

卵殻形成における血漿カルシウム濃度と卵殻腺部のカルシウム結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) mRNA の発現

後藤尚也¹⁾・田上雅之¹⁾・水野雅司²⁾・亀岡絵都子³⁾・武石 勝¹⁾
山村奈美子³⁾・土井 守³⁾・上吉道治³⁾

¹⁾ 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

²⁾ 日清食品株式会社中央研究所, 滋賀県草津市野路町 2247, 525-0055

³⁾ 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

ニワトリの卵管の卵殻腺部におけるカルシウム (Ca) 沈着に Ca 結合蛋白質 (CaBP-D_{28K}) が関与していることは良く知られている。しかし, CaBP-D_{28K} の遺伝子発現とカルシウムとの関連についての報告は少ない。そこで, 本実験では, 卵殻形成との関連において, 最初に, 血漿 Ca 濃度を測定し, 次に, 血漿 Ca イオン濃度と十二指腸及び卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度を測定した。

産卵鶏と休産鶏において, 24 時間にわたり 2 時間毎に血漿 Ca 濃度を測定したところ, 産卵鶏においては, 血漿総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度は, 排卵 14~16 時間後に相当する 20~22 時にピークが認められた。一方, 血漿 Ca イオン濃度は, 排卵 4 時間後から 6 時間後に相当する 10~12 時にかけて有意に増加し, 排卵 6 時間後において最も高い値を示した後, 排卵 10 時間後にかけて急激に減少し, その低い濃度が排卵 16 時間後まで維持された後, 次の放卵時まで徐々に増加した。休産鶏においては, 何れの血漿 Ca 濃度についても有意な変動は認められなかった。また, プロスタグランジン F_{2α} を投与して放卵を誘起することにより, 血漿 Ca イオン濃度の低下は認められなくなり, さらに, アミノグルテチミドを投与してステロイドホルモンの合成を抑制することにより, 血漿総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度のピークは認められなくなった。血漿 Ca イオン濃度と共に CaBP-D_{28K} mRNA を測定した実験において, 卵殻への Ca 蓄積は, 排卵 4~5 時間後から始まり, 最初の 3 時間は少なかったが, その後はほぼ一定の割合で行われ, 放卵前に減少した。血漿 Ca イオン濃度は前述の結果と同様な変動が認められたが, この血漿 Ca イオン濃度の変動の様相とは逆に, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は, 排卵 4~5 時間後に最も低い値を示した後, 排卵 13~14 時間後まで徐々に増加し, その高い値が排卵 19~20 時間後まで維持された後, 次の放卵にかけて有意に減少した。これに対して, 十二指腸における CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は, 排卵周期中で有意な変動は認められなかった。以上の結果から, 血中 Ca イオン濃度は卵殻への Ca 蓄積と関連して変動し, 血中非透過性 Ca 濃度はステロイドホルモンにより影響を受けることが明らかとなった。また, 卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA 発現は, 卵殻への Ca 蓄積のみならず, それと関連した血中 Ca イオン濃度とも関連している可能性が示唆された。

キーワード: カルシウム結合蛋白質, 遺伝子発現, プロスタグランジン F_{2α}, アミノグルテチミド, カルシウムイオン

緒 言

2001 年 9 月 27 日受付 2001 年 11 月 21 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

ニワトリの排卵周期は約 1 日であるが, この周期において, 卵管の漏斗部に排卵された卵は, 膨大部で卵白, 峡部で卵殻膜, 卵殻腺部 (子宮部) で卵殻が形成され, 完成した卵として約 1 日後に卵殻腺部から膣部を介して放卵される。そして, 次の卵が排卵される。Warren と Scott (1935) によると, 卵管内の各部位に卵が滞留する

時間は、漏斗部に 18 分、膨大部に 2 時間 54 分、峽部に 1 時間 14 分、卵殻腺部に 20 時間 40 分である。卵殻腺部で形成される卵殻は 5~6 g であるが、その主成分は CaCO_3 である。従って、一個の卵を産むのに要するカルシウム (Ca) は約 2.0~2.4 g である。この Ca は、飼料から摂取した Ca と鳥類において発達している Ca を貯蔵する機能を有する骨髄骨から供給されている (Driggers and Comar, 1949; Mueller *et al.*, 1964)。

血中における Ca は、蛋白質と結合した蛋白結合 Ca、イオン化した Ca イオンおよび無機物と化合物を形成した Ca 化合物として存在しているが、大部分は蛋白結合 Ca と Ca イオンであり、これらで血中全 Ca の 98% 近くを占めている (Copp *et al.*, 1969)。卵殻に Ca が蓄積することから、卵殻への Ca 蓄積との関連で、血中における総 Ca 濃度 (Hodges, 1969; Luck and Scanes, 1979; Parson and Combs, 1981; Nys *et al.*, 1986a; Kolling *et al.*, 1992)、非透過性 Ca 濃度 (Paul and Snetsinger, 1969; Mueller *et al.*, 1973; Nys *et al.*, 1986b) 及び Ca イオン濃度 (Luck and Scanes, 1979; Parsons and Combs, 1981; Nys *et al.*, 1986a; Singh *et al.*, 1986) の変動の様相が報告されている。しかし、非透過性 Ca 濃度が卵殻形成と関連しているか否か、また Ca イオン濃度が卵殻形成以外のステロイドホルモンにより影響をうけているか否かは、まだ明確にされていない。

飼料からの Ca は主に小腸から吸収されるが、小腸での Ca 吸収能は十二指腸、空腸、回腸の順で低くなり、この順位と同じ様な関係で Ca 結合蛋白質 (CaBP- D_{28K}) 濃度が低くなる (Taylor and Wasserman, 1967) ことなどから、今日では小腸における Ca 吸収は CaBP- D_{28K} を介し、しかもこの蛋白質の合成に関与する mRNA の発現は活性型ビタミン D によって調整されている (Corradino and Fullmer, 1991; Nys *et al.*, 1992) ことが知られている。一方、卵殻形成部位である卵管の卵殻腺部においても、腸管と同じ CaBP- D_{28K} が存在し (Corradino *et al.*, 1968)、しかもこの蛋白量と CaBP- D_{28K} mRNA 濃度が卵殻形成との関連で変動する (Nys *et al.*, 1989; Striem and Bar, 1991; Bar *et al.*, 1992; Ieda *et al.*, 1995) ことから、卵殻腺部における卵殻への Ca 蓄積においても CaBP- D_{28K} が関与していると考えられている。しかし、卵殻腺部における CaBP- D_{28K} mRNA の発現機構は、必ずしも十分に明らかにされていない。

以上のことから、本実験では、最初に、血漿総 Ca 濃度、非透過性 Ca 濃度及び Ca イオン濃度を排卵周期中の産卵鶏と休産鶏において一日の各時期に測定し、さらにプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF 2α) 投与による放卵誘

起とアミノグルテチミド (AGT) 投与によるステロイド合成抑制が排卵周期中における血漿カルシウム濃度に与える影響を検討した。次に、卵殻への Ca 蓄積との関連で、血漿 Ca イオン濃度と十二指腸及び卵殻腺部における CaBP- D_{28K} mRNA 濃度を測定した。

材料及び方法

本実験では、大きく分けて 2 種類の実験を試みたが、それらの実験に使用した供試鶏と試料の採取は次の通りである。

実験 1 卵殻形成における血漿 Ca 濃度 供試鶏

この実験 1 では、3 種類の実験を行ったが、これらの実験に使用した供試鶏は何れも岐阜大学農学部動物環境飼育室で飼育した白色レグホーン種 (ハイラインマリア) である。ニワトリは点灯開始を午前 5 時とする 14 時間照明 10 時間暗黒の明暗周期下で、単飼ケージ内で飼育し、成鶏用飼料 (Ca 含量 2.75% 以上、P 含量 0.55% 以上) と水は自由に摂取させた。産卵鶏においては、実験に先立ち、最低 2 週間以上の産卵記録をとり、1 クラッチの長さが 4 から 6 であり、クラッチ間の休産日が 1 日で、しかも同じような連産を 2 回以上繰り返したニワトリ (体重 1.6~2.2 kg, 18~24 カ月齢) を使用した。また、一部の実験で休産鶏を使用した。休産鶏については、予備実験で 3 日間の絶食絶水処理を行ったところ、処理開始から 1 週間は産卵せず、しかも処理 1 週間後における卵巣重量が 9 g 以下、卵管重量が 19 g 以下であったことから、同じような処理を行い、処理 1 週間のニワトリ (体重 1.2~1.8 kg, 18~24 カ月齢) を休産鶏として使用した。実験 1 における血液採取は、ストレスをできる限り少なくするため、採血開始の前日にカニューレを装着し、カニューレを介して、翼下静脈よりヘパリン溶液で湿らせておいた注射筒を用いて行った。採取した血液は、ヘパリン溶液で湿らせ、流動パラフィン (和光純薬工業株式会社特級) 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 (1,400×g, 10 分, 4℃) し、血漿を得た。採取 60 分以内に Ca イオンを測定し、残りの血漿は、非透過性 Ca の測定時まで -20℃ で保存した。なお、産卵鶏における血液採取は、全てクラッチ第 2 卵に対しての排卵前の一日内で行い、クラッチ第 2 卵 (C2) の排卵予定時刻の推定とカニューレ装着法による血液採取は山村ら (2001b) の報告と同様にして行った。

試料の採取

1) 血漿 Ca 濃度

この実験ではクラッチ第 2 卵排卵周期中の産卵鶏 (8

羽)と休産鶏(7羽)について、午前10時から翌日の10時までの24時間にわたり、2時間毎に血液を採取し、それらの血漿中のCa濃度を測定した。

2) 放卵誘起による血漿Ca濃度

クラッチ第2卵排卵前22時間、言い換えればクラッチ第1卵排卵後4時間に相当する午前10時に1回目の血液を採取し、その4時間後の午後2時における2回目の採血後、0.5 mlの生理的食塩水に溶解した1 µgのPGF_{2α}、または0.5 mlの生理的食塩水をポリエチレン製チューブを取り付けた注射器を用いて卵殻腺部に投与した。PGF_{2α}を投与した場合には、投与15分以内に放卵が誘起されたニワトリについて、他方、生理的食塩水を投与した場合には、投与により放卵が誘起されなかったニワトリについて、4時間毎に翌日の午前10時まで血液を採取し、血漿Ca濃度を測定した。

3) ステロイド合成阻害による血漿Ca濃度

クラッチ第1卵の排卵4時間後に相当する午前10時とその30分後に、それぞれAGTを体重kg当たり200 mg/mlの投与量で浅胸筋に注射した。対照鶏には体重kg当たり1 mlの溶媒を注射した。血液はこれらのニワトリから、AGTの投与直前とその後4時間毎に翌日の午前10時まで採取した。

実験2 卵殻形成における卵殻腺部のCaBP-D_{28K} mRNA

この実験では、mRNAをNorthern blot hybridization法で定性的に、またSolution hybridization RNase protection法で定量的に測定したが、それらの方法における供試鶏と試料の採取は下記の通りである。

供試鶏

Northern blot hybridizationに供試したニワトリは、実験1と同様であるが、Solution hybridization RNase protection法に供試したニワトリは、採卵用コマシャルの白色レグホーン種産卵鶏(50週齢のデカルブTX-35)であり、ニワトリは日本配合飼料株式会社飼料畜産開発センター内飼育室において、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、餌と水は自由摂取させて単飼ケージで飼育した。

試料の採取

1 Northern blot hybridization法

この実験では、卵殻形成が行われている時期と行われていない時期において、腸管と卵管におけるCaBP-D_{28K} mRNA発現状況を定性的に知るために、午前8~9時に放卵したニワトリについて、卵殻腺部に卵が認められなかった正午と卵殻腺部に卵が認められた午前2時との2時期に、それぞれ断頭屠殺して、腸管と卵管の組織を摘出し、内容物を食塩水で洗い流した後、それぞれの組織

から粘膜組織を剥がし取り、マイクロチューブに入れ、液体窒素で急速凍結した後、Northern blot hybridizationによるmRNA測定時まで-80℃で保存した。

2 Solution hybridization RNase protection法

この実験では、卵殻形成過程における卵殻腺部と十二指腸のCaBP-D_{28K} mRNA発現状況を定量的に知るために、連産を比較的正しく繰り返す、しかも午前8時から9時の間に放卵したニワトリにおいて、排卵1~2時間後から3時間毎に排卵23~24時間後までの9時期に、1時刻に10羽ずつ断頭屠殺し、卵殻腺部と十二指腸を採取して内容物を洗い落とし、粘膜組織を採取した。組織は速やかに液体窒素下で凍結した後、Solution hybridization RNase protectionによるmRNA測定まで-80℃で凍結保存した。また、卵殻腺部に卵が存在し、卵殻膜が完全に形成された卵において、卵殻重量と卵殻Ca含量を測定した。さらに、血漿Caイオン濃度の測定のために、血液を断頭屠殺前に翼下静脈より、予めヘパリンで湿らしておいた注射筒を用いて採取した。採取した血液はヘパリンと酸化防止のため流動パラフィン(和光純薬株式会社、特級)を0.1 ml入れておいた小型試験管にできる限り空気にふれないように入れた。その後、30分以内に遠心分離(1,400×g, 10分間, 4℃)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。

Ca測定法

1) 血漿Ca

(1) 総Ca濃度

凍結保存しておいた血漿を室温で解凍した後、100 µlを小型試験管に採取して原子吸光分析用希釈液で50倍に希釈した後、試験管ミキサーで攪拌してから、原子吸光分光光度計(Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer; 日立Z6100型)で測定した。

(2) 非透過性Ca濃度

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、上述した方法と同様に求めた。一方、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 µl入れ、遠心分離(5,000×g, 1時間, 4℃)して得られた濾液25 µl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。

(3) Caイオン濃度

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⁺⁺ 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、パスツ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) 卵殻 Ca

乳鉢で磨砕した卵殻 1 g をるつぼに入れ、600°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、原子吸分光光度計で卵殻中 Ca 含量を測定した。

CaBP-D_{28K} mRNA

本実験においては、mRNA の定性的な測定方法としての Northern blot hybridization 法と mRNA を定量的に測定可能な Solution hybridization PNase protection 法を使用して、mRNA の測定を行った。これらの測定に使用した CaBP-D_{28K} cDNA プロローブは、Komm 博士 (アリゾナ大学) が作成し、島田清司博士と家田照子博士 (名古屋大学) により提供されたものを使用した。また、組織からの RNA の抽出はグアニジンチオシアネート-フェノール・クロロホルム法により行った。抽出した RNA は、吸光度計で 260 nm の吸光度を測定することにより濃度を算出した。なお、実験に供した RNA の 260 nm と 280 nm の吸光度の比は 1.8 以上であった。

1) Northern blot hybridization 法

mRNA の定性的な測定は、767 bp の CaBP-D_{28K} cDNA プロローブを用いて、Northern blot hybridization 法で行い、その概略は次の通りである。

すなわち、0.02M MOP を含む 1% アガロースゲルのスロットに組織から抽出した RNA を 1 スロット当たり 20 µg/30 µl になるように、または RNA 分子量マーカーを注入して電気泳動を行った。泳動終了後、ゲル上の RNA をバイオダイン A-ナイロンメンブラン (日本ポール(株)) に転写した。これと 561 bp の CaBP-D_{28K} cDNA から作成し、³²P で標識した CaBP-D_{28K} DNA プロローブとハイブリさせ、その後バイオイメージアナライザー (BAS2000, 富士フイルム(株)) を用いて画像を読みとり、解析を行った。測定値は特異的なバンドの放射線量から非特異的な部分の放射線量 (バックグランド) を差し引いた値で表した。なお、一部の実験で、宮本 薫博士と水谷哲也博士 (福井医科大学) により提供され、PCR 法により合成され T-Easy ベクターに取り込まれた 561 bp のニワトリ GAPDH cDNA プロローブを用いて、Internal Standard として、上述と同様にして測定を行った。

2) Solution hybridization RNase protection 法

mRNA の定量的な測定は、ヒツジ下垂体前葉中の

Comm- α , LH- β 及び FSH β mRNA を測定した Leung ら (1988) の方法に準拠して、山村ら (2001 a) の報告と同様に、Solution hybridization-PNase protection 法によって行った。なお、この法においては、標準品となる Sense RNA と ³²P により標識した ³²P-antisense RNA は、Bluescript II SK (−) ベクターに挿入された 560 bp のニワトリ CaBP-D_{28K} cDNA プロローブを使用し、*in vitro* transcription 法によって合成した。

統計処理

データの統計処理は分散分析により F 値を検定した後、ダンカンの多重範囲検定法で危険率が 5% 以下になった場合に有意な差があるものとし、2 つの平均値の差の検定は、Student's t-test で行った。

結 果

血漿 Ca 濃度の変動

産卵鶏と休産鶏の一日の各時期における血漿 Ca 濃度の測定結果を図 1 に示した。

産卵鶏においては、総 Ca 濃度 (3.75 mM~5.02 mM)、非透過性 Ca 濃度 (2.09 mM~3.31 mM)、及び Ca イオン濃度 (1.15 mM~1.41 mM) の何れにおいてもほぼ 1 日の周期である排卵周期中において有意な変動が認められた ($P < 0.05$)。すなわち、総 Ca 濃度は、午前 10 時から増加し始め、22 時に最も高い値を示した後、翌日の午前 10 時にかけて前日の午前 10 時とほぼ同じ濃度まで順次減少した。非透過性 Ca 濃度は総 Ca 濃度の場合と同様に、午前 10 時から増加し始めたが、最も高い濃度は 20 時に認められ、その後は総 Ca 濃度の場合とほぼ同様な様相で推移した。これに対して、Ca イオン濃度は、排卵 4 時間後から 6 時間後に相当する 10~12 時にかけて有意に増加し ($P < 0.05$)、排卵 6 時間後に最も高い値を示した後、排卵 10 時間後に相当する 16 時にかけて急激に減少し、その低い濃度で 22 時まで推移した後、放卵時にかけて徐々に増加した。一方、休産鶏においては、何れの Ca 濃度に関しても測定した 1 日に期間において有意な変動は認められず ($P > 0.05$)、しかも産卵鶏に比べ低い値であった。

放卵誘起による影響

PGF_{2 α} を子宮内に投与し放卵が誘起された処理鶏と対照鶏における血漿 Ca 濃度測定結果を図 2 に示した。

総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度は、共に 10 時から徐々に増加し 22 時に最も高い値を示した後、翌日の 10 時にかけて減少し、何れの時期においても、処理鶏と対照鶏との間で有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。これに対して、Ca イオン濃度は、対照鶏においては、14 時から 22 時にかけて急激に減少し、その後は次の放卵時に

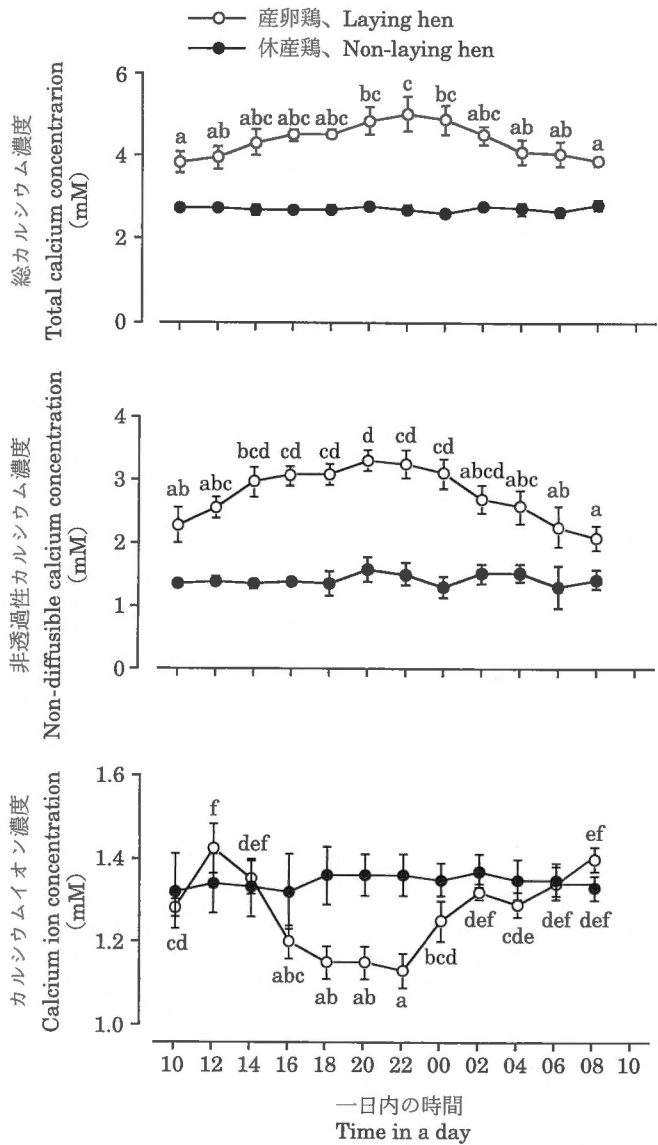


図 1. 産卵鶏と休産鶏の一日の各時期における血漿総カルシウム、非透過性カルシウムとカルシウムイオン濃度

Fig. 1. Concentrations of total calcium, non-diffusible calcium and calcium ion in the plasma of laying and non-laying hens at various times in a day

各点は 7～8 羽の平均値±標準誤差.

Each point is Mean±SE of 7～8 hens.

同じライン上での異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり.

Means with different superscripts in the same line are significantly different ($P < 0.05$).

かけて順次増加した。一方、14 時の血液採取後に卵殻腺部内への PGF_{2α} 投与により放卵を誘起した処理鶏においては、濃度は放卵誘起後から増加し、放卵誘起後の何れの時期においても対照鶏との間で有意に高い値を示し

た ($P < 0.01$)。

ステロイド合成阻害による影響

AGT を投与し、ステロイドホルモンの合成を阻害した処理鶏と対照鶏における血漿 Ca 濃度の測定結果を図

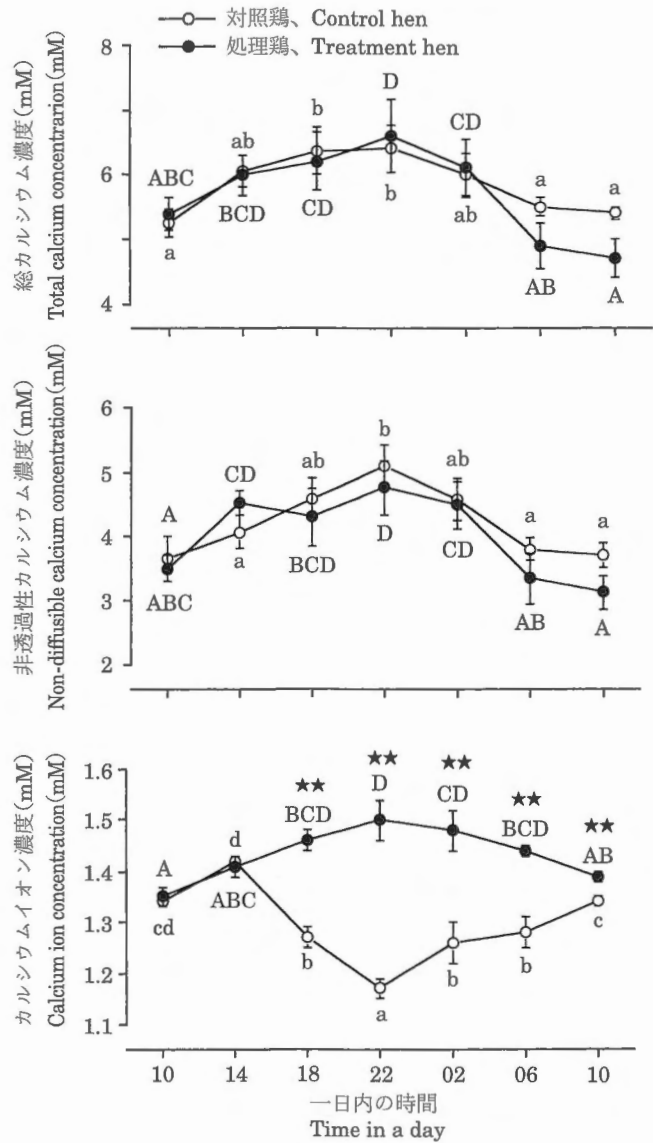


図 2. プロスタグランジンの投与が血漿総カルシウム、非透過性カルシウムとカルシウムイオン濃度に及ぼす影響

Fig. 2. Influence of prostaglandin injection on plasma concentrations of total calcium, non-diffusible ion and calcium ion

各点は 5~6 羽の平均値±標準誤差.

Each point is Mean±SE of 5~6 hens.

同じライン上での異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり.

Means with different superscripts in the same line are significantly different ($P < 0.05$).

★★ 対照鶏に対して 1% 水準で有意差あり.

★★ $P < 0.01$ versus control hen..

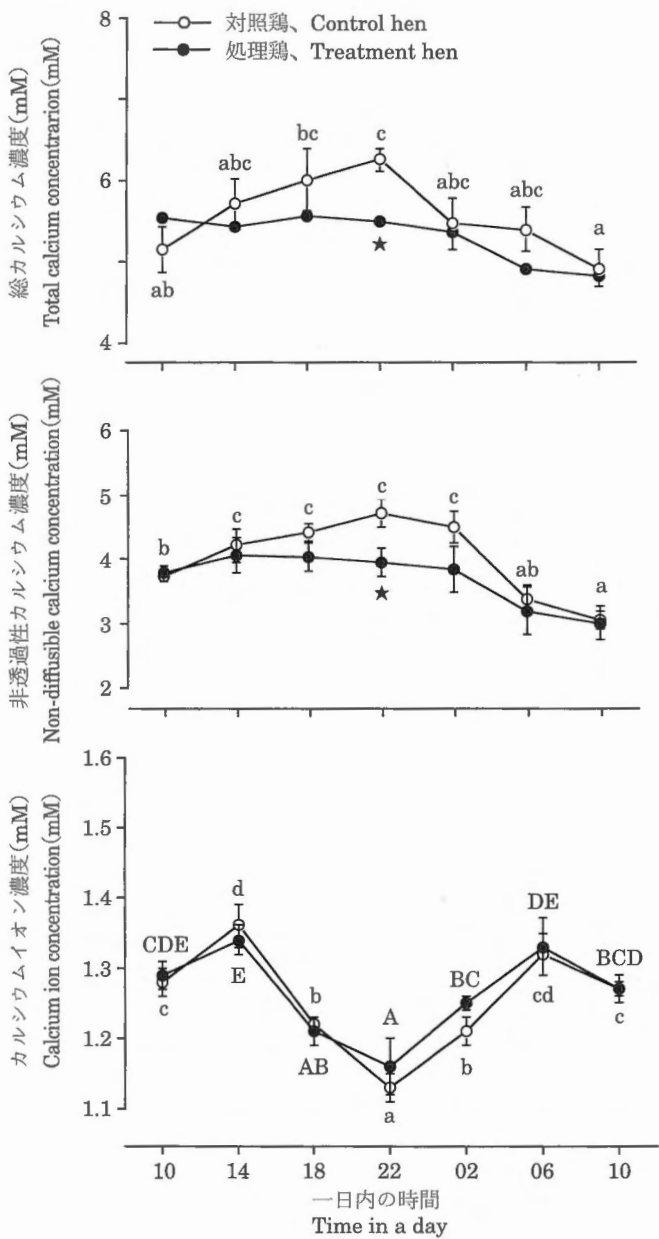


図 3. アミノグルテチミドの投与が血漿総カルシウム、非透過性カルシウムとカルシウムイオン濃度に及ぼす影響

Fig. 3. Influence of aminogluthethimide injection on plasma concentrations of total calcium, non-diffusible ion and calcium ion

各点は 5~6 羽の平均値±標準誤差。

Each point is Mean±SE of 5~6 hens.

同じライン上での異符号間に 5%水準の危険率で有意差あり。

Means with different superscripts in the same line are significantly different (P<0.05).

★ 対照鶏に対して 5%水準で有意差あり。

★ : P<0.05 versus control hen.

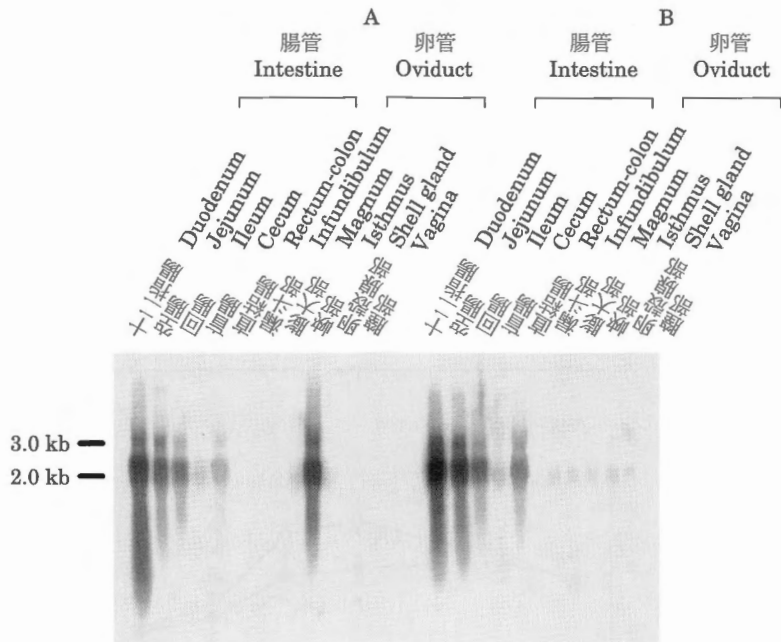


図 4. 腸管と卵管における CaBP-D_{28K} mRNA の Northern blot 分析
Fig. 4. Northern blot analysis of CaBP-D_{28K} mRNA in the intestine and oviduct
A : 組織は卵が卵殻腺部に存在していた午前 2 時に採取した。
A : Tissues were collected at 2 : 00 am when an egg was present in the shell gland.
B : 組織は卵が卵殻腺部に存在してしていない正午に採取した。
B : Tissues were collected at noon am when an egg was not present in the shell gland.
CaBP-D_{28K} mRNA 分子種のサイズは左側に示されている
Sizes of CaBP-D_{28K} mRNA species are shown on the left side.

3 に示した。
AGT を投与したニワトリにおいて、放卵は全て予想排卵時刻に行われた。
総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度は、対照鶏においては、前述した排卵周期中における変動の様相と同様に、22 時にピークとなるような有意な変動を示した。これに対して、AGT 処理鶏では、有意なピークは認められず、時間の経過と共に少しずつ減少する傾向が認められた。
一方、Ca イオン濃度は、対照鶏と処理鶏との間でいずれの時期においても有意な差は認められず、前述した排卵周期中における変動の様相とほぼ同様な変動であった。
Northern blot hybridization 法による CaBP-D_{28K} mRNA 発現
卵殻腺部に卵が認められず卵殻形成が行われていない正午と卵が認められ卵殻形成が行われている午前 2 時の

2 時期において、腸管の十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結直腸と卵管の漏斗部、膨大部、峽部、卵殻腺部、膣部における mRNA 発現を検討した結果を図 4 に示した。
図 4 に示されるように、腸管においても卵管においても 2.0 kb と 3.0 kb の二種類の CaBP-D_{28K} mRNA 分子種が認められた。それらの分子種の発現量は、腸管においては十二指腸、空腸、回腸、結直腸、盲腸の順で、何れの腸管組織においても卵殻形成の有無による大きな差異は認められなかった。これに対して、卵管においては卵殻腺部においてのみ発現が認められ、しかも卵殻形成が認められない時期に比べ卵殻形成が行われている時期の方が発現量が多かった。
上述の結果から、CaBP-D_{28K} mRNA が多く検出された腸管の十二指腸と卵管の卵殻腺部において、卵殻形成の有無による CaBP-D_{28K} mRNA 分子種の発現に差異があるか否かを検討した。その結果を図 5 に示した。

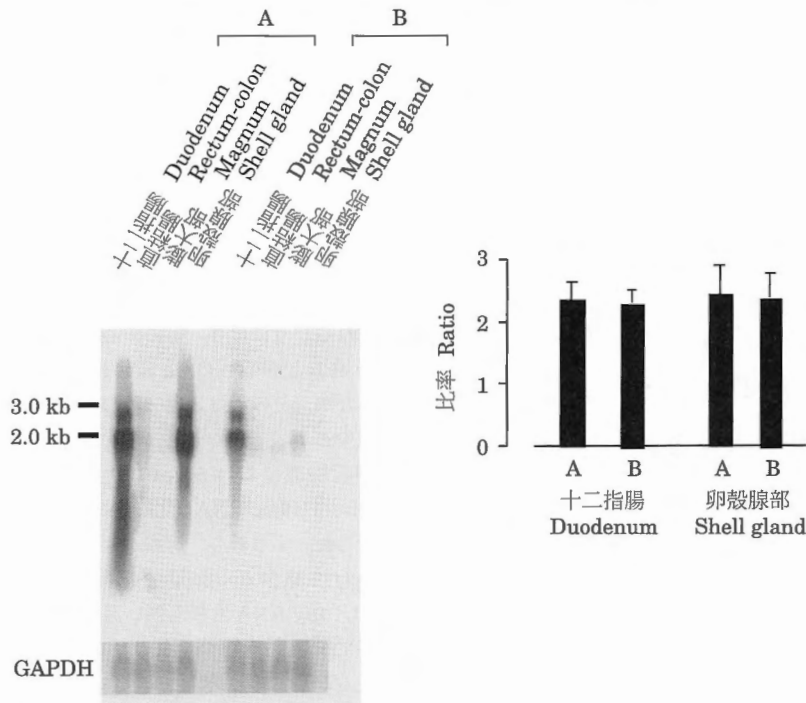


図 5. 十二指腸と卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA の大分子種に対する小分子種の割合

Fig. 5. Ration of the major species versus the minor species of CaBP-D_{28K} mRNA in the duodenum and shell gland

A : 組織は卵が卵殻腺部に存在していた午前 2 時に採取した。
A : Tissues were collected at 2 : 00 am when an egg was present in the shell gland.
B : 組織は卵が卵殻腺部に存在してしていない正午に採取した。
B : Tissues were collected at noon am when an egg was not present in the shell gland.
各棒は 10 羽の平均値と標準誤差。
Each bar is Mean±SE of 10 hens.

図 4 の結果と同様に、十二指腸においても卵殻腺部においても、2.0 kb と 3.0 kb の二種類の分子種が認められ、しかも 3.0 kb の CaBP-D_{28K} mRNA 分子種に比べて 2.0 kb のそれの方が発現量が多かった。そこで、十二指腸と卵殻腺部の組織間、及び卵殻形成の有無により、2 種類の分子種の発現量に差異があるか否かを知るために発現量をバンドの濃淡から BAS200 を用いて数値化することによって求め比較したところ、十二指腸と卵殻腺部において何れも、2.0 kb の CaBP-D_{28K} mRNA 分子種の方が 3.0 kb のそれに比べて約 2.4 倍多く、しかもそれらの値は十二指腸と卵殻腺部における組織間のみならず卵殻形成の有無においても有意な差異は認められなかった ($P>0.05$)。

Solution hybridization Rnase protection 法による CaBP-D_{28K} mRNA 発現

1) Solution hybridization Rnase protection 法による CaBP-D_{28K} mRNA 測定法の確認

Solution hybridization Rnase protection 法により、CaBP-D_{28K} mRNA が定量的に測定できるか否かを確認するために、³²P で標識した CaBP-D_{28K} の anti-senseRNA プローブを、標準品である CaBP-D_{28K} sense RNA とあるいは十二指腸、卵殻腺部、結直腸、膨大部のそれぞれの組織から抽出した RNA を反応させ、得られた用量と反応との関係を図 6 に示した。

Antisense RNA は Sense RNA と 7.8～250 pg の範囲で用量-反応曲線が成立した。Sense RNA 測定におけ

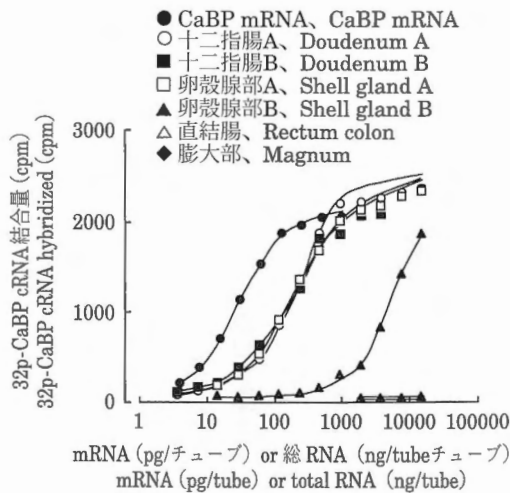


図 6 ^{32}P -CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ cRNA (antisense RNA) と Sense RNA あるいは各種組織の RNA とによる用量-反応曲線

Fig. 6. The dose-response curves for hybridization of ^{32}P -CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ cDNA (antisense RNA) with sense RNA or RNA from various tissues

- A : 組織は卵が卵殻腺部に存在していた午前 2 時に採取した。
A : Tissues were collected at 2:00 am when an egg was present in the shell gland.
B : 組織は卵が卵殻腺部に存在していない正午に採取した。
B : Tissues were collected at noon am when an egg was not present in the shell gland.

るアッセイ内の変動係数は、7.13%であった。また、CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ の Antisense は十二指腸と卵殻腺部から抽出した RNA とは反応し、用量-反応曲線が成立し、しかもこれらの用量-反応曲線と Sense RNA による用量-反応曲線との間で平行性が認められた。また、これらの組織の反応において、卵殻形成の有無により、十二指腸ではほとんど差は認められなかったが、卵殻腺部においては卵殻形成が行われている場合の方が行われていない場合に比べて反応が多かった。これらに対して、結直腸と膨大部の RNA は、本実験で使用した $13\mu\text{g}$ までの用量内では、反応は認められなかった。

2) 卵殻形成過程における十二指腸と卵殻腺部の CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ mRNA 濃度

排卵周期中において 3 時間毎に十二指腸と卵殻腺部の CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ mRNA 濃度を測定した結果を血漿 Ca イオ

ン濃度と卵殻重量および卵殻 Ca 含量の測定結果と共に、図 7 に示した。

血漿 Ca イオン濃度は、排卵 1~2 時間後から排卵 4~5 時間後にかけて有意に増加し ($P < 0.05$) し、排卵 4~5 時間後において最も高い値を示した後、排卵 10~11 時間後にかけて急激に有意に減少し ($P < 0.05$)、その低い濃度が排卵 19~20 時間後まで維持された後、次の放卵時にかけて有意に増加した ($P < 0.05$)。

排卵された卵は、排卵 4~5 時間後から卵殻腺部に認められるようになり、その卵殻腺部における卵の卵殻重量の増加と卵殻への Ca 蓄積は、最初の 3 時間は少なかったが、その後はほぼ一定の割合で増加し、放卵直前に減少した。

卵殻腺部における CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ mRNA 濃度は、 $0.7 \sim 10.8 \text{ fmol}/10\mu\text{g RNA}$ で排卵周期中において著しい変動を示した。すなわち、排卵 1~2 時間後から 4~5 時間後にかけて減少し、排卵 4~5 時間後において $0.7 \pm 0.1 \text{ fmol}/10\mu\text{g RNA}$ と最も低い濃度を示した後、急激に増加して排卵 13~14 時間後に $10.8 \pm 0.7 \text{ fmol}/10\mu\text{g RNA}$ と最も高い濃度を示した。その高い濃度が排卵 19~20 時間後まで維持された後、放卵時にかけて有意に減少した ($P < 0.05$)。これに対して、十二指腸における CaBP- $\text{D}_{28\text{K}}$ mRNA 濃度は、 $5.8 \sim 9.1 \text{ fmol}/10\mu\text{g RNA}$ の範囲であったが、有意な変動は認められなかった ($P > 0.05$)。

考 察

今までに、卵殻形成との関連で血中 Ca 濃度の変動の様相が報告されている (Hodges, 1969; Paul and Snetsinger, 1969; Mueller *et al.*, 1973; Luck and Scanes, 1979; Parson and Combs, 1981; Nys *et al.*, 1986ab; Kolling *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1986) が、本実験において、血中 Ca イオン濃度は卵殻形成との関連で変動しているが、蛋白質と結合した非透過性 Ca 濃度は必ずしも卵殻形成とは連動せず、むしろステロイドホルモンによって影響されていることが明らかとなった。すなわち、存在形態が異なる Ca 全てを合計したものとして表される総 Ca、分子量の大きい蛋白質と結合していると考えられる非透過性 Ca およびイオン化した Ca イオンの血漿における濃度は、何れも、周期がほぼ一日である排卵周期中において変動していることが認められた。しかし、排卵が認められない休産鶏においては一日の内でも有意な変動は認められなかった。これらのことは、これらの血中 Ca 濃度は、少なくとも排卵との関連で変動していることを示している。しかし、PGF 2α の卵殻腺部への投与により放卵を促して卵殻形成を阻止することに

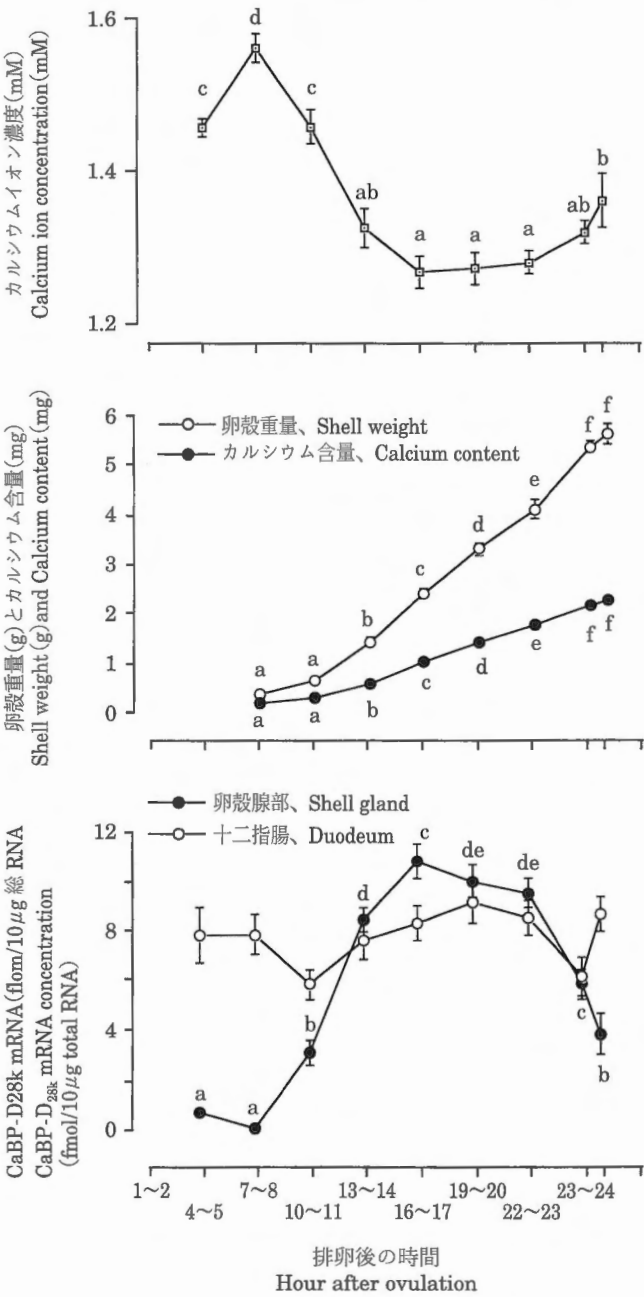


図 7. 排卵周期中の色々な時期における血漿カルシウムイオン濃度，卵殻重量，卵殻カルシウム含量と卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA 濃度

Fig. 7. Calcium ion concentration in the plasma, egg shell weight, calcium content in the egg shell and CaBP-D_{28K} mRNA concentration in the shell gland at various times during the ovulatory cycle

各点は 9～10 羽の平均値±標準誤差.

Each point is Mean±SE of 9～10 hens.

同じライン上での異符号間に 5% 水準の危険率で有意差あり.

Means with different superscripts in the same line are significantly different (P<0.05).

より、卵殻形成時に認められた血漿 Ca イオン濃度の減少は認められなくなり、むしろ増加したのに対して、血漿総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度の変動には有意な影響は認められなかった。これらのことは、血中 Ca イオン濃度は卵殻形成との関連で変動しているが、卵殻への Ca 沈着は血中総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度には必ずしも反映しないことを示している。

AGT はコレステロール側鎖切断酵素活性の抑制を介してステロイドホルモンの合成を阻害する (Kowal, 1969) ことが知られている。本実験では、LH の放出に対するステロイドホルモンの影響を検討した Johnson and van Tienhoven (1984) の報告における用量と投与方法で AGT を投与したところ、AGT の投与によって、排卵周期中における血漿 Ca イオン濃度の変動には影響が認められなかったが、血漿総カルシウム濃度と非透過性 Ca 濃度の変動は認められなくなった。このことは、ステロイドホルモンが血中 Ca イオン濃度に影響を与える可能性は少ないが、血中総 Ca 濃度と非透過性 Ca 濃度には影響を与えていることを示している。血漿非透過性 Ca 濃度は、総 Ca 濃度の約 60% を示しているが、この非透過性 Ca は卵黄前駆物質として知られる vitellogenin と呼ばれるリン蛋白質と結合した (Greenberg *et al.*, 1936) ものであり、産卵に伴って血中濃度が増加する (Copp, 1969) ことが知られている。また、血中非透過性 Ca 濃度は、エストロジェンの投与によって雄鶏やヒナにおいても増加する (Urist *et al.*, 1958) ことが報告されている。本実験では、総 Ca 濃度と共に、非透過性 Ca 濃度は一日の時刻では正午頃から徐々に増加し、20 時頃に最も高い濃度を示した後、徐々に減少している。実験ではクラッチ第 2 卵の排卵前の一日内において、Ca 濃度を測定しているので、クラッチ第 2 卵に対してはこの実験での正午は排卵 20 時間前頃に相当し、また 22 時は排卵 10 時間前頃に相当する。本実験と同じ条件で供試している山村ら (2001b) は、本実験で血漿非透過性 Ca 濃度の増加が認められたと同じ時期に卵胞発育が認められたと報告している。このように、血漿非透過性 Ca 濃度の増加の時期と卵胞の発育が認められる時期とが一致していることは、排卵との関係で認められた血漿非透過性カルシウム濃度の変動は、卵胞発育と関連していると推察される。この推察は、AGT を投与して、ステロイドホルモンの合成を阻害することにより、排卵との関連で認められた血漿非透過性 Ca 濃度の変動が認められなくなったことによっても支持される。

すでに、ウズラ (Striem and Bar, 1991) とニワトリ (King and Norman, 1986; Bar *et al.*, 1992; Ieda *et al.*,

1995) の十二指腸と卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA 分子種について、比較的発現量の多い 2.0 kb の分子種と 2 種類の発現量が比較的少ない約 3.0 kb の分子種が存在すると報告されているが、発現量が少ない約 3.0 kb の 2 種類の分子種のサイズはほぼ同じで、Striem and Bar (1991) と Bar ら (1992) の報告では約 3.0 kb の 2 種類の分子種はまとめて 1 種類の分子種として表している。本実験では、十二指腸と卵殻腺部において、少なくとも 2.0 kb と 3.0 kb の CaBP-D_{28K} mRNA 分子種が存在することが確認されると共に、それら 2 分子種間における発現量は 2.0 kb の分子種の方が 3.0 kb の分子種に比べて多く、しかも何れの分子種においても腸管組織では、十二指腸、空腸、回腸、結直腸、盲腸の順で発現量が多く、すでに報告されている腸管における Ca 吸収能 (Taylor and Wasserman, 1967) と相応していた。また、卵管では卵殻腺部においてのみ、CaBP-D_{28K} mRNA が検出された。これらのことは、CaBP が卵殻腺部における Ca 沈着機能と密接に関係しているという報告を支持している。また、前述したように、CaBP D_{28K} mRNA 分子種は 2 種類として確認されたが、卵殻腺部のみならず十二指腸においても、発現量は 2.0 kb の分子種の方が 3.0 kb の分子種に比べて約 2.4 倍多く、しかもこの発現量の割合は卵殻形成の有無によって有意な差異は見出されなかった。このことは、2.0 kb と 3.0 kb の分子種の発現割合は、少なくとも卵殻形成に伴う生理的变化には影響されていないことを示している。

ニワトリの卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA を Solution hybridization RNase protection 法により、定量的にまた特異的に測定出来るか否かを検討したところ、十二指腸と卵殻腺部から抽出した RNA は、いずれも CaBP-D_{28K} の Antisense RNA と反応し、用量と反応が得られ、しかもそれらの用量-反応曲線と Sense CaBP-D_{28K} RNA による用量-反応曲線との間で平行性が認められた。これに対して、結直腸と膨大部より抽出した RNA は、本実験で使用した用量の範囲では Antisense CaBP-D_{28K} RNA との間では反応が認められなかった。また、反応は、十二指腸では卵殻形成の有無による差異は見出されなかったが、卵殻腺部においては卵殻形成時において多かった。これらのことから、ニワトリの十二指腸と卵殻腺部において、CaBP-D_{28K} mRNA を定量的かつ特異的に測定出来ることが明らかとなった。

本実験では、排卵周期中に、CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は卵殻腺部においては著しく変動することが確認されたが、十二指腸において有意な変動は見出されなかった。これらの結果は、CaBP-D_{28K} mRNA を Northern blot hybridization 法で測定した Ieda ら (1995) と、Solu-

tion hybridization RNase protection 法によって測定した Striem and Bar (1991) と Bar ら (1992) の結果と良く一致している。Ieda ら (1995) は、プロスタグランジン E₂ を投与して放卵を誘起すると、卵殻腺部に卵が存在する対照鶏に比べて、卵殻腺部の CaBP-D_{28K} mRNA レベルが減少することから、卵殻腺部における卵の存在と Ca 沈着が CaBP-D_{28K} mRNA の合成と蓄積に対しての刺激因子かもしれないと推察している。本実験においても、卵殻形成の開始と共に、卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルが急激に増加したことから、卵が卵殻腺部に到達して卵殻が形成されることが、卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA レベルの増加を促すことは伺い知ることが出来るが、その増加が約 10 時間持続しているにも関わらず、その期間に卵殻重量と共に卵殻への Ca 蓄積は一定の割合で増加していること、および卵殻への Ca 沈着が未だ行われているにも関わらず放卵数時間前から CaBP-D_{28K} mRNA レベルが急激に減少したことは、卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA の発現は卵殻への Ca 沈着だけでは説明出来ないことを示している。すでに述べたように、本実験では排卵周期中において血中 Ca イオン濃度が卵殻形成との関連で変動していることが示されたが、この血中 Ca イオン濃度における変動と卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の変動との間で、Ca イオン濃度の増加時には CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が減少し、逆に Ca イオン濃度の減少時期には CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が増加し、また Ca イオン濃度が低いときは CaBP-D_{28K} mRNA 濃度は高い傾向が認められた。このように、血中 Ca イオン濃度と卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA 濃度の変動の様相の間で、ほぼ逆の関係が認められたことは、あるいはカルシウム恒常性に関与する副甲状腺ホルモンとカルシトニンの場合と同様に、Ca イオンが卵殻腺部における CaBP-D_{28K} mRNA の発現を調整しているのかも知れない。しかしながら、これらの推察にはさらなる研究が必要とされる。

また、本実験では、排卵 19~20 時間後から急激に卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が急激に減少することが見出されたが、この時期は次の卵に対しては排卵 4~5 時間前に相当する。この時期には排卵誘起ホルモンである LH の放出が認められ、この LH の刺激により血中プロジェステロン (P4) 濃度が増加していることが知られている (Johnson, 1990)。また、産卵鶏への P4 投与により、卵殻腺部 CaBP-D_{28K} mRNA 濃度が減少することが見出されている (Bar *et al.*, 1996; 後藤ら, 未発表)。これらのことから、LH により分泌が刺激される P4 の作用により、CaBP-D_{28K} mRNA の発現が抑制され、その結果として卵殻への Ca 沈着が減少して、卵殻形成が終了

するのであろうと推察される。

謝 辞

実験遂行にあたり懇意なる御指導を賜り、ニワトリ CaBP-D_{28K} cDNA プローブ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と、ニワトリ GAPDH cDNA プローブをご提供頂いた福井医科大学教授宮本 薫博士及び水谷哲也博士に深く感謝の意を表します。また、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, Striem S, Vax E, Talpaz H and Hurwitz S. Regulation of calbindin mRNA and calbindin turnover in intestine and eggshell of the chicken. *American Journal of Physiology*, 262 : R800-R805. 1992.
- 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.
- Copp DH. Review: Endocrine control of calcium homeostasis. *Journal of Endocrinology*, 43 : 137-161. 1969.
- Corradino RA and Fullmer CS. Positive cotranscriptional regulation of intestinal Calbindin-D_{28K} gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and glucocorticoids. *Endocrinology*, 128 : 944-950. 1991.
- Corradino RA, Wasserman RH, Pubols MH and Chang SI. Vitamin D₃ induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laing hen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 : 378-380. 1968.
- Driggers J and Comar C. The secretion of radioactive calcium (Ca⁴⁵) in the hen's egg. *Poultry Science*, 28 : 429-424. 1949.
- Greenberg DM, Larson CE, Pearson PB and Brumestre BR. The state and partition of the calcium and inorganic phosphorus in the serum of the fowl. Effect of growth and ovulation. *Poultry Science*, 15 : 483-489. 1936.
- Hodges RD. The structure of the fowl's ultimobranchial gland. *Annals of Biological Animal Biochemistry and Biophysics*, 10 : 255-275. 1969.
- Ieda T, Saito N, Ono T and Shimada K. Effects of presence of an egg and calcium deposition in the shell gland on levels of messenger ribonucleic acid CaBP-D_{28K} and of vitamin D₃ receptor in the shell gland of laying hen. *General and Comparative Endocrinology*, 99 : 145-151. 1995.

- Johnson AL. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2 : 319-346.1990.
- Johnson AL and van Tienhoven A. Effects of aminoglutethimide on luteinizing hormone and steroid secretion, and ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. *Endocrinology*, 114 : 2276-2283. 1984.
- King MW and Norman AW. Analysis of the mRNA coding for chick vitamin D-induced calbindin and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 248 : 613-619. 1986.
- Kolling K, Hofmeier A and Merckenschlager M. The ionized calcium in the blood of domestic chickens : dependence on the laying cycle. *Zentralblatt Veterinarmedizin A*, 39 : 115-120. 1992.
- Kowal J. Adrenal cells in tissue culture. IV. Use of an inhibitor of steroid synthesis for the study of ACTH action. *Endocrinology*, 85 : 270-279. 1969.
- 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.
- Luck MR and Scanes CG. Plasma levels of ionized calcium in the laying hen (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 177-181. 1979.
- Mueller WJ, Hall KI, Maurer PA, Joshua JR and Joshua IG. Plasma calcium and inorganic phosphate response to laying hens to parathyroid hormone. *Endocrinology*, 92 : 853-856. 1973.
- Mueller WJ, Schraer R and Schraer H. Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets. *Journal of Nutrition*, 84 : 20-26. 1964.
- Nys Y, Baker K, Bouillon R, van Baelen H and Lawson DEM. Regulation of calbindin D28k and its mRNA in the intestine of the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology*, 86 : 460-468.1992.
- 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 egg. *Journal of Endocrinology*, 111 : 151-157. 1986 a.
- Nys Y, Parkes CO and Thomasset M. Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity and intestinal calcium absorption in hens. *General and Comparative Endocrinology*, 64 : 293-299. 1986 b.
- Nys Y, Mayer-Afshar S, Bouillon R, Van Baelen H and Lawson DEM. Increase in calbindin D_{28K} mRNA in the uterus of the domestic fowl induced by sexual maturity and shell formation. *General and Comparative Endocrinology*, 76 : 322-329. 1989.
- Parson AH and Combs GF Jr. Blood ionized calcium cycles in the chicken. *Poultry Science*, 60 : 1520-1524. 1981.
- Paul HS and Snetsinger DC. Dietary calcium and phosphorus and variations in plasma alkaline phosphatase activity in relationship to physical characteristics of eggshell. *Poultry Science*, 48:241-250. 1969.
- Striem S and Bar A. Modulation of quail intestinal and shell gland calbindin (Mr 28,000) gene expression by vitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 73 : 325-331. 1991.
- Singh R, Joyner CJ, Peddie MJ and Taylor TG. Changes in the concentrations of parathyroid hormone and ionic calcium in the plasma of laying hens during the egg cycle in relation to dietary deficiencies of calcium and vitamin D. *General and Comparative Endocrinology*, 61 : 20-28. 1986.
- Taylor AN and Wasserman RH. Vitamin-D₃-induced calcium-binding protein : partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 119:536-540. 1967.
- Warren DC and Scott HM. The time factor in egg formation. *Poultry Science*, 14 : 195-207. 1935.
- 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βsubunitとプロラクチンのmRNA レベルの変動. 日本家禽学会誌, J36-J46. 2001 a.
- 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, J47-J57. 2001 b.
- Urist MR, Schjeide OA and Mclean FC. The partition and binding of calcium in the serum of laying hen and of estrogenized rooster. *Endocrinology*, 63,570-585. 1958.

Plasma Calcium Concentrations and Expression of CaBP-D_{28K} mRNA in the Shell Gland in Relation to Calcification in the Laying Hen

Hisaya Goto¹⁾, Masayuki Tagami¹⁾, Masashi Mizuno²⁾, Etuko Kameoka³⁾,
Masaru Takeishi¹⁾, Namiko Yamamura³⁾, Osamu Doi³⁾
and Michiharu Kamiyoshi³⁾

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

²⁾ Laboratory of Nissin Food Products Co., Ltd. Shiga 525-0055

³⁾ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

It is known well that calcium-binding protein (CaBP-D_{28K}) is involved in calcium (Ca) deposition in the eggshell gland of the oviduct in the laying hen. However, there are few reports regarding a correlation between gene expression of CaBP-D_{28K} and Ca. In this study, changes in plasma Ca concentrations in relation to calcification were measured, and then, plasma Ca ion and CaBP-D_{28K} mRNA concentrations in duodenum and shell gland were quantitatively analyzed. The plasma Ca concentrations were measured every 2 hours during 24 hours in laying and non-laying hens. In laying hens, a peak of plasma total and non-diffusible Ca concentrations was observed between 20 : 00 and 22 : 00 corresponding to between 14 and 16 hours after the ovulation. Plasma Ca ion concentrations significantly increased until 10 : 00 to 12 : 00 corresponding to 4 to 6 hours after the ovulation. After indicating the maximum value at 6 hours, plasma Ca ion concentrations rapidly decreased and reached the lowest value at 10 hours after the ovulation. Plasma Ca ion concentrations maintained the lowest value until 16 hours after the ovulation, and thereafter, gradually increased by next ovulation. In contrast, no significant change in the plasma Ca concentrations was observed in non-laying hens. Plasma Ca ion concentrations did not decreased following administration of prostaglandin F_{2α}, which induced ovulation. Additionally, the peaks of the plasma total and the non-diffusible Ca concentrations disappeared following administration of aminoglutethimide, which inhibited synthesis of steroid hormones. In simultaneous measurement of the plasma Ca ion and CaBP-D_{28K} mRNA concentrations, Ca deposition in the eggshell initiated at 4 to 5 hours after the ovulation, was mild for the first 3 hours, thereafter, Ca constantly accumulated, and decreased before the next oviposition. Plasma Ca ion concentrations changed with same manner as mentioned above. CaBP-D_{28K} mRNA concentrations in the eggshell gland were the lowest value at 4 to 5 hours after the ovulation, gradually increased until 13 to 14 hours, were stable at the high value until 19 to 20 hours, and significantly decreased by the next oviposition. However, CaBP-D_{28K} mRNA concentrations in the duodenum did not show significant changes during the ovulatory cycle. These results demonstrated that the blood Ca ion

concentrations correlatively changed with Ca deposition in the eggshell, and the blood non-diffusible Ca concentrations were changed by the steroid hormones. Gene expression of CaBP-D_{28K} in the shell gland was suggested possibly correlating with the change in blood Ca ion concentration as well as Ca deposition in the eggshell.

(Japanese Poultry Science, 39 : J25-J40, 2002)

Key word : calcium-binding protein, gene expression, prostaglandin F_{2α}, aminoglutethimide, calcium ion