

ニワトリの排卵周期中における血漿と卵黄膜内層中のビテロゲニン (VTG) レベル

武石 勝¹・小池達大^{2,*}・西田沙世²・山村奈美子²・石川信幸¹・
後藤尚也¹・渋井仁志¹・土井 守³・上吉道治²

¹ 日本配合飼料株式会社中央研究所飼料畜産開発センター, 栃木県芳賀郡茂木町 321-3621

² 岐阜大学農学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

³ 岐阜大学応用生物科学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

* 故人

ニワトリにおける卵胞の発育は、卵黄前駆物質として肝臓で合成されるビテロゲニン (VTG) などが卵細胞に取り込まれることによって起こることが知られている。しかしながら、卵胞発育に伴う VTG の取り込みの様相については未だ十分には知られていない。

そこで本実験では、約 1 日のニワトリの排卵周期中において 3 時間毎に、卵胞重量と共に、血漿中の VTG と VTG が卵細胞に取り込まれる際に必ず通過する卵細胞のすぐ外側の組織である卵黄膜内層中の VTG を測定することにより、卵胞発育と関連して、卵胞への VTG の取り込みの様相を知ろうとした。

使用したニワトリは、50 週齢の白色レグホーン種産卵鶏で、14 時間照明の下で、水と餌は自由に摂取させた。これらのニワトリから、排卵周期の 3 時間毎に、血液と共に、最大卵胞 (F1)、3 番目 (F3) と 5 番目に大きな卵胞 (F5) を採取した。卵胞は重量を測定した後、卵黄膜内層を単離し、血漿と共に、SDS-PAGE と VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット法に供し、得られた VTG 特異的なバンドを画像解析プログラム (NIH-Image ver. 1.60) で数値化した。

卵胞重量は、いずれの卵胞においても、F1 の排卵 19-20 時間前から 10-11 時間前に相当する時期にかけて順次増加し、その後はほぼ同じレベルで推移した。血漿 VTG レベルは、排卵周期中においてほぼ一定の値で推移した。これに対して卵黄膜内層の VTG レベルは、いずれの卵胞においても F1 の排卵 22-23 時間前から順次増加し、F1 では排卵 13-14 時間前に、F3 と F5 では F1 の排卵 16-17 時間前に相当する時期において最も高いレベルを示した後、急激に減少し、その後は低いレベルで推移した。これらのことから、卵胞重量の増加に先立ち、卵黄膜内層中の VTG が増加することが示され、排卵周期中における VTG の卵胞への取り込みの様相が明らかとなった。

キーワード: ビテロゲニン, 卵黄膜内層, 排卵周期, ニワトリ

緒 言

ニワトリの卵胞発育において、卵黄前駆物質として知られるビテロゲニン (VTG) は、卵胞の卵胞膜外層細胞で生産されるエストロゲン (Caicedo *et al.*, 1997) の刺激によって肝臓で合成が促進される (Deeley *et al.*, 1975)。肝臓での合成後に血中に放出された VTG は、血流を介して卵胞に到達し、卵胞内組織を経て、卵細胞膜表面のリポ蛋白質レセプター遺伝子ファミリーに属する多機能なレセプターを介したエンドサイトーシスにより、他の体細胞では前例がないほど効率的に卵細胞に取り込まれる (Barber *et al.*, 1991; Bujo *et al.*, 1997)。このように卵胞の発育に卵胞自身が直接関与していることは知られているが、最近、卵細胞以外に顆粒層細胞 (Schuster *et al.*, 2004) や卵胞膜外層細胞 (Hum-

mel *et al.*, 2004) によっても卵胞の発育が調整されている可能性が報告された。しかしながら、卵胞内に拡散した卵黄前駆物質が卵細胞膜表面に到達するまでの移行の様相について未だ十分には明らかにされていない。

肝臓から血流を介して卵胞に到達したビテロゲニンが卵細胞内に取り込まれるまでの経路については、主に解剖学的な知見を中心に以下のように考えられている。排卵前の卵胞は、卵細胞を中心にして、外側から上皮、結合性外膜、外層と内層から成り立つ卵胞膜、基底膜、顆粒膜、卵胞膜内層で構成される。このような構造の卵胞において、卵巣門から卵巣内に侵入した動脈は、最終的には卵胞茎を経由して基底膜に向かって分枝して細動脈に分かれ、基底膜に接触して毛細管血管網を形成し、それよりも内側には血管分布は認められない (Gilbert, 1971)。毛細管血管網を形成する毛細管には小孔が存在し、血管外の組織にも赤血球の存在が認められ (Perry *et al.*, 1978a)、さらに直径 20-30 nm の脂質蛋白質と思われる粒子が基底膜や卵黄膜内層に多数存在する (Wyburn *et al.*, 1965; Wyburn *et al.*, 1966; Ito *et al.*, 2003)。また、顆粒膜を構成する顆粒層細胞には明らかな細胞間隙が存在し、この細胞間隙にも脂質蛋白質の粒子が認められており

2007 年 9 月 12 日受付, 2007 年 11 月 15 日受理

連絡者: 武石 勝

〒321-3621 栃木県芳賀郡茂木町大字天子 451

Tel: 0285-63-1121

Fax: 0285-63-1120

E-mail: masaru.takeishi@nippai.co.jp

(Wyburn *et al.*, 1965; Wyburn *et al.*, 1966; Perry and Gilbert, 1979), さらに卵細胞の細胞膜表面には被膜に被われた直径 250–350 nm の多数の小孔が見出されている (Perry *et al.*, 1978b; Perry and Gilbert, 1979)。これらのことから、肝臓から血流によって卵胞に運ばれた卵黄前駆物質は、卵胞膜内層で毛細血管の小孔から卵胞組織内に拡散し、基底膜の結合組織間、顆粒膜の細胞間隙、卵黄膜内層を通過して卵細胞膜に到達すると考えられている。

このように、毛細血管から放出された卵黄前駆物質が卵細胞膜に到達するまでには多くの組織を通過する。これらの組織の中でも顆粒層細胞によって構成される顆粒膜は構造的な変化が著しく、鳥類では未成熟な卵胞では多層構造を示し、成熟するに従って単層化する (Perry *et al.*, 1978b)。しかし、卵胞内における卵胞単位表面積当たりの卵黄前駆物質の移動率は卵胞が成熟するに従って低くなる (Smith, 1959; Warren and Conrad, 1939)。これらのことは卵黄前駆物質の顆粒膜の細胞間隙における移動が細胞層の構築状態のみに依存していないことを示唆しているが、卵黄前駆物質の取り込みとの関連は明確ではない。卵黄前駆物質の取り込みは、卵細胞膜のエンドサイトーシスによる調節機構 (Perry *et al.*, 1978b; Perry and Gilbert, 1979) が知られているものの、排卵周期中におけるエンドサイトーシスの動態についての報告は少なく、卵細胞膜における超低密度リポタンパク (VLDL) の結合量が排卵 0–2 時間前よりも排卵 14–16 時間前の方が高いこと (Baba *et al.*, 2002) が報告されているに過ぎない。

そこで本実験では、卵胞重量を測定すると共に、卵黄前駆物質の中でも VTG に注目し、排卵周期中の血漿中の VTG と、卵細胞に取り込まれる VTG が必ず通過する卵細胞のすぐ外側の繊維性の膜である卵黄膜内層中の VTG を測定することにより、卵細胞におけるエンドサイトーシス以外による卵黄前駆物質の取り込み調節機構の可能性を検討した。

材料と方法

供試鶏

本実験に使用したニワトリは白色レグホーン種の雌鶏 (50 週齢のハイラインマリア) である。ニワトリは岐阜大学農学部附属農場無窓鶏舎内で点灯開始を 5 時とする 14 時間照明: 10 時間暗黒の明暗周期のもと、飼料と水を自由に摂取させて飼育した。これらのニワトリの産卵記録を 4 週間以上記録し、1 クラッチの長さが 4 から 7 で、比較的規則正しくクラッチを繰り返す、クラッチ間の休産日が 1 日である個体を供試した。

試料の採取

クラッチ第 2 卵の排卵推定時刻直前のいろいろな時間にニワトリを屠殺して排卵の有無を確認した予備実験の結果から、本実験飼育条件下でクラッチ第 2 卵の排卵は午前 8 時前後に起こることを確認した。そこで、午前 8 時を排卵 0 時間とし、クラッチ第 2 卵排卵における 1 周期中において 3 時間毎に 1 時期に 7 から 10 羽ずつ供試し、血液と卵胞を採取した。血液は予めヘパリンで湿らせた注射筒で翼下静脈より採取し、遠心分離 (3,000×g, 10 min, 4°C) 後に血漿を得た。卵胞は、断頭屠殺後直ちに開腹して最大卵胞 (F1), 3 番目に大きな卵胞 (F3), 5 番目に大きな卵胞 (F5)

を採取した。重量測定後、速やかに Gilbert ら (1977) の方法により卵黄膜内層を含む卵胞組織を分離し、それを Kuroki と Mori (1997) の方法に従って蒸留水で処理することにより、顆粒膜を形成する顆粒層細胞を破壊し、基底膜と卵黄膜内層とに分離した後、卵黄膜内層に比べて淡い白色であり、脆い基底膜を取り除くことにより卵胞膜内層を採取した。卵黄膜内層は組織の湿重量を測定し、湿重量の 4 倍量の 0.1 M トリス-0.25 M スクロースバッファー (pH 7.4) を加えて超音波破砕機 (PowerSonic Model 50; ヤマト科学株式会社) でホモジェナイズした後、液体窒素下 (-196°C) で急速凍結し、電気泳動まで -80°C で保存した。

卵黄膜内層の単離方法に関する予備実験

本実験では卵胞膜内層の単離に関して、以下の 2 点を確認する予備的な実験を行った。

まず、Gilbert ら (1977) の方法により採取した卵黄膜内層を含む卵胞組織を蒸留水処理することにより卵黄膜内層の単離が可能かどうかを確認するために、採取した F1, F3, F5 の卵胞組織を、それぞれ眼科ハサミで 2 つに切り分け、一方は Kuroki と Mori (1997) の方法に従って蒸留水処理を実施し、残りは蒸留水処理の代わりに生理的食塩水で洗浄した。これら処理の異なる 2 つの組織をブアン固定液で固定し、パラフィン切片の作成とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を常法に従って行い、光学顕微鏡下で 1000 倍の拡大倍率にて観察した。

次に蒸留水処理の際に、卵黄膜内層に含まれる VTG が溶け出す可能性があるか否かを確認するために、単離に用いた蒸留水を後述する VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット解析に供した。この際の比較サンプルは、無処理の産卵鶏の血漿、エストラジオール 17β (E2) を体重 1 kg あたり 1 mg 投与して 6 時間後に採取した血漿、F1, F3, F5 の各卵胞から採取した卵黄膜内層のホモジェネートとした。

VTG の測定

血漿および卵黄膜内層中の VTG は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) とウサギ抗ニワトリ VTG 抗血清 (Sekimoto *et al.*, 1990) を用いたウェスタンブロット法により測定した。血漿は 0.1 M トリス-0.25 M スクロースバッファー (pH 7.4) で 50 倍希釈したものに Laemmli (1970) のサンプルバッファーの 2 倍濃縮液 (125 mM トリス塩酸 pH 6.8, 4% SDS, 20% グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.02% プロモフェノールブルー) を等量加えて最終的に 100 倍希釈とした。卵黄膜内層をホモジェナイズした懸濁液は Lowry 法で総蛋白質濃度を測定し、0.1 M トリス-0.25 M スクロースバッファー (pH 7.4) で総蛋白質を 20 mg/ml に調製したものに Laemmli (1970) のサンプルバッファーの 2 倍濃縮液を等量加えて最終的に総蛋白質を 10 mg/ml とした。調製したサンプル溶液は沸騰水中に 3 分間入れて変性させた。SDS-PAGE は 7.5% の分離ゲルを用い、サンプルは泳動ゲル 1 レーンあたり 10 μl 添加し、卵黄膜内層については 1 レーンあたりの総蛋白質は 0.1 mg とした。SDS-PAGE で分子量マーカー (High-range; Bio-Rad) とともに分離した蛋白質は、PVDF 膜 (Immobilon; Millipore) に転写し、5% のスキムミルクを含む TBS-T (0.1% Tween 20-20 mM トリス-137 mM NaCl, pH 7.6) でブロッキングした後、5% スキ

ムミルクを含む TBS-T で 10 万倍に希釈した VTG 抗血清に 4℃ で一晚培養した。その後、PVDF 膜は TBS-T で 3 回洗浄し、TBS-T で 10 万倍に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Life Technologies) に室温で 1 時間培養した。最後に PVDF 膜はアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを用いた発色反応 (Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Assay Kit ; Bio-Rad) で分子量約 240 kDa の VTG 抗血清反応物質のバンドを検出した。このようにして検出したバンドは、イメージキャナーで画像データとして保存し、マッキントッシュの画像解析プログラム (NIH-Image v. 1.60) の Gel Plotting Macros の機能を用いて数値化した。血漿 VTG レベルは、排卵 19-20 時間前における一個体の測定値を、また卵黄膜内層 VTG レベルは同じ個体の F1 から採取した卵黄膜内層の測定値を、それぞれ 100 として比較した相対値 (%) として表した。また、泳動ゲル間の誤差は、全てのゲルに同一のサンプル (1 羽の産卵鶏の F1 から採取した卵黄膜内層のホモジネート) を泳動して得られた測定値によって補正した。

統計処理

データの統計処理は一元配置の分散分析後、平均値間の有意差の検定は Duncans new multiple range test で危険率が 5% 以下になった場合に有意な差があるものとした。

結 果

約 1 日の周期であるニワトリの排卵周期中において 3 時間毎に測定した卵胞重量の測定結果を図 1 に示した。卵胞重量は、F1, F3 および F5 のいずれの卵胞においても、F1 の排卵 19-20 時間前から排卵 10-11 時間前に相当する時期にかけて順次増加し、その後はほぼ同じレベルで推移した。

卵黄膜内層の単離方法に関する予備実験で、蒸留水処理により卵黄膜内層が単離可能かどうかを確認した結果を図 2 に示した。Kuroki と Mori (1997) の方法で蒸留水で処理することにより顆粒層細胞は破壊され、単離した卵黄膜内層の HE 染色像には、F1, F3 および F5 の全てにおいて、光学顕微鏡下では卵黄などの付着は認められなかった。尚、図 2 の C に示した Gilbert ら (1977) の方法で採取した F3 の卵胞組織の写真には、A (F1) や E (F5) とは異なり、基底膜が欠落し、卵黄膜内層と顆粒膜のみとなっている。これは、Gilbert ら (1977) の方法で採取した卵胞組織は非常に薄い膜であり、パラフィン切片を卵白グリセリンを用いてスライドガラスに接着後に HE 染色を実施の際に、スライドガラスから基底膜だけが剥がれ落ちてしまったためである。

血漿および卵黄膜内層の VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット解析の写真を図 3 に示した。血漿および卵黄膜内層の両方において分子量が約 240 kDa の VTG 抗血清反応物質が検出され、血漿中における量は E2 投与により増加した。また先に示した通り、本実験における卵黄膜内層の採取方法は、卵胞から単離した顆粒膜層を蒸留水で処理することによって顆粒膜細胞を破壊し、基底膜と卵黄膜内層を分離したが、この過程で卵黄膜内層に含まれる VTG が溶け出す可能性が考えられた。そこで卵黄膜内層の分離に用いた蒸留水について、VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット解析を実施したところ、VTG 抗血清反応物質は検

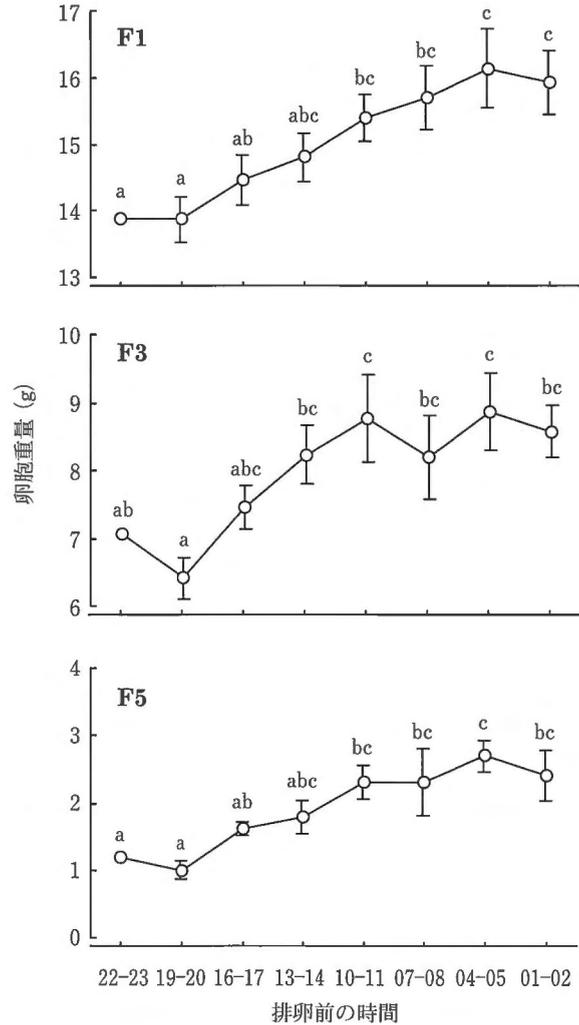


図 1. 排卵周期中における最大卵胞 (F1), 三番目に大きな卵胞 (F3) および五番目に大きな卵胞 (F5) の重量。各点は 7-10 羽の平均値 ± 標準誤差。異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり。

出されなかった。これらの結果から、本実験の方法により、卵黄膜内層を単離可能で、しかも VTG の溶出はほとんど認められず、この方法で測定した卵黄膜内層中の VTG レベルはニワトリ体内での状態を反映していると考えられた。

排卵周期中における血漿中の VTG レベルの測定結果を図 4 に示した。血漿 VTG レベルは、測定した各時間の間において有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。

F1, F3 および F5 の卵胞において、卵黄膜内層中の VTG レベルを測定した結果は、一定蛋白質あたりの VTG レベルの相対値として図 5 に示した。卵黄膜内層の VTG レベルは、いずれの卵胞においても、F1 の排卵 22-23 時間前から順次増加し、F1 では排卵 13-14 時間前に、F3 と F5 においては F1 の排卵 16-17 時間前に相当する時期に最も高いレベルを示した後、F1 の排卵 10-11 時間前に相当する時期にかけて急激に減少し、その後は低いレベルで推移した。

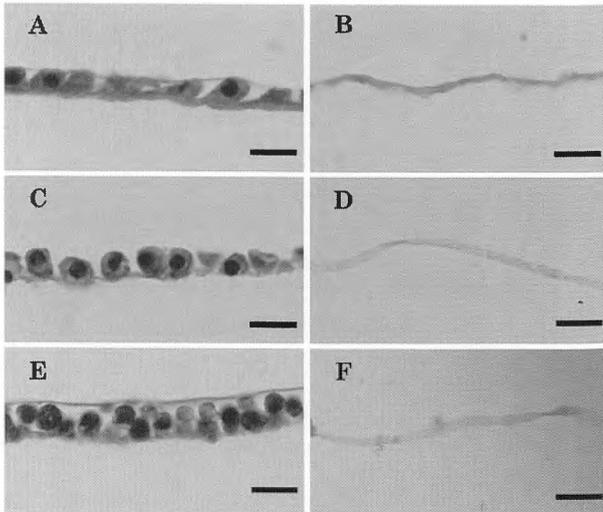


図 2. 排卵周期中における最大卵胞 (F1)、三番目に大きな卵胞 (F3) および五番目に大きな卵胞 (F5) の組織像

Gilbert ら (1977) の方法で採取した基底膜、顆粒膜および卵黄膜内層を含む卵胞組織 (A, C, E) と、Kuroki と Mori (1997) の方法に従って採取した卵黄膜内層 (B, D, F) のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色像。A と B は F1, C と D は F3, E と F は F5 の組織を示している。尚, C に示した F3 の卵胞組織の写真には, A (F1) や E (F5) とは異なり, 基底膜が欠落し, 卵黄膜内層と顆粒膜の 2 層のみとなっている。これは, Gilbert ら (1977) の方法で採取した卵胞組織は非常に薄い膜であり, パラフィン切片をスライドガラスに接着後に HE 染色を実施の際に, スライドガラスから基底膜だけが剥がれ落ちてしまったためである。写真の撮影倍率は 1000 倍であり, 各写真中のスケールバーは 10 μ m である。

考 察

本実験では, 排卵周期中において, 卵胞重量は F1 の排卵 19-20 時間前から排卵 10-11 時間前にかけて順次増加し, その後の時期においては有意な増加は認められなかった。この卵胞重量の増加が認められた時期は, 排卵周期中に F1 と F2 について, 卵胞重量を測定した山村ら (2001) の結果と一致し, また, 放射性³²P の卵黄内への取り込みを排卵周期中で検討した Kamiyoshi ら (1977) の結果とも相応している。これらのことから, 約 1 日の周期であるニワトリの排卵周期中においてはこの時間帯に卵黄前駆物質が取り込まれて卵胞発育が促されていると考えられる。

卵黄膜内層の単離方法についての予備実験において, Gilbert ら (1977) の方法により分離した組織を Kuroki と Mori (1997) の方法に従って蒸留水処理することにより, F1, F3 および F5 の全てにおいて, 顆粒層細胞が完全に破壊されて, 光学顕微鏡下による観察では卵黄膜内層しか確認できなかった。光学顕微鏡では卵細胞膜の観察は困難であり, 卵黄膜内層に卵細胞膜が付着しているか否かについては確認できなかったため, 厳密には卵黄膜内

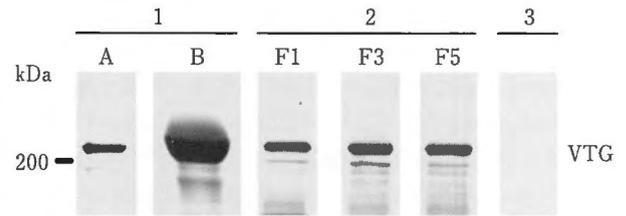


図 3. ビテロゲン抗血清を用いたウェスタンブロット解析写真

1: 血漿 (100 倍希釈, A: 無処理の産卵鶏, B: エストラジオール 17 β (E2) を体重 1 kg あたり 1 mg 投与した産卵鶏), 2: 卵黄膜内層のホモジェネート (総蛋白質 0.1 mg/レーン, F1: 最大卵胞, F3: 三番目に大きな卵胞, F5: 五番目に大きな卵胞), 3: 卵黄膜内層を単離する際に用いた蒸留水 (原液を使用し, 液中の総蛋白質含量は調整していない)。SDS-PAGE は 7.5% の分離ゲルを用いて実施し, PVDF 膜に転写後に 10 万倍に希釈したビテロゲン (VTG) 抗血清を反応させ, 材料と方法に記した方法で VTG 抗血清反応物質を検出した。分子量マーカーの泳動位置は左側に示した。

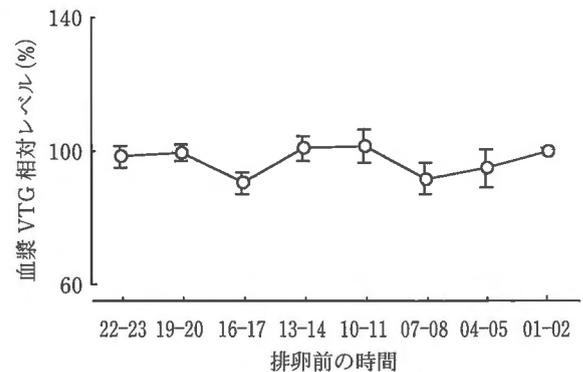


図 4. 排卵周期中における血漿中ビテロゲンレベル
各点は 7-10 羽の平均値±標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

層のみを単離したとは言い切れないかも知れない。しかし, 卵黄膜内層に卵黄球の付着や顆粒層細胞の残留は認められなかったため, 本実験で測定した卵黄膜内層中の VTG レベルには, 卵黄の内容物の洗い残しなどに由来する VTG が測定される確率は低く, 卵胞への VTG 取り込み状況を十分に観察できていると判断した。

VTG 測定の予備実験において, 検体中の蛋白質を SDS-PAGE で分離した後, VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット法により VTG を検出したところ, 血漿と卵黄膜内層の両方で分子量 240 kDa の VTG 抗血清反応物質が検出された。ニワトリの血中における VTG は 450-500 kDa であり, 240 kDa のサブユニットからなる 2 量体で存在するが (Deeley *et al.*, 1975), 電気泳動に供すると 240 kDa の VTG 単量体に分かれることが知られている (Deeley *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 1983)。それ故に, 本研究で検

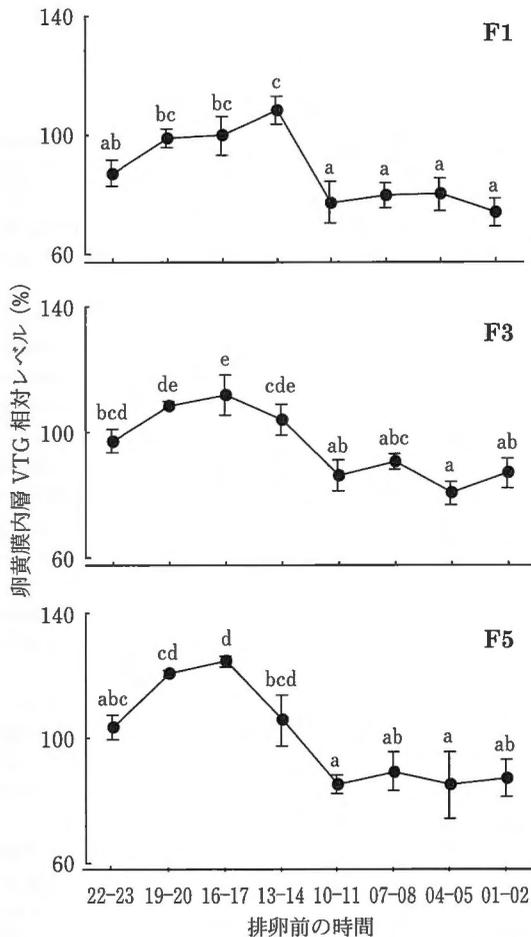


図 5. 排卵周期中における最大卵胞 (F1), 三番目に大きな卵胞 (F3) および五番目に大きな卵胞 (F5) の卵黄膜内層中ピテロゲンレベル
各点は 7-10 羽の平均値土標準誤差
異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり

出された約 240kDa の VTG 抗血清反応物質は、2 量体からなる VTG の単量体部分であると考えられる。この VTG 抗血清反応物質の検出量と試料の希釈との間で相関関係が認められ、さらに肝臓で VTG 合成を促すことが知られているエストラジオール-17 β (E2) を体重 1kg あたり 1mg 投与した 6 時間後に血漿中の検出量が増加したこと (図 3) から、本実験で使用した SDS-PAGE と VTG 抗血清を用いたウェスタンブロット法によりニワトリの血漿と卵黄膜内層における VTG レベルを半定量的に測定できることが示された。

本実験では排卵周期中において、血中 VTG レベルはほぼ一定のレベルで維持されていた。排卵周期中の血中 VTG レベルの変動はこれまでに報告された例は見当たらないが、肝臓からの VTG 放出は E2 の刺激を受けた直後の 15-20 分で起こり (Clemens, 1974), VTG の mRNA 合成は 3 日後まで持続する (Wiskocil *et al.*, 1980; Deeley *et al.*, 1977) ことから、血中 E2 レベルの高い排卵周期中のニワトリの肝臓では常に VTG の合成と放出が起こり、血中 VTG は高いレベルで一定に維持されている

のではないかと考えられる。

すでに述べたように、卵黄膜内層に到着した卵黄前駆物質は卵細胞膜の表面でエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが知られているが、最近、卵細胞膜に到達する以前の経路において卵黄前駆物質の移動を調節する仕組みが存在する可能性が示唆されている。

卵胞膜内層に散在する毛細管血管網から拡散した VTG などの卵黄前駆物質は基底膜の間隙を透過した後、顆粒膜の細胞間隙を通過して卵細胞の外側の卵黄膜内層に到達する。卵黄膜内層は複雑な構造を持たない非細胞性の繊維で構成され、さまざまな蛋白質を自由に通過させる (Jordanov *et al.*, 1966) ことから、卵黄前駆物質の取り込みには積極的に関与している可能性は少ないと考えられている (森, 1993)。Hummel ら (2004) は、ニワトリの卵胞の成長に関して、細胞外マトリックスとしてのパールカン (perlecan) 蛋白が卵胞膜外層細胞で生産され、卵胞膜外層に局在的に存在することを見出し、しかもこのタンパクが卵黄成分として知られる低密度リポタンパク (LDL) や VLDL と結合可能なことから、パールカンが卵胞へのリポ蛋白の取り込みに関与している可能性を示唆している。しかし、この報告では、パールカンの存在は卵黄前駆物質の卵細胞への移動経路となる基底膜、顆粒層と卵胞膜内層においては認められていない。

また、Schuster ら (2004) は、顆粒層細胞の表層に、細胞間の密着結合 (Tight junction) に関与する蛋白質であるオクルディン (Occludin) が存在し、その量は、急速発育相に入った黄色卵胞よりもまだ急速な卵胞発育が認められない白色卵胞においての方が多く存在し、しかも顆粒層細胞を *in vitro* で培養した実験において卵胞発育の主な調節因子と考えられている卵胞刺激ホルモン (FSH) とアクチビン A (activin A) とにより増加することを見出した。これらのことから、彼らは、卵胞が成長するに伴い顆粒層細胞における FSH とアクチビン A に対する反応性が低下することによりオクルディン量が減少して密着結合が弱まり、結果として卵黄成分の移行能力が高まって卵胞が急速成長するようになるのではないかと推察している。すなわち、FSH が卵胞発育に関与するとしても、その作用が弱まることで卵胞の発育を促進すると推察している。

一方、粗製ニワトリ FSH 剤や FSH 用作用を示すことが知られている妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を投与すると卵細胞への卵胞前駆物質の取り込みが増加する (Imai, 1973; Mitchell, 1970) ことから、ほ乳類と同様に鳥類においても、FSH は卵胞発育を刺激するとも考えられている。本実験において、卵黄膜内層における VTG レベルが増加することが見出された時期は、本実験と同じ飼育条件で飼育したニワトリにおいて、排卵周期中の血中 FSH レベルを測定した山村ら (2001) の報告における血中 FSH レベルの高い時期と相応し、また、Scanes ら (1977) によって報告された排卵周期中において卵胞の FSH 結合能の高い時期とも相応している。さらに、Yamamura ら (2001) により、顆粒層細胞における FSH 受容体 mRNA レベルが排卵周期中に測定されているが、そのレベルは本研究で卵黄膜内層の VTG レベルが低く維持された時期に減少しており、この時期には FSH の顆粒層細胞に対する作用は低下していることを示唆している。これ

らのことから、本実験で卵胞重量の増加に先立ち見出された卵黄膜内層 VTG レベルの増加は FSH の刺激により促されていると推察される。

ニワトリの顆粒層細胞には FSH 受容体 mRNA の存在が報告されている (Yamamura *et al.*, 2001) ことから、FSH が顆粒層細胞に作用することは明らかであるが、この顆粒層細胞には、不活性化酵素のプラスミノゲン (plasminogen) を繊維素分解酵素であるプラズミン (plasmin) に変換するプラズミノゲン・アクチベーター (plasminogen activator: PA) が存在する (Tilly and Johnson, 1987) ことが知られ、PA が顆粒層細胞層の再構築に関与すると考えられている (Politis *et al.*, 1990)。我々が知る限りニワトリにおける報告は見当たらないが、ほ乳類の顆粒層細胞においては PA 活性が FSH により刺激されることが報告されている (Martinat and Combarnous, 1983)。これらのことから、ニワトリにおいても、FSH の刺激により PA 活性が高まり、繊維素を分解するプラズミンが生成されることによって、顆粒層細胞間隙が疎となり、結果として卵黄膜内層への VTG の移行が促進されるのではないかと推察される。

以上述べてきたように、本実験では、排卵周期中において採取した F1, F2, F3 の全ての卵胞において、卵胞重量の増加に先立ち卵黄膜内層 VTG レベルが増加し、卵胞重量の増加がほとんど認められなくなった F1 の排卵 10 時間前頃から排卵時までの時期には卵胞膜内層 TVG は低いレベルで推移することが明らかとなった。この卵黄膜内層 VTG レベルの増加が認められた時期には卵胞刺激ホルモンとして知られる FSH の血中レベルが高く、しかも卵胞の FSH 結合能が高く、また卵黄膜内層 VTG レベルが低く維持された時期には顆粒膜細胞における FSH 受容体 mRNA レベルが減少すると報告されている。さらに、顆粒膜細胞には細胞層の再構築に関与することが知られているプラズミノゲン・アクチベーターが存在し、しかもこの活性がほ乳類では FSH により刺激されることから、卵細胞への卵黄前駆物質の取り込みが顆粒層細胞におけるプラズミン・プラズミノゲンアクチベーター系を介した機構によっても調節されている可能性が推察される。しかしながら、これらの推察には更なる検討が必要である。

謝 辞

実験遂行にあたり懇意なる御指導を賜り、VTG 抗血清を提供して頂いた群馬大学医学部生理活性分析センターおよび終始実験に協力頂いた日本配合飼料株式会社中央研究所の所員一同に感謝致します。

引用文献

Baba T, Iwasawa A, Doi O, Suzuki F and Nakamura T. Correlating changes in follicular VLDL binding and follicular aromatase activity in the ovulation cycle of the laying hen. *Japanese Poultry Science*, 39 : 100-108. 2002.
 Barber D, Sanders E, Aebersold R and Schneider W. The receptor for yolk lipoprotein deposition in the chicken oocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 266 : 18761-18770. 1991.

Bujo H, Hermann M, Lindstedt KA, Nimpf J and Schneider WJ. Low density lipoprotein receptor gene family members mediate yolk deposition. *Journal of Nutrition*, 127 : 801S-804 S. 1997.
 Caicedo RE, Kawashima M and Kamiyoshi M. Steroidogenesis in theca cells of chicken follicle in response to ovine gonadotropins. *Japanese Poultry Science*, 34 : 36-44. 1997.
 Clemens MJ. The regulation of egg yolk protein synthesis by steroid hormones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 28 : 71-107. 1974.
 Deeley RG, Mullinix KP, Wetekam W, Kronenberg HM, Meyers M, Eldridge JD and Goldberger RF. Vitellogenin synthesis in the avian liver. Vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250 : 9060-9066. 1975.
 Deeley RG, Udell DS, Burns AT, Gordon JI and Goldberger RF. Kinetics of avian vitellogenin messenger RNA induction. Comparison between primary and secondary response to estrogen. *Journal of Biological Chemistry*, 252 : 7913-7915. 1977.
 Gilbert AB. The ovary. In : *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. (Bell DJ and Freeman BM eds.), Vol. 3. pp. 1163-1208. Academic Press. London. 1971.
 Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM and Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 50 : 179-181. 1977.
 Hummel S, Osanger A, Bajari TM, Balasubramani M, Halfter W, Nimpf J and Schneider WJ. Extracellular matrices of the avian ovarian follicle. Molecular characterization of chicken perlecan. *Journal of Biological Chemistry*, 279 : 23486-23494. 2004.
 Imai K., Effects of avian and mammalian pituitary preparations on induction of ovulation in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 33 : 91-98. 1973.
 Ito Y, Kihara M, Nakamura E, Yonezawa S and Yoshizaki N. Vitellogenin transport and yolk formation in quail ovary. *Zoological science*, 20 : 717-726. 2003.
 Jordanov J, Georgiev I and Boyadjieva-Mihailova A. Physicochemical and electron-microscopical investigations on the vitelline membrane of hen's egg with a view to its permeability to macromolecules. *Comptes rendus de l' Academie bulgare des Sciences*, 19 : 153-157. 1966.
 Kamiyoshi M, Tanaka K and Sakaida M. Changes in radioactive phosphorus uptake by the ovarian follicular yolk of laying hen during an ovulatory cycle. *Japanese Poultry Science*, 14 : 196-198. 1977.
 Kuroki M and Mori M. Binding of spermatozoa to the perivitelline layer in the presence of a protease inhibitor. *Poultry Science*, 76 : 748-752. 1997.
 Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685. 1970.
 Martinat N and Combarnous Y. The release of plasminogen activator by rat granulosa cells is highly specific for FSH activity. *Endocrinology* 123 : 433-435. 1983.
 Mitchell ME. Treatment of hypophysectomized hens with

- partially purified avian FSH. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22 : 233-241. 1970.
- 森 誠. 卵黄膜の科学. *日本家禽学会誌*, 30 : 249-262. 1993.
- Perry MM and Gilbert AB. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *Journal of Cell Science*, 39 : 257-272. 1979.
- Perry MM, Gilbert AB and Evans AJ. Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*, 125 : 481-497. 1978a.
- Perry MM, Gilbert AB and Evans AJ. The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. *Journal of Anatomy*, 127 : 379-392. 1978 b.
- Politis I, Wang L, Turner DJ and Tsang BK. Changes in tissue-type plasminogen activator-like and plasminogen activator inhibitor activities in granulosa and theca layer during ovarian follicular development in domestic hen. *Biology of Reproduction*, 42 : 747-754. 1990.
- Scanes CG, Godden PM and Sharp PJ. An homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone: observations on the ovulatory cycle. *Journal of Endocrinology*, 73 : 473-481. 1977.
- Schuster MK, Schmierer B, Shkumatava A, Kuchler K. Activin A and follicle-stimulating hormone control tight junctions in avian granulosa cells by regulating occludin expression. *Biology of Reproduction*, 70 : 1493-1499. 2004.
- Sekimoto K, Imai K, Kato Y and Takikawa H. Acute decrease in vitellogenin synthesis by deprivation of food and water in laying hens. *Endocrinologia Japonica*, 37 : 319-330. 1990.
- Smith AH. Follicular permeability and yolk formation. *Poultry Science*, 38 : 1437-1446. 1959.
- Tilly JL, and Johnson AL. Presence and hormonal control of plasminogen activator in granulosa cells of the domestic hen. *Biology of Reproduction*, 37 : 1156-1164. 1987.
- Wang SY, Smith DE and Williams DL. Purification of avian vitellogenin III: comparison with vitellogenin I and II. *Biochemistry*, 22 : 6209-6212. 1983.
- Warren DC and Conrad RM. Growth of the hen's ovum. *Journal of agricultural research*, 58 : 875-894. 1939.
- Wiskocil R, Bensky P, Dower W, Goldberger RF, Gordon JI and Deeley RG. Coordinate regulation of two estrogen-dependent genes in avian liver. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America*, 77 : 4474-4478. 1980.
- Wyburn G, Aitken R and Johnston H. The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. *Journal of Anatomy*, 99 : 469-484. 1965.
- Wyburn G, Johnston H and Aitken R. Fate of the granulosa cells in the hen's follicle. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 72 : 53-65. 1966.
- 山村奈美子, 土井 守, 上吉道治. ニワトリの一日内における卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモンの血漿濃度の変動. *日本家禽学会誌*, 38 : J47-J57. 2001.
- Yamamura N, Takeishi M, Goto H, Tagami M, Mizutani T, Miyamoto K, Doi O, Kamiyoshi M. Expression of messenger RNA for gonadotropin receptor in the granulosa layer during the ovulatory cycle of hens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 129 : 327-337, 2001.

Vitellogenin Levles in Plasma and Perivitelline Membrane During Hen Ovulatory Cycle

Masaru Takeishi¹, Tatuhiro Koike^{2#}, Sayo Nishida², Namiko Yamamura²,
Nobuyuki Ishikawa¹, Hisaya Goto¹, Hitoshi Shibui¹,
Osamu Doi³ and Michiharu Kamiyoshi²

¹ Laboratory of Nippon Formula Feed Mfg.Co., Ltd. Tochigi 321-3621

² Faculty of Agriculture, Gif University, Gif 501-1193

³ Faculty of Applied Biological Science, Gif University, Gif 501-1193

Deceased

Vitellogenin (VTG) is an egg yolk precursor protein that is synthesized in and secreted from liver. It is transported from liver to oocytes within ovarian follicles of laying hens. The mechanism that controls VTG transport to the follicles during the follicular growth is not sufficiently clear.

In this study, plasma and follicles were collected from laying hens at 3-h intervals for 24 h. The perivitelline membrane, which immediately surrounds the oocyte membrane, was isolated from the largest (F1), third largest (F3), and fifth largest (F5) preovulatory follicles after measurement of follicular weight. VTG in plasma and the perivitelline membrane was separated by SDS-PAGE and detected by Western blot analysis using an anti-VTG antibody. Bands were quantified using NIH Image ver. 1.60 software.

Follicular weight increased gradually from 19–20 to 10–11 h before F1 ovulation, and then remained constant. Plasma VTG did not show significant changes during the ovulatory cycle. The VTG level in perivitelline membrane increased from 22–23 h before F1 ovulation in all follicles, and then decreased rapidly after attaining the highest value at 13–14 h in F1 and at 16–17 h in F3 and F5.

These results indicate that VTG in the perivitelline membrane increased before the increase in follicular weight, thereby suggesting that the mechanism that controls VTG transport to follicles exists besides the oocyte.

(Japanese Journal of Poultry Science, 45 : J1–J8, 2008)

Key words : vitellogenin, perivitelline membrane, ovulatory cycle, chicken