

## ニワトリの卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に及ぼす 性ステロイドホルモンの影響

後藤尚也<sup>1)</sup>・田上雅之<sup>1)</sup>・伊那佐江子<sup>2)</sup>・荒川仲代<sup>2)</sup>  
山村奈美子<sup>2)</sup>・武石 勝<sup>1)</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, 栃木県芳賀郡茂木町字天子 451, 321-3621

<sup>2)</sup> 岐阜大学農学部生物資源生産学科, 岐阜県岐阜市柳戸 1-1, 501-1193

ニワトリにおいて、腸管におけるカルシウム (Ca) 吸収と卵管の卵殻腺部における Ca 沈着に Ca 結合蛋白質 (CaBP-D<sub>28K</sub>) が関与していることは良く知られている。ペプチドである CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現が腸管においては主に 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に支配されていることは明らかにされているが、卵殻腺部においては未だ十分には明らかにされていない。そこで本実験では卵管機能に影響を与えることが知られている性ステロイドホルモンが卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに与える影響を検討した。

最初の実験では、産卵鶏に 100 IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を 5 日間毎日投与して、性ステロイドホルモン分泌を増加させた場合の卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度に与える影響を検討した。PMSG 投与により血中エストラジオール-17β (E2) とテストステロン (T) 濃度は投与 2 日後から、プロゲステロン (P4) 濃度は投与 3 日後から、生理的食塩水を投与した対照鶏に比べ有意に増加した。血中 Ca イオン濃度は産卵が停止した投与 3 日後から対照鶏に比べて有意に高くなった。一方、血中非透過性 Ca 濃度は投与 2 日後において対照鶏に比べ有意に高い値を示したが、その他の時期では有意な差は認められなかった。5 回目の PMSG 投与 24 時間後に測定した CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度は PMSG 投与により有意に減少した。これらのことは、産卵鶏では性ステロイドホルモンが卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> 遺伝子発現を刺激する可能性は少ないことを示している。

次に、排卵周期中においてまだ卵殻形成が認められない排卵 2 時間後と卵殻形成の盛んな排卵 10 時間後にそれぞれ E2, T, P4 を投与し、それらの投与 4 時間後に卵重量、卵殻重量、卵殻中の Ca と Mg 含量および卵殻腺部の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度を測定した。その結果、卵重量はいずれの投与時期においても性ステロイドホルモン投与による有意な影響は認められなかった。これに対して、卵殻重量、卵殻中 Ca と Mg 含量および CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度は、いずれも排卵 10 時間後に P4 を投与した場合においてのみ対照鶏に比べ有意に低い値を示した。

以上の結果より、性ステロイドホルモンが産卵鶏の卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> 遺伝子発現を刺激する可能性は少ないと推察された。

キーワード: カルシウム結合蛋白質, 遺伝子発現, 性ステロイドホルモン, 卵殻腺部, ニワトリ

### 緒 言

カルシウム (Ca) 結合タンパク質である CaBP-D<sub>28K</sub> は、腸管からの Ca の吸収と卵殻腺部における卵殻への Ca の沈着に関与していることが知られている (Bar *et al.*, 1990)。CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現は、腸管においては 1α, 25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> により誘導される (Norman *et al.*, 1982; Corradino and Fullmer, 1991; Nys *et al.*, 1992) が、卵殻腺部においては腸管における

2001年8月6日受付 2001年9月25日受理  
連絡者: 後藤尚也  
〒321-3621 日本配合飼料株式会社中央研究所, 栃木  
県芳賀郡茂木町字天子 451  
Tel 0285-63-1121  
Fax 0285-63-1120  
Email: hisaya.goto@nippai.co.jp

場合とは異なった制御によって調節されていると報告されている (Bar *et al.*, 1978 b; Navickis *et al.*, 1979; Bar *et al.*, 1984; Nys and de Laage, 1984; Nys *et al.*, 1989; Bar *et al.*, 1990; Striem and Bar, 1991; Corradino *et al.*, 1993)。Corradino ら (1993) は、腸管における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA の発現はビタミン D により誘発されるが、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA の発現はビタミン D よりむしろ性ステロイドホルモンによって調節されている可能性を示唆し、また、Corradino と Alaimo (1994) は、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 発現にはビタミン D とエストラジオール-17β (E2) の両方が関与していると報告している。一方、Bar ら (1996) は、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA の発現は E2 によってはほとんど影響されず、卵殻の形成と関連した促進因子と排卵周期中に変動することが知られているプロジェステロン (P4) による抑制因子によって制御されているとの仮説を提唱している。さらに、Ieda ら (1995) は、ステロイドホルモンの合成を阻害すると報告されている Aminoglutethimide を産卵鶏に投与することにより、卵殻腺部の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルと卵重量に対する卵殻重量の割合が有意に減少したことから、性ステロイドホルモンが卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> 遺伝子発現を促すような作用で関係していると推察している。このように、ニワトリの卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に対する性ステロイドホルモンによる影響は、必ずしも明確にされていない。

そこで本実験では、最初に、産卵鶏に妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を投与することによって、卵胞発育を促し、それに伴う性ステロイドホルモン分泌の増加が血中 Ca 濃度と卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに与える影響を検討し、次に、排卵周期中において卵殻形成のまだ認められない排卵 2 時間後と卵殻形成の盛んな排卵 10 時間後にそれぞれ性ステロイドホルモンを投与して、それらの投与が卵殻質と卵殻腺部の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに与える影響を検討することにより、産卵鶏の卵殻腺部の CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に性ステロイドホルモンが関与する可能性があるか否かを明らかにしようとした。

## 材料及び方法

### 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 (40 週齢のデカルブ TX-35) である。ニワトリは、日本配合飼料株式会社中央研究所の無窓鶏舎において、点灯管理を午前 5 時とする 14 時間照明 : 10 時間暗黒の照明周期下で、飼料 (産卵鶏用市販飼料 ; 粗蛋白質 17.3%、

代謝エネルギー 2,830 kcal/kg, Ca3.1%, リン 0.6%) と水は、自由摂取させて単飼ケージで飼育した。これらの飼育条件下で、産卵記録を一ヶ月以上記録し、1 クラッチの長さが 7 以上で、かつ、クラッチを比較的正確に繰り返しているニワトリを使用して、次の 2 通りの実験を行った。

### 実験 1 卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに及ぼす PMSG 投与の影響

実験に際し、連産中のニワトリ 40 羽を選び出し、生理的食塩水に溶解した 100 IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin : PMSG ; 帝國臓器製薬株式会社一試験区 20 羽) または生理的食塩水 (対照区 20 羽) を 1 ml の容量で筋肉内に、午前 10 時に 5 日間にわたって毎日投与した。これらのニワトリから、血液を PMSG 投与開始 1 日後から、PMSG 投与の直前に翼下静脈から 5 日間採取した。血液は予めヘパリンで湿らせておいた注射筒を用いて採取し、血漿中 Ca イオン測定用の血液は、ヘパリンと酸化防止のため流動パラフィン油を 0.1 ml 入れておいた小型試験管にできる限り空気に触れないように入れた。その後、30 分以内に遠心分離 (3,000 × g, 10 分間, 4°C) し、血漿を得た。Ca イオン濃度は、血漿を得た後、60 分以内に測定した。他の Ca 濃度とステロイドホルモン測定用の血液は、流動パラフィン油を用いなくて同様に血漿を得、測定までの間、-20°C で凍結保存した。ニワトリは、PMSG または生理的食塩水投与開始後 5 日目の午前 10 時に屠殺し、対照区と試験区それぞれ卵殻腺部の粘膜組織を採取した。屠殺には、試験区では PMSG 投与後 3 日目から放卵が停止し、屠殺時に卵管に卵が認められなかった 10 羽、また対照区は産卵が正常に行われ、屠殺時に卵殻腺部に卵が認められなかった 8 羽のニワトリを供した。粘膜は、採取後速やかに液体窒素で凍結し、その後、測定まで、ディープフリーザー (-20°C) 内で凍結保存し、CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA の測定に供した。

### 実験 2 卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに及ぼす性ステロイドホルモン投与の影響

まだ卵殻形成が認められない排卵 2 時間後または卵殻形成が盛んな排卵 10 時間後に、試験鶏には 1 mg/0.5 ml の濃度でオリーブ油に溶解した E2、テストステロン (T) または P4 を 1 mg/kg 体重の投与量で、また対照鶏には 0.5 ml/kg 体重のオリーブ油をそれぞれ筋肉内投与し、それらの投与 4 時間後に卵殻腺部に存在していた卵の重量、卵殻重量、卵殻中 Ca とマグネシウム (Mg) 含量を測定した。また、卵殻腺部の粘膜組織における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度を測定した。

### 血漿 Ca 濃度の測定

## 1) Ca イオン濃度の測定

血漿 Ca イオン濃度は、血漿を得た後、60 分以内に Ca イオン測定器 (Ca イオンアナライザー, CA<sup>++</sup> 150; (株)常光) で血漿状態のまま測定した。なお、測定の際、流動パラフィンによる測定妨害を避けるため、パストールピペットで血漿のみを保存チューブに移し換え測定を行った。

## 2) 非透過性 Ca 濃度の測定

非透過性 Ca 濃度は、総 Ca 濃度と透過性 Ca 濃度を測定し、総 Ca 濃度から透過性 Ca 濃度を差し引くことにより求めた。すなわち、総 Ca 濃度は、血漿 100  $\mu$ l を小型試験管に採取して原子吸光分析用希釈液で 50 倍希釈した後、原子吸光分光光度計 (Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer; 日立 Z6100 型) で測定した。透過性 Ca 濃度は、血漿を限外濾過用チューブ (セントリカット W-10; 分画分子量 1 万; 倉敷紡績株式会社) に 400  $\mu$ l 入れ、遠心分離 (5,000  $\times$ g, 1 時間, 4 $^{\circ}$ C) して得られた濾液 25  $\mu$ l を原子吸光分析用希釈液で 40 倍希釈した後、原子吸光分光光度計で測定した。

## 血漿性ステロイドホルモン濃度の測定

血漿中の性ステロイドホルモンの測定は、血漿中よりエチルエーテルによりステロイドを抽出後、群馬大学医学部生理活性分析センターより提供された抗血清を用いて、ラジオイムノアッセイにより行った。すなわち、血漿中からのステロイドの抽出はエチルエーテルにより 2 回行い、その乾固物を 1% 牛血清アルブミン (BSA)-0.01 M リン酸緩衝液 (PBS) で測定可能な濃度に希釈した。この希釈溶液 100  $\mu$ l と 0.05 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)-0.01 M PBS で 10,000 または 20,000 倍に希釈した抗血清 100  $\mu$ l と 1% BSA-0.01 M PBS で約 25,000 cpm/100  $\mu$ l となるように希釈した <sup>3</sup>H 標識ステロイドホルモン (104Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) 100  $\mu$ l を入れ、攪拌した後、常温で 20 時間以上培養した。培養後、0.5% チャコール・0.05% デキストラン懸濁液を 200  $\mu$ l 加え、攪拌後、正確に 30 分間、4 $^{\circ}$ C 下で静置した。その後、遠心分離 (3,000  $\times$ g, 15 分, 4 $^{\circ}$ C) して、上澄み 700  $\mu$ l を放射能測定用バイアルに採取し、これに液体シンチレーター (ACS-II, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) を 4 ml 加え、約 10 秒間攪拌し、一日放置した後、液体シンチレーションカウンター (Packard) で放射能を測定した。なお、測定は同一検体について 3 本ずつ行いその平均値を検体の測定値とし、同様にして作成した標準曲線から、性ステロイドホルモン濃度を算出した。

CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA の測定

CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 量の測定は、Leung ら (1988) の方

法に準拠して、山村ら (2001) と同様な方法で、Solution hybridization 法で行なった。組織からの Total RNA の抽出はグアニジンチオシアネート・フェノールクロロホルム法 (AGPC 法) によって行った。Sense RNA と Antisense RNA の作成は、Komm 博士が作成し、島田博士と家田博士から提供された 560 bp の CaBP-D<sub>28K</sub> プローブを用いて行った。

## 卵重量、卵殻重量及び卵殻割合の測定

卵殻腺部から採取した卵の重量を卵重量として、また、採取した卵の卵殻を蒸留水で洗浄し、乾燥させた後の重量を卵殻重量として求めた。卵殻割合は卵殻重量を卵重量で除することによって算出した。

## 卵殻中 Ca と Mg 含量の測定

## 1) Ca の測定

乳鉢で磨砕した卵殻 1 g をるつぼに入れ、600 $^{\circ}$ C で 2 時間炭化したものに 6N 塩酸を 10 ml 加え、約 10 分間放置後、蒸留水を加え、6 倍に希釈した。得られた溶液は、1N 塩酸で 500 倍に希釈し、原子吸光分光光度計で測定した。

## 2) Mg の測定

Mg 測定の場合は Ca 測定の場合と同様にして炭化した卵殻に 1N 塩酸を 20 ml 加え、約 10 分間放置した。得られた溶液は、蒸留水で 50 倍に希釈し、原子吸光分光光度計で測定した。なお、測定値は Ca の場合も Mg の場合も 1 個当たりに換算して表した。

## 統計処理

F 検定により有意差が認められたとき、多重間の差の検定は Duncan's new multiple range test で行い、2 つの平均値間の差の検定は Student's t-test で行った。

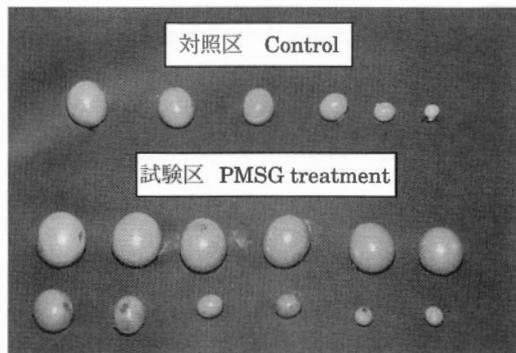


図 1. 卵胞発育におよぼす妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 投与の影響

Fig. 1. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection on follicular growth.

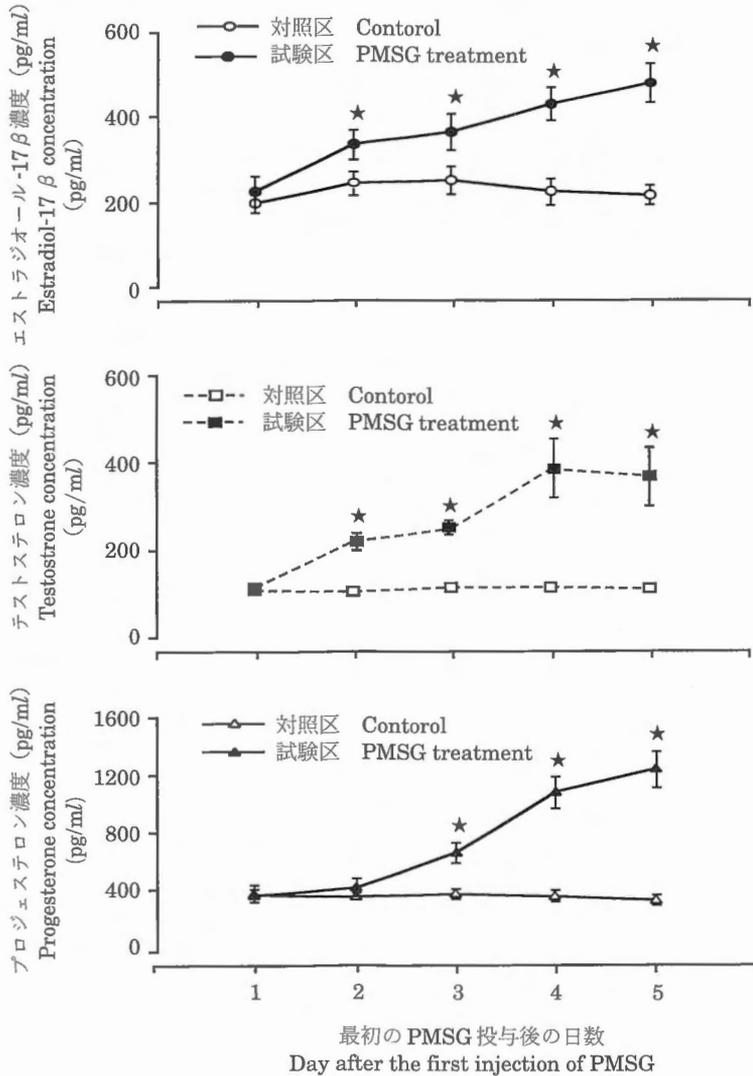


図 2. 血漿中のエストラジオール-17β (E2), テストステロン (T) 及びプロジェステロン (P4) 濃度に及ぼす妊馬血清刺激ホルモン (PMSG) 投与の影響

Fig. 2. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection on plasma concentrations of estradiol-17β (E2), testosterone (T) and progesterone (P4).

PMSG は毎日 1 羽当たり 100 IU の投与量で筋肉内に 5 日間投与した。

PMSG was injected intramuscularly for 5 days with a dose of 100 IU daily.

各点は 8~10 羽の平均値±標準誤差。

Each point is mean±SE of 8~10 hens.

\*対照区に対して 5% 水準で有意差あり (t-検定).

\*P < 0.05 versus each control (t-test).

結 果

卵殻腺部における CaBP-D<sub>28k</sub> mRNA レベルに及ぼす PMSG 投与の影響

産卵しているニワトリに 100 IU の投与量で PMSG を筋肉内に毎日 5 日間連続して投与することによって、投与した 20 羽の中で、最初の投与 2 日後から 4 羽、3 日後から 13 羽、4 日後から 3 羽において、それぞれ産卵が停

止した。本実験では、PMSGまたは生理的食塩水を投与の1日後から5日間にわたって血漿中のCa濃度と性ステロイドホルモン濃度を測定すると共に、投与5日後において卵殻腺部の粘膜組織におけるCaBP-D<sub>28K</sub> mRNA濃度を測定した。その結果、PMSGを投与したニワトリは、図1に示したように、対照として生理的食塩水を投与したニワトリに比べて、卵巣中に発育した大きな卵胞が数多く認められた。対照鶏における最大卵胞の直径が平均3.62cmであるのに対し、PMSG投与鶏におけるそ

れは平均3.97cmと、最大卵胞の直径はPMSG投与鶏の方が対照鶏に比べて有意に大きかった ( $P < 0.05$ )。

PMSG投与により、血漿T濃度とE2濃度は投与2日後から、血漿P4濃度は投与3日後から、それぞれ対照鶏に比べて有意に高くなり ( $P < 0.05$ )、その後も増加した (図2)。

図3に示されるように、PMSG投与鶏の非透過性Ca濃度は、投与2日目において対照鶏のそれに比べて有意に高い値が認められた ( $P < 0.05$ ) が、その他の時期では

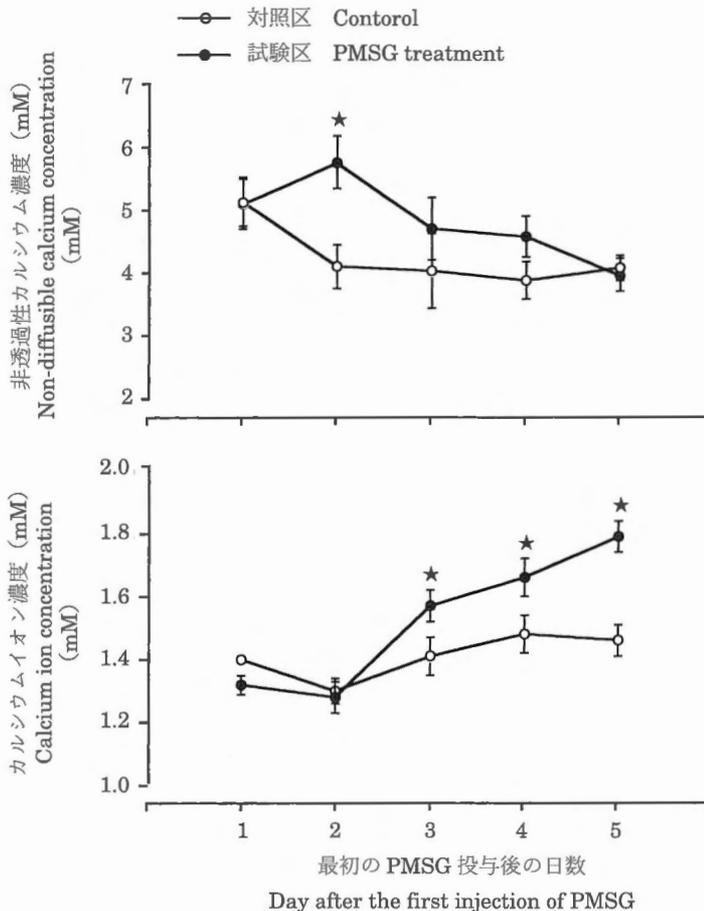


図3. 血漿中の非透過性カルシウム濃度とカルシウムイオン濃度に及ぼす妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 投与の影響

Fig. 3. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection on plasma concentrations of non-diffusible calcium and calcium ion

PMSGは毎日1羽当たり100IUの投与量で筋肉内に5日間投与した。

PMSG was injected intramuscularly for 5 days with a dose of 100 IU daily.

各点は8~10羽の平均値±標準誤差。

Each point is mean ± SE of 8~10 hens.

\*対照区に対して5%水準で有意差あり (t-検定)

\* $P < 0.05$  versus each control (t-test).

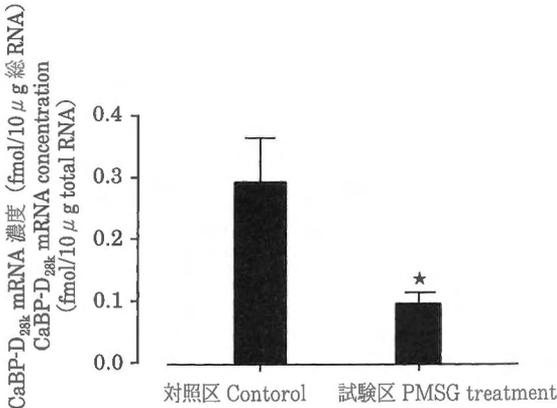


図 4. 卵殻腺部におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D<sub>28K</sub>) mRNA 濃度に及ぼす妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) 投与の影響

Fig. 4. Effect of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) injection on mRNA concentration of calcium-binding protein (CaBP-D<sub>28K</sub>) in the shell gland.

PMSG は毎日 1 羽当たり 100 の投与量で筋肉内に 5 日間投与した。最後の投与の 24 時間後に卵殻腺部中のカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D<sub>28K</sub>) mRNA を測定した。PMSG was injected intramuscularly for 5 days with a dose of 100 IU daily. 24 hr after the last injection CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA in th shell gland was measured. 各棒は 8~10 羽の平均値±標準誤差。

Each bar is mean±SE of 8~10 hens. \* 対照区に対して 5% 水準で有意差あり (t- 検定)。

\* P<0.05 versus each control (t-test).

有意な差は見られなかった (P>0.05)。これに対して、血漿 Ca イオン濃度は、PMSG 投与により産卵が停止した投与 3 日目後から PMSG 投与鶏において対照鶏に比べて有意に高くなり、その後も少しずつ増加した (P<0.05)。

卵殻腺部の粘膜組織における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度は、PMSG の投与により有意な減少が認められた (P<0.05) (図 4)。

#### 卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA レベルに及ぼす性ステロイドホルモン投与の影響

卵殻腺部内に存在していた卵の重量は、排卵 2 時間後の投与の場合に比べ、排卵 10 時間後の投与の場合の方が有意に高い値を示した (P<0.05)。しかし、いずれの時期に投与した場合においても性ステロイドホルモン投与による卵重量への影響は認められなかった (図 5)。

卵殻重量と卵殻重量を卵重量で除して算出した卵殻割合は、いずれも排卵 2 時間後の投与の場合に比べ、排卵 10 時間後の投与の場合の方が有意に高い値であった。それらに対する性ステロイドホルモン投与の影響は排卵 2 時間後の投与の場合においては認められなかったが、排卵 10 時間後の投与の場合においては P4 投与のみにおいて対照に比べ、有意に低い値を示した (P<0.05) (図 5)。

卵殻中 Ca 含量と Mg 含量は共に、排卵 2 時間後の場合と比べ、排卵 10 時間後の場合の方が有意に高い値であった。性ステロイドホルモンの投与によって、排卵 10 時間後の P4 においてのみ対照に比べ、有意に低い値が認められた (P<0.05) (図 6)。

卵殻腺部から採取した粘膜組織の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度を solution hybridization RNase protection 法で測定した結果、排卵 2 時間後の投与の場合に比べ、排卵 10 時間後の投与の場合の方が有意に高い値であった。また、CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度は、性ステロイドホルモンの投与によって、排卵 2 時間後の投与においては影響は認められなかったが、排卵 10 時間後の投与においては P4 投与によって有意な減少が認められた (図 7)。

## 考 察

Ca 結合タンパク質である CaBP-D<sub>28K</sub> の腸管における遺伝子発現は、主に活性型ビタミン D<sub>3</sub> により誘導されることは知られているが、卵殻腺部におけるその遺伝子発現制御機構はまだ十分には明らかにされていない。そこで本実験では、最初に、卵胞発育を刺激して性ステロイドホルモンの分泌を促すことが知られている妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を投与することにより、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に影響を受けるかどうかを検討することによって、性ステロイドホルモンが CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に関与する可能性があるかどうかを明らかにしようとした。

PMSG を投与したニワトリは、対照として生理的食塩水を投与したニワトリに比べて、卵巣中に発育した大きな卵胞が数多く認められ、最大卵胞の直径は、対照鶏に比べて試験鶏の方が有意に大きく、本実験の投与方法で PMSG によって卵胞の発育が刺激されることが確認された。さらに、血漿中 T と E2 濃度は投与 2 日後から、P4 濃度は投与 3 日後から、それぞれ対照鶏に比べて有意に高くなり、その後も増加することが見出された。これらの血中濃度の結果は、卵胞発育の発育初期には T と E2 の分泌が、卵胞が発育して成熟すると P4 の分泌が多くなるとの報告 (Haung *et al.*, 1979; Scanes and Fagioli, 1980; Hammond *et al.*, 1981; Robinson *et al.*,

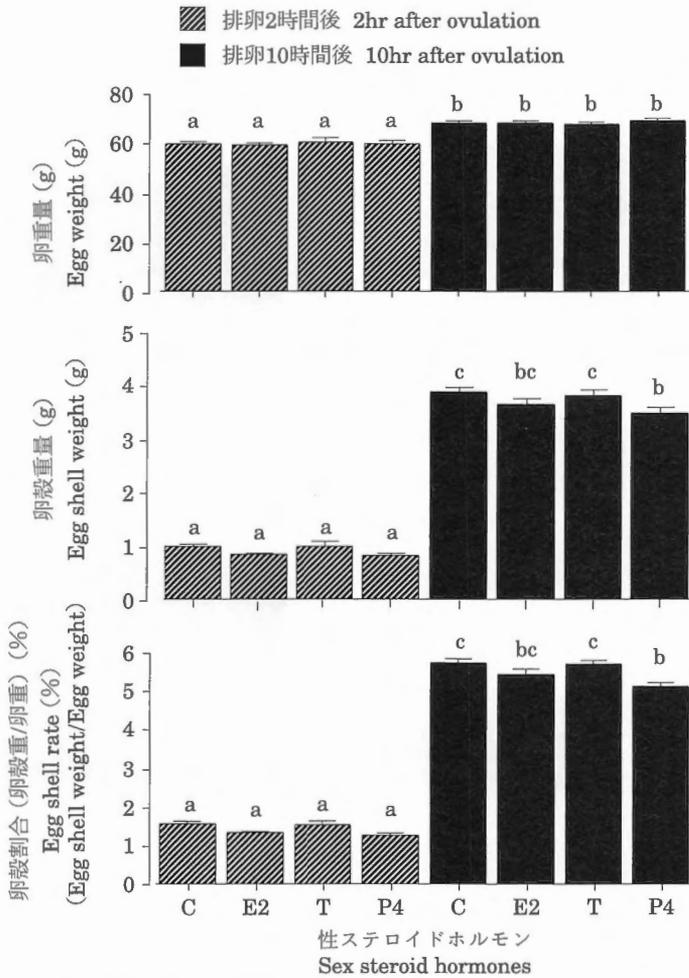


図 5. 卵重量、卵殻重量及び卵殻割合に及ぼす性ステロイドホルモン投与の影響

Fig. 5. Effect of sex steroid hormone injection on egg weight, egg shell weight and egg shell rate

オリーブ油 (対照) と性ステロイドホルモン (1 mg/kg 体重) を排卵 2 時間後または排卵 10 時間後に筋肉内投与し、投与 4 時間後に卵重量、卵殻重量と卵殻割合 (卵殻重量/卵重量) を測定した。

Olive oil (control) and sex steroid hormones (1 mg/kg BW) were injected intramuscularly 2 or 10 hr after the ovulation, and 4 hr after the injection egg weight, egg shell weight and egg shell rate (egg shell weight/egg weight) were measured.

C: オリーブ油. C: Olive oil.

E2: エストラジオール-17β. E2: Estradiol-17β.

T: テストステロン. T: Testosterone.

P4: プロジェステロン. P4: Progesterone.

各棒は 8~10 羽の平均値±標準誤差.

Each bar is mean±SE of 8~10 hens.

異符号間で 5% 水準で有意差あり.

Different alphabetical superscripts indicate significant difference (P<0.05).

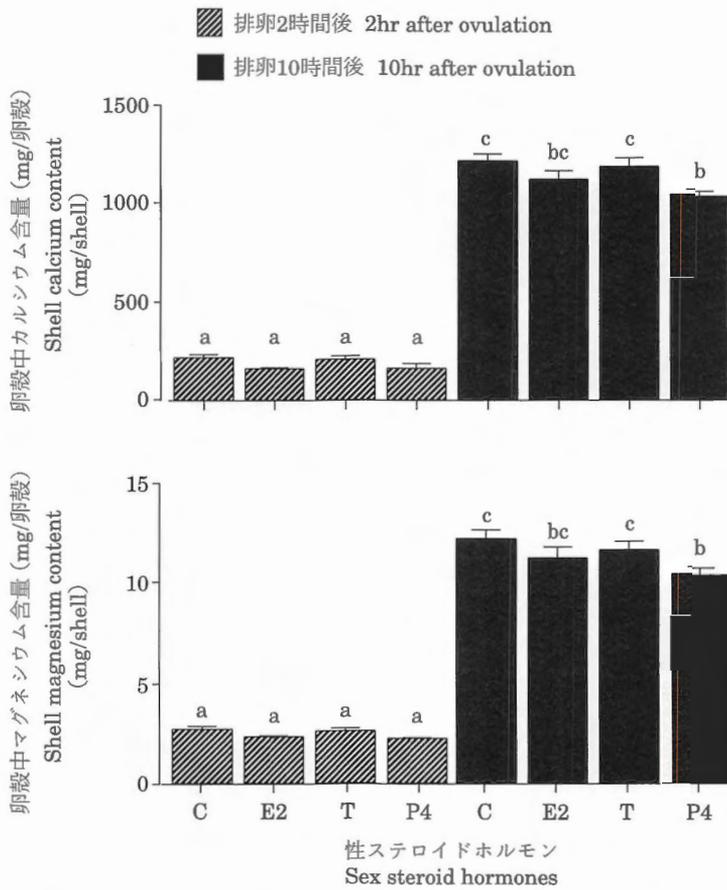


図 6. 卵殻中のカルシウム含量とマグネシウム含量に及ぼす性ステロイドホルモン投与の影響

Fig. 6. Effect of sex steroid hormone injection on concentrations of calcium and magnesium in the egg shell

オリーブ油 (対照) と性ステロイドホルモン (1 mg/kg 体重) を排卵 2 時間後または排卵 10 時間後に筋肉内投与し、投与 4 時間後に卵殻中のカルシウム含量とマグネシウム含量を測定した。

Olive oil (control) and sex steroid hormones (1 mg/kg BW) were injected intramuscularly 2 or 10 hr after the ovulation, and 4 hr after the injections and the contents of calcium and magnesium in the egg shell were measured.

C: オリーブ油

C: Olive oil.

E2: エストラジオール-17β

E2: Estradiol-17β.

T: テストステロン

T: Testosterone.

P4: プロジェステロン

P4: Progesterone.

各棒は 8~10 羽の平均値±標準誤差。

Each bar is mean±SE of 8~10 hens.

異符号間で 5% 水準で有意差あり。

Different alphabetical superscripts indicate significant difference (P < 0.05).

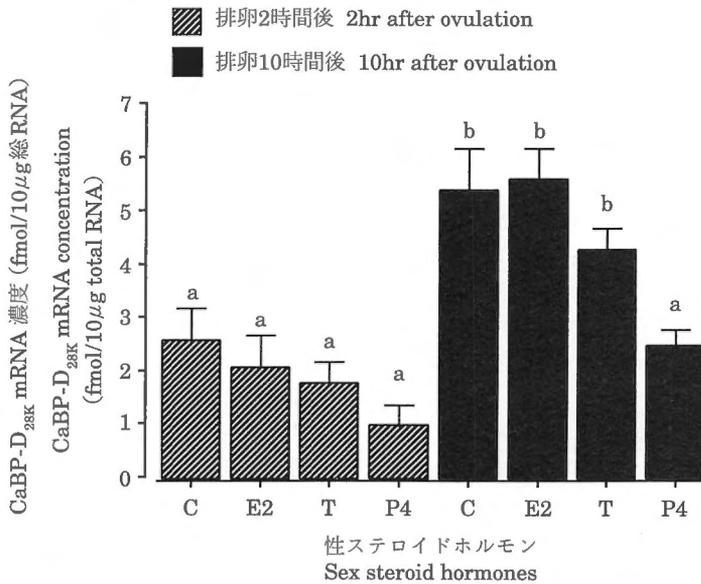


図 7. 卵殻腺部におけるカルシウム結合蛋白質 mRNA (CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA) 濃度及び性ステロイドホルモン投与の影響

Fig. 7. Effect of sex steroid hormone injection on the concentration of calcium binding protein (CaBP-D<sub>28K</sub>) mRNA in the shell gland

オリーブ油 (対照) 及び性ステロイドホルモン (1 mg/kg 体重) を排卵 2 時間後または排卵 10 時間後に筋肉内投与し、投与 4 時間後に卵殻腺部中におけるカルシウム結合蛋白質 mRNA (CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA) 濃度を測定した。

Olive oil (control) and sex steroid hormones were injected intramuscularly 2 or 10 hr after the ovulation, and 4 hr after the injections and the concentrations of calcium-binding protein (CaBP-D<sub>28K</sub>) mRNA in the shell gland were measured.

C: オリーブ油

C: Olive oil.

E2: エストラジオール-17 $\beta$

E2: Estradiol-17 $\beta$ .

T: テストステロン

T: Testosterone.

P4: プロジェステロン

P4: Progesterone.

各棒は 8~10 羽の平均値±標準誤差。

Each bar is mean±SE of 8~10 hens.

異符号間で 5% 水準で有意差あり。

Different alphabetical superscripts indicate significant difference (P<0.05).

1988) から推察すると、PMSG の投与によって卵胞発育が刺激され、その結果として T と E2 の分泌が増加し、その後さらに卵胞が発育することにより発育した卵胞において P4 の分泌が増加したことを反映しているものと思われる。

血漿中の Ca イオン濃度は、PMSG 投与により産卵の停止した投与 3 日後から対照鶏に比べて有意に高くなり、その後も少しずつ増加したことから、PMSG の投与

により排卵が停止したため、卵殻腺部での卵殻形成が行われなくなり、卵殻形成に要する Ca 需要がなくなった結果として、血液中の Ca イオン濃度が増加したと推察される。これに対し、血漿中の非透過性 Ca イオン濃度は、PMSG 投与により対照鶏に比べて投与 2 日後に有意に高い値が認められたが、その他の時期では有意な差は認められなかった。このことは、PMSG の投与により投与 2 日後から分泌が促進された E2 により肝臓での卵黄

前駆物質の生産が刺激された結果、卵黄前駆物質に結合した Ca すなわち非透過性 Ca の血中濃度が増加したものと考えられる。また、非透過性 Ca 濃度の増加は、PMSG 投与による卵胞発育の刺激の程度が少ない投与 2 日後には血中濃度に反映しているが、その後卵胞発育がさらに刺激され卵胞に取り込まれる卵黄前駆物質の量が多くなると同時に非透過性 Ca の卵胞への取り込み量も多くなったものと考えられる。その結果として、PMSG 投与 3 日以降において PMSG 投与により血中非透過性 Ca 濃度が増加しているにも関わらず、見かけ上は対照鶏と差のない結果として現れているのではないかと考えられる。

未成熟なニワトリでは、卵殻腺部において性ステロイドホルモン、特にエストロジェンが CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現を誘起することが報告されている (Corradino, 1993; Nys *et al.*, 1992; Nys *et al.*, 1989; Corradino and Alaimo, 1994; Navickis *et al.*, 1979)。これに対して、Bar ら (1996) は産卵鶏への E2 投与によって卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現に影響は認められなかったが、P4 投与により卵管における卵の滞留時間が延長されたにもかかわらず卵殻への Ca 沈着と CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度が減少したことから、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現は E2 によっては影響されず、卵殻形成と関連した刺激因子と P4 による抑制因子によって制御されていると報告している。この産卵鶏における報告と本実験において産卵鶏に PMSG を投与することによって性ステロイドホルモンの血中濃度が増加したにも関わらず、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度が減少したことを考え合わせると、卵管が機能化している産卵鶏の卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> 遺伝子発現は、性ステロイドホルモンによって、刺激されるよりはむしろ抑制されている可能性が高いと推察される。

そこで、次に、後藤ら (1998) により確認されている排卵周期中における卵殻腺部の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度の変動の様相に基づいて、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度が未だ卵殻形成が行われず低い排卵 2 時間後と卵殻形成が盛んで高い排卵 10 時間後に性ステロイドホルモンを投与し、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> の遺伝子発現と卵殻質に及ぼす影響を検討した。

その結果、投与 4 時間後に、卵殻腺部に存在していた卵の重量は、排卵 2 時間後の投与の場合に比べ、卵殻形成が進んでいる排卵 10 時間後の投与の場合の方が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ ) が、いずれの投与時期においても性ステロイドホルモンによる影響は認められなかったことから、性ステロイドホルモンは少なくとも 4

時間という短時間では卵重量には影響を与えないと思われる。卵殻重量と卵殻割合、卵殻中 Ca 含量と Mg 含量は、いずれも排卵 2 時間後の投与の場合に比べ、排卵 10 時間後の投与の場合の方が有意に高い値を示した。これは、排卵 2 時間後から試料採取をした排卵 6 時間後までの期間は、卵殻形成が開始されたばかりで卵殻形成が盛んではないのに対し、排卵 10 時間後から試料採取をした排卵 14 時間後までの期間は、卵殻形成が盛んに行われているため、卵殻重量、卵殻割合、卵殻中 Ca と Mg 含量が排卵 2 時間後の投与の場合に比べて排卵 10 時間後の投与の場合の方が高い値を示したと考えられる。また、卵殻重量と卵殻割合、卵殻中 Ca 含量と Mg 含量は、いずれも投与した 3 種類の性ステロイドホルモンのうち、排卵 10 時間後の P4 投与の場合においてのみ、対照に比べ、有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ )。このことは、卵殻形成が盛んな時期においては、P4 が卵殻への Ca 沈着を抑制する可能性を示唆している。さらに、卵殻腺部から採取した粘膜組織の CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度においても、排卵 2 時間後の投与の場合では、性ステロイドホルモンによる影響は認められず、排卵 10 時間後の投与の場合では P4 を投与した場合においてのみ有意な減少が認められ ( $P < 0.05$ )、しかもその減少した値は卵殻形成初期でまだ卵殻への Ca 沈着が余り盛んでない排卵 6 時間後における値 (後藤ら 1998) と同じ位であった。これらの結果は、少なくとも卵殻形成が盛んな排卵 10 時間後から 14 時間後の時期においては P4 が卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度を抑制する可能性を示している。これらのことと、後藤ら (1998) によって、ニワトリの排卵周期中において、卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度は、排卵された卵が卵殻腺部に入り卵殻形成が始まると急激に増加し、その後は高い値が維持された後、放卵 4~5 時間前から放卵時にかけて急激に減少することが見出されていること、及び CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度が減少するこの時期には血中における P4 濃度が著しく増加する (Johnson, 1990) ことから、卵管が機能化している産卵鶏においては、P4 が卵殻腺部における CaBP-D<sub>28K</sub> 遺伝子発現を抑制し、この P4 の作用によって卵殻形成の末期に CaBP-D<sub>28K</sub> 濃度が減少し、卵殻への Ca 沈着が減少して、卵殻形成が終了してして放卵に至るのであろうと推察される。

すでに述べたように、P4 を排卵 2 時間後に投与した場合には CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度に影響は認められず、排卵 10 時間後に投与した場合には CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度の減少が認められたことは、投与の時期の相違により P4 が CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA 濃度に与える影響が異なることを示している。この投与時期の相違により影響が異

なる理由は、本実験の結果からでは明らかではないが、

以上のように、本実験の結果から、卵管が機能化した産卵鶏においては、卵殻腺部におけるCaBP-D<sub>28K</sub>遺伝子発現は、性ステロイドホルモンにより刺激される可能性は少なく、むしろP4により抑制され、結果として卵殻へのCa沈着が抑制されると推察される。

## 謝 辞

実験遂行にあたり懇意なる御指導を賜り、CaBP-D<sub>28K</sub>cDNAをご提供頂いた名古屋大学農学部教授島田清司博士及び家田照子博士に深く感謝の意を表します。また、性ステロイドホルモンの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及び終始実験に協力戴いた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所員一同に感謝いたします。

## 引用文献

- Bar A, Dubrov, Eisner U and Hurwitz S. Calcium-binding protein and kidney 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in turkey poults. *Journal of Nutrition*, 108 : 1501-1507. 1978.
- Bar A, Rosenberg J and Hurwitz S. The lack of relationships between vitamin D<sub>3</sub> metabolites and calcium-binding protein in the eggshell gland of laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78B : 75-79. 1984.
- Bar A, Striem H, Mayel-Afshar S and Lawson DEM. Differential regulation of calbindin-D<sub>28K</sub> mRNA in the intestine and eggshell gland of the laying hen. *Journal of Endocrinology*, 4 : 93-99. 1990.
- Bar A, Vax E, Hunziker W, Halevy O and Striem S. The role of gonadal hormones in gene expression of calbindin in the laying hen. *General and Comparative Endocrinology*, 103 : 115-122. 1996.
- Corradino RA and Fullmer CS. Positive transcriptional regulation of intestinal calbindin-D<sub>28K</sub> gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and glucocorticoids. *Endocrinology*, 128 : 944-950. 1991.
- Corradino RA, Smith CA, Krook LP and Fullmer CS. Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D<sub>28K</sub> biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology*, 132 : 193-198. 1993.
- Corradino RA. Calbindin D<sub>28K</sub> regulation in precociously matured chick egg shell gland *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 91 : 158-166. 1993.
- Corradino RA and Alaimo J. *In vitro* regulation of calbindin D<sub>28K</sub> mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and estradiol in precociously-matured egg shell gland from vitamin D<sub>3</sub>-depleted chicks. *Hormone & Metabolic Research*, 27 : 39-40. 1994.
- 後藤尚也・高橋大三・田上雅之・亀岡絵都子・山村奈美子・武石 勝・上吉道治. 十二指腸と卵管子宮部におけるカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D<sub>28K</sub>) mRNA 発現及び血中カルシウム濃度のニワトリ排卵周期中の変動. *東海畜産学会報*, 9 : 1-5. 1998.
- Hammond RW, Burke WH and Hertelendy F. Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey ovine gonadotropins. *Biology of Reproduction*, 24 : 1045-1055. 1981.
- Huang ESR, Kao KJ and Nalbandov AV. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biology of Reproduction*, 20 : 451-461. 1979.
- Ieda T, Saito N and Shimada K. Effects of Aminoglutethimide on Levels of Messenger Ribonucleic Acid of CaBP-D<sub>28K</sub> and of Vitamin D<sub>3</sub> Receptor in the Shell Gland of Laying Hen. *Japanese Poultry Science*, 35 : 346-355. 1998.
- Johnson ALL. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2 : 319-346. 1990.
- Leung K, Kim KE, Maurer RA and Landefeld TD. Divergent changes in the concentrations of gonadotropin beta-subunit messenger Ribonucleic acid during the estrous cycle of sheep. *Molecular Endocrinology*, 2 : 272-276. 1988.
- Lundholm CE. Increased eggshell thickness in domestic fowls after administration of the anti-progesterone RU 38486 (Mifepristone). *Pharmacology and Toxicology*, 67 : 185-187. 1990.
- Navickis RJ, Katzenellenbogen BS and Nalbandov AV. Effects of the sex steroid hormones and vitamin D<sub>3</sub> on calcium-binding proteins in the chick shell gland. *Biology of Reproduction*, 21 : 1153-1162. 1979.
- Nys Y, N'Guyen TM, Williams J and Etches RJ. Blood levels of ionized calcium, inorganic phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol and gonadal hormones in hens laying hard-shelled or shell-less eggs. *Journal of Endocrinology*, 111 : 151-157. 1986.
- Nys Y, Mayel-Afshar, Bouillon R, Van Baelen H and Lawson DEM. Increases in calbindin D<sub>28K</sub> mRNA in the uterus of the domestic fowl induced by sexual maturity and shell formation. *General and Comparative Endocrinology*, 76 : 322-329. 1989.
- Nys Y, Baker K, Bouillon R, Van Baelen H, and Lawson DEM. Regulation of calbindin D<sub>28K</sub> and its mRNA in the intestine of the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology*, 86 : 460-468. 1992.
- Robinson FE, Etches RJ, Anderson LC, Burke WH, Cheng KW, Cunningham FJ, Ishii S, Sharp PJ and

- Talbot RT. Steroidogenic relationships of gonadotropin hormones in the hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 69 : 455-466. 1988.
- Scanes CG and Fagioli JH. Effects of mammalian and avian gonadotropins on in vitro Progesterone production by avian ovarian granulosa cells. *General Comparative Endocrinology*, 41 : 1-7. 1980.
- Striem S and Bar A. Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin(Mr 28000) gene expression by vitamin D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 75 : 169-177. 1991.
- 山村奈美子・水谷哲也・岩澤 淳・中島邦夫・田中実・土井 守・上吉道治. ニワトリの排卵日と無排卵日における下垂体前葉中の黄体形成ホルモンβ subunit とプロラクチンの mRNA レベルの変動. *日本家禽学会誌*, 38 : J36-J46. 2001.

## Effect of Sex Steroid Hormone on Gene Expression of Calcium-Binding Protein (CaBP-D<sub>28K</sub>) in the Shell Gland

Hisaya Goto<sup>1)</sup>, Masayuki Tagami<sup>1)</sup>, Saeko Ina<sup>2)</sup>,  
Nakayo Arakawa<sup>2)</sup>, Namiko Yamamura<sup>2)</sup>,  
Masaru Takeishi<sup>1)</sup> and Michiharu Kamiyoshi<sup>2)</sup>

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

<sup>2)</sup> The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

It is known well that calcium-binding protein (CaBP-D<sub>28K</sub>) participates into calcium (Ca) absorption from the intestine and Ca deposition in the shell gland of the oviduct. It is evident that the gene expression of peptide, CaBP-D<sub>28K</sub> is controlled by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the intestine. On the other hand, the gene expression in the shell gland remains to be clear. The purpose of the study was to examine effects of sex steroid hormones, known to modify the function of the oviduct, on the CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA levels in the shell gland.

In the first experiment, changes in the CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA levels in the shell gland was examined while sex steroid hormone was increased following 5-day administration of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) to laying hens. The blood progesterone (P4) concentrations on 3 days after the 1st injection, and estradiol-17 $\beta$  (E2) and testosterone (T) concentrations on 2 days after the 1st injection significantly increased in the PMSG-treated hens compared with those in control hens. The blood Ca ion concentrations on 3 days after the 1st injection when oviposition stopped significantly increased in the PMSG-treated hens compared with that in the control hens. The blood non-diffusible Ca concentrations on 2 days after the 1st injection significantly increased in the PMSG-treated hens compared with that in the control, but did not significantly change on the other days. The CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA concentrations in the shell gland significantly decreased at 24 hours after the fifth administration of PMSG. These results demonstrated there was less possibility of sex steroid hormone-stimulated gene expression of CaBP-D<sub>28K</sub> in the shell gland.

In the second experiment, changes in the CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA concentrations in the shell gland was examined after administration of E2, T, and P4 at 2 and 10 hours after ovulation when the CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA levels are low and high, respectively. The sex steroid hormones produced no significant change in the egg weight at both times of administration. The administration of P4 at 10 hours after ovulation significantly decreased in the shell weight, the ratio of shell, and the shell Ca and Magnesium contents compared with the control hens. The CaBP-D<sub>28K</sub> mRNA concentrations were significantly decreased following the administration of P4 at 10 hours after ovulation. These results demonstrated that E2 and T did not affect on shell formation at an early phase of the ovulatory cycle, and P4 probably inhibited shell formation at mature

phase.

In conclusion, the sex steroid hormones were suggested not inducing gene expression of CaBP-D<sub>28K</sub> in the shell gland.

*(Japanese Poultry Science, 39 : J11-J24, 2002)*

**Key word** : calcium-binding protein, gene expression, sex steroid hormone, shell gland, chicken