.5 ml ずつ分取した。

ハイドロキシルアパタイトカラム (2.5×20 cm, Bio-Rad) を用いた吸着クロマトグラフィーには Hydroxylapatite (Nacalai tesque, Japan) を用いた。リン酸カリウム緩衝液、pH 6.8 (KP) を用いたステップワイズ法により0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M および1.2 M KP を用い溶出を行った。流速は40 ml/h として4°C で行った。

免疫学的手法及び電気泳動法

寒天内一元放射免疫拡散法 (Mancini 法) による血中 Vg 量の測定は Mancini et al. (1965) の方法に従った。0.9% NaCl (0.1% NaN₃ 含有) 溶液にアガロースを1%になるように加え、加熱溶解後56°C とし、a-gLv を0.75% 加えたゲルプレートを作製した。このゲルプレートに試料添加用の well を作製後、標準液 (Lv 濃度 25, 50, 100, 200, 400 μ g/ml) を5 μ l 添加し、室温で48時間反応させた。反応後、0.9% NaCl による洗浄を繰り返した後、プレートを乾燥させ、7% 酢酸に溶解した1% Amido black 10B 溶液にて染色を施し、7% 酢酸で脱色を行った。Vg 濃度は精製 Lv の標準直線より算出した。寒天内二元免疫拡散法 (Ouchterlony 法) および免疫電気泳動法 (IEP 法) は常法に従った。

Sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル (polyacrylamide gel) 電気泳動 (SDS-PAGE 法) は、濃度勾配スラブゲル (5~22.5%) および均一スラブゲル (7.5%) を用いた Tris 緩衝液系による Laemmli (1970) の方法に従った。試料は、Hara and Hirai (1978) に準じ、試料に2-mercaptoethanol および SDS をそれぞれ1%になるように添加後、100°C で2分間処理した。染色には40% エタノール、10% 酢酸の混合溶液に溶解した0.1% Coomassie bril-

liant blue R-250 溶液を用い、脱色は 20% エタノール、5% 酢酸、2.5% グリセロールの混合液で行った。分子量マーカー (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) は Low molecular marker として、 α -lactalbumin (14.4 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), albumin (67 kDa) および phosphorylase b (94 kDa) を用い、High molecular maker として、lactate dehydrogenase (36 kDa), catalase (60 kDa), albumin (67 kDa), ferritin (220 kDa, 18.5 kDa) および thyroglobulin (330 kDa) を用いた。Western blot は Kwon et al. (1990) の方法に準じた。一次抗体として抗魚類血清は 1:1,000, a-gLv は 1:16,000 の希釈で行った。

結 果

抗魚類血清によるウミネコ Vg の検索

ウミネコ Lv の精製に際して、ウミネコ雌血漿および卵抽出液と免疫交叉性を示す抗血清の検索を Ouchterlony 法および Western blot により行った。a-エゾメバル egg を用いた Ouchterlony 法において ウミネコの雌血漿、E₂ 処理した雄血漿 (以下 E₂ 処理血漿) および卵抽出液に対して 1 本の沈降線が観察された (Fig. 1)。また、Western blot においても、雌血漿、E₂ 処理血漿中に高分子蛋白のバンドおよび卵抽出液中のメイン蛋白が染色された (data not shown)。しかしながら、a-ベステル β' 、a-ベステル Vg および a-エゾメバル FS は、ウミネコ血漿中の Vg 様蛋白を明確に認める特異的な反応は観察されなかった。

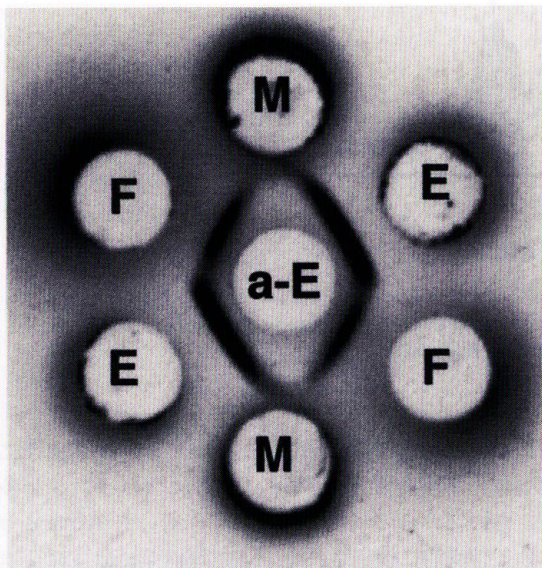


Fig. 1. Precipitin reaction of plasma and egg extracts from black-tailed gulls using an antiserum against egg extracts of white-edged rock fish (a-E) for double immunodiffusion. F: female plasma, M: male plasma, E: egg extracts.

Lv の精製

ウミネコ卵抽出液からの Lv 精製の概略を Fig. 2 に示す。精製には 1998 年 6 月に採取した受精卵の卵黄を用いた。約 50 g の卵黄に 10 倍量 (v/w) の 0.02 M Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0 (2% NaCl, 0.1% NaN₃ 含有) を加え、ミキサーおよびガラスホモジナイザーを用いて卵黄蛋白を抽出した。抽出液は 4°C 中で 15,000 rpm, 30 分間の遠心分離を行い、上清を卵抽出液とした。卵抽出液 50 ml を高純水で 1 晩透析した後、遠心分離して得られた沈澱物を水沈澱分画とした。沈澱分画を上記の Tris-HCl 緩衝液で溶解し、0.2 M KP (pH 6.8) に 1 晩透析後、ハイドロキシルアパタイトカラムに供した (Fig. 3A)。これらの溶出分画を SDS-PAGE により解析した結果、0.4 M 溶出分画に卵抽出液のメインバンドと一致する顕著なバンドが観察され、a-エゾメバル egg を用いた Ouchterlony 法において 1 本の沈降線が認められた。0.4 M KP 溶出分画を Superose 6 カラムに添加した結果、2 つの主要なピークが観察された (Fig. 3B)。第 2 ピークの分子量は 280 kDa と算出された。この分画の SDS-PAGE におけるメインバンドは、卵抽出液で観察された 100 kDa のバンドと同位置に泳動されたことから (data not shown), ウミネコ Lv と同定し、このピークを精製 Lv とした。

抗血清の検討

a-gLv の特異性を Ouchterlony 法および IEP 法により行った (Fig. 4)。a-gLv は雌血漿および卵抽出液に対してのみそれぞれ一本の沈降線を形成し、雄血漿とは全く反応しなかった。同様に Western blot においても a-gLv は雄血漿

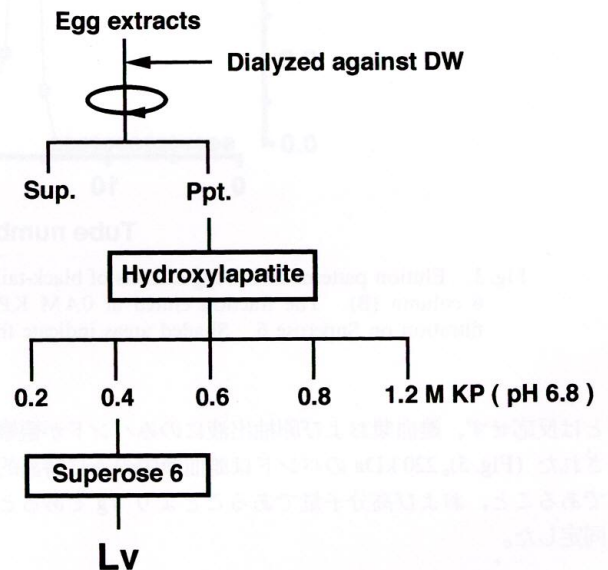


Fig. 2. Flow chart for purification of black-tailed gull lipovitellin. DW: distilled water, Sup.: supernatant, Ppt.: precipitate, KP: potassium phosphate, Lv: lipovitellin.

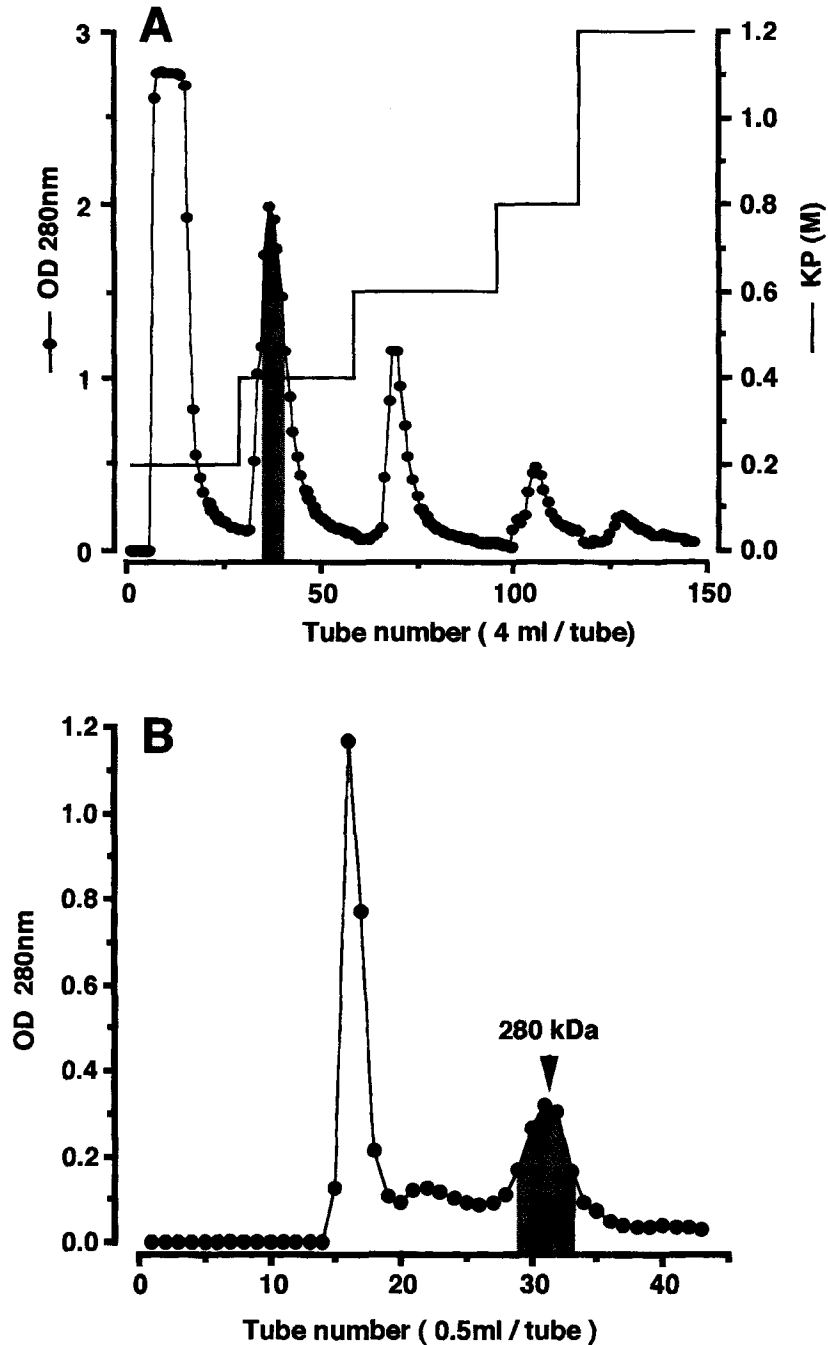


Fig. 3. Elution patterns of the egg extracts of black-tailed gulls from the hydroxylapatite column (A) and the Supersose 6 column (B). The fraction eluted at 0.4 M KP during hydroxylapatite chromatography was subjected to gel filtration on Supersose 6. Shaded areas indicate fractions containing lipovitellin.

とは反応せず、雌血漿および卵抽出液にのみバンドが観察された (Fig. 5)。220 kDa のバンドは雌血漿中のみに特異的であること、および高分子量であることより Vg であると同定した。

E₂ 投与によるウミネコ血漿の変化

5 mg/kg BW で E₂ 処理した雄個体の血漿の経時的变化を SDS-PAGE および a-gLv を用いた Western blot により

解析した (Fig. 6)。SDS-PAGE において、E₂ 処理血漿にはコントロール雄血漿 (0 時間) に見られないバンドが多数観察され、これらのバンドは a-gLv を用いた Western blot において特異的に検出された。E₂ 処理血漿には主に 2 本のメインバンド (分子量 220 kDa, 110 kDa) が観察され、そのうち 220 kDa のバンドは E₂ 投与 18 時間後から検出されはじめ、時間経過に伴い濃く染色された。一方、110 kDa のバンドも同様 E₂ 投与 18 時間後から検出されたが、経時

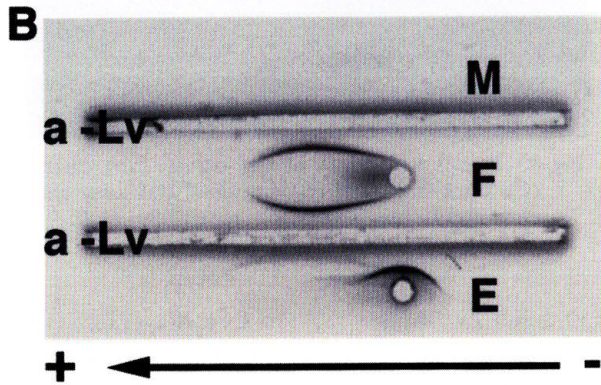
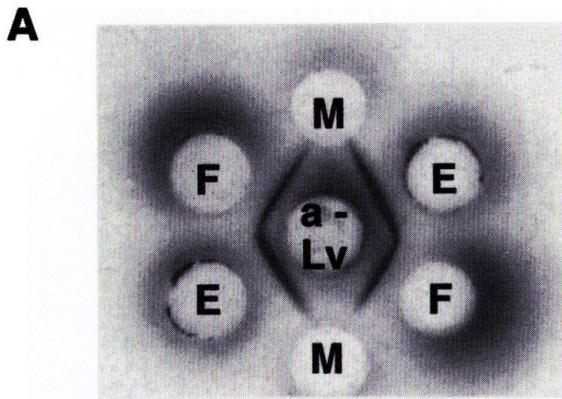


Fig. 4. Precipitin reactions of plasma and egg extracts from black-tailed gulls using the antiserum against black-tailed gull lipovitellin (a-Lv) for double immunodiffusion (A) and immunoelectrophoresis (B). M: male plasma, F: female plasma, E: egg extracts.

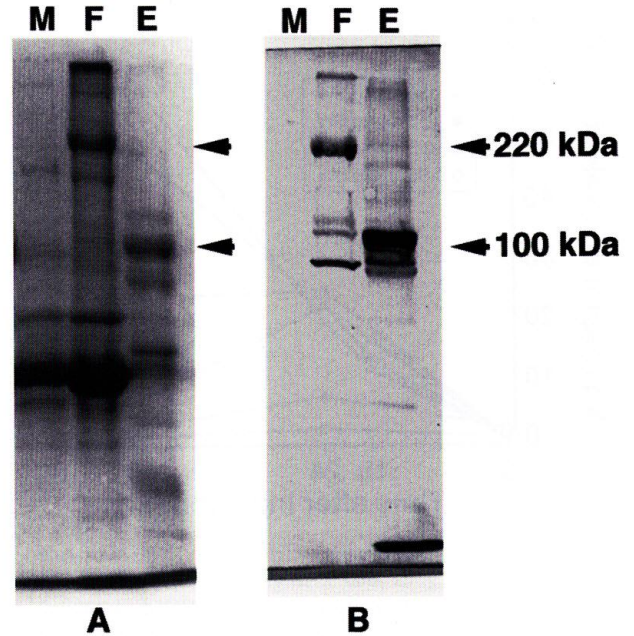


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and corresponding Western blots (B) using the antiserum against lipovitellin of plasma and egg extracts of black-tailed gulls. M: male plasma, F: female plasma, E: egg extracts.

的に減少する傾向が見られた。他の E₂ 処理群 (0.05 mg, 0.5 mg および 50 mg/kg BW) でも同様の結果が得られたが、0.05 mg と 0.5 mg/kg BW E₂ 投与群では 24 時間以降にメインバンドが観察された (data not shown)。

血漿中の Vg 量の測定は、Lv 濃度既知の卵抽出液を標準蛋白とした Mancini 法により行った。確立した Mancini 法において、Lv 濃度 25 μg/ml-400 μg/ml の範囲で直線的

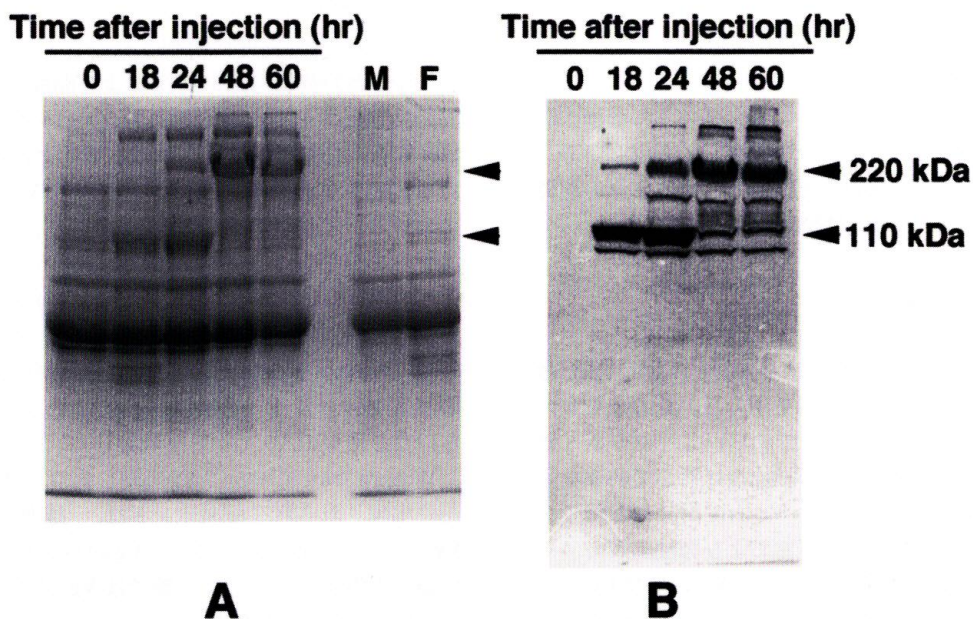


Fig. 6. SDS-PAGE (A) and corresponding Western blots (B) of plasma from E₂-treated black-tailed gulls. The antiserum against lipovitellin was used for Western blotting. The plasma was repeatedly collected from animals treated with E₂ at a dose of 5 mg/kg BW. M: male plasma, F: female plasma.

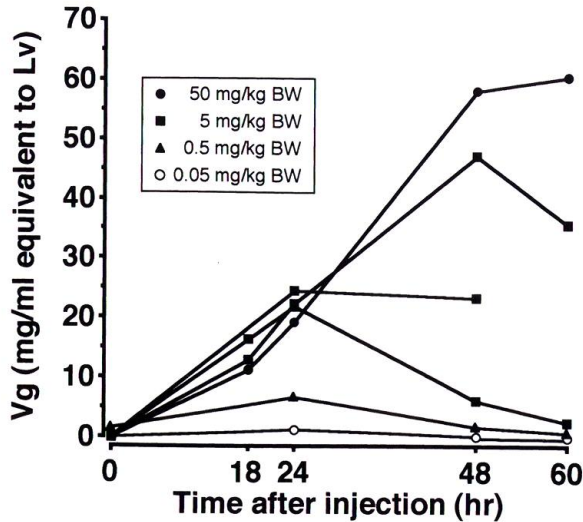


Fig. 7. Changes in plasma vitellogenin levels in male black-tailed gulls after a single injection of E₂. The concentration of vitellogenin was estimated as equivalents of lipovitellin using egg extracts containing known amount of lipovitellin as the standard. Symbols indicate plasma vitellogenin levels in individual animals.

なスタンダードカーブが得られ、これをもとに血漿 Vg 量を Lv 量相当量 (mg/ml equivalent to Lv) として算出した。各 E₂ 処理群の Vg 量の測定結果を Fig. 7 に示す。50 mg/kg BW の E₂ 処理群では 60 時間まで増加傾向を示し、最高値で 61.7 mg/ml を示した。5 mg/kg BW の E₂ 処理群の血漿 Vg は 24 時間もしくは 48 時間後にピークを示し、他の処理群 (0.05 mg および 0.5 mg/kg BW) では 24 時間後にピークが観察された。

a-gLv の免疫交叉性

a-gLv を用いてニワトリおよびニホンウズラの卵抽出液との反応を Ouchterlony 法により観察した結果を Fig. 8 に示す。両卵抽出液とも a-gLv と反応し、ウミネコの沈降線と spur を形成する 1 本の沈降線が観察された。

考 察

ウミネコ Vg および Lv を検索するため、4 種の魚類 Vg あるいは卵黄蛋白に対する抗血清を用いた。そのうち a-エゾメバル egg のみが Ouchterlony 法において、ウミネコ雌血漿、E₂ 処理した雄血漿並びに卵抽出液に対して明瞭な免疫交叉反応性を示した。さらに、Western blot においても雌血漿、E₂ 処理血漿中の高分子蛋白および卵抽出液のメイン蛋白と免疫交叉性を示し、ウミネコの Vg および Lv 様蛋白を特異的に認めた。本研究では、a-エゾメバル egg を用いてウミネコ Lv の検出を行った。この結果は、エゾメバルとウミネコの Vg あるいは Lv の分子内に一部共通した抗原決定基が存在することを示唆している。

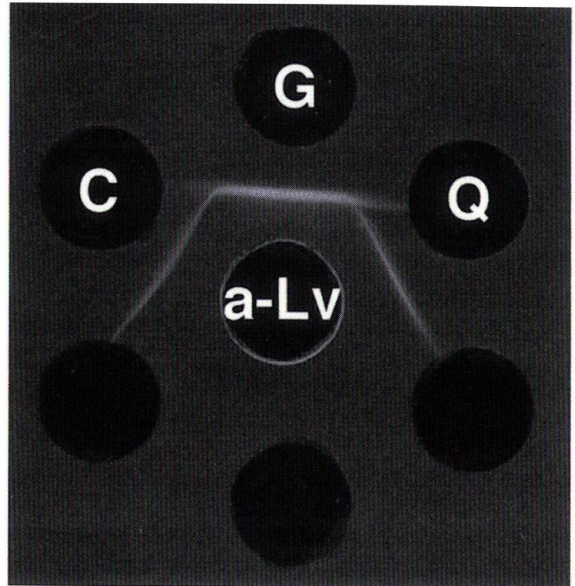


Fig. 8. Precipitin reactions of egg extracts from chicken (C), black-tailed gull (G) and quail (Q) using antiserum against black-tailed gull lipovitellin (a-Lv).

ウミネコ Lv の精製はニワトリ Lv に用いられたハイドロキシルアパタイトカラムにより行った (Bernardi and Cook, 1960)。ウミネコ Lv の分子量は、ゲル濾過で 280 kDa であり、SDS-PAGE においては 100 kDa にメインバンドを示した。このサブユニットの分子量はニワトリの Lv I (Lv heavy chain) の 120 kDa とよく一致した (Yamamura et al., 1995)。精製 Lv に対する抗血清 (a-gLv) は Ouchterlony 法および IEP 法において、雄血漿とは反応せず雌血漿および卵抽出液に対してそれぞれ 1 本の沈降線を形成し、Lv が免疫学的に高度に精製されたことおよび a-gLv が雌血漿中の雌特異蛋白、即ち Vg および卵抽出液中の Lv と特異的に反応することが示された。a-gLv を用いて Western blot を行った結果、ウミネコ雌血漿中には雌特異的な 220 kDa のバンドが観察された。ニワトリ Vg の SDS-PAGE における分子量は 200~256 kDa であり、抗原性、サブユニットの分子量およびアミノ酸組成の異なる 3 種の Vg (I: 260 kDa, II: 246 kDa, III: 210 kDa) が存在することが報告されている (Wang and Williams, 1980; Wang et al., 1983)。Western blot において、ウミネコ雌血漿中の 220 kDa のバンドはニワトリ Vg の分子量によく一致したことから、ウミネコの Vg であると同定した。

Western blot において E₂ 処理したウミネコ雄血漿に新たに出現した 220 kDa のバンドは、雌血漿に観察された Vg バンドと一致した。また、Vg のバンドは時間経過に伴い強く染色された。一方、鳥類では Vg が分解されて低分子化しやすいという報告があり (van den Boorgaart et al., 1981)、a-gLv と反応した低分子量のバンドは Vg の分解産物である可能性が考えられた。

異なる濃度の E₂ 処理群における Vg 濃度のピークは投

与した E₂ 量に依存して増加し、またピーク時までの時間も長くなる傾向が観察された。魚類では、サクラマス *Oncorhynchus masou* (Fujita, 1999), fathead minnow, *Pimephales promelas*, (Parks et al., 1999), コイ *Cyprinus carpio* (Tyler et al., 1999), 大西洋サケ *Salmo salar* L. (Celius and Walther, 1998) において、E₂ の濃度依存的に血中 Vg 量の増加が報告されている。魚類同様、ウミネコにおいても血漿中に誘導される Vg 量は投与した E₂ 量に依存的であり、Vg が E₂ により直接的に誘導されることが確認された。また、低濃度の E₂ 処理群では、Vg 濃度のピークが 24 時間後に観察されたことから、1 回の E₂ 処理により 24 時間以内に E₂ の作用が現れ、Vg 合成が開始されると考えられた。50 mg/kg BW の E₂ 処理群においては他の群とは異なり、60 時間後まで高値が維持された。

血中 Vg 濃度を測定する初期の手法は、リンおよびカルシウムを定量することによる間接的な方法が使用されてきた (Mommsen and Walsh, 1988)。鳥類においてもこの手法が用いられていたが (Bergink et al., 1974), ラジオイムノアッセイ法 (RIA 法) による定量 (Redshaw and Follett, 1976) も開発された。しかしながら、リンによる定量は間接的であり直接的な値を得られないこと、また、RIA 法は放射ラベルの必要性があり、ラベルされた蛋白の分解が起こるといった問題点がある。本研究で用いた Mancini 法の測定限界は 10 µg/ml 前後と、RIA 法などよりも低感度であるが、定量に必要な操作が著しく少なく、簡便であるという利点をもつ。さらに、血中量が数 ng ~ 数十 mg/ml の広範囲に変化する Vg の測定法の一次スクリーニングには適していると考えられる。今後、より高感度な酵素免疫測定法 (EIA 法) と併用することでさらに詳細な解析が可能になると思われる。

一方、a-gLv を用いてニワトリおよびニホンウズラの卵抽出液との免疫交叉反応性を Ouchterlony 法を用いて観察した結果、両種の Lv はウミネコ Lv と交叉反応性を有することが示された。これらの知見は、本抗血清が広く他の鳥類の Vg および Lv の検索に利用可能であることを示唆している。

以上、本研究では、ウミネコの Lv と Vg を同定して免疫学的測定系を確立するとともに、E₂ 処理したウミネコ血漿 Vg 量の動態を明らかにした。今後、野生のウミネコ雄 Vg の出現を調査することにより、環境エストロジェンの影響を評価する知見が得られるものと考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、本稿の御校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究科資源生態学講座、桜井泰憲教授に深く感謝いたします。また、サンプリングにあたり御理解と御厚意を頂いた札幌医科大学付属臨海研究所、高橋延昭助教授、同研究所の皆様方ならびに本研究科生物海洋学講座福本由利氏並びに生命機能学講座高橋みのり氏に厚く

御礼申し上げます。

文 献

- Bergink, E.W., Wallace, R.A., van de Berg, J.A., Bos, E.S., Gruber, M. and AB, G. (1974). Estrogen-induced synthesis of yolk proteins in roosters. *Amer. Zool.*, **14**, 1177-1193.
- Bernardi, G. and Cook, W.H. (1960). Separation and characterization of the two high density lipoproteins of egg yolk, α - and β -lipovitellin. *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 96-105.
- Celius, T. and Walther, B.T. (1998). Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Endocrinol.*, **158**, 259-266.
- Deely, R.G., Mullinix K.P., Wetekam, W., Kronenberg, H.M., Meyers M., Eldridge, J.D. and Goldberger, R. (1975). Vitellogenin synthesis in the avian liver: vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 9060-9066.
- Fry, D.M., Toone, C.K., Speich, S.M., and Peard, R.J. (1987). Sex ratio skew and breeding patterns of gulls demographic and toxicological considerations. *Studies Avian Biol.*, **10**, 26-43.
- Fujita, T. (1999). Immunochemical and biochemical studies on precursors of vitelline envelope proteins of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Doctoral thesis*, pp. 157, *Hokkaido Univ.*
- Gibbins, A.M.V. and Robinson, G.A. (1982). A comparison of diethylstilbestrol- and estradiol-17 β -induced vitellogenesis in quail. *Poultry Sci.*, **61**, 1188-1193.
- Gschwendt, M., Rincke, G. and Schuster, T. (1982). The estrogen-induced vitellogenin synthesis in chicken liver after estrogen withdrawal or antiestrogen treatment. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **26**, 231-242.
- Guillette, L.J. Jr, Pickford, D.B., Crain, D.A., Rooney, A.A. and Percival, H.F. (1996). Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **101**, 32-34.
- Hara, A. and Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **48B**, 389-399.
- 原 彰彦・竹村明洋・松原孝博・高野和則 (1986). エゾメバル雌特異血清蛋白の免疫学的検索. *北大水産彙報*, **37**, 101-110.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiesen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T. and Zaman, N. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 534-542.
- Hiramatsu, N., Hiramatsu, K., Hirano, K. and Hara, A. (2002a). Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso* x *Acipenser ruthenus*): identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, **131A**, 429-441.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Weber, G.M., Sullivan, C.V. and Hara, A. (2002b). Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, **68**(suppl. 1), 694-699.

- Kwon H. C., Hara A., Mugiya Y. and Yamada J. (1990). Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in whitespotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **41**, 162-180.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. (1965). Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, **2**, 235-254.
- Moccia, R.D., Fox, G.A., and Britton, A. (1986). A quantitative assessment of thyroid histopathology of herring gulls (*Larus argentatus*) from the Great Lakes and a hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J. Wildl. Diseases.*, **22**, 60-70.
- Mommsen, T.P. and Walsh, P.L. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. pp. 347-406, Hoar, W. S. and Randall, D.J. (eds), *Fish Physiology XIA*, Academic Press, New York.
- Parks, L.G., Check, A.O., Denslow, N.D., Heppel, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A. and Sullivan, C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Physiol.*, **123C**, 113-125.
- Redshaw, M.R. and Follett, B.K. (1976). Physiology of egg yolk production by the fowl: the measurement of circulating levels of vitellogenin employing a specific radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55A**, 399-405.
- Reijnders, P.J.H. (1986). Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature*, **324**, 456-457.
- Tyler, C.R., van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S. and Trip, H. (1999). An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**, 337-347.
- Yamamura, J., Adachi T., Aoki N., Nakajima H., Nakamura R. and Matsuda T. (1995). Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: the 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1244**, 384-394.
- van den Boogaart, P., Mulder, J., Halsema, I., Gruber, M. and AB, G. (1981). Estradiol-induced vitellogenin synthesis in duck liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **654**, 1-10.
- Wallace, R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. pp. 127-177, Browder, L.W. (ed.), *Developmental biology I*, Plenum Press, New York.
- Wang, S.-Y. and Williams D.L. (1980). Identification, purification, and characterization of two distinct avian vitellogenins. *Biochemistry*, **19**, 1557-1563.
- Wang, S.-Y., Smith, E., and Williams, D.L. (1983). Purification of avian vitellogenin III: comparison with vitellogenins I and II. *Biochemistry*, **22**, 6209-6213.