

Zofia Luberda

Katedra Biochemii Zwierząt Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie

Enzym wyklucia ryb

Wstęp

Zarodki ryb wykluwają się przy udziale specyficznej proteiny, która częściowo trawi otaczającą je osłonę jajową (chorion). Proteinaza ta zwana enzymem wyklucia lub chorionazą hydrolizuje glikoproteiny wewnętrznej warstwy osłony jajowej i osłabia ją tak dalece, że pozostałe jej części rozrywane są przez energiczne ruchy zarodka, który uwalnia się i rozpoczyna samodzielne życie.

Synteza i sekrecja enzymu

Enzym wyklucia ryb kostnoszkieletowych syntetyzowany jest w wyspecjalizowanych, jednokomórkowych gruczołach wyklucia. Do momentu wyklucia enzym magazynowany jest w granulach sekrecyjnych w formie proenzymu [31, 35]. W rozwoju zarodkowym gruczoły wyklucia pojawiają się po raz pierwszy najczęściej w stadium pigmentacji oczu [34]. U większości gatunków ryb kostnoszkieletowych gruczoły wyklucia są pochodzenia ektodermalnego i zlokalizowane są w nabłonku jamy gębowej, gardzieli oraz na wewnętrznej powierzchni wieczka skrzelowego [38]. Gruczoły wyklucia u większości gatunków ryb położone są między peridermą (pojedyncza warstwa komórek nabłonkowych, stykających się z płynem okołożółtkowym) a komórkami embrionalnego naskórka (warstwa komórek przylegających do błony podstawnej).

W określonym stadium rozwoju zarodkowego następuje sekrecja enzymu z gruczołów wyklucia do płynu okołożółtkowego. Podczas wydzielania enzymu wyklucia komórki gruczołowe pęcznieją, a połączenia okrywających je komórek peridermalnych ulegają rozdarciu. Nad gruczołami powstaje "okienko sekrecyjne", przez które błona cytoplazmatyczna wierzchołkowej części komórki gruczołowej kontaktuje się z płynem okołożółtkowym [29, 39]. Wewnątrz komórek następuje częściowa fuzja i rozpuszczanie się granul. Jednocześnie w wierzchołkowej części komórki formuje się duża wakuola sekrecyjna, otwierająca się do przestrzeni okołożółtkowej. Wydzielanie zawartości granul następuje najczęściej na wierzchołku komórki gruczołowej albo bezpośrednio do przestrzeni okołożółtkowej, albo za pośrednictwem wakuoli sekrecyjnej [29, 39].

Czynniki stymulujące sekrecję enzymu wyklucia

Sekrecja enzymu wyklucia pozostaje pod znacznym wpływem czynników środowiska zewnętrznego. Decydujący wpływ na sekrecję enzymu wyklucia, i w konsekwencji wylęgnięcie się zarodków, wywiera koncentracja tlenu w środowisku otaczającym jajo. Podniesienie zawartości tlenu w wodzie opóźnia wyklucie zarodków [6]. Niska koncentracja tlenu w środowisku natomiast stymuluje proces wyklucia ryb [4, 10]. Di Michele i Taylor [3] zaobserwowali, że inkubacja zarodków fundulus (*Fundulus heteroclitus*) w wodzie z rozpuszczonym tlenem o stężeniu powyżej $6 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \cdot \text{dm}^{-3}$ opóźnia proces ich wyklucia. Zarodki te natomiast wykluwają się normalnie, gdy stężenie tlenu w wodzie wynosi $4 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ lub mniej. Di Michele i Powers [4] sugerują, że wyklucie jest stymulowane, kiedy wzrasta zapotrzebowanie oddechowe zarodków, przez co wytwarzają się warunki hipoksji w mikrośrodowisku otaczającym jajo.

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na sekrecję enzymu wyklucia jest temperatura, szczególnie w odniesieniu do ryb zimnolubnych. U zarodków siejowatych w temperaturze około 2°C zostaje zahamowane wydzielanie chorionazy, mimo licznie wykształconych dojrzałych gruczołów wyklucia [17]. W warunkach naturalnych sekrecja chorionazy pozostaje również pod wpływem światła. Szybkość wyklucia zarodków ryżanki japońskiej (*Oryzias latipes*) inkubowanych w warunkach 12 godzin światła – 12 godzin ciemności była znacznie wyższa w pierwszym z wymienionych okresów [30]. W norweskich wylęgarniach często obserwowano, że krótka ekspozycja świetlna jaj łososia atlantyckiego bezpośrednio przed wykluciem może indukować ten proces [22]. Odnotowano również pozytywny wpływ światła na embriogenezę i wyklucie ryb siejowatych [1].

Na wyklucie prawidłowo rozwiniętych zarodków mogą wywierać niekorzystny wpływ jony metali ciężkich. Miś i in. [19] odnotowali spadek normalnych i wzrost zdeformowanych zarodków karpia wykłutych z zapłodnionych jaj inkubowanych w obecności jonów miedzi (w stężeniu od 0,2 do $1,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i w obecności jonów cynku (w stężeniu od 3,0 do $13,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Cytowani autorzy zaobserwowali jednocześnie, że jony Cu^{2+} i Zn^{2+} wpływają na zmniejszenie powierzchni gruczołów wyklucia, a także na degradację cytoplazmy wewnątrz tych komórek.

Mechanizm fizjologiczny powodujący sekrecję enzymu wyklucia nie jest jeszcze całkowicie poznany. Już na początku lat osiemdziesiątych zaobserwowano, że homogenat przedniego płata przysadki mózgowej uwalnia chorionazę z izolowanych gruczołów wyklucia ryżanki japońskiej. Szczegółowsze badania wykazały, że za sekrecję enzymu wyklucia odpowiedzialna jest prolaktyna, której uwalnianie pozostaje pod kontrolą podwzgórza [27, 30]. Wśród czynników środowiskowych uruchamiających neurosekrecyjny szlak uwalniania chorionazy wymienia się hipoksję i światło [27, 30]. W kaskadzie reakcji prowadzącej do uwolnienia enzymu z gruczołów wyklucia prawdopodobnie biorą również udział jony wapnia. Wykazano bowiem, że jonofory wapniowe prawie natychmiast indukują sekrecję enzymu wyklucia [36].

Chorion

Ośłona niezapłodnionych, jak i zapłodnionych jaj oraz rozwijających się zarodków ryb zwana jest chorionem. Oślony jajowe większości ryb zawierają dwie lub trzy warstwy. Warstwy te różnią się cechami morfologicznymi i właściwościami chemicznymi. Jedna lub dwie warstwy są cienkie, natomiast najbardziej wewnętrzna warstwa jest przeważnie grubsza i najczęściej wieloblaszkowa [32, 35].

Wewnętrzna warstwa oślony dojrzałych oocytów ryb kostnoszkieletowych składa się z kilku dużych (najczęściej trzech, czterech) i z kilku małych komponentów glikoproteinowych [9, 23]. Po zapłodnieniu miękka i krucha ośłona oocytów ulega tzw. procesowi twardnienia i zostaje zamieniona w twardą i mocną strukturę o dużej elastyczności. Proces twardnienia oślon zapłodnionych jaj ryb kostnoszkieletowych następuje w wyniku formowania się kowalencyjnych wiązań poprzecznych (izopeptydowych) między γ -karbonyłowymi grupami glutaminy jednego łańcucha polipeptydowego a ϵ -aminowymi grupami lizyny drugiego łańcucha w obecności Ca^{2+} -zależnej transglutaminazy płynu okołozółtkowego. W wyniku polimeryzacji białka chorionu stają się prawie całkowicie nierozpuszczalne w roztworach wodnych, konstruując mocny jego szkielet o dużej wytrzymałości mechanicznej [23].

Chorionaza

Mocne oślony jajowe ryb z dużą trudnością trawione przez wiele znanych protei-
naz są sprawnie upłynniane przez natywne enzymy wyklucia. Stwierdzono [43], że w czasie katalizy enzym wyklucia ryb wiąże się z chorionem za pomocą specjalnego miejsca, niezależnego od centrum aktywnego. Należy przypuszczać, że związanie enzymu z substratem ułatwia trawienie twardej biologicznej struktury, jaką jest ośłona jajowa ryb kostnoszkieletowych. Wieloblaszkowa wewnętrzna warstwa chorionu jest sukcesywnie trawiona od najbardziej wewnętrznej strony (przylegającej do przestrzeni okołozółtkowej) do strony zewnętrznej. Po trawieniu enzymem pozostaje tylko cienka warstwa zewnętrzna chorionu, która jest rozrywana mechanicznie przez wykluwający się zarodek.

Generalnie chorion jest trawiony na drodze proteolizy ograniczonej, w wyniku której uwalniane są rozpuszczalne białka o relatywnie wysokiej masie cząsteczkowej [11, 12] i peptydy [11]. W enzymatycznym hydrolizacie oślon jajowych ryb stwierdza się również wolne aminokwasy od niewielkich ilości u siejowatych [12] i ryżanki japońskiej [11] do znacznych u pstrąga tęczowego [21].

Enzymy wyklucia siei, sielawy [12] i ryżanki japońskiej [41] preferencyjnie hydrolizują wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy hydrofobowe (leucynę, izoleucynę i walinę), a także tyrozynę.

W warunkach naturalnych czas enzymatycznej hydrolizy osłon jajowych jest stosunkowo krótki. Dla przykładu dla ryżanki japońskiej wynosi on ok. 0,5 godz. [35], ryb siejowatych — 1,2–2,0 godz. [18] i podobnie pstrąga tęczowego — 2 godz. [11]. Chorionaza może trawić nie tylko własny chorion, ale także osłony jajowe innych gatunków. I tak proteinaza wyklucia sielawy trawi choriony siei, pelugi, troci czy pstrąga tęczowego [12]. Enzym wyklucia szczupaka wykazuje raczej wysoką gatunkową specyficzność, bowiem nie trawi osłon jajowych danio pręgowanego czy ryżanki japońskiej [28].

Proteinazy wyklucia ryb są niskocząsteczkowymi białkami. Masa cząsteczkowa enzymów wyklucia opisanych dotychczas gatunków ryb kostnoszkieletowych mieści się w zakresie 8,0–25,4 kDa [20, 28, 41]. Jak wykazały dotychczasowe badania enzym wyklucia wielu gatunków ryb, m.in. pstrąga tęczowego [8], ryżanki japońskiej [41], siei i sielawy [12, 13] czy szczupaka [28] można zaliczyć do metaloproteinaz, zawierających w centrum aktywnym cynk. Enzym wyklucia łososa atlantyckiego, jak wynika z badań Ronga i Walthera [25] należy prawdopodobnie do proteinaz serynowych. W wypadku chorionazy fundulus w katalizie enzymatycznej prawdopodobnie uczestniczy jon metalu, jak i obecna w centrum aktywnym seryna [5].

Aktywność chorionazy pozostaje pod dużym wpływem czynników środowiska, takich jak temperatura, odczyn czy siła jonowa wód. U ryb temperatura jest najważniejszym czynnikiem determinującym czas upływający między zapłodnieniem jaj a wykluciem się zarodków. Wpływ temperatury na aktywność enzymu wyklucia badano natomiast u niewielu gatunków. Z nielicznych badań wynika, że optimum temperatury dla enzymu wyklucia ryb ciepłolubnych wynosi 30–40°C [37], dla ryb zimnolubnych wartość ta mieści się w zakresie 18–25°C [7, 12, 15].

Wśród ryb zimnolubnych odnotowuje się dość istotne zróżnicowanie wartości optymalnych temperatur dla aktywności enzymu wyklucia. I tak na przykład optimum temperatury enzymu wyklucia golca zwyczajnego (*Salvelinus alpinus*), gatunku wybitnie zimnolubnego, zasiedlającego północne wody Norwegii jest o około 5°C niższe niż innych gatunków łososiowatych czy siejowatych [16]. Badania wpływu temperatury na tempo choriolizy przedstawiają się również interesująco w odniesieniu do ryb siejowatych. Enzym wyklucia siei i sielawy wykazuje aktywność proteolityczną już w 2°C, która szybko rośnie i ulega podwojeniu w temp 6–8°C. W temp. 10°C aktywność omawianych proteinaz wyklucia wynosi ponad 40% aktywności maksymalnej [12].

Niekorzystny wpływ na reprodukcję niektórych gatunków ryb zimnolubnych może mieć globalne ocieplenie i w konsekwencji wzrost temperatur wód naturalnych. Scott i Poynter [33] sugerują bowiem, że przy podwyższeniu temperatury wód na północ od 37°S o 1,5°C w Nowej Zelandii przed 2050 rokiem nastąpi ograniczenie obecności pstrąga potokowego wskutek obniżenia efektów wyklucia. Wzrost temperatury wód o 3°C może spowodować eliminację z tego obszaru zarówno pstrąga potokowego, jak i pstrąga tęczowego.

Ryby charakteryzują się różną tolerancją na stopień zasolenia wód. Niektóre gatunki ryb (euryhalinowe) mogą żyć w wodach różniących się znacznie pod względem

zawartości soli, podczas gdy inne, określane jako stenohalinowe znoszą tylko niewielkie wahania zasolenia. Podobnie jak ryby dorosłe, również ikra i wczesne stadia rozwojowe odznaczają się różną wrażliwością na zasolenie. Enzymy wyklucia ryb słodkowodnych charakteryzują się znaczną tolerancją na stopień zasolenia wód. Dla przykładu enzymy wyklucia siei i sielawy traciły znaczną część aktywności dopiero w roztworach z zawartością NaCl powyżej 3‰ [12], podczas gdy zasolenie wód słodkich rzadko kiedy przekracza 0,3‰. Z drugiej strony enzymy wyklucia ryb słonowodnych (fundulus, babki czarnej — *Gobius jozo*) tracą aktywność po usunięciu wszystkich jonów z medium inkubacyjnego i odzyskują ją po dodaniu wody morskiej [2].

Zdolność zarodków ryb gatunków słodkowodnych i wód słonawych do degradacji chorionów w warunkach relatywnie wysokiej siły jonowej i relatywnie wysokiego pH, które bardziej odpowiada odczynowi wody morskiej niż wód słodkich, skłania do interpretacji faworyzującej morskie pochodzenie ryb kostnoszkieletowych [22].

Na prawidłowy i terminowy wylęg zarodków ryb kostnoszkieletowych wywiera wpływ odczyn wód. Obniżenie pH w końcowym okresie inkubacji powoduje opóźnienie lub uniemożliwia wykluwanie się zarodków ryb [24, 26]. Opóźnienie wykluwania się zarodków ryb w kwaśnym środowisku jest następstwem obniżenia aktywności enzymu wyklucia przez wysokie stężenie jonów wodorowych. Aktywność enzymu wyklucia ryb bowiem gwałtownie spada w pH poniżej 7,0. U niektórych gatunków aktywność enzymu w zakresie pH 6,0–7,0 może wynosić poniżej 20% aktywności maksymalnej [12]. Najwyższą aktywność enzym wyklucia ryb wykazuje środowisku alkalicznym, najczęściej jest to wartość pH w zakresie 8,0–9,0 [7, 12, 14, 15, 16, 28, 41].

Zarówno pH, jak i siła jonowa, a często również temperatura, w których wykluwają się zarodki ryb są odległe od optymalnych wartości dla reakcji choriolitycznej. W warunkach naturalnych enzym wyklucia ryb może wykazywać tylko niewielką część aktywności maksymalnej. W wypadku fundulus jest to około 10% aktywności maksymalnej [5], a w wypadku ryb siejowatych około 20% tej wartości [12]. W związku z tym każdy dalszy, nawet niewielki ubytek aktywności omawianego enzymu, np. w wyniku niekorzystnych zmian środowiskowych może wpłynąć na opóźnienie lub zahamowanie wyklucia zarodków ryb. Dlatego dla rozrodu ryb tak ważne jest zachowanie ekosystemów wodnych w jak najmniej naruszonym stanie, bowiem enzym wyklucia jest jednym z najważniejszych ogniw procesu reprodukcji ryb kostnoszkieletowych.

Uwagi końcowe

Yasumasu i in. [40, 41] badający molekularne podstawy wyklucia u rybki akwarijnej — ryżanki japońskiej (*Oryzias latipes*) uważają, że jej enzym wyklucia składa się z dwóch cynkoproteinaz, które określili jako HCE (ang. high choriolytic enzyme) i LCE (ang. low choriolytic enzyme). Oba są syntetyzowane w tych samych komórkach gruczołowych wyklucia i magazynowane w tych samych granulach sekrecyj-

nych [42]. Ci sami autorzy w rozszerzonym składzie [44] uzyskali cDNA dla HCE i LCE, określili ich sekwencję nukleotydową i odpowiadającą im sekwencję aminokwasową. cDNA dla LCE zawiera 813 par zasad otwartej ramki odczytu kodujących proenzym z 20-aminokwasową sekwencją sygnałową, 51-aminokwasowym propeptydem i 200-aminokwasowym dojrzałym enzymem. Dla HCE otrzymano dwa odmienne cDNA o zbliżonej w 92,8% sekwencji nukleotydów. Oba cDNA zawierają otwarte ramki odczytu kodujące preproenzymy zawierające odpowiednio 279 i 270 aminokwasów. Obie formy dojrzałego enzymu HCE zawierają 200 aminokwasów, a podobieństwo między nimi wynosi około 95,5%. Stwierdzono również obecność aminokwasowego motywu sekwencyjnego HExxH, który jest znanym składnikiem centrum aktywnego niektórych cynkoproteinaz.

Jak dotąd poza *Oryzias latipes* nie opisano enzymu wyklucia u pozostałych gatunków ryb kostnoszkieletowych czy innych zwierząt jako podwójnego kompleksu cynkoproteinaz.

Literatura

- [1] Chernyaev Z.A. 1993. Effect of light on embryogenesis of coregonid. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* 20(1): 49–57.
- [2] Denucé J. 1976. Some characteristics of a hatching enzyme produced by the marine teleost *Gobius jazo*. *Archs Int. Physiol. Biochim.* 84(5): 1067–1068.
- [3] DiMichele L., Taylor M.H. 1980. The environmental control of hatching in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* 216: 133–140.
- [4] DiMichele L., Powers D.A. 1984. The relationship between oxygen consumption rate and hatching in *Fundulus heteroclitus*. *Physiol. Zool.* 57(1): 46–51.
- [5] DiMichele L., Taylor M.H., Singleton R.Jr. 1981. The hatching enzyme of *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* 216: 133–140.
- [6] Gulidov M.V., Popova K.S. 1977. The influence of the elevated oxygen concentrations on the survival and hatching of bream (*Abramis brama* L.) embryos. *Vopr. Ichtiol.* 17: 188–191.
- [7] Hagenmaier H. E. 1974. The hatching process in fish embryos-IV. The enzymological properties of a highly purified enzyme (chorionase) from the hatching fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Com. Biochem. Physiol.* 49B: 313–324.
- [8] Hagenmaier H.E. 1974. The hatching process in fish embryos V. Characterization on the hatching protease (chorionase) from the perivitelline fluid of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich, as a metalloenzyme. *Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org.* 175: 157–162.
- [9] Hamazaki T.S., Iuchi I., Yamagami K. 1987. Isolation and partial characterization of a "spawning female-specific substance" in the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 242: 343–349.
- [10] Ishida J. 1985. Hatching enzyme: Past, present and future. *Zool. Sci.* 2: 1–10.
- [11] Iuchi I., Yamagami K. 1976. Major glikoproteins solubilized from the teleostean egg membrane by the action of the hatching enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 453: 240–249.
- [12] Luberda-Bieńkowska Z. 1995. Właściwości enzymu wyklucia zarodków ryb głąbielowatych (*Coregonidae*). *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst.* 42: 1–44.
- [13] Luberda Z., Strzeżek J. 1990. The influence of metal ions and some inhibitors on the proteinase isolated from the hatching liquid of *Coregonus peled*. *Acta Bioch. Pol.* 37(1): 197–200.

- [14] Luberda Z., Strzeżek J., Łuczyński M. 1992. The influence of chosen physico-chemical factors on proteolytic activity of the hatching liquid of *Coregonus albula* and *C. lavaretus*. *Acta Bioch. Pol.* 39(1): 59–64.
- [15] Luberda Z., Strzeżek J., Łuczyński M. 1993. Some proteolytic properties of hatching liquid in the sea trout, *Salmo trutta m. trutta* L. *Fish Physiol. Biochem.* 12(1): 75–80.
- [16] Luberda Z., Strzeżek J., Łuczyński M., Naesje T.F. 1994. Catalytic properties of hatching enzyme of several *Salmo* species. *Arch. Hydrobiol.* 131(4): 503–511.
- [17] Łuczyński M. 1987. Uwarunkowania termiczne wczesnego rozwoju osobniczego Coregoninae. *Acta Acad. Agricult. Tech. Olst.* 14: 1–56.
- [18] Łuczyński M., Strzeżek J., Brzuzan P. 1987. Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in Coregoninae (*Coregonus albula* L. and *C. lavaretus* L.) embryos. *Fish Physiol. Biochem.* 4(2): 57–62.
- [19] Miś J., Bigaj J., Bieniarz K., Epler P. 1996. Hatching glands of carp embryos from the eggs incubated at various concentration of zinc or copper. Fish Reproduction '96, 9–12 September 1996, Ceske Budejovice, Czech Republic.
- [20] Ohzu E., Kasuya H. 1979. Studies of the hatching enzyme of the fish. I. Isolation of the hatching enzyme of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Annot. Zool. Jap.* 52(20): 125–132.
- [21] Ohzu E., Yamaguchi M., Kusa M. 1983. Notes on the failure in the turbidimetry of choriolytic activity on the hatching enzyme in the rainbow trout eggs. *Annot. Zool. Jap.* 56: 73–77.
- [22] Oppen-Berntsen D.O. 1990. Oogenesis and hatching in teleostean fishes with special reference to eggshell proteins. PhD Thesis, Univ. of Bergen, Norway.
- [23] Oppen-Berntsen D.O., Helvik J.V., Walther B.T. 1990. The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Dev. Biol.* 137: 258–265.
- [24] Peterson R.H., Daye P.G., Metcalfe J.L. 1980. Inhibition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) hatching at low pH. *J. Fish. Res. J. Bd Can.* 37(5): 770–774.
- [25] Rong C.J., Walther B.T. 1994. Endoproteolytic hatching enzyme from Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos. Comm. of the Int. Mar. Biotechn. Conf. 1994, Tromsø-Norway: 127.
- [26] Runn P., Johansson N., Milbrink G. 1977. Some effects of low pH on the hatchability of eggs of perch, *Perca fluviatilis* L. *Zoon.* 5: 115–125.
- [27] Schoots A.F.M., De Bont R.G., Van Eys G.J.J.M., Denucé J.M. 1982. Evidence for a stimulating effect of prolactin on teleostean hatching enzyme secretion. *J. Exp. Zool.* 219: 129–132.
- [28] Schoots A.F.M., Denucé J.M. 1981. Purification and characterization of hatching enzyme of the pike (*Esox lucius*). *Int. J. Biochem.* 13: 591–602.
- [29] Schoots A.F.M., Evertse P.A.C.M., Denucé J.M. 1983. Ultrastructural changes in hatching gland cells of pike embryos (*Esox lucius*) and evidence for their degeneration by apoptosis. *Cell Tiss. Res.* 229: 573–589.
- [30] Schoots A.F.M., Meijer R.C., Denucé J.M. 1983. Dopaminergic regulation of hatching in fish embryos. *Dev. Biol.* 100: 59–63.
- [31] Schoots A.F.M., Opstelten R.J.G., Denucé J.M. 1982. Hatching in the pike *Esox lucius* L.: Evidence for a single hatching enzyme and its immunocytochemical localization in specialized hatching gland cells. *Dev. Biol.* 89: 49–56.
- [32] Schoots A.F.M., Stikkelbroeck J.J.M., Bekhuis J.F., Denucé J.M. 1982. Hatching in teleostean fishes: Fine structural changes in the envelope during enzymatic breakdown in vivo and in vitro. *J. Ultrastruct. Res.* 80: 185–196.
- [33] Scoot D., Poynter M. 1992. Upper temperature limits for trout in New Zealand and climate change. *Hydrobiologia* 222(2): 147–151.
- [34] Willemse M.T.M., Denucé J.M. 1973. Hatching gland in the teleosts, *Brachydanio rerio*, *Danio malabaricus*, *Moemkhausia oligolepis* and *Barbus schuberti*. *Dev. Growth Differ.* 15: 169–177.
- [35] Yamagami K. 1981. Mechanisms of hatching in fish: Secretion of hatching enzyme and enzymatic choriolysis. *Amer. Zool.* 21: 459–471.

- [36] Yamagami K. 1992. Studies on the hatching enzyme and its substrate, egg envelope of *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 9: 1131.
- [37] Yamamoto M. 1975. Hatching gland and hatching enzyme. In: Medaka (Killifish). Biology and Strains. Ed: Yamamoto T., Keigaku Publ. Co., Tokyo: 73–79.
- [38] Yamamoto M., Yamagami K. 1975. Electron microscopic studies on choriolysis by the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*. *Dev. Biol.* 43: 313–321.
- [39] Yamamoto M., Iuchi I., Yamagami K. 1979. Ultrastructural changes of the teleostean hatching gland cell during natural and electrically induced precocious secretion. *Dev. Biol.* 68: 162–174.
- [40] Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K. 1989. Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Biochem.* 105(2): 212–218.
- [41] Yasumasu S., Iuchi I., Yamagami K. 1989. Purification and partial characterization of high choriolytic enzyme (HCE) a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Bioch.* 105 (2): 204–211.
- [42] Yasumasu S., Katow S., Hamazaki T.S., Iuchi I., Yamagami K. 1992. Two constituent proteases of a teleostean hatching enzyme: Concurrent syntheses and packaging in the same secretory granules in discrete arrangement. *Dev. Biol.* 149: 349–356.
- [43] Yasumasu S., Katow S., Umino Y., Iuchi I., Yamagami K. 1989. A unique proteolytic action of HCE, a constituent protease of a fish hatching enzyme: Tight binding to its natural substrate egg envelope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 58–63.
- [44] Yasumasu S., Yamada K., Akasaka K., Mitsunaga K., Iuchi I., Shimada H., Yamagami K. 1992. Isolation of cDNAs for LCE and HCE, two constituent proteases of the hatching enzyme of *Oryzias latipes*, and concurrent expression of their mRNAs during development. *Dev. Biol.* 153: 250–258.

The hatching enzyme of fish

Summary

The hatching of embryo fish is a biochemical-mechanic process. In the final stage of embryogenesis the specialised hatching gland cells of the embryos secrete specific proteinase named a hatching enzyme or chorionase, which partially digests the multilayered egg envelope surrounding the embryo. The remaining parts of the envelope are ruptured by energetic movement of the embryo, which then emerges and starts an independent life.

Present paper reviews the recent literature on the properties of hatching enzyme of various species of teleost embryos. It also contains a review of literature on the influence of environmental factors on the secretion and activation of this enzyme.