



Title	シロサケ(<i>Oncorhynchus keta</i>)卵発生に伴うアミノ酸変動
Author(s)	米田, 勤; YONEDA, Tsutomu
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 28(1), 29-39
Issue Date	1977-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23602
Type	departmental bulletin paper
File Information	28(1)_P29-39.pdf



シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 卵発生に伴うアミノ酸変動

米田 勤*

On Amino Acids in the Developing Eggs of
Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*

Tsutomu YONEDA*

Abstract

One of the most interesting phenomena of the developing egg is how the yolk proteins were converted into the proteins of the embryo. Free amino acids (FAA), the protein amino acid (PAA), and the proteolytic activity in the developing eggs of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, were determined. FAA was extracted with 6% TCA from frozen eggs, purified by the ionexchanger and analyzed by gas-liquid chromatography as their N-TFA-n-butyl derivatives. PAA was obtained in the acid-hydrolysate of 6% TCA precipitate of eggs without chorione. The proteolytic activities were estimated by the UV-absorption method using the 20,000 ×g supernatant of 0.9% NaCl extract of eggs for the enzyme and acid-denatured chick yolk protein (CY) and egg albumin (EA) as the substrates.

From the results of the changes of FAA, five developing stages were proposed: I (0-8 hrs), the first consuming stage; II (8-48 hrs), the recovered stage; III (2-28 days), the variable stage; IV (28-42 days), the second consuming stage; V (42-56 days), the stable stage. The contents of amino acids were most changeable in stage (III); the glutamic acid and aspartic acid especially showed the high contents and large periodical variations. The composition of PAA was characterized by high levels of leucine, alanine and lysine as well as acidic amino acids, and the patterns of the composition of PAA were not changed through any of the stages of development. As to the proteolytic activities, the same patterns were obtained in the different pH (3.5, 5.0, 7.0, 8.5), and at any pH the substrate CY was more easily digested than EA. Moreover, a mutual relation seemed to exist between the variation patterns of FAA and the proteolytic activity in the developing salmon eggs. Some discussions were attempted on the role of the characteristically changeable amino acids during the course of the development.

緒 言

生物の発生現象が単に分化や生長にとどまらず組織の再生や細胞の異常増殖の基礎的問題を含む恰好の研究材料として注目され、その生化学的研究は水産増殖の面でも重要である。また生命現象としてたとえば魚卵から稚魚への劇的な変化は多くの研究者の興味の的であり今なお多くは謎に包まれている。現在の発生に関する生化学の二つの主流は遺伝情報による蛋白合成の調節とエネルギー代謝である¹⁾が、本報の主たるテーマは発生段階を追っての遊離アミノ酸 (FAA) すなわちアミノ酸プール

* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座
(Laboratory of Polymer Chemistry of Marine Products, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

の変化である。発生に伴うアミノ酸の代謝の研究として古くは Kavanau^{2,3,4)} によりウニ *Paracentrotus lividus* について報告され、1967 年には Emerson⁵⁾ によりアルテミア *Artemia salina* について報告されている。また最近ではミルクウイドバグ *Oncopeltus fasciatus* について Favolora ら⁶⁾ が、十脚類 *Pisidia longicornis* (L.) について Smaldon⁷⁾ が報告している。

組織の FAA は蛋白合成のみならず核酸塩基や生理活性物質 (アドレナリン・チロキシン・セロトニンなど) の生合成に利用され、エネルギー獲得のためにも消費されるが、成体においては食物中の蛋白質や体組織の蛋白質の分解によりたえず供給され動的平衡の下にその恒常性が維持されている。しかし種々の生理的条件下ではそのパターンに変動を与えるので病理学的・栄養学的解析手段として応用されており、激しい生理現象の変化が短期日の間に進行する魚卵発生段階では当然大きな FAA パターンの変動が推定される。発生の研究は受精から孵化に至る飼育条件の簡便さから海産では棘皮動物、淡水産では両棲類が多く用いられ魚類の研究は少い。その魚類の発生にも種々の進化と適応の段階により卵性・卵胎性・胎性があり、卵性魚のうちでも魚体に比して卵粒の小さいものと大きいものがある⁸⁾。発生を卵黄蛋白の胚蛋白への変換として捕えようとする目的に沿って卵粒の大きいサケ科魚類の卵が適当な材料と考えられる。サケ卵発生に伴う FAA の変化については 1967 年に渡辺ら⁹⁾ による報告があり、1969 年には著者らが報告した¹⁰⁾。

本報はシロサケ発生段階の 25 のステージにおける FAA の定量と蛋白を構成しているアミノ酸 (PAA) の分析を行い更に蛋白分解活性の測定を試み、そして変動の大きい FAA を中心にそれらの役割について考察を加えたものである。

実験方法

試料および試薬

シロサケ (*Oncorhynchus keta*) はいずれも産卵期に函館近郊の茂辺地川に帰川した 4 年魚で、1970 年には FAA, PAA, 卵重量および水分含量の測定を、1971 年には蛋白分解活性の測定をそれぞれ行うための採卵を行った。人工受精は茂辺地漁業協同組合の採卵場で一組の雌雄魚で常法通り行われた。受精卵は直ちにガーゼ袋に移し川水で冠水してから魔法ビンに入れその上に氷片を置き動かないようにして実験室に持ち帰った。標準アミノ酸は和光純薬工業と味の素製、メタノール、*n*-ブタノール、ジクロロメタン、クロロホルム、無水トリフルオロ酢酸およびトリクロロ酢酸 (TCA) は和光純薬工業製のものを用いた。

イオン交換樹脂は Dow Chemical Co. Ltd. 製、ガスクロマトグラフィー用カラム充填剤はガスクロ工業製と島津製を用いた。

飼育とサンプリング

受精卵を実験室に運び込む 1 ヶ月前から水槽 (24×35×21 cm) に水道水を入れ、リットル当り 8 mg のチオ硫酸ナトリウムを添加し、砂底をフィルターにしてエアレーションを行って塩素を除去した。水槽の温度はクールニクスを用いて 9±1°C に保った。網棚は一腹 (およそ 2700 粒) の受精卵をその上のせ水がすべての卵を充分おおう位置まで沈め固定した。水槽は遮光し毎日死卵を除き水生菌の発生を妨いだ。各発生段階における卵のサンプリングは予定の期日 (表 1) にアミノ酸定量用に 25 粒、形態観察用に 10 粒そして卵重量と水分含量の測定用に 5 粒をそれぞれ行った。

生態観察

発生段階の各ステージで 10 個の卵を 50 ml の Bouin 氏液 (ピクリン酸飽和溶液: ホルマリン: 氷酢酸, 75: 25: 5, 容量比) で固定した。写真撮影は 80% エタノール中で行った。

卵重量および水分含量の測定

発生段階の各ステージで 5 個の卵を水槽から取り出し、濾紙で水分を除き直ちに秤量管で精秤した。

Table 1. *The sampling program of the developing chum salmon eggs.*

No.	Development	Morphology
1		Uninseminated egg
2	0 hrs	Inseminated
3	2	
4	5	
5	8	
6	10	Two cells
7	16	Eight cells
8	24	Morula
9	2 days	Blastula
10	4.5	
11	6.5	Germ-ring
12	8.5	Gastrula
13	10.5	
14	12.5	
15	14.5	Yolk plug
16	16.5	
17	18.5	
18	20.5	4 mm embryo
19	22.5	
20	25.5	
21	28.5	Eyeing stage
22	35.5	
23	42.5	
24	49.5	
25	56.5	Hatching

また水分含量は秤量管中の卵を 105°C で乾燥して失われた重量として求め、卵重量、水分含量ともに 5 個の卵の平均値を算出した。

FAA の抽出および精製

発生段階の各ステージで 25 個の卵をアセトンドライアイスで凍結し、25 ml の 6% TCA と 1 ml の内部標準溶液 (1.25 mg ノルロイシン/ml 0.1 N-塩酸) を加えあらかじめ冷却しておいた乳鉢でホモジナイズした。3000 rpm, 10 分間の遠心分離で上澄を集め、沈澱は再度 15 ml の 6% TCA で抽出し同様に上澄を集めて一括し、これをエチルエーテル 50 ml で 3 回抽出して TCA を除き、2N-アンモニアで中和、メスフラスコで蒸留水を加えて 50 ml にした。この溶液 5 ml を Dowex 50 W, X-8 (H⁺) (100~200 mesh, 2 ml, wet) に吸着、水洗後 10 ml の N-アンモニアで溶出、溶出液を Dowex 1 W, X-8 (OH⁻) (100~200 mesh, 2 ml wet) に通し水洗後 10 ml の N-塩酸でアミノ酸を溶出しロータリーエバポレーターで減圧加温して塩酸および水を除去しその残渣を精製 FAA とした。

アミノ酸の定量

アミノ酸は Gehrke らの方法¹¹⁾ に従いガスクロマトグラフィーにより定量した。アミノ酸試料は Roach らの方法¹²⁾ により n-ブチルエステルとし、乾燥ジクロルメタン中ハロアシル化を行い N-トリフルオロアセチル誘導体とし、島津製ガスクロマトグラフ; GC-4A PTF による分析に供した。カラムは充填剤として 0.25% EGSS-X, 0.75% DEGS を Chromosorb W にコーティングしたもの (4mm×1.5m) と 1.5% OV-17 を Chromosorb W にコーティングしたもの (4mm×1m) との異種のデュアルシステムとした。測定条件は前報¹⁰⁾ の通りであるが、OV-1 の N₂ flow を 60 ml/min, 昇温プログラムを 6°C/min とした。FAA は卵 25 個の平均値として卵 1 個当りの 10⁻⁶ モルとして表示した。

PAA の定量

FAA の抽出時に 6% TCA で生じる卵蛋白質の沈澱からコリオンを除いたものおよそ 50mg をとり、5ml の定沸点塩酸 (5.7N) にサスペンド、アセトンドライアイスで凍結、真空ポンプで脱気、封管後 110°C で 20 時間加水分解を行った。その一部分につき上記の方法でアミノ酸の精製および定量を行った。PAA は定量可能なアミノ酸の重量総和を 100 とした時の各アミノ酸の重量 % で表示した。

蛋白分解活性の測定

活性の測定はおおむね Jones ら¹³⁾ が行った方法に準じた。基質として鶏卵白アルブミン (EA) と鶏卵黄 (CY) を 0.33M クエン酸で 37°C 1 時間加温変性させた。1M-NaOH で各 pH (3.5, 5.0, 7.0, 8.5) に合せた後にその濃度を 0.85% (w/v) に合せた。酵素液は発生段階の各ステージの卵 5 個を 10 倍量の 0.9% NaCl で抽出し 20,000×g, 20 分間の遠心分離でえられる上澄とした。酵素反応は 3.0 ml の基質溶液に 0.5ml の酵素液を加え 37°C で 20 分間インキュベートを行い 3.5ml の 0.8M-TCA を添加して反応を停止させた。未分解の基質および酵素蛋白からなる沈澱を 3000 rpm, 10 分間の遠沈で除き、上澄の 280 nm における吸光度を測定し蛋白分解活性とした。なお酵素液中の蛋白濃度は 0.9% NaCl で 200 倍に稀釈後 280 nm の吸収により測定した。

実験結果

受精後の形態的变化

循環水槽の水温を $9 \pm 1^\circ\text{C}$ に保つとシロサケ受精卵は 60 日以内に孵化しその間以下の変化がみられる：受精により直ちに起こる変化は重量増であり平均 260mg の未受精卵が 295mg になる。これは主として水分吸収によるもので、水分含量は 54% から 61% に増加する (図 1)。また乾燥重量は 110~120mg で未受精卵から孵化にいたる変動幅は 10mg 以内におさまる。受精卵はひとたび水分を吸収するとその後重量の変動は少なくその幅は孵化にいたるまでおよそ 6% にすぎない。受精卵はおよそ 10 時間で blastodisc が現われ、16 時間で 4 細胞、24 時間で morula, 48 時間で blastula, 7 日

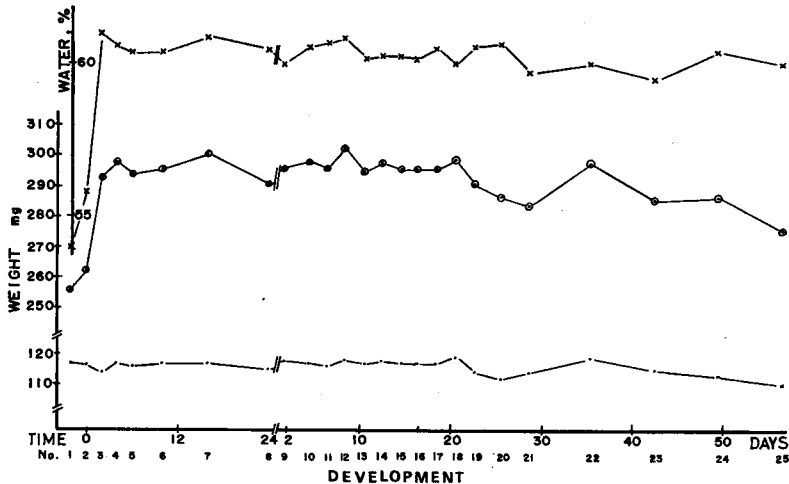


Fig. 1. Changes of egg weight and its water content of chum salmon during the development.

-○- - egg weight before dry, -●- - egg weight after dry,
-×- - water content

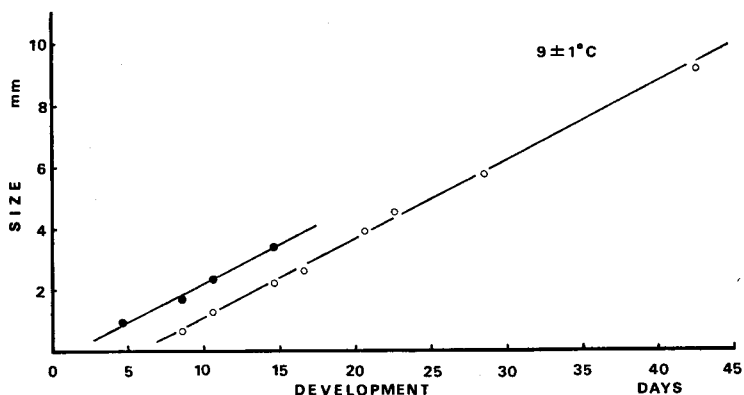


Fig. 2. Growth of the blastodisc and the embryo of developing chum salmon egg.
 -●- diameter of blastodisc, -○- length of the embryo

で germ-ring, 8日で gastrula, 14日で yolplug, 20日で 4mm embryo, 28-29日で eyeing の各ステージを経て, 56~58日で 孵化にいたる (Plate 1)。blastodisc および embryo の生長は時間に対して比例的であることがわかった (図2)。胚の成長速度は $9 \pm 1^\circ\text{C}$ で 0.25 mm/day であった。

FAA について

本実験により定量可能な FAA はアラニン, バリン, グリシン, イソロイシン, ロイシン, プロリン, スレオニン, セリン, システイン, メチオニン, フェニルアラニン, アスパラギン酸, グルタミン酸, リジン, チロシン, アルギニンおよびオルニチンの 17 種であるが, このうち含硫アミノ酸は受精後のどのステージにおいても検出されなかった。なおグルタミンとアスパラギンはグルタミン酸とアスパラギン酸として定量した。

発生初期 (0~48 hrs) の FAA の変動は一般に小さいものであったが, グルタミン酸とアスパラギン酸が共通した変動を示した (図3)。すなわち 5 時間まで減少し 8 時間以後は徐々に増加した。セリン, グリシン, アラニン, バリン, イソロイシン, ロイシン, スレオニンはやゝ酸性アミノ酸に似た変動を示すがプロリン, フェニルアラニン, チロシン, リジン, アルギニンそしてオルニチンは含量も低くまた変動も小さかった。

発生前期 (0~30 days) においてグルタミン酸とアスパラギン酸が特に高い含量を示し, 極めて顕著な周期的変動が両アミノ酸でほとんど平行にえられた。この発生前期にはセリン, アラニン, グリシン, バリン, スレオニンも比較的高い含量を示し変動もみられた。イソロイシン, ロイシンは比較的高い含量を示しながらほとんど変動せず, フェニルアラニン, チロシン, リジンは比較的低い含量で少し変動し, プロリン, アルギニンおよびオルニチンは含量も低く変動も小さかった。

発生後期 (30~60 days) においてグルタミン酸とアスパラギン酸は急激に減少し, 孵化時にその含量をやゝ回復した。その他のアミノ酸は孵化時に向って増加の傾向を示しこのうちセリン, グリシン, リジンおよび両酸性アミノ酸は孵化時の増加は急であった。フェニルアラニンは 22 日頃から酸性アミノ酸につく高い含量を示し孵化時に向って徐々に増加の傾向を示した。チロシンはフェニルアラニンにやゝ類似する変動を示すが含量が低く, プロリン, アルギニンおよびオルニチンは低含量小変動であった。

以上の FAA 分析からシロサケ卵発生中に見られるアミノ酸プールについて 5 つの段階が考えられる: 第Ⅰ期は受精直後からおよそ 8 時間に向って見られる FAA の消費期である。第Ⅱ期は FAA の回復期で 48 時間後には未受精卵のレベルを凌駕する。第Ⅲ期は 2 日から 28 日に至る酸性アミノ酸の

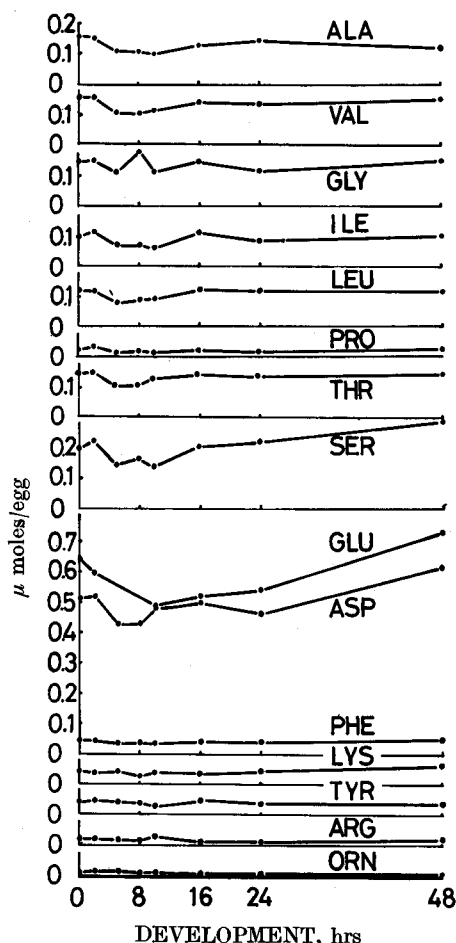


Fig. 3. Free amino acid (FAA) of the early developing chum salmon eggs. FAA was extracted from 25 frozen eggs with 6% TCA, purified by the ionexchanger, analyzed by GLC as N-TFA n-butyl derivatives, and calculated by the internal standard method using norleucine.

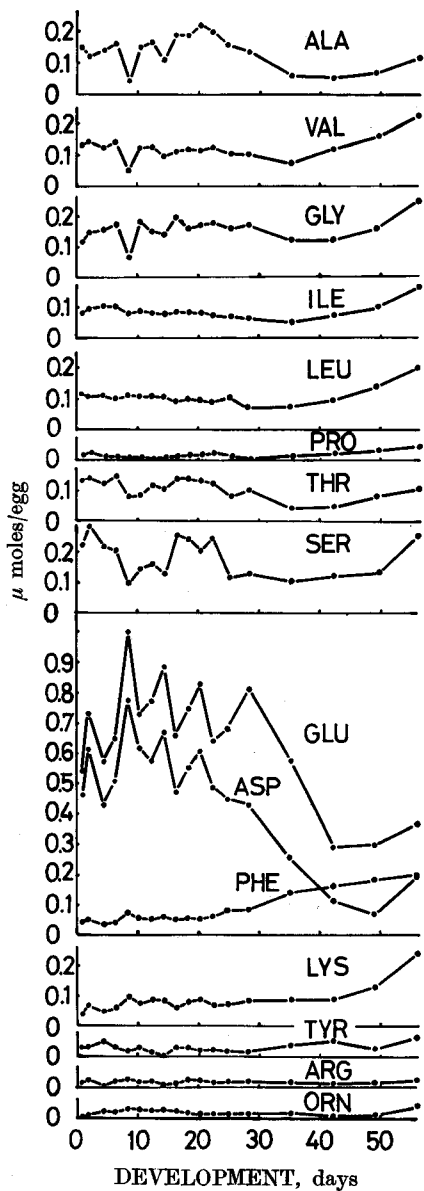


Fig. 4. Free amino acid (FAA) of the chum salmon eggs through their development.

周期的変動を中心とする多くの FAA の変動期で、期間とし発生前期の大部分を占め、変動において全発生過程の代表となりうる段階である。第Ⅶ期はその後42日頃迄のおよそ2週間に見られる第二の消費期で、減少の傾向は酸性アミノ酸で顕著でありアラニン、グリシン、スレオニン、セリン、バリンにこの傾向がみられる。しかしこの段階で芳香族のアミノ酸は増加している。第Ⅷ期はその後孵化にいたるものでこの段階はすべての FAA が増加する安定期である。孵化の直前にはグルタミン酸、

アスパラギン酸、アラニン、スレオニンは未受精卵より低いレベルであるがその他のアミノ酸はすべて未受精卵より高いレベルになる。増加の傾向はリジン、フェニルアラニンが極めて顕著であり、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシンも顕著である。

PAA について

6% TCA で沈澱して来る蛋白質についてコリオンを除去し常法通りの酸加水分解中にえられるアミノ酸 (PAA) を 13 のステージで定量した。TCA で沈澱して来る蛋白質は受精時にはほとんどが卵黄蛋白であり孵化時にはこれに相当量の胚蛋白が加わった組成となるが、PAA の重量%はその間ほとんど変化が見られなかった (表 2)。PAA の特徴は酸性アミノ酸、アラニン、ロイシン、リジンの含量が高いことである。

Table 2. Protein amino acids (PAA) of the chum salmon eggs through their development.

Stage No.	1	4	9	10	12	13	15	16	18	19	21	23	25	Chorione
ALA	10.09	10.59	10.59	10.75	11.18	10.68	11.38	10.70	10.74	10.90	10.88	11.20	9.92	4.71
VAL	6.05	6.74	6.70	6.45	5.44	6.32	6.43	6.46	5.87	6.16	6.10	5.85	6.01	5.08
GLY	3.01	2.15	2.90	3.01	3.34	2.56	3.25	3.16	3.05	3.43	3.94	3.87	4.01	4.17
ILE	4.98	5.17	5.20	5.44	3.87	4.92	4.88	5.03	4.58	4.77	4.44	4.75	5.03	6.01
LEU	13.94	11.94	11.49	11.22	9.54	11.63	11.72	12.62	12.32	11.92	13.50	11.58	11.72	20.09
PRO	5.62	6.26	6.16	5.69	6.27	5.86	6.13	5.55	5.73	5.98	6.12	5.95	4.97	8.76
THR	5.21	5.68	5.45	5.36	6.09	5.75	6.30	6.26	5.81	6.45	7.08	6.22	6.48	12.72
SER	6.10	4.49	5.80	5.89	6.52	6.29	5.42	6.69	5.97	6.46	6.86	5.69	5.26	4.07
MET	2.19	1.90	3.25	2.62	1.66	1.48	0.89	0.83	tr	0.17	0.40	tr	tr	1.03
PHE	5.69	5.77	6.00	5.48	6.01	5.88	5.59	5.87	5.78	5.62	6.79	5.84	6.10	5.73
ASP	10.24	10.76	11.02	10.93	13.63	11.24	11.76	11.28	11.18	11.07	13.57	11.42	12.09	10.61
GLU	12.67	12.69	12.60	12.72	12.49	12.71	12.95	11.93	12.64	12.93	14.43	13.51	14.38	15.29
LYS	9.16	9.11	7.77	9.07	8.74	9.52	8.29	8.39	9.56	8.97	10.37	9.04	8.45	5.71
TYR	3.62	4.11	4.01	3.86	3.92	4.05	3.45	3.33	3.67	4.07	4.58	4.06	4.65	4.68
ARG	1.33	1.88	0.95	1.42	1.24	1.05	1.48	1.31	3.02	1.04	1.65	0.95	0.86	1.26

なお比較のためコリオンを集め同様の酸加水分解中にえられるアミノ酸の定量を試みた。コリオンアミノ酸組成の特徴は PAA と比べアラニンが少くスレオニンが多い点である。そしてプロリンがやゝ多く、セリン、リジンがやゝ少く、酸性アミノ酸はいずれも多く含まれるが PAA に比べグルタミン酸がやゝ多くアスパラギン酸はやゝ少く、その他のアミノ酸は PAA と同様であった。これらの比較から PAA とコリオンアミノ酸組成は容易に区別できるものである。

蛋白分解活性

受精から孵化に至る 25 のステージにおける蛋白分解活性を 4 種の pH につき測定した。基質として鶏卵黄蛋白 (CY) と卵白アルブミン (EA) を用いた。酵素液中に抽出されてくる蛋白質量は受精時に高く、12 時間後にはその 1/3 程度にまで下り、その後は孵化にいたるまで大きな変化はみられなかった。シロサケ卵発生の伴う蛋白分解活性の大きな特徴は、どの pH における活性の変動もおおむね類似したパターンを示し、いずれの pH においても EA に比べ CY がよく分解される。なお両基質に対する活性の差は pH 3.5 において小さく発生前期においてより小さい。変動パターンは受精後 2 日目にかけて下降、その後 15 日に向い上昇、25 日に向い下降、その後基質 CY については 30 日基質 EA については 35 日に向い上昇、そして 45 日に向い下降し、その後は孵化に向い上昇した。いずれの pH においても孵化直前の活性が最も高くその次には 30 日 (CY) と 35 日 (EA) の活性が高かった (図 5)。

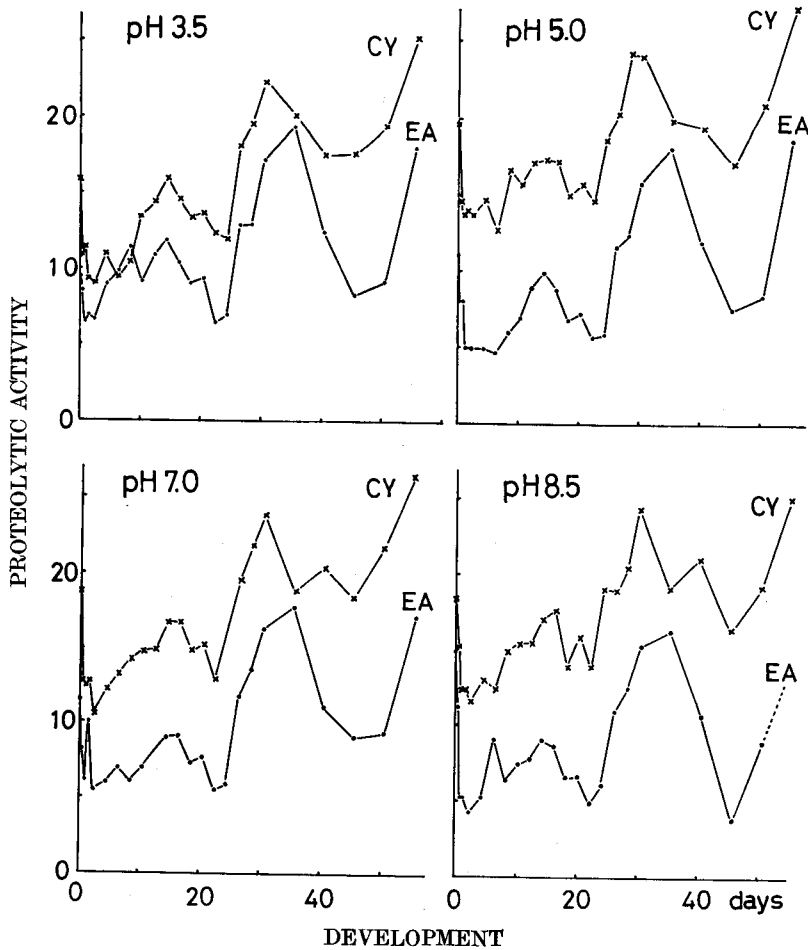


Fig. 5. Proteolytic activities of the developing eggs of chum salmon. Substrates; 0.33 M citrate denaturated chick yolk protein (CY) and egg albumin (EA). Enzyme; 20,000 \times g supernatant of 0.9% NaCl extract of the developing eggs. activity; $-\log T \times 100$ at 280 nm of the supernatant stopped with TCA after incubation at 37°C for 20 min.

考 察

発生途上の卵および胚の FAA は微量であるためにかつてはペーパークロマトグラフィーを用いた分析では検出されなかった¹⁴⁾が、1950年 Holtfreter ら¹⁵⁾により魚類の卵や胚にも FAA が存在することが認められた。その後ウニや両棲類について発生に伴う FAA の研究が行われ、その中で Kavanau⁴⁾ はウニにおいてグリシンが高濃度でありその他の FAA も発生に伴い変動することを報告した。魚類についての報告はほとんど見当たらないが、1967年に渡辺ら⁹⁾によりサケの未受精卵から17日に至る6つのステージで FAA の測定が行われ10種のアミノ酸が薄層クロマトグラフィーにより定量された。発生初期を通してアスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、イソロイシン、ロイシン、アラニンが多くこれらの FAA が発生に伴い変動することが報告された。1969年に著者ら¹⁰⁾がサケ卵発生の4つのステージにつき14種のアミノ酸の定量をガスクロマトグラフィーにより行いそれぞ

れのクロマトグラムを示した。全般に酸性アミノ酸が多量でロイシン，バリンも比較的多く，後期に両酸性アミノ酸の減少が顕著であり，フェニルアラニンとリジンの増加が認められた。その後ガスクロマトグラフィーによる微量アミノ酸定量技術が進み本報告ではオルニチンを含む17種の定量を行った。また，発生に伴う蛋白分解活性は真野¹⁶⁾によりウニについて報告されており，発生途上の種々の細胞分画で活性が認められ，酸性域，中性域，アルカリ性域にそれぞれ至適のpHが示されているが，魚類についてはほとんど報告が見当たらない。

シロサケ卵発生の過程は卵黄蛋白の胚蛋白への変換の過程として捕え，アミノ酸プールを構成するFAAはそれぞれ固有の化学構造に起因する機能を有するものとして捕え，発生途上の生理的断面でこれらのFAAの定量を行い経時的にその変動を観察することにより浮び上る特定のアミノ酸の役割を中心に考察を行う。

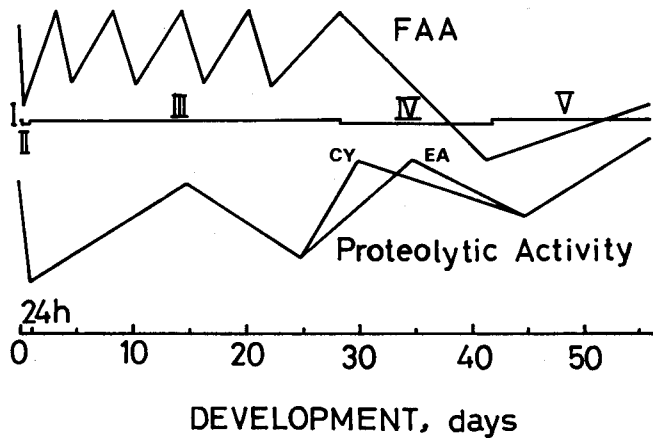


Fig. 6. Relation between FAA and proteolytic activity of chum salmon eggs through their development.

シロサケ卵発生におけるFAAと蛋白分解活性の概略を模式的に表わすと図6のようになり，両者の間に相互関係があるように見受けられる。第I期は未受精時にすでに存在していたFAAは受精後数時間に盛んに利用され，受精直後の全FAAは 2.59μ moles，5時間後は 1.75μ molesとなる。この時期は蛋白分解活性が高いが酵素液として抽出されてくる蛋白量も多い。第II期はFAAレベルが回復に向い，蛋白分解活性も徐々に上昇し，この期の終りには卵割が完了する。第III期はFAAが最も激しく変動する。殊にグルタミン酸とアスパラギン酸の変動が大きくしかもその変動は周期的であった。その周期はかなり正確なリズムを成し4日間で蓄積され2日間で消費される。この周期の成因については酸性アミノ酸が蓄積され一定レベルに達するのを待って急速に利用されるというメカニズムが存在するのであろう。シロサケの場合主として卵黄蛋白と考えられるPAAの中でアラニンとロイシンがグルタミン酸とアスパラギン酸に匹敵する高い含量を示したがFAAにおいてはグルタミン酸とアスパラギン酸は高いレベルで変動するのに反しアラニンとロイシンはその他のFAAと同じ低いレベルを保っている。PAAからFAAへの移行はどのアミノ酸についても平等に行われFAAから胚蛋白合成への利用もバランスのとれたものであろう。しかし，FAAのエネルギー獲得系への利用は個々のアミノ酸により異なり，シロサケの場合はアラニンやロイシンが利用されやすいのではなかろうか。さらに異化により生じる余剰のアミノ基はピルビン酸と反応してアラニンが生合成されると考えられるが，FAA中アラニン含量がさほど高くない。この場合アラニンと α -ケト酸との間でアミノ

基転移反応が進み酸性アミノ酸が蓄積されると考えるのが自然であろう。しかし一定レベルまで蓄積を待って起こる急速な消費については具体的な現象を想定することができない。この第Ⅲ期は胞胚期からのう胚期を経てヨークプラグのステージまで蛋白分解活性が上昇し胚が生じてから発眼期に向い活性は下降する。第Ⅳ期は FAA の第二の消費期で、この時間は 25 日頃からの蛋白分解活性が上昇し PAA の FAA への供給が盛んに行われるにもかかわらず FAA の減小が著しい。従ってこの時期にはもっぱら胚の生長に利用されると考えられる。蛋白分解活性は 30 日頃 (CY) と 35 日頃 (EA) から下降する。この基質の違いにより生じる活性変動のずれはそれぞれの基質に対し選択的である別種の蛋白分解酵素の存在を示唆するものであろう。またこの時期フェニルアラニンとチロシンが増加しはじめこれはおそらく色素の沈着などに関連するのであろう。第Ⅴ期はすべての種類の FAA 増加の傾向を示し、この時期はシロサケ卵の全発生段階を通じて最も FAA プールが潤沢である。この現象の中に卵黄蛋白よりも利用しやすい FAA のレベルを高く保つことの有利性がうかがえる。この時期は酸性アミノ酸が高いレベルを保つ必要がなくなるのであろう。グルタミン酸とアスパラギン酸は第Ⅲ期に比べ相当低いレベルに下がっている点が印象的である。孵化を目前に控え 45 日を境に蛋白分解活性も再度上昇し 56 日には全発生過程での最高レベルに達し、FAA の供給が盛んに行われる背景がうかがわれる。孵化直前のシロサケ卵黄蛋白は肉眼的には極めて流動性に富む状態になるが、PAA は全発生過程を通じてほとんどアミノ酸組成を変えない点は注目に値する。卵黄蛋白は受精により引き起こされる自発的なアンホールディングや各発生段階に応じた蛋白分解酵素の働きによる高次構造の変化を受けるが 6% TCA で沈澱してくるポリペプチドを構成するアミノ酸すなわち PAA は変化していない。この結果は卵黄蛋白の胚蛋白への変換が極めて順調に進んだ時にはじめて得られるものであり、未受精時に保持していたペプチド結合のポテンシャルが孵化直前では保たれていることになり、ペプチド結合の解裂により失われる化学結合エネルギーはおおむね回復していると考えられる。従って PAA の胚蛋白への変換のために必要なエネルギーは FAA 中特定のアミノ酸がトリカルボン酸回路と関連して変化することにより生みだされることが考えられよう。

外からの栄養補給のない卵の発生段階でエネルギー獲得系と関連して消費される FAA の最終代謝産物はどのように処理されるのであろうか。哺乳動物の肝細胞における尿素合成系は酸性アミノ酸の脱アミノ反応により生じるアンモニアがカルバミル燐酸を経てオルニチンに取込まれシトルリンが生成することにより進められるものであるが、最近 Mendes-Mourão ら¹⁷⁾によりこの脱アミノ反応がロイシンにより阻害されること、またアラニンの存在でロイシンがグルタミン酸とグルタミンの生産を促進することが見出された。この知見は哺乳動物の肝細胞とは全く異なる魚卵発生段階における窒素代謝を考える上でも示唆に富むものと考えられる。

シロサケ卵発生に伴う FAA の測定から各発生段階におけるアミノ酸プールの状況を示し、この中で特に酸性アミノ酸が高い含量を示し、グルタミン酸がアスパラギン酸に比べ常にやや優位の量的関係を保ち、相互の変動が平行でしかも周期的であることを見出した。これらの酸性アミノ酸はジカルボン酸でありその前駆体が α -ケト酸であると云う化学構造により支えられたアミノ基 (或はアンモニア) の受容体として窒素代謝産物を排泄系に送らず再度利用できる形、すなわち酸性アミノ酸とそのアミド、に保つ役割を演じているように考えられる。そしてまた PAA 中のアラニン、ロイシンの高含量も単なる偶然ではなく、さらにミオシン系の蛋白合成のために酸性アミノ酸に次いで多くを必要とするリジンが高含量であることを考慮に入れるならば、卵黄蛋白のアミノ酸組成も胚蛋白合成を行う上でアプリーオーに備った有利な条件の一つを満していると考えられよう。

シロサケ卵発生における主要なテーマは卵黄蛋白が発生のためにどのように使われるかということであろう。その中で FAA がセントラルドグマに従って胚蛋白に組立てられることに関しては疑問の余地はない。従って卵黄蛋白がどのようにして FAA になるかという処に多くの問題が残されている。この問題の解決は卵黄蛋白そのもの、蛋白質化学的研究と各発生段階を通じて蛋白質の変化の追

跡により進展するであろう。これに関連して前報¹⁰⁾に述べた発生途上で増減する低分子ペプチド様物質の究明、さらに FAA のエネルギー獲得系への利用に関してはアミノ基転移酵素の測定により卵黄蛋白および FAA の利用のメカニズムの一部が解明されるのではないかと考える。生命が次の世代に受けつがれる生化学的機構は興味をつきないものであり、そのなかでも卵黄蛋白の胚蛋白への変換は量的変化を最小にとどめながら大きな質的变化を行う生命現象として昆虫などのメタモルフオシスとならぶ代表的なものであり、この機構と合目的性の解明は生命の営みと物質利用の両面における蛋白質とアミノ酸の価値の認識に新たな示唆を与えるものであろう。

本稿の御校閲をいただいた石原義雄教授、生態観察を御指導下さった小野里坦博士、貴重なシロサケ卵をお譲り下さった上磯町茂辺地漁業協同組合の方々に深く謝意を表す。

文 献

- 1) 石田寿老 (1968). 発生生化学 280 p. 東京; 裳華堂.
- 2) Kavanau, J.L. (1954). Amino acid metabolism in developing sea urchin embryos *Exp. Cell Res.* **6**, 563-566.
- 3) Kavanau, J.L. (1953). Metabolism of free amino acids, peptides and proteins in early sea urchin development. *J. Exp. Zool.* **122**, 285-337.
- 4) Kavanau, J.L. (1954). Amino acid metabolism in the early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Exp. Cell Res.* **7**, 530-557.
- 4) Emerson, D.N. (1967) Some aspects of free amino acid metabolism in developing encysted embryos of *Artemia salina*, the brine shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* **20**, 245-261.
- 6) Favallora, V.H. and Kalioki, H.G. (1973). Investigation of the free amino acid metabolism in the embryo of the milkweed bug: *Oncopeltus fasciatus*. *Ibid.* **44B**, 843-847.
- 7) Smaldon, G. (1973). Free pool amino acids in the developing embryos of *Pisidia longicornis* (L). (Decapoda, anomura). *Ibid.* **44B**, 711-714.
- 8) 岩井 保 (1974). 魚学概論 228 p. 東京; 恒星社厚生閣.
- 9) 渡辺俊夫・西田秀夫 (1967). サケ卵の発生初期におけるアミノ酸および α -ケト酸 生化学. **39**, 806-810.
- 10) 国崎直道・米田 勤・石原義雄 (1969). ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析について. 北大水産彙報 **20**, 193-201.
- 11) Gehrke, C.W., Zumwalt, R.W., and Wall, L.L. (1968). Gas-liquid chromatography of protein amino acids. *J. Chromatog.* **37**, 398-413.
- 12) Roach, D. and Gehrke, C.W. (1969). Direct esterification of the protein amino acids gas-liquid chromatography of N-TFA n-Butyl esters. *Ibid.* **44**, 269-278.
- 13) Jones, R.E. and Hemmings, W.A. (1971). Proteolytic enzymes of the yolk-sac splanchnopleur. *Biochem. Biophys. Acta* **242**, 278-287.
- 14) Chao-t'e Li and Eugene Roberts (1949). Free amino acids and peptides in frog embryos. *Science* **110** 425-426.
- 15) Holtfreter, J., Koszalka, T.R., and Miller, L.L. (1950). Chromatographic studies of amino acids in the eggs and embryos of various species. *Exp. Cell Res.*, **1**, 453-459.
- 16) 眞野嘉長 (1968). 初期発生におけるタンパク合成の調節. 生化学 **40**, 273-305.
- 17) Mendes-Mourão, J., McGivan, J.D. and Chappel, J.B. (1975). The effects of L-leucine on the synthesis of urea, glutamate and glutamine by isolated rat liver cell. *Biochem. J.* **146**, 457-464.

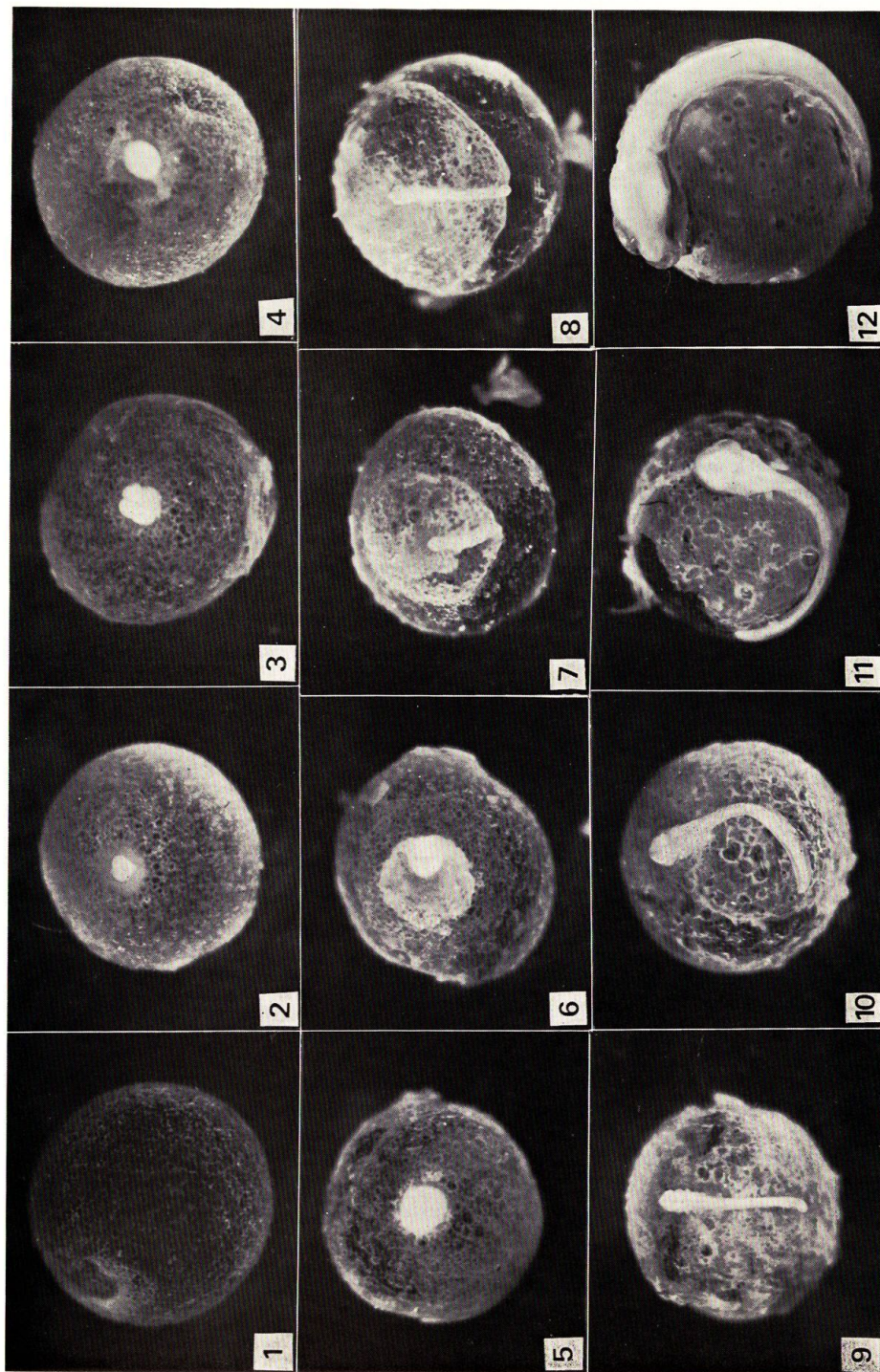


PLATE I

Surface view of the developing embryo of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*.

Fig. 1. Egg at a few minutes after the insemination.

Fig. 2. Egg at five hours.

Fig. 3. Egg at sixteen hours.

Fig. 4. Egg at forty-eight hours.

Fig. 5. Egg at four and a half days.

Fig. 6. Egg at eight and a half days.

Fig. 7. Egg at ten and a half days.

Fig. 8. Egg at fourteen and a half days.

Fig. 9. Egg at sixteen and a half days.

Fig. 10. Egg at twenty and a half days.

Fig. 11. Egg at twenty-eight and a half days.

Fig. 12. Egg at fifty-six and a half days.

(Figs. 1-12; ca. $\times 7.7$)