

文章编号:1000-0615(2009)03-0417-07

日本囊对虾卵母细胞发育过程中 组织蛋白酶 C 比活性测定

邱高峰^{1,2}, 朱 琴¹, 蔡生力¹, 山野惠佑³

(1. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306;

2. 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学, 上海 201306;

3. 日本国立水产研究综合中心养殖研究所, 日本国 三重 南势町 516-0193)

摘要:组织蛋白酶 C 是一种溶酶样半胱氨酸蛋白酶, 近年报道了组织蛋白酶 C 的表达与日本囊对虾卵母细胞最后成熟阶段密切相关。对卵母细胞发育主要不同时相特别是卵母细胞最后生理成熟过程进行了连续观察, 测定了组织蛋白酶 C 在卵母细胞发育过程中的比活性。结果显示, 日本囊对虾卵母细胞发育可划分为 9 个时相, 即卵原细胞时相、核仁时相、周边核仁时相、初级卵黄发生时相、次级卵黄发生时相、皮质棒早期时相、皮质棒中期时相、皮质棒晚期时相、排卵期时相, 生发泡的破裂是在排卵之前就已经发生; 免疫印迹实验结果显示, 组织蛋白酶 C 蛋白只在卵母细胞最后成熟阶段即皮质棒发生时期表达, 但酶活性测定结果显示, 组织蛋白酶 C 比活力在皮质棒发生前后没有变化, 酶活性较低。以上数据提示组织蛋白酶 C 可能与受精时皮质棒的释放以及受精卵外胶膜的形成有关。

关键词:日本囊对虾; 卵母细胞发育; 组织蛋白酶 C

中图分类号:Q 55; S 917

文献标识码:A

动物卵母细胞的成熟包括两个主要阶段, 即卵黄发生和卵子的最后生理成熟(以生发泡破裂为标志)。卵母细胞在完成卵黄积累后, 只有达到最后的生理成熟, 才能正常排卵、受精, 由此可见最后生理成熟是卵母细胞成熟的关键所在。迄今许多学者分别对中国对虾 (*Penaeus chinensis*)^[1]、南美白对虾 (*P. vannamei*)^[2-3]、斑节对虾 (*P. monodon*)^[4-5]、哈氏仿对虾 (*Parapenaeopsis hardwickii*)^[6] 卵母细胞的发育过程进行了显微和亚显微观察, 但对对虾卵母细胞最后生理成熟这一重要环节较为忽视, 未见相关阐述, 大多数研究集中在卵黄的发生^[7-10], 对卵母细胞最后生理成熟机制的专门研究报道甚少^[11-12]。组织蛋白酶 C (cathepsin C) 是一种溶酶样半胱氨酸蛋白酶 (lysosomal cysteine protease), 属于木瓜蛋白酶族 (papain superfamily), 在哺乳类, 组织蛋白酶 C 的生理功能不仅限于细胞内蛋

白质的降解, 而且还与细胞生长、免疫有关^[13], 还可激活其它许多蛋白酶, 如 granzymes A and B, cathepsin G, neutrophil elastase and chymases^[14-15], 因此组织蛋白酶 C 被认为是一种主要的胞内加工酶^[16]。在硬骨鱼类, 木瓜蛋白酶族的其它成员如组织蛋白酶 B, D, L 被发现与卵母细胞中卵黄的发生有关^[17-18], 组织蛋白酶 L 在排卵过程中还起着瓦解滤泡层的重要作用^[19], 然而在任何动物未见组织蛋白酶 C 与卵母细胞最后成熟阶段相关的报道, 我们研究组首次获得了组织蛋白酶 C 与日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 卵母细胞最后成熟阶段密切相关的分子生物学证据^[20], 本研究对卵母细胞发育主要不同时相特别是卵母细胞最后生理成熟过程进行了连续观察, 在此基础上进一步测定了卵母细胞发育过程中组织蛋白酶 C 比活力变化, 同时对组织蛋白酶 C 的功能进行了探讨。

收稿日期: 2008-10-25 修回日期: 2008-12-31

资助项目: 国家自然科学基金 (30471348); 上海市教育委员会 E-研究院建设项目资助 (E03009); 上海市教育委员会重点学科建设项目 (J50701)

通讯作者: 邱高峰, E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集

在对虾繁殖季节,采集不同发育时期卵巢组织样品,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。组织学样品用 Bouin 氏固定液固定。

1.2 组织学切片与发育分期

固定的卵巢组织样品经过系列酒精梯度脱水、二甲苯透明,进行常规石蜡包埋、切片,苏木精、伊红对比染色,于显微镜下观察、拍照,卵巢时相分期主要根据 Yano 等^[10]的分类标准,并且根据皮质棒出现和生发泡破裂与否进一步细分。

1.3 蛋白质电泳与免疫印迹

冰冻保存的卵巢组织样品于 SDS Buffer (1 mmol/L PMSF)中匀浆后,稀释10倍,上样5%~20% SDS-PAGE 梯度胶,电泳结束后通过半干法电转印到 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜,转印膜经封闭液 (Roche) 处理,于室温与本实验室制备的日本囊对虾组织蛋白酶 C 抗体(一抗)结合, TBS (20 mmol/L Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween-20) 缓冲液洗膜后,与碱性磷酸酶标记的二抗 (Bio-Rad) 结合,以 NBT/BCIP (Roche) 作为底物进行发色。

1.4 酶比活力测定

参照 McGuire 等^[21]测定酶活性的方法,以 Gly-Phe- β -naphthylamide 为底物,测定不同发育时期的对虾卵巢组织中组织蛋白酶 C 的活性,每个发育期各测量5个个体,然后取平均值进行显著性差异统计学检验, $P < 0.05$ 为显著性差异。1个酶活力单位(U)定义为在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 每分钟水解底物释放 $1\text{ }\mu\text{mol}$ β -naphthylamine 所需要的酶量。在测定酶活性之前,用 Bradford 法对不同发育时期的对虾卵巢组织总蛋白进行定量,不同发育时期组织蛋白酶 C 的活性以 U/ μg 总蛋白表示。此外,不同 pH(3~8) 对组织蛋白酶 C 的活性的影响也同时进行测定,以便确定酶促反应最适 pH。

2 结果

2.1 日本囊对虾卵母细胞发育时相

周年采集不同发育时期的对虾卵巢组织样本,进行组织学切片,观察确认卵母细胞发育时相。

卵原细胞时相 (Oogonium phase) 细胞

小,直径 $7\sim 10\text{ }\mu\text{m}$,核大而圆,内含嗜碱性的染色质丝,细胞质稀少,进行有丝分裂的卵原细胞不见核膜,但含嗜碱性强的染色体(图版-1)。

核仁时相 (Plasmosome phase) 大小与卵原细胞期相差不大,但在核内含有一个被苏木精染色深的卵圆形核仁(图版-1)。

周边核仁时相 (Peripheral nucleolus phase) 为生长中的初级卵母细胞,与卵原细胞期相比,体积明显增大, $40\sim 90\text{ }\mu\text{m}$,核膨大为生发泡 (germinal vesicle),呈透明泡状,生发泡内至少含5个核仁,沿着核膜内面排列,细胞质嗜碱性强,被苏木精染成兰色,该时相后期的卵母细胞逐渐被单层的滤泡细胞包围(图版-2,3)。

初级卵黄发生时相 (Primary vitellogenesis phase) 卵母细胞体积增大到 $90\sim 150\text{ }\mu\text{m}$,圆形的生发泡位于细胞中央,在嗜碱性的细胞质中开始出现嗜酸性(红色)的卵黄蛋白和透明的油滴,但尚未见卵黄颗粒(图版-4)。

次级卵黄发生时相 (Secondary vitellogenesis phase) 卵母细胞体积剧增, $130\sim 250\text{ }\mu\text{m}$,细胞质中由于出现大量的卵黄颗粒而被伊红染成鲜红色,核膜开始皱缩,使得生发泡不再呈现为圆形(图版-5)。

皮质棒早期时相 (Early cortical rod phase) 在紧靠质膜下的卵质中,皮质棒出现,为泡状,实为皮质泡 (cortical vesicle),生发泡位于卵母细胞中央(图版-6)。

皮质棒中期时相 (Middle cortical rod phase) 皮质泡延伸变长形成皮质棒,生发泡仍然未破裂,位于卵母细胞中央(图版-7)。

皮质棒晚期时相 (Late cortical rod phase) 生发泡已经破裂,减数分裂纺锤体形成并且移到卵母细胞的周边,染色体排列在纺锤体的中央,标志卵母细胞达到生理性成熟,等待排卵,但该时期卵母细胞仍然被周围滤泡层所包被(图版-8)。

排卵期时相 (Ovulation phase) 生发泡已破裂的成熟卵母细胞周围的滤泡层溶解、消失(图版-9)。

2.2 组织蛋白酶 C 在日本囊对虾卵母细胞发育过程中的表达

粗提不同发育时期的对虾卵巢组织总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,电转移到 PVDF 膜上,用日本囊对虾组织蛋白酶 C 多克隆抗体进行免疫

印迹检测,如图 1 所示,只在早、中、晚皮质棒时相才检测到组织蛋白酶 C 蛋白的表达,而在皮质棒发生前的任何发育时期都没有信号。检测到组织蛋白酶 C 蛋白分子量大小为 51 ku,与预期的组织蛋白酶 C 的酶原蛋白分子量相符,但没有检测到成熟蛋白(成熟组织蛋白酶 C)。

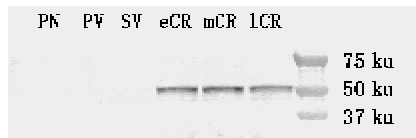


图 1 Western-blotting 示组织蛋白酶 C 蛋白在日本囊对虾卵巢不同发育时期的表达

PN: 周边核仁期; PV: 初级卵黄发生期; SV: 次级卵黄发生期; eCR: 皮质棒发生早期; mCR: 皮质棒发生中期; ICR: 皮质棒发生晚期,右侧为分子量标记

Fig. 1 The expression profile of *M. japonicus* cathepsin C protein was revealed by Western-blotting analysis in ovaries at various stages

PN: peripheral nucleolus phase; PV: primary vitellogenesis phase; SV: secondary vitellogenesis phase; eCR: early cortical rod; mCR: middle cortical rod; ICR: late cortical rod; Prestained markers are shown on the right side of the membrane, and their approximate molecular masses are indicated on the left margin

2.3 组织蛋白酶 C 在日本囊对虾卵母细胞发育过程中比活性测定

为了首先确定酶活力最适 pH,应用梯度 pH 系列,测定比活力变化,表明组织蛋白酶 C 最适 pH 为 5.2 (图 2),与哺乳动物组织蛋白酶 C 最适 pH(6.8~7.0)相比较小^[22],略偏酸,但与南美白对虾组织蛋白酶 L 最适 pH 相近^[23],在极端 pH(3,7,8)条件下组织蛋白酶 C 活性极低。

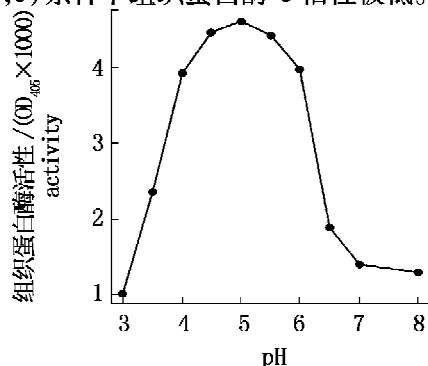


图 2 不同 pH 浓度梯度下的组织蛋白酶 C 活性
Fig. 2 Cathepsin C activity at various pH values

组织蛋白酶 C 在日本囊对虾卵母细胞发育过程中比活性测定结果如图 3 所示,组织蛋白酶 C 在卵巢不同发育时期包括卵母细胞最后成熟阶段的组织蛋白酶 C 比活性没有显著性差异($P > 0.05$)。

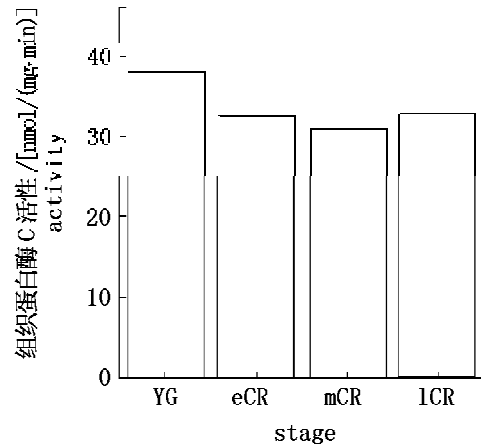


图 3 不同发育时期卵巢中组织蛋白酶 C 活性
YG: 卵黄发生时相; eCR: 皮质棒早期时相; mCR: 皮质棒中期时相; ICR: 皮质棒晚期时相

Fig. 3 Cathepsin C activity in the ovarian tissues at various phases

YG: secondary vitellogenesis phase; eCR: early cortical rod phase; mCR: middle cortical rod phase; ICR: late cortical rod phase

3 讨论

与大多数动物卵母细胞一样,对虾卵母细胞的成熟也遵循相似的发育模式^[12,23],经历了卵黄发生和卵子的最后生理成熟过程,但对虾卵母细胞的成熟还具有其特有的细胞学特征,卵母细胞在完成卵黄蓄积、体积长足后,进入最后生理成熟阶段,首先在卵母细胞中出现特有的标志性细胞学特征——皮质棒(cortical rod)^[24-25],然后核膜瓦解,形成减数分裂相包括纺锤体、染色体的形成等,最终停留在减数分裂中期 I,之后才能排卵、受精^[11],但日本学者 Yano 等^[10]报道日本囊对虾卵母细胞生发泡破裂是在排卵后陆续发生的,为了验证这一结果的正确性,本研究对皮质棒发生时期处于成熟阶段的卵巢进行连续切片观察,结果与之不符合,图版-8 清楚显示生发泡破裂形成纺锤体后的卵母细胞周围仍然存在滤泡细胞层(尚未排卵),说明生发泡的破裂是在排卵之前就已经发生,而且在卵巢中不同卵母细胞生发泡的破裂几乎是同步的,而不是 Yano 等^[10]所描述的

“陆续发生的”。为了排除由于中国与日本地理和野生环境差异可能导致对虾个体卵巢成熟过程变化,本研究还在日本三重县采集了日本囊对虾成熟卵巢样本,实验结果也与国内采集的一致。

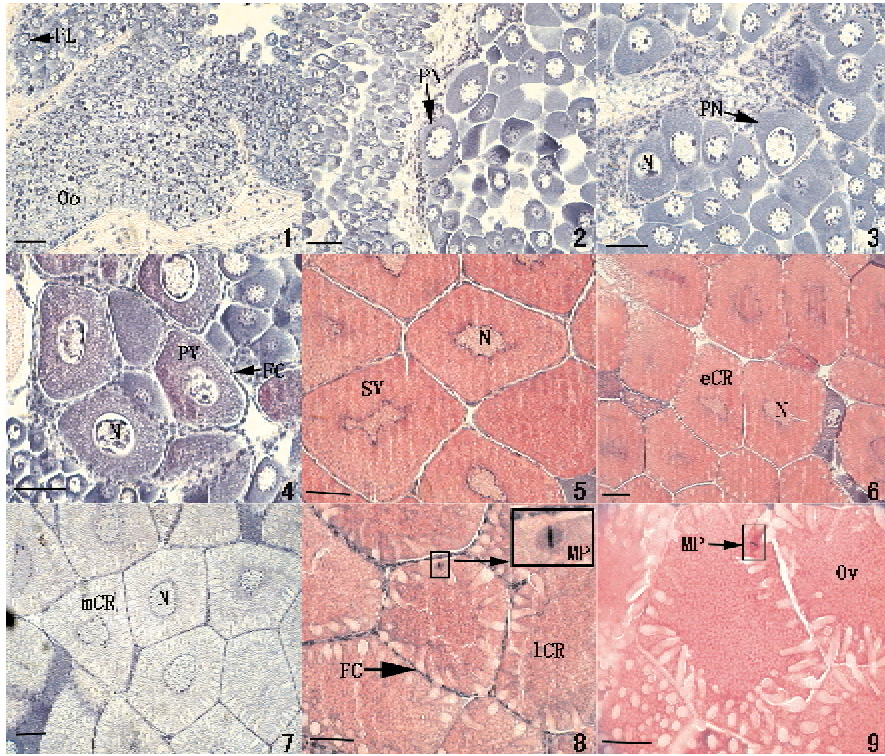
我们研究组之前发现组织蛋白酶 C 转录本的表达与卵母细胞的最后生理成熟阶段紧密相关^[20],Real-time 荧光定量 PCR 结果显示,组织蛋白酶 C 的 mRNA 水平在卵黄发生前期和卵黄发生期都很低,但有趣的是,一旦卵母细胞进入皮质棒发生早期,组织蛋白酶 C 的 mRNA 相对水平非常显著地骤增将近 10 倍,在生发泡破裂后皮质棒发生晚期,组织蛋白酶 C 的 mRNA 量又跌落回卵黄发生前期和卵黄发生期的最低水平。本研究在蛋白水平分析了组织蛋白酶 C 在日本囊对虾卵母细胞最后成熟过程中的时空表达,证明了组织蛋白酶 C 蛋白的表达只在卵母细胞成熟阶段,即皮质棒发生时期,与 mRNA 的表达高峰出现在皮质棒发生中期相对应,但 Western-blotting 只检测到组织蛋白酶 C 蛋白酶原(前体),而且免疫组织化学定位进一步显示组织蛋白酶 C 的酶原蛋白只储存在皮质棒中^[20],本研究酶活性测定结果也表明组织蛋白酶 C 比活力在成熟和未成熟的卵母细胞(即皮质棒发生前后)没有变化,酶活性很低,以上这些数据提示组织蛋白酶 C 与受精时皮质棒的释放以及受精卵外胶膜的形成有关,而与皮质棒的发生无关。对虾成熟卵子只要接触海水即使未与精子接触,皮质棒也会自动释放形成卵外胶膜^[23,26],皮质棒具有类似溶酶体的功能,皮质棒释放和卵胶膜的形成与皮质棒中的蛋白酶有关^[27-29],在受到海水刺激后,其中的蛋白溶解酶激活导致皮质棒释放。生化酶学研究表明,组织蛋白酶 C 只有在含足够浓度 Cl 离子(卤化物)时才能发挥活性^[30-31],海水中的卤化物足以激活组织蛋白酶 C,组织蛋白酶 C 可能在皮质棒释放过程中起着重要的调节功能或直接参与了这一过程。在将来的研究中,阐明这一过程将一定会十分有趣,同时也具有重要学术价值,因为皮质棒释放、卵胶膜形成对于保护随后的胚胎正常发育,免受来自外界干扰和损伤是极其重要的。

参考文献:

[1] 李怀梅,张乃禹. 中国对虾卵母细胞发育的初步研究[J]. 海洋与湖沼,1994, 25(3):243-247.

- [2] 颜素芬,姜永华. 南美白对虾卵巢结构及发育的组织学研究[J]. 海洋湖沼通报,2004,(2):52-57.
- [3] 姜永华,颜素芬,王重刚,等. 凡纳滨对虾卵子发生的超微结构[J]. 水产学报,2005,29(4):454-460.
- [4] Tan-Fermin J D, Pudadera R A. Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius [J]. Aquaculture, 1989, 77: 229-242.
- [5] 黄建华,周发林,马之明,等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察[J]. 热带海洋学报, 2006,25(3):47-52.
- [6] 郑忠明,李明云. 哈氏仿对虾卵巢发育的形态学与组织学观察[J]. 水产学报,2002,26(2):105-110.
- [7] 洪水根. 长毛对虾卵子发生的研究 II. 卵黄发生[J]. 海洋与湖沼,1992,23(3):280-284.
- [8] Chen Y N. Site of vitellogenin synthesis determined from a cDNA encoding a vitellogenin fragment in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. [J]. Mol Reprod Dev, 1999, 54 (3): 215-222.
- [9] Tsutsui N, Kawazoe I, Ohira T, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Zool Sci, 2000, 17(5): 651-660.
- [10] Yano I, Chinzei Y. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 86: 213-218.
- [11] Anderson S L, Chang E S, Clark W H Jr. Timing of postvitellogenic ovarian changes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* (Penaeidae) determined by ovarian biopsy [J]. Aquaculture, 1984, 42: 257-271.
- [12] Yano I. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Mar Biol, 1998, 99: 547-553.
- [13] Doughty M J, Gruenstein E I. Cell growth and substrate effects on characteristics of a lysosomal enzyme (cathepsin C) in Duchenne muscular dystrophy fibroblasts[J]. Biochem Cell Biol, 1987, 65(7): 617-625.
- [14] Pham C T N, Ley T J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 8627-8632.
- [15] Wolters P J, Raymond W W, Blount J L, et al.

- Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273, 15514 - 15520.
- [16] Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine protease: facts and opportunities [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (17): 4629 - 4633.
- [17] Sire M F, Babin P J, Vernier J M. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout [J]. *J Exp Zool*, 1994, 269: 69 - 83.
- [18] Carnevali O, Carletta R, Cambi A, *et al.* Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases [J]. *Biol Reprod*, 1999, 60: 140 - 146.
- [19] Robker R L, Russell D L, Espey L L, *et al.* Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (9): 4689 - 4694.
- [20] Qiu G F, Yamano K, Unuma T. Cathepsin C transcripts are differentially expressed in the final stages of oocyte maturation in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Comp Biochem Physiol (Part B)*, 2005, 140(2): 171 - 181.
- [21] McGuire M J, Lipsky P E, Thiele D L. Purification and characterization of dipeptidyl peptidase I from human spleen [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 295(2): 280 - 288.
- [22] Dolenc I, Turk B, Pungerc G, *et al.* Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270, 21626 - 21631.
- [23] Clark W H Jr, Lynn J W, Yudin A I, *et al.* Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus* [J]. *Biol Bull*, 1980, 158: 175 - 186.
- [24] Boulay D, Duterte-Boucher D, Leroux-Nicollet I, *et al.* Locomotor sensitization and decrease in [³H] mazindol binding to the dopamine transporter in the nucleus accumbens are delayed after chronic treatments by GBR 12783 or cocaine [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 1996, 278: 330 - 337.
- [25] Pillai M C, Clark W H Jr. Development of cortical vesicles in *Sicyona ingentis* ova: their heterogeneity and role in elaboration of the hatching envelope [J]. *Mol Reprod Dev*, 1990, 26: 78 - 89.
- [26] Clark W H Jr, Yudin A I, Lynn J W, *et al.* Jelly layer formation in penaeoidean shrimp eggs [J]. *Biol Bull*, 1990, 178: 295 - 299.
- [27] Clark W H Jr, Lynn J W. A Mg²⁺ dependent cortical reaction in the eggs of penaeid shrimp [J]. *J Exp Zool*, 1977, 200: 177 - 183.
- [28] Green J D, Glas P S, Lynn J W. Jelly release in shrimp eggs is suppressed by trypsin inhibitors [J]. *Am Zool*, 1990, 30: 39.
- [29] Lynn J W, Clark W H Jr. Physiological and biochemical investigations of the egg jelly release in *Penaeus aztecus* [J]. *Biol Bull*, 1987, 451 - 460.
- [30] McDonald J K, Zeitman B B, Reilly Y T J, *et al.* New observations on the substrate specificity of cathepsin C (Dipeptidyl aminopeptidase I) [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244: 2693 - 2709.
- [31] Karibayashi M, Yamada H, Ohonoi T, *et al.* Endopeptidase activity of cathepsin C, dipeptidyl aminopeptidase I from bovine spleen [J]. *Biochem (Tokyo)*, 1993, 113: 441 - 449.



图版

1. 卵原细胞时相(Oo);2. 核仁时相(PL);3. 周边核仁时相(PN);4. 初级卵黄发生时相(PV);5. 次级卵黄发生时相(SV);6. 皮质棒早期时相(eCR);7. 皮质棒中期时相(mCR);8. 皮质棒晚期时相(ICR);9. 排卵期时相(Ov)。

FC:滤泡细胞;MP:减数分裂中期I;N:细胞核

Plate

1. Oo, oogonium phase; 2. PL, plasmosome phase; 3. PN, peripheral nucleolus phase; 4. PV, primary vitellogenesis phase; 5. SV, secondary vitellogenesis phase; 6. eCR, early cortical rod phase; 7. mCR, middle cortical phase; 8. ICR, late cortical rod phase; 9. Ov, ovulation phase FC, follicle cells MP, meiotic metaphase I; N, nuclear; Bars indicate 50 μm

Enzymatic activity measurement of cathepsin C during the oogenesis of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*

QIU Gao-feng^{1,2}, ZHU Qin¹, CAI Sheng-li¹, KEISUKE Yamano³

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Research Institute of Aquaculture, Aquaculture, Fisheries Research Agency, Nansei, Mie 516-0193, Japan)

Abstract: Cathepsin C is a member of the papain superfamily of lysosomal cysteine protease. Our previous studies showed that the expression of cathepsin C was involved in the final stages of oocyte maturation of the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). In this study, the developmental process of the prawn oocytes was examined with light microscope and the cathepsin C activity was measured during oogenesis and final oocyte maturation. The prawn oocyte development was classified into 9 phases, which include (1) oogonium phase, (2) plasmosome phase, (3) peripheral nucleolus phase, (4) primary vitellogenesis phase, (5) secondary vitellogenesis phase, (6) early cortical rod phase, (7) middle cortical rod phase, (8) late cortical rod phase, and 9) ovulation phase. The germinal vesicle breakdown occurred before ovulation. Immunological blot analysis showed that cathepsin C protein was expressed exclusively at the cortical rod stages in final oocyte maturation. However, the cathepsin C activity was low and there was no significant difference at cortical rod stages as compared with non-cortical rod stages, suggesting that cathepsin C might have a crucial role in regulating CR release and/or formation of a jelly layer during fertilization.

Key words: *Marsupenaeus japonicus*; oocyte development; cathepsin C