

## ニワトリの排卵周期中における卵胞重量の増加と顆粒膜プラスミノーゲン・ アクチベーター活性との関係

武石 勝<sup>1</sup>・安住水穂<sup>2</sup>・西田沙世<sup>2</sup>・山村奈美子<sup>2</sup>・後藤尚也<sup>1</sup>・土井 守<sup>3</sup>・上吉道治<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 岐阜大学農学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

<sup>3</sup> 岐阜大学応用生物科学部, 岐阜県岐阜市柳戸 501-1193

ニワトリにおいて、顆粒膜のプラスミノーゲン・アクチベーター (PA) は、卵胞の急速成長相における顆粒層細胞の増殖と細胞外マトリクスの再構築に関与することが知られているが、約1日の排卵周期中における卵胞重量の増加への関与については未だ十分には明らかにされていない。そこで本実験では、排卵周期中において3時間毎に卵胞重量と顆粒膜におけるPA活性を測定することにより、排卵周期中の卵胞重量増加への顆粒膜PA活性の関与の可能性を検討した。

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、水と餌を自由に摂取させた。これらのニワトリから、排卵周期の3時間毎に、最大卵胞 (F1) と2番目に大きい卵胞 (F2) を採取した。卵胞は重量を測定した後、顆粒膜を単離した。単離した顆粒膜のPA活性は色素性合成基質を用いる方法で、DNAはジフェニルアミン法の変法で測定した。

卵胞重量は、F1とF2共に、F1の排卵22-23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、その後はほぼ同じ値で推移した。顆粒膜のDNA含量は、周期中の時期間における差異のみならず、F1とF2における間にも差異は見出されなかった。排卵周期中においてDNA当たりに換算した顆粒膜PA活性は、F1とF2共に、F1の排卵22-23時間前から16-17時間前に相当する時期にかけて有意に増加し、排卵13-14時間前まで高い値を維持した後、排卵4-5時間前に相当する時期にかけて徐々に低下した。前後の時期における平均卵胞重量の差から求めた卵胞重量増加量は、排卵周期中においてF1とF2と共に、顆粒膜PA活性における傾向とほぼ同じ傾向を示した。

これらのことは、顆粒膜PA活性と排卵周期中における卵胞重量の増加の間に相関関係があることを示している。

**キーワード:** プラスミノーゲン・アクチベーター, 顆粒膜, 排卵周期, 卵胞重量, ニワトリ

### 緒 言

プラスミノーゲン・アクチベーター (PA) は、活性の無い酵素前駆体であるプラスミノーゲンをセリンプロテアーゼの一種であるプラスミンに変換して線溶系を促進する蛋白質である (Robbin *et al.*, 1967)。プラスミンの代表的な生理作用は、血液中において不溶性のフィブリンを可溶性物質に分解することであり、血流を正常に維持することに重要な役割を果たしている (Warren, 1964; Buonassisi and Venter, 1976; Loskutoff and Edgington, 1977)。ニワトリの卵胞におけるPAは、Urokinase-Type (uPA) と Tissue-Type (tPA) の2種類が存在するが (Tilly and Johnson, 1987; Poilits *et al.*, 1990; Johnson *et al.*,

1997), tPAの方が量的に少ないことからuPAがPAの主体であると考えられている (Lafrance *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1997)。卵胞におけるPAの作用は、哺乳類と鳥類で違いがあることが知られている。哺乳類は主に顆粒層細胞で生産されたPAによりプラスミノーゲンがプラスミンに変換されて、プラスミンは卵胞壁の開裂に作用して排卵に関与すると考えられている (Beers *et al.*, 1975; Too *et al.*, 1984; Martinat and Combar-nous, 1983)。さらにPA-プラスミン系が未熟卵胞の顆粒膜の再構築に関与することにより卵胞腔の形成に関与するのではないかと示唆されている (Knecht, 1986, 1987)。

一方、鳥類では、PAは卵胞において哺乳類と同様に顆粒層細胞で合成されるが、排卵直前の卵胞よりも発育途上の卵胞の方がPA活性は高く (Politis *et al.*, 1990; Tilly *et al.*, 1992; Lafrance *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1997), さらに排卵前の最大卵胞 (F1) のPA活性は排卵予定時間が近づくに従って低下すること (Tilly *et al.*, 1992), 培養した顆粒層細胞において排卵誘起ホルモンとして知られる黄体形成ホルモン (LH) がPA活性を阻害することから (Tilly and Johnson, 1987; Tischkau *et al.*, 1996), 哺乳類のような排卵に関する作用は少ないと考えられている。これまでに報

2009年9月4日受付, 2010年3月9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

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

Tel: 0285-63-1121

Fax: 0285-63-1120

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

告されているニワトリの卵胞における PA の役割は、顆粒層細胞の増殖 (Politis *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1997), 細胞外マトリクスの再構築 (Tilly *et al.*, 1992; Tischkau *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997) などがある。

我々は最近の研究において、卵胞の顆粒膜の PA が小卵胞の急速成長相への転移に関与することを報告した (武石ら, 2009)。この研究では、排卵 18 時間前に 9 番目に大きい卵胞 (F9) から最大卵胞 (F1) までの各卵胞を採取し、顆粒膜における PA 活性と卵胞膜におけるエストラジオール 17 $\beta$  (E2) 濃度を測定すると共に、卵胞重量と卵胞に取り込まれる物質の移動率を算出した。この結果、小卵胞の急速成長相への転移は F6 で起こり、顆粒膜における PA 活性と卵胞膜における E2 濃度は、共に急速成長相への転移に先立ち、F8 から F7 にかけて有意に増加し、しかも急速成長相の転移直前の F7 において最も高い値を示した。これらのことは、E2 が小卵胞の急速成長相への転移に重要な役割を担っているとの報告 (Imai *et al.*, 1998) を裏付けるとともに、顆粒層細胞における PA 活性が急速成長相への転移に関与することが示唆されている。

卵胞の急速成長相では、卵胞への物質の取り込みが促進されることで卵胞重量が短期間で急激に増加する。卵胞に取り込まれる主な物質には、卵黄前駆物質であるビテロゲン (VTG) や超低密度リポタンパク (VLDL) があり、小卵胞の急速成長相への転移においてもこれらの卵黄前駆物質の取り込みが急激に増加する。これら卵黄前駆物質の卵胞への取り込みは、約 1 日の排卵周期中にも変化が認められており、VTG の卵胞への取り込みの様相を観察した報告では (武石ら, 2008), 排卵周期の特定の時間に VTG の卵胞への取り込みが盛んに起こり、この取り込みの調節に PA が関与する可能性が推察されているが十分な証拠は無い。

このように、顆粒層細胞における PA の役割には、顆粒層細胞の増殖と、増殖に伴う細胞外マトリクスの再構築に加えて、小卵胞の急速成長相への転移に関与することが示唆されているものの、排卵周期中における卵胞重量の増加への関与については未だ十分に検討されていない。

そこで本実験では、顆粒層細胞の増殖や、細胞外マトリクスの再構築が行われていない F1 と F2 を対象として、排卵周期中における卵胞重量と顆粒膜の PA 活性を測定し、排卵周期中における卵胞重量の増加に PA 活性が関与する可能性について検討した。

## 材料と方法

### 供試鶏

本実験で使用したニワトリは、白色レグホーン種の雌鶏 (50 週齢) と雄鶏 (96 週齢) である。産卵鶏は岐阜大学付属農場無窓鶏舎内で点灯開始を午前 5 時とする 14 時間照明: 10 時間暗黒の明暗周期条件下で、飼料と水は自由に摂取させた。産卵鶏は最低 3 週間以上産卵記録を取り、1 クラッチの長さが 4 から 6 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 日であるニワトリのみを使用した。また、雄鶏は岐阜大学付属農場開放鶏舎にて飼育し、飼料と水は自由に摂取させた。本実験は、実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR and NRC, 1996) に従っ

て実施した。

### 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 30 分以内の範囲で起こることが確認された。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 10 羽ずつ供試し、卵胞を採取した。卵胞は、断頭屠殺後直ちに開腹して F1 と F2 を採取した。重量測定後、速やかに Gilbert *et al.* (1977) の方法に従って顆粒膜を採取して、直ちに液体窒素で凍結させ、PA 活性測定時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

プラスミノーゲンの精製に使用した血清は雄鶏から採取し、精製当日に常法に従って血清を得た。

### 顆粒膜における PA 活性の測定

顆粒膜の PA 活性は Tilly and Johnson (1987) の色素性合成基質を用いる方法を一部変更して測定した。この測定におけるプラスミノーゲンの精製法と測定操作は前報 (武石ら 2009) に記した方法と同様である。すなわち、凍結保存しておいた顆粒膜を 0.2% Triton $\times$ 100-0.1 M トリス塩酸緩衝液 1 ml 中でガラスホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。得られたホモジェネートは遠心分離し、その上澄みの一部を PA 活性の測定に、沈殿を DNA の測定に供した。ただ、PA 活性値の表現は前報とは異なり、測定したパラニトロアニリン (pNA) 量を顆粒層細胞の DNA100 $\mu\text{g}$  当たりの値として示した。

### 顆粒膜中の DNA の測定

顆粒膜中の DNA は、ジフェニルアミン法の変法 (Leyva and Kelley, 1974) に従って測定した。

測定は同一検体について 2 本ずつ行い、その平均値を検体の測定値とし、子牛胸腺 DNA (Sigma) を 0.01 M Tris-HCl 緩衝液に溶解した標準液を用いて同様に測定した標準曲線から DNA 量を算出した。

### 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表 1 に示した。卵胞重量は、F1 と F2 共に、F1 の排卵 22-23 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。

F1 と F2 の排卵周期中における顆粒膜の DNA 含量を表 2 に示した。周期中の各時期の間のみならず、F1 と F2 の間においても、測定した全てのデータの間に差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

F1 と F2 のそれぞれの卵胞重量において、前後の時間帯の平均卵胞重量の差から求めたその期間の卵胞重量増加量を図 1 の上段に示した。卵胞重量増加量は、F1 と F2 共に、F1 の排卵 22-23~19-20 時間前に相当する期間から順次増加し、排卵 16-17~13-14

表 1. 排卵周期中における最大卵胞 (F1) と 2 番目に大きな卵胞 (F2) の重量

排卵前時間	卵胞重量 (g)	
	F1	F2
22-23	16.7±0.14 <sup>a</sup>	12.3±0.23 <sup>a</sup>
19-20	17.1±0.10 <sup>a</sup>	12.8±0.19 <sup>ab</sup>
16-17	17.7±0.22 <sup>b</sup>	13.6±0.28 <sup>b</sup>
13-14	18.7±0.25 <sup>c</sup>	14.7±0.36 <sup>c</sup>
10-11	19.2±0.22 <sup>cd</sup>	15.4±0.20 <sup>cd</sup>
07-08	19.3±0.23 <sup>d</sup>	15.4±0.31 <sup>cd</sup>
04-05	19.5±0.20 <sup>d</sup>	15.5±0.23 <sup>d</sup>
01-02	19.6±0.24 <sup>d</sup>	15.7±0.39 <sup>d</sup>

各時期の卵胞重量は 10 羽の平均値±標準偏差で示してある。図中のアルファベットは異なる文字間で 5% 水準の危険率で有意差があることを示している。

表 2. 排卵周期中の最大卵胞 (F1) と 2 番目に大きな卵胞 (F2) の顆粒膜における DNA 含量

排卵前時間	DNA 含量 (μg/granulosa)	
	F1	F2
22-23	60.8±1.4 <sup>a</sup>	61.8±1.9 <sup>a</sup>
19-20	66.6±1.2 <sup>a</sup>	62.0±2.4 <sup>a</sup>
16-17	64.0±1.2 <sup>a</sup>	62.4±1.9 <sup>a</sup>
13-14	61.3±2.0 <sup>a</sup>	61.5±1.4 <sup>a</sup>
10-11	63.2±1.6 <sup>a</sup>	63.0±3.0 <sup>a</sup>
07-08	66.3±1.8 <sup>a</sup>	67.4±1.6 <sup>a</sup>
04-05	63.6±2.3 <sup>a</sup>	62.4±1.4 <sup>a</sup>
01-02	65.9±3.7 <sup>a</sup>	63.9±1.2 <sup>a</sup>

各時期の DNA 測定値は 10 羽の平均値±標準偏差で示してある。図中のアルファベットは異なる文字間で 5% 水準の危険率で有意差があることを示している。

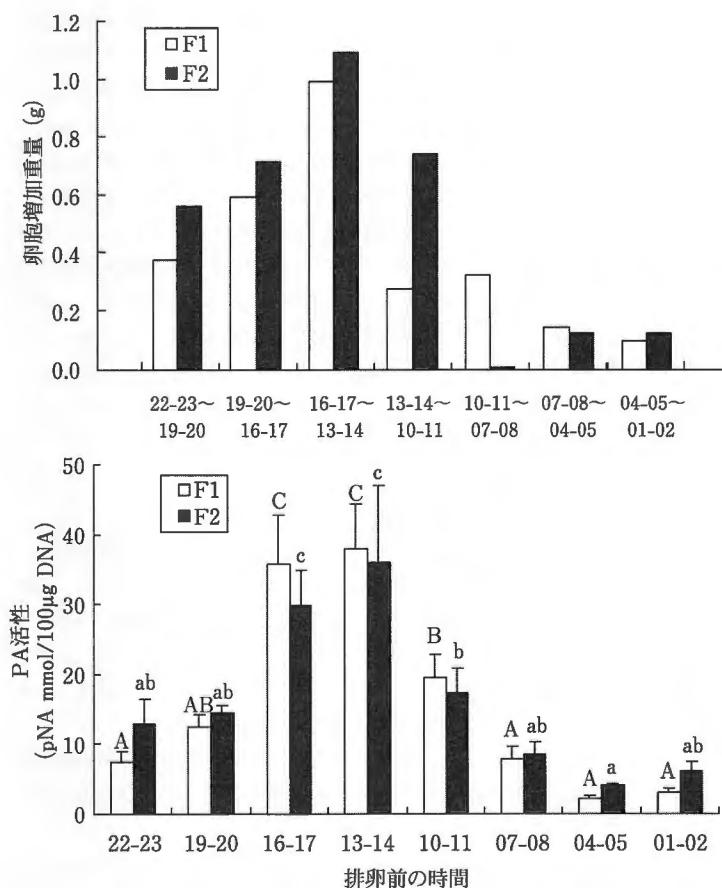


図 1. 排卵周期中における最大卵胞 (F1) と 2 番目に大きな卵胞 (F2) の平均重量から算出した各時期における卵胞増加重量 (上段) と、顆粒膜における PA 活性 (下段) 各時期の PA 活性測定値は 10 羽の平均値±標準偏差で示してある。図中のアルファベットは異なる文字間で 5% 水準の危険率で有意差があることを示している。

時間前に相当する期間において最も高い値を示した。その後、卵胞重量増加量は減少し、F1 の排卵 7 時間前に相当する時期からは低い値で推移した。

顆粒膜の PA 活性は、DNA 当たり換算した値で示した結果を図 1 の下段に示した。排卵周期中における顆粒膜の PA 活性は、F1, F2 共に図 1 の上段に示した卵胞重量増加量とほぼ同じ様相で推移した。すなわち顆粒膜の PA 活性は、F1 の排卵 22-23

時間前に相当する時期から 16-17 時間前に相当する時期にかけて有意に増加した後、排卵 13-14 時間前まで高い値を維持した。その後は、排卵 4-5 時間前にかけて徐々に低下した。

### 考 察

本実験では、排卵周期中における F1 と F2 の卵胞顆粒膜における PA 活性の変動の様相が明らかとなった。その PA 活性は F

1 のみならず F2 においても, F1 の排卵 22-23 時間前に相当する時期から排卵 16-17 時間前に相当する時期にかけて増加し, 13-14 時間前に相当する時期にピークを示した後, 減少して, 排卵 07-08 時間前に相当する時期以降は低いレベルで推移することが見出された。

また, 前後の時間帯の平均卵胞重量の差から求めたそれぞれの時間帯における卵胞重量増加量は, F1 と F2 共に F1 の排卵 22-23~19-20 時間前に相当する時期から順次増加し, 排卵 16-17~13-14 時間前に相当する時期において最も高い値を示した。その後の卵胞重量増加量は減少し, 排卵 07-08 時間前に相当する時期以降の増加はほとんど認められなかった。このことは, 排卵周期中における卵胞重量の増加は, 一定の持続した状態で行われるのではなく, 周期の前半に起こり, 後半の時期にはほとんど起こらないことを示していると共に, 卵胞重量増加が顆粒膜における PA 活性の変動とほぼ同じような様相を示したことは, 排卵周期中における卵胞重量の増加に, 顆粒層細胞の PA が関与していることを示唆している。

本実験で測定した, 卵胞重量において, F2 から F1 へと階層が変わる際に大きな重量差が認められた。連産中のニワトリの卵重は, 連産が進むに従って軽くなり, ある程度軽くなると休産して次の連産に移っていくことは経験的に知られている。Zakaria *et al.* (1984) は卵胞の急速成長のパターンを詳細に調査し, クラッチの長さ, クラッチ内の卵の位置と卵胞成長日数の関係について報告している。この報告によると, クラッチの長いニワトリほど卵胞の急速成長期間は短く, 更にクラッチ内の卵の位置がクラッチ第 1 卵, 第 2 卵…第 5 卵と進むに従って, 急速成長日数は短くなる傾向が認められている。特にクラッチ第 1 卵は他の位置の卵よりも卵胞の急速成長期間は長く, 卵黄体積が大きい傾向が認められている (Zakaria *et al.*, 1984)。しかし, これらの現象が何故起こるかに関しての報告は見当たらない。

これまでに報告されているニワトリの卵胞における PA の役割は, 顆粒層細胞の増殖 (Politis *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1997), 細胞外マトリクスの再構築 (Tilly *et al.*, 1992; Tischkau *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997), 小卵胞の急速成長相への転移 (武石ら, 2009) 等である。これらのうち, 1990 年代に行われた一連の研究では, 哺乳類の卵巣における PA の作用との違いの観点から研究が進められた。特に本研究で得られた結果と類似している Tilly *et al.* (1992) の報告では, 排卵前 17, 5, 0.5 時間で F1 の顆粒層細胞の PA を測定して, 排卵時期に近づくに従い PA 活性値が減少していることを見出し, さらに, 卵胞サイズ別の PA 活性と  $^3\text{H}$ -thymidine を使った DNA 合成能と F1 の顆粒膜の杯盤部分とその他の部分での PA 活性と DNA 合成能の検討結果から, DNA 合成が盛んで細胞増殖が盛んな時期・部位で PA 活性が高いことが見出された。これら結果から, 彼らは, 鳥類の顆粒膜における PA は, 卵胞の発育における顆粒層細胞の増殖に関与し, 排卵への関与は少ないと結論している。

これに対して, 本研究で我々は, Tilly *et al.* (1992) とは異なる着眼点で, 卵胞発育の直接的な効果である卵胞重量の増加と PA の関係を検討した。すなわち, Tilly *et al.* (1992) は顆粒層細胞の増殖に伴う細胞外マトリクスの再構築に PA が関与すると考察し

たが, 我々は顆粒層細胞の増殖がほとんど行われていない F2 と F1 を対象として, 約 1 日の排卵周期中における卵胞重量増加量, 顆粒膜中の DNA 含量と PA 活性の変化を時系列で観察した。その結果, 排卵周期中の色々な時期で測定した顆粒膜の DNA 含量は, F1 と F2 とにおいてのみならず, 測定した期間においても有意な差は認められなかった。このことは, 大きさが 5 番目以上の発育卵胞では大きさの違いにより顆粒膜における DNA 含量に相違が認められていない報告 (武石ら, 2009) とも符合し, しかも顆粒膜には顆粒層細胞しか認められないことから, 少なくとも大きさが 5 番目以上に発育した卵胞では顆粒層細胞の増殖は起こらないことを示している。このことは, 少なくとも大きさが 5 番目以上に成長した卵胞における顆粒層細胞における PA は, 顆粒層細胞の増殖や, 細胞増殖に伴う細胞外マトリクスの再構築には関与していないことを示唆している。

肝臓で合成された卵黄前駆物質は, 血流を介して卵胞に到達し, 卵胞膜内層において基底膜に接して分布する毛細管の小孔から卵胞組織内に拡散し, 基底膜の結合組織間, 細胞膜の細胞間隙, 卵黄膜内層を通過して (Perry and Gilbert, 1979), 卵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 (Barber *et al.*, 1991; Bujo *et al.*, 1997) により, 他の体細胞では前例がないほど効率的に卵胞に取り込まれ, 蓄積されることにより, 結果として卵胞重量が増加して成長する。主な卵黄前駆物質として VTG と VLDL が知られているが, 排卵周期において卵胞に接する卵黄膜内層における VTG を測定することで, 排卵周期中における卵胞への卵黄前駆物質の取り込みの様相を検討した報告 (武石ら, 2008) がある。この報告において, 血液中における VTG レベルには排卵周期中に有意な変動は認められず, 検討した F1, F3 と F5 の何れにおいても卵胞重量は, F1 の排卵 19-20 時間前に相当する時期から 10-11 時間前に相当する時期にかけて順次増加し, その後はほぼ一定の値で推移したのに対して, 卵黄膜内層中の VTG レベルは, 卵胞重量の増加に先立って増加し, 卵胞重量の増加が認められなくなった後は急激に減少して, その後は低いレベルで推移したことが見出されている。本実験で見出された顆粒膜中の PA 活性値は, 卵黄膜内層中の VTG レベルが増加する時期には増加し, 減少する時期には減少して, さらに低いレベルで推移した時期には同じように PA 活性も低いレベルで推移していることから, 顆粒層細胞の PA が, VTG すなわち卵黄前駆物質が卵胞に取り込まれてから卵黄膜内層までの移動に関与して, 卵胞重量の増加に寄与している可能性が推察される。

卵黄膜内層で毛細管血管網を形成する毛細管の小孔から拡散して卵胞内に取り込まれた VTG などの卵黄前駆物質は, 卵黄膜内層に到達するまでに, 基底膜の結合組織間と顆粒膜の顆粒層細胞間隙を通過する (Gilbert, 1971)。これらの組織の中で顆粒膜のみに細胞が存在するが, 顆粒膜は構造的変化が著しく, 哺乳類とは逆に, 鳥類では未成熟な卵胞では細胞が多層構造を示し, 成熟するに従って単層化し, 細胞間隙が広がる (Perry *et al.*, 1978; 武石ら, 2009)。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; 武石ら, 2009)。これ

らのことは、顆粒膜の細胞間隙における卵黄前駆物質の移動が細胞層の構築状態のみに依存していないこと示していると共に、細胞間隙における卵黄前駆物質の移動に関与する機構が存在する可能性を示唆している。プラスミンは組織内のコラゲナーゼを活性化し、基質蛋白を分解することにより細胞外基質を粗にする (Birkedal-Hansen *et al.*, 1976; Eeckhout and Vase, 1977; Paranjpe *et al.*, 1980; Reich *et al.*, 1985) ことが知られているが、このプラスミンは活性のない酵素前駆体であるプラスミノゲンから PA の作用によって活性化したものとして生成される (Robbins *et al.*, 1967)。従って、前述したように本実験において、卵胞重量の増加と卵黄膜内層 VTG レベルとはほぼ同じ様相で顆粒層細胞における PA 活性が変動することが見出されたことは、少なくとも卵胞発育の 1 機序として、顆粒細胞における PA により活性化されたプラスミンが、顆粒膜の細胞間隙を粗にすることにより、卵黄前駆物質の移動が促され、結果として卵細胞における卵黄前駆物質の蓄積が増加して、その反映として卵胞重量が増加し、言い換えれば卵胞発育が促されると推察される。

卵胞発育を促進する要因として、卵胞刺激ホルモン (FSH) の効果が古くから報告されており、粗製ニワトリ FSH 剤や FSH 様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ことが知られている (Imai, 1973; Mitchell, 1970)。しかし、これらの報告では、排卵周期中の卵胞に FSH がどのように関与しているのかは十分に明らかではない。本実験で顆粒層細胞の PA 活性が高いと認められた時期と、我々の報告で卵黄膜内層 VTG レベルの増加が認められた時期 (武石ら, 2008) は、FSH の血中レベルと卵胞の FSH 結合能が高い時期 (山村ら, 2001; Scanes *et al.*, 1977) と一致し、PA 活性が低くしかも卵黄膜内層 VTG レベルが低く維持された時期は、顆粒層細胞における FSH 受容体 mRNA レベルが減少する時期 (Yamamura *et al.*, 2001) と相応している。

ニワトリの顆粒層細胞を刺激する因子として、トランスフォーミング増殖因子アルファ (TGF- $\alpha$ )、上皮成長因子 (EGF)、プロスタグランジン E2 (PGE2) 等が報告されているが (Tilly and Johnson, 1990a, 1990b; Li *et al.*, 1994, 1997)、これらはどれも顆粒層細胞の増殖に関連する因子として考えられており、我々が考える卵黄前駆物質の取り込みへの PA の関与における刺激作用については不明である。一方、ほ乳類においては、FSH が顆粒層細胞における PA の合成と分泌を刺激することが報告されている (Liu *et al.*, 1981; Wang and Leung, 1983; Martinat and Combarnous, 1983)。しかしながら、鳥類の PA 活性は、LH によって抑制されることは知られているが (Tilly and Johnson, 1987)、純粋な FSH が得られていないことから、FSH が刺激するか否かは明らかにされていない。本実験においては、先に述べたように、排卵周期中で顆粒膜の PA 活性が高いことを確認した時期は、FSH の血中レベルと卵胞の FSH 結合能が高い時期 (山村ら, 2001; Scanes *et al.*, 1977) と一致し、PA 活性が低い時期は、顆粒層細胞における FSH 受容体 mRNA レベルが減少する時期 (Yamamura *et al.*, 2001) とも相応している。

これらのことは、ニワトリ卵胞の顆粒層細胞における PA 活性

は、卵胞刺激ホルモンとして知られる FSH により制御されている可能性が示唆されるが、このことをより明確にするには、さらなる研究が必要とされる。

## 謝 辞

実験遂行にあたり終始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

- 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.
- Beers WH, Strickland S and Reich E. Ovarian plasminogen activator : relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell*, 6 : 387-394. 1975.
- Birkedal-Hansen H, Cobb CM, Taylor RE, Taylor RE and Fullmer HM. Activation of fibroblast procollagenase by mast cell proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 438 : 273-286. 1976.
- 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-804S. 1997.
- Buonassisi V and Venter JC. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73 : 1612-1616. 1976.
- Eeckhout Y and Vase G. Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of the bone collagenase. *Biochemical Journal*, 166 : 21-31. 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.
- Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council (ILAR and NRC). *Guideline for the care and use of laboratory animals* (7th edition). National Academy Press, Washington DC. 1996.
- 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.
- Imai K, Sonoda Y and Kai O. Follicular transformation in hen's ovary after the administration of aminoglutethimide. *Japanese Poultry Science*, 35 : 329-336. 1998.
- Johnson AL, Bridgham JT and Abthony RV. Expression of avian urokinase and tissue-type plasminogen activator messenger ribonucleic acid during follicle development and atresia. *Biology of Reproduction*, 56 : 581-588. 1997.
- Knecht M. Production of a cell-associated and secreted plasminogen activator by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 118 : 348-353. 1986.

- Knecht M. Hormonal and immunological characterization of the cell-associated plasminogen activators produced by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 120 : 2174-2179. 1987.
- Lafrance M, Zhou L and Tsang BK. Interactions of transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  and luteinizing hormone in the regulation of plasminogen activator activity in avian granulosa cells during follicular development. *Endocrinology*, 133 : 720-727. 1993.
- Leyva A Jr and Kelley WN. Measurement of DNA in cultured human cells. *Analytical Biochemistry*, 62 : 173-179. 1974.
- Li J, Croze F, Yan W, Hache RJ and Tsang BK. Up-regulation of urokinase plasminogen activator messenger ribonucleic acid and protein in hen granulosa cells by transforming growth factor  $\alpha$  in vitro during follicular development. *Biology of Reproduction*, 56 : 1317-1322. 1997.
- Li J, Li M, Lafrance M and Tsang BK. Avian granulosa cell prostaglandin secretion is regulated by transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$  and does not control plasminogen activator activity during follicular development. *Biology of Reproduction*, 51 : 787-794. 1994.
- Liu Wk, Burleigh BD and Ward DN. Steroid and plasminogen activator production by cultured rat granulosa cells in response to hormone treatment. *Molecular Cellular Endocrinology*, 21 : 63-73. 1981.
- Loskutoff DJ and Edgington TE. Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 : 3903-3907. 1977
- Martinat N and Combarous 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.
- Perry MM and Gilbert AB. York 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. 1978.
- Paranjpe M, Engel L, Young N and Liotta LA. Activation of human breast carcinoma collagenase through plasminogen activator. *Life Science*, 26 : 1223-1231. 1980.
- 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.
- Reich R, Tsafiriri A and Mechanic GL. The involvement of collagenolysis in ovulation in the rat. *Endocrinology*, 116 : 522-527. 1985.
- Robbins JC, Summarián L, Hsieh B and Shah RJ. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 242 : 2333-2342. 1967.
- Scanes CG, Godden PMM and Sharp PJ. An homologous radioimmunoassay for chicken follicle-stimulating hormone : observations on the ovulatory cycle. *Journal of Endocrinology*, 41 : 266-269. 1977
- Smith AH. Follicular permeability and yolk formation. *Poultry Science*, 38 : 1437-1446. 1959
- 武石 勝, 小池達大, 西田沙世, 山村奈美子, 石川信幸, 後藤尚也, 渋井仁志, 土井守, 上吉道治. ニワトリの排卵周期における血漿と卵黄膜内層中のビテロゲン (VTG) レベル. *日本家禽学会誌*, 45 : J1-J8. 2008.
- 武石 勝, 安住水穂, 西田沙世, 山村奈美子, 後藤尚也, 渋井仁志, 土井 守, 上吉道治. ニワトリ卵胞顆粒膜におけるプラスミンノーゲン・アクチベーター活性と小卵胞の急速成長相への転移との関係. *日本家禽学会誌*, 46 : J1-J8. 2009.
- 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.
- Tilly JL and Johnson AL. Modulation of hen granulosa cell steroidogenesis and plasminogen activator activity by transforming growth factor  $\alpha$ . *Growth Factors*, 3 : 247-55. 1990a.
- Tilly JL and Johnson AL. Control of plasminogen activator activity in the thecal layer of the largest preovulatory follicle in the hen ovary. *Endocrinology*, 126 : 2079-2087. 1990b.
- Tilly JL, Kowalski ZLI, Levorese JM and Johnson AL. Plasminogen activator activity and thymidine incorporation in avian granulosa cells during follicular development and periovulatory period. *Biology of Reproduction*, 46 : 195-200. 1992.
- Tischkau SA, Jackson JA, Finnigan-Bunick C and Bahr JM. Granulosa layer : primary site of regulation of plasminogen activator messenger ribonucleic acid by luteinizing hormone in the avian ovary. *Biology of Reproduction*, 55 : 75-79. 1996.
- Too CK, Bryant-Greenwood GD and Greenwood FC. Relaxin increases the release of plasminogen activator, collagenase, and proteoglycanase from rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 115 : 1043-1050. 1984.
- 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 H, Tagami M, Mizutani T, Miyamoto K, Doi M and 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.
- Wang C and Leung A. Gonadotropins regulate plasminogen activator production by granulosa cell. *Endocrinology*, 112 : 1201-1207. 1983.
- Warren BA. Fibrinolytic activity of vascular endothelium. *British Medical Bulletin*, 20 : 213-216. 1964.
- Warren DC and Conrad RM. Growth of the hen's ovum. *Journal of Agricultural Research*, 58 : 875-894. 1939.
- Zakaria AH, Miyaki T and Imai K. The relationships of clutch length and egg position on ovarian follicular growth in laying hens. *Poultry Science*, 63 : 1250-1254. 1984.

## Relationship between Ovarian Follicle Development and Plasminogen Activator Activity in Granulosa Layer during Hen Ovulatory Cycle

Masaru Takeishi<sup>1</sup>, Mizuho Azumi<sup>2</sup>, Sayo Nishida<sup>2</sup>, Namiko Yamamura<sup>2</sup>,  
Hisaya Goto<sup>1</sup>, Osamu Doi<sup>3</sup> and Michiharu Kamiyoshi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Nippon Formula Feed Mfg.Co.,Ltd. Tochigi 321-3621

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu 501-1193

<sup>3</sup> Faculty of Applied Biological Science, Gifu University, Gifu 501-1193

In domestic fowl, the plasminogen activator (PA) in granulosa is related to ovarian follicle development. However, the participation in follicular growth during the hen ovulatory cycle of the activity of PA in granulosa is not sufficiently clear.

White leghorn hens, 50 weeks of age, had free access to feed and water, and were exposed to a photoperiod of 14 h of light and 10 h of darkness. In this study, follicles were collected from laying hens at 3-h intervals for 24 h. The granulosa layer was isolated from the largest (F1) and second largest (F2) preovulatory follicles after measurement of follicular weight. In the follicles, the activity of PA in granulosa was measured using plasminogen extracted from rooster's plasma and chromogenic substrate. The DNA content of granulosa was determined by the diphenylamine method.

Follicular weight increased gradually from 22-23 to 13-14 h before F1 ovulation, and then remained constant. The PA activity of granulosa increased significantly from 22-23 h to 16-17 h before F1 ovulation in both follicles, showed a peak in 13-14 h and decreased according to the growth of follicles. Follicular weight gain, which is calculated from the difference in average follicular weight, showed a similar change to that of PA activity. The DNA content of granulosa did not show significant changes during the ovulatory cycle.

These results suggest that the activity of PA in granulosa may participate in the increase of follicular weights during the hen ovulatory cycle.

*(Japanese Journal of Poultry Science, 47 : J71-J77, 2010)*

**Key words** : chicken, follicular weight gain, granulosa layer, ovulatory cycle, plasminogen activator activity