
総 説

ニワトリ卵黄膜のタンパク質

木戸 詔子

Proteins of the Vitelline Membrane of Hen's Egg

Shoko Kido

はじめに

卵膜 (egg membrane) は卵子表面に存在する膜であるが、動物によって卵子の大きさや卵子を取り巻く環境も大きく異なるため、卵膜の形態にもかなりの相違が見られ、名称も様々 (卵殻, choline/硬骨魚類; セリー層, jelly coat/両生類; 卵黄膜, vitelline membrane/爬虫類; 透明帯, zona pellucida/哺乳類; その他, vitelline coat, vitelline layer, vitelline envelop など) である¹⁾。鳥類の卵黄膜 (vitelline membrane) は卵黄を包んでいる半透明の膜で、卵黄と卵白を仕切る境膜として存在している。鳥卵は哺乳動物などの卵子と比較すると母体外で胚が発達する。従って、その栄養補給源である卵黄はかなり大きく、卵黄を包む卵黄膜はかなりの強度をもつ必要がある。鳥卵の卵黄膜に関する研究は殆どがニワトリで行われている²⁻⁷⁾。卵黄膜は外圧に耐える強度をもち、ふ化に必要な卵黄を物理的に守るだけでなく^{3,4,8,9)}、微生物から最終的に守る障壁としての役割、代謝に必要な低分子成分の卵黄と卵白間の移動の制御^{7,10-16)}、受精の際の精子の認識¹⁷⁻²⁰⁾や多受精防止^{21,22)}、胚の発生に重要な栄養の運搬など重要な役割をもつことが認められているものの、これらの詳しい作用機序については殆ど分かっていない。

ニワトリ卵は栄養的にも経済的にも優れたタンパク質食品であり、しかも、多様な機能性タンパク質を含むため、食品素材としての利用価値も高い。卵黄膜は全卵重に比べると微量 (1個の重量は乾燥重

量で 5.7 ± 0.6 mg) であるが⁹⁾、食品としての品質管理の面からも重要な役割をもつ。貯蔵に伴い卵黄膜の脆弱化が進むと卵黄膜破損を起こす (例えば、夏の貯蔵卵では著しく卵黄膜の強度が低下し、2日貯蔵卵の手割りで1.4%、自動割卵機 (100個/分) で8.6%)²³⁾。卵黄と卵白は成分が異なるため、工業的に両者は分離して、製造加工されることが多い。最近では高速割卵機 (600個/分) が用いられるので、卵黄膜強度の高い卵が要求される。割卵時の卵黄膜破損による卵白と卵黄の混合卵は著しい経済的損失を招く。卵白に卵黄が0.1%混入すると卵白の起泡性を低下させたり²⁴⁻²⁷⁾、卵黄への卵白混入は卵黄の乳化性に影響を与える²⁸⁾。従って、工業的な規模で行われる割卵工程で、卵黄膜破損による混合卵を出さないように注意がはられる。

著者らはニワトリの卵黄膜構成タンパク質の物理化学的性質や構造解析など、一連の研究を行ってきた^{9,29-36)}。その結果、卵黄膜は数種のタンパク質から構成されており、そのうちの少なくとも1つはユニークな構造をもつタンパク質であることを明らかにした。しかし、これらタンパク質の機能はまだ不明な部分が多く、卵黄膜タンパク質の様々な生理活性の解明が注目されている。

I. 卵黄膜の形成

ニワトリの卵黄膜は内層 (inner membrane) と外層 (outer membrane) と呼ばれる形態及び成分の全く異なる2層から構成され、2層の間は極めて薄い連続層 (continuous membrane) が存在している (図1a)。産み立ての新鮮卵から卵白を分離した後、卵黄を0.01 N 塩酸に浸漬すると、卵黄中に水が入

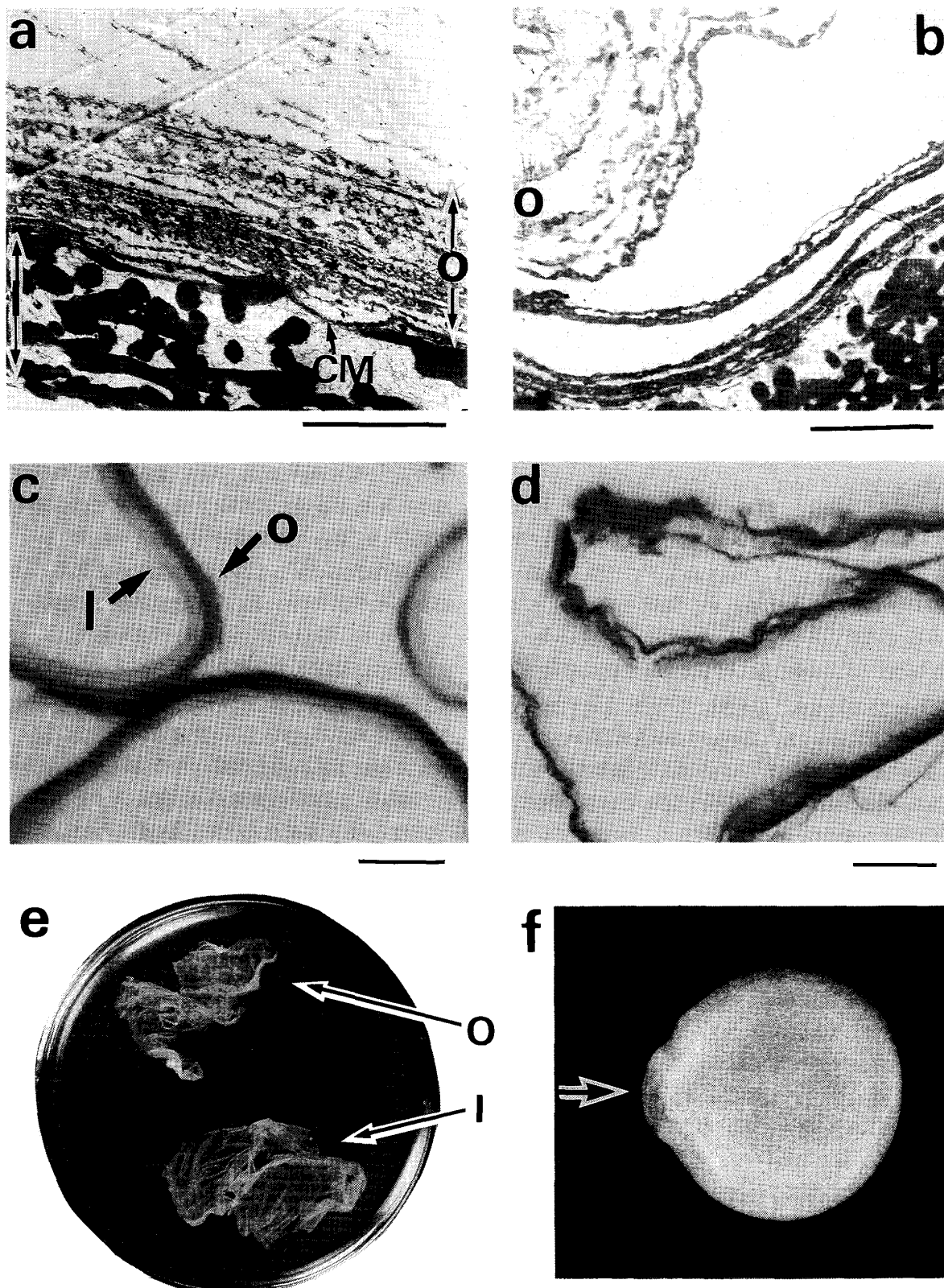


図1 新鮮卵の卵黄膜構造と還元による膜構造の変化 透過型電子顕微鏡観察による新鮮卵の卵黄膜断面構造 (a) と 0.1 M メルカプトエタノール, pH 7 で 1 時間処理後の膜構造の変化を示す (b)。還元処理で内層に大きな変化はみられないが、外層の重層構造が崩壊し、外側から繊維の剝離、切断を起こしている。光学顕微鏡で同様に新鮮卵卵黄膜 (c) と還元処理膜 (d) の断面構造を PAS 染色を行い観察したところ、新鮮卵の断面は糖濃度に依存した密度の高い外層 (O) と密度の低い内層 (I) の 2 層構造が鮮明に観察されたが、処理膜では、外層の崩壊が大きく、2 層構造は不鮮明となった。写真 ↗

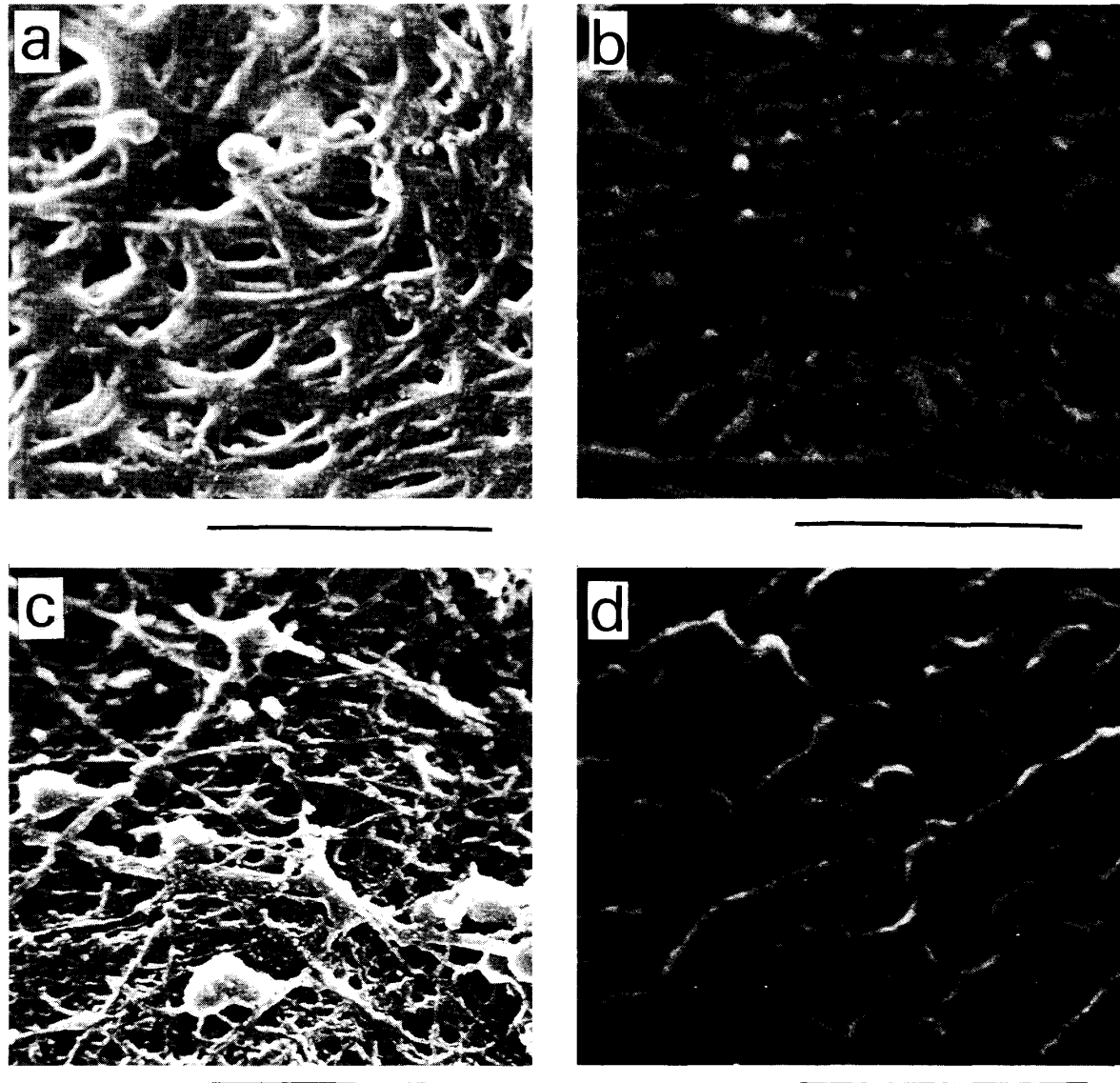


図2 走査型電子顕微鏡による卵黄膜表面構造の観察 新鮮卵の卵黄膜内層表面構造 (a, 卵黄側表面) と外層表面構造 (c, 卵白側表面)。塩酸処理により分離した内層と外層 (図1e) の接合面 (b, 連続層と接合している内層の表面) と外層に付着している連続層表面 (d)。写真の下に示した線の長さは5 μm 。

り、その膨圧で内層と外層がはずれ、それぞれ完全な一枚の膜として分離できる (連続層は外層に接合した状態で分離する。図1e, 2d)⁹⁾。内層は卵巣の卵胞顆粒細胞で卵胞成熟に伴い形成されるが、初

期の白色卵胞 (直径6 mm 以下の卵胞) には存在せず、排卵数日前から急激に成長する黄色卵胞 (直径10~35 mm) で形成が起こる³⁷⁾ (成熟した卵子は産卵後の卵黄膜内層と同じ構造をもち、内層の外側

中の I は内層, O は外層, CM は連続層を表す。写真の下に示した線の長さは4 μm (a, b) と20 μm (c, d)。

写真 e は卵白を除去した卵黄を0.01 N 塩酸に浸漬の結果、卵黄中に著しく水が入り、その膨圧で内層と外層がはずれ、それぞれ完全な状態で分離した内層 (I) と外層 (O)。内層はやや透明度が高く膜強度は低い、外層は弾力性に富み膜強度が高い⁹⁾。図2に示す連続層は外層に付着して分離される。

写真 f は卵白を除去した卵黄を0.1 M メルカプトエタノール (pH 7), 30分浸漬後の卵黄の状態を示す。著しく卵黄係数は低下し、浸漬液から取り出した卵黄は矢印で示すように、外層の一部が崩壊し内層がはみだしてくる。時間の経過とともに全体に拡がり、やがて卵黄が流れ出る。

を顆粒細胞, 基底膜, さらに厚い数層の膜や組織で覆われている)。排卵された卵子は顆粒細胞との間で分離され, 卵黄膜内層で覆われた状態で, 卵管上部の漏斗部に受けとられ, 次の膨大部へ移動する僅か15~18分間に漏斗部分泌細胞で連続層と外層が形成されると考えられている³⁸⁾。そして, 膨大部で卵白, 峡部で卵殻膜, 子宮で卵殻が形成され, 排卵から24~27時間後に排卵される³⁹⁾。

卵膜は形成される泌細胞の違いにより3種類に分類できる。すなわち, 卵子自体が泌する1次卵膜, 卵胞細胞が泌する2次卵膜, 卵管が泌する3次卵膜である。これに従えば, ニワトリ卵黄膜の内層は2次卵膜, 連続層と外層は3次卵膜に相当し, 卵白, 卵殻膜, 卵殻も3次卵膜に相当する。1次卵膜は極めて微量で薄く, 卵黄膜分離操作の過程で失われる可能性が大きいので, 以下の報告では2次卵膜と3次卵膜についてのみ論述する。

II. 卵黄膜の構造と構成成分

卵黄膜の構造は1963年に Bellairs ら⁵⁾による電子顕微鏡観察でその全貌が明らかにされ, 内層と外層構造が詳しく調べられた^{6, 38)}。その結果, 膜の厚さは24 μm, 内層と外層の厚さは1:3と報告されたが, 最近の研究では内層・外層共に4 μmと報告されている^{9, 40)} (透過型電子顕微鏡並びに光学顕微鏡による膜断面写真の内層と外層はほぼ同じ厚を示す, 図1 a, c)。卵黄膜内層の内側にはさらに薄い膜 (inner single membrane) が存在し, 卵黄膜を卵白や卵黄から分離・精製する時, 水溶液中に失われる⁴¹⁾との報告もある。

内層は太い繊維 (thick fiber) が三次元的な網目構造を形成しているのに対し, 外層は微細な繊維

表1 卵黄膜の化学組成 (g/100 g)⁹⁾

化学成分	全膜	内層	外層
タンパク質	82.1±0.3	84.0±1.0	69.0±0.5
中性糖	6.0±0.4	4.2±0.3	7.7±0.9
ヘキソサミン	7.5±0.2	7.1±0.1	10.5±0.1
シアル酸	3.0±0.2	1.0±0.1	6.2±0.2
脂質	0.9±0.1	nd*	nd

* 未測定

(fine fibril) が二次元的格子構造を形成し, これがおよそ24~26層重なった多層構造をとる (図1 a, b)。著者らの開発した方法により分離した内層の外層側から観察した繊維構造は卵黄側の繊維とはほぼ類似している (図2 b)。一方, 外層の接合面は2層とは全く異なり, 滑らかな波打構造を示しており (図2 d), 連続層が付着していると考えられた⁹⁾ (この連続層は膜試料の調製時の取り扱い方によっては失われるので, 一次的に存在が否定されたことがある^{40, 43)})。

全膜および内層, 外層, それぞれの化学組成は表1に示す。2層共, タンパク質を主成分としており, 糖は全てタンパク質に結合した形で存在している (表2)。脂質 (グリセライド, コレステロール, コレステロールエステル, 遊離の脂肪酸, スフィンゴミエリンを含む⁴³⁾) の存在形態については明らかにされていないが, 連続層または inner single membrane の構成成分かもしれない。外層は内層に比べると約2倍の糖を含むため, 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色による卵黄膜断面の観察では, 外層の密度が高く内層は低い (図1 c)。これは表2に示すように外層主成分のオボムシンが糖を多く含む (53

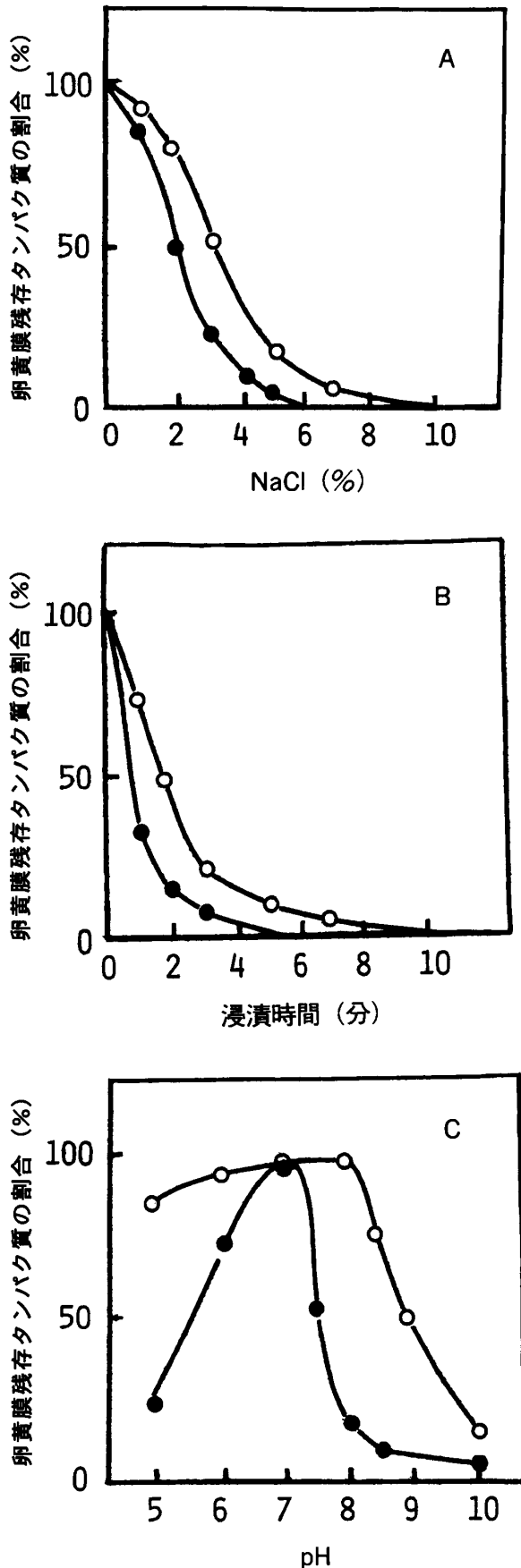
表2 卵黄膜内層と外層の構成タンパク質とその性質^{9, 31, 32, 51)}

卵黄膜	タンパク質	含有量 (%)	分子量 (kDa)	組成 (g/100 g)			
				タンパク質	中性糖	ヘキソサミン	シアル酸
内層	GP-I	32	32	96.0	4.4	3.0	1.7
	GP-II	45	183	91.5	4.1	3.3	0.6
	GP-III	20	>1,000	52.3	15.9	25.3	5.7
	GP-IV	3	nd*	nd	nd	nd	nd
外層	リゾチーム	32	14	100	0	0	0
	VMO-I	20	17	100	0	0	0
	VMO-II	5	9	100	0	0	0
	オボムシン	43	50,000	47.4	23.4	24.1	5.5

* 未測定

%) ことによる。卵黄膜には核酸⁵⁾ や酵素 (リン酸基転移酵素, RN アーゼ, ATP アーゼ, アルカリ

ホスホジエステラーゼなど)^{44~49)} も含まれているので, これらの存在が詳細に確認できれば, 連続層, inner single membrane を含めて卵黄膜の機能がより明らかになるとと思われる。



III. 卵黄膜内層タンパク質

卵黄膜内層成分は塩溶液およびアルコールには殆ど溶解しないが, タンパク質変性剤存在下で長時間の激しい攪拌により, 3種の糖タンパク質・GP-I, GP-II, GP-IIIは溶解する。GP-Iは0.5% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム)でも溶解するが, GP-IIとGP-IIIは1% SDSしか溶解せず, 尿素やグアニジン塩酸中ではいずれも会合体の形でしか溶解しない²⁹⁾。これら3種の糖タンパク質とも疎水性アミノ酸を多く含み, 内層の繊維構造の形成には疎水結合が関与している^{29~31)}。また, 内層には微量であるが, 1% SDS不溶性の糖タンパク質 (GP-IV)が存在している (表2)⁹⁾。興味あることに卵黄膜を Britton-Robinson's 緩衝液 (以下 BRB と略す), pH 2に浸漬すると内層の主成分 GP-II と GP-Iの一部が溶出する。しかし, 塩酸 (pH 2)では全く溶出せず, BRBに含まれるリン酸や酢酸の効果が大きかった⁵⁰⁾。内層の約80%が GP-I と GP-IIで占められており, これらの溶出に伴い内層は崩壊を起こすことから, 両者は内層繊維構造の基本的骨格を形成していると思われる。両者の相互作用は現在詳しく調べているが, 食塩添加や特定の pH で会合を起こすことから, イオン結合の関与が示唆されている。

IV. 卵黄膜外層タンパク質

卵黄膜外層成分中, オボムシン以外の3種のタンパク質 (いずれも塩基性で比較的低分子の単純タンパク質, 表2)は10%食塩水に浸漬すると容易に膜から溶出する (図3A, B)。これらのタンパク質が

図3 食塩及び pH による卵黄膜塩基性タンパク質の膜からの離脱 卵黄膜を食塩に浸漬し, 外層塩基性タンパク質, リゾチーム (○) と VMO-I (●)の膜からの離脱に及ぼす食塩と pH の影響を調べた。a, 食塩濃度の影響 (pH 7, 1時間浸漬); b, 浸漬時間の影響 (10%食塩, pH 7); c, pH 依存性。SDS 電気泳動により⁹⁾, 新鮮卵の卵黄膜に存在する各タンパク質含有量を100とし相対的变化をプロットした。VMO-IIは微量成分のため, 測定しなかったが, VMO-I とほぼ同じ結果を示した。

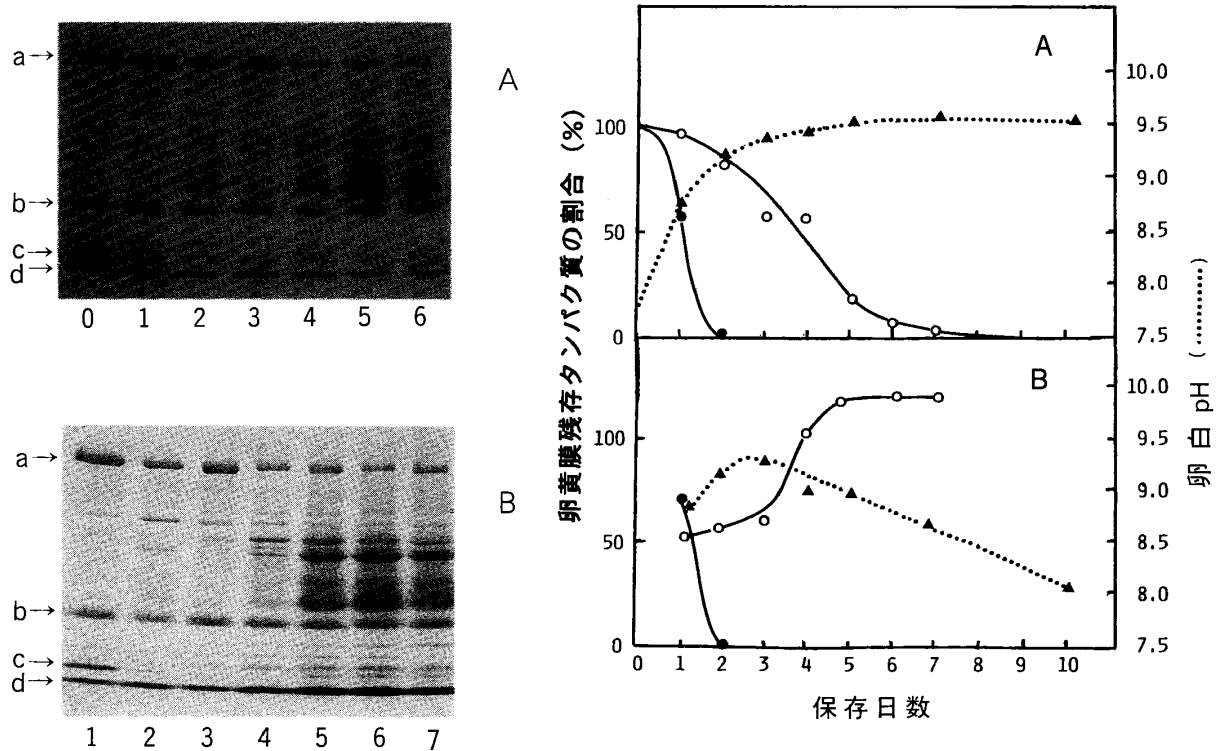


図4 未受精卵と受精卵の保存による卵白 pH と卵黄膜外層の塩基性タンパク質の変化 未受精卵 (A) と受精卵 (B) を 37.8℃ で 10 日間保存し、SDS-電気泳動により⁹⁾、卵黄膜成分の変化を調べた。新鮮卵の各タンパク質含有量を 100 とし、外層塩基性タンパク質、リゾチーム (○) と VMO-I (●) の相対的变化と各卵白 pH の変化 (▲) をプロットした。VMO-II は微量成分のため、測定しなかったが、VMO-I とほぼ同じ結果を示した。受精卵は産卵の翌日に入手したので、入手日を保存 1 日とし、卵黄膜分離が可能な 7 日後までを調べた。電気泳動パターン下の数は保存日数を、バンド a, b, c, d は GP-II, GP-I, VMO-I, リゾチームを示す。

外層から溶出しても外層の膜構造は維持され、膜強度も失われないことから、外層の基本骨格はオボムシン繊維で形成されていることが証明されている⁹⁾。リゾチーム、VMO-I 及び VMO-II (vitelline membrane outer layer protein I, II) はいずれも塩基性の強いタンパク質で (pI, 10.0~11.5)^{32,36)}、これら 3 者とオボムシンの結合は pH に依存している (図 3 C)、オボムシンのシアル酸と塩基性タンパク質のイオン結合であることが容易に推察できる。卵黄膜オボムシンは卵白ゲルを形成しているオボムシンとは共通したサブユニットを含むものの、その含有割合が異なるだけでなく、オボムシン複合体の分子サイズや糖含有量や物性などにかなりの相違がある^{9,51)}。

卵黄膜は卵黄と卵白の浸透圧の差 (1.8 atm)⁵²⁾ に耐える強度をもつ。しかし、還元剤存在下で、容易に膜強度は失われる。事実、卵白から分離した卵黄を還元剤の入った溶液に浸漬すると、図 1 f に示すように外層の膜強度が著しく失われ、卵黄の重力

を支えきれなくなり、内層が外層よりはみ出してくる。還元剤で処理すると内層はあまり変化しないが、外層の重層構造は図 1 b, d に示すように各層に分離され、著しく膜強度の低下をおこす。膜オボムシンを純化し、SDS 存在下で還元すると約 10 種のサブユニットに分かれることから、外層骨格はオボムシンの S-S 結合による高次構造で維持され、膜強度が保持されていることが分かる⁹⁾。

卵黄膜リゾチームは卵白リゾチームと全く同一の活性をもつこと、食塩処理膜 (リゾチームを完全に除去した膜) を卵白溶液とインキュベーションすると卵白リゾチームは膜に結合してくること、また貯蔵中、CO₂ が卵白から逸散して卵白 pH が上昇するとリゾチームは膜から離脱するが、ふ化により卵白中に CO₂ が増加し、卵白 pH が低下すると膜リゾチームは産卵直後よりも増加することや (図 4 B)、両者のアミノ酸組成⁴⁰⁾ から、膜リゾチームは卵白リゾチームと同一と考えている。

VMO-I は Back ら⁴⁰⁾ によって見出されたが、著

者らは一次構造を決定し、既知タンパク質のアミノ酸配列と相同性が少ないことから、新規タンパク質であることを明らかにした³⁶⁾。さらに X 線解析による高次構造の決定により、VMO-I の新しいユニークな立体構造が立証された³⁴⁾。VMO-I は β シートのみからなる全 β 型のタンパク質で、「グリークキー」と呼ばれる β 構造が3回繰り返している。グリークキー・モチーフ自体は逆平行型 β 構造によく現れるだけでなく、ジェリーロール・バレルを形成し、植物レクチンのコンカナバリン⁵³⁾ やインフルエンザウイルスの赤血球凝集素タンパク質⁵⁴⁾ などに見つかっている。ところが、VMO-I のグリークキー・モチーフは三角形のプリズム表面に3回対称的に配置した「 β プリズム」と命名された高次構造をもつことが明らかとなり、新たな高次構造をもつ一群のタンパク質 (super family) として立証された⁵⁵⁾。現在、VMO-I 以外に δ -エンドドキシンのドメイン II に β プリズム構造が存在していることが判明している⁵⁵⁾。 δ -エンドドキシンは昆虫毒素タンパク質で、*Bacillus thuringiensis* に存在し、3つのドメインをもち、昆虫細胞膜上に存在する受容体・糖タンパク質とドメイン II が結合する^{56~58)}。 β プリズム構造が存在する2つの種は進化的に遠いことから、この β プリズム構造は案外、多くのタンパク質に存在している可能性がある。

VMO-I にちなみ VMO-II と命名されたタンパク質は、発見当初は分子量が小さく塩基性が強いいため、リゾチームもしくは VMO-I の断片化物と考えていたが、一次構造の決定により全く異なるタンパク質であることが明らかにされた³²⁾。さらに、際だって S-S 結合を多く含むこと、6 M グアニジン塩酸では変性するが尿素や還元剤存在下でも高次構造は変化しないこと、熱安定性が極めて高い (pH 3~4.6, 尿素存在下で、95℃まで加熱しても高次構造は変化しない) などの性質も明らかになった^{32,59)}。VMO-II の高次構造は現在解析中であるが、82残基のアミノ酸配列に6個の S-S 結合が存在し、しかも Cys-Cys の配列が2箇所も存在する。隣接した Cys 間では S-S 結合が形成されないことから、この部分に2本のペプチド鎖が集束されるとすれば、非常に密な硬い構造をとっていると思われる。後述のように、このタンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示すタンパク質はかなり存在し、それらのタンパク質の機能性との関連に興味をもたれる。

V. 卵黄膜および構成タンパク質の機能性

卵黄膜は受精の際、内層タンパク質のいずれかが特定の精子のみを認識する重要な役割をもつと考えられている^{17~22)}。ニワトリで、精子とインキュベーションすると内層に直径9 μ m の孔が開き精子が通過すること²⁰⁾ や酸可溶性の内層成分とインキュベーションした精子は内層に結合しないこと⁶⁰⁾ から、内層が精子認識機構を備えていると推察されている。しかし、鳥類の受精が卵管のどの部分で起こるか、また、外層が付く前か後か、意見が分かれ、詳しいことは分かっていない。哺乳類ではネズミの受精機構の研究が進んでおり、ニワトリの内層に相当する透明帯 (zona pellucida) は3種の糖タンパク質 (ZP 1, ZP 2, ZP 3) から構成され、そのうち、分子量 830 kDa の ZP 3 のみが精子レセプターの機能をもつことが分かっている。精子が卵黄膜に結合すると、先体反応が起こりトリプシン様のタンパク質分解酵素が放出され、透明帯を精子が通過し、卵子細胞膜と融合する。また、分子量 200 kDa の ZP 2 は先体反応を起こした精子を透明帯に保持し、さらに、他の精子の透明帯への結合を阻止している^{61,62)}。前述のニワトリ卵黄膜内層の GP-I, GP-II は ZP タンパク質と同様、酸溶液に溶け出す性質をもち、GP-I, GP-II の詳しい糖鎖構造は決定されていないが、GP-II は赤血球凝集阻止活性をもつ。アルカリで不安定なことから³¹⁾ O 結合オリゴ糖の存在が考えられ、また、糖組成との共通性から O 結合オリゴ糖をもつ ZP 3 に関連していると思われる。事実、GP-II の一部のアミノ酸配列から、ZPA のホモログと同定されている⁶³⁾。いずれにしても、受精の機構は複雑な多種の相互作用を伴った反応なので完全な解明には時間を要するであろう。

一方、外層は多受精防止に関わっていることが、Bakst ら^{21,22)} によって報告された (外層のオボムシン繊維が物理的な障壁になって精子の進入を阻止している)。しかし、最近著者らは、VMO-II が化学的にも精子進入を阻止している役割をもつことをつきとめた⁵⁹⁾。また、VMO-II の一次構造はヘビ毒、凝集素、レセプターなどの機能性をもつタンパク質と高い相同性をもつことから、その高次構造と機能性との相関関係に興味をもたれる。さらに、VMO-I は細胞の伸張成長促進⁶⁴⁾ 及び接着因子の作用⁶⁵⁾ をもつ。BRB 処理により、外層から塩基性タンパク質が離脱すると、外層の重層構造が広がることから、塩基性タンパク質のいずれか (VMO-I ま

たは II) が、外層の接着因子である可能性が高い。また、VMO-I は糖重合活性 (N-アセチルグルコサミン) をもつことが報告されている³⁷⁾。VMO-I は分子上部に大きなくぼみ (cavity) をもち、5つのオリゴ糖 (N-アセチルグルコサミン) を収容するサイズをもつだけでなく、リゾチーム分子のクレフト (大きな溝) にリゾチームの基質である N-アセチルグルコサミン 4~6 量体との結合様式とよく似ていることがコンピューターグラフィック上から立証された^{36,66)}。膜リゾチームは卵白リゾチームと同じ溶菌活性をもつことから、卵黄を微生物から最終的に守る役割を果たしているが、卵白に比べ卵黄膜外層には10倍近くも存在すること、リゾチームには弱い糖転移活性⁶⁷⁾ もあることから、膜リゾチームの機能としては溶菌活性より糖転移活性が重要なかもしれない。これらの VMO-I の性質を考慮すると、VMO-I は卵黄膜外層構造の安定化あるいは分化の際の卵黄膜表面に存在してくる血管などの伸張成長などに関与しているのかもしれない。

食卵の品質管理面からも卵黄膜は重要な役割を果たしている。卵黄膜内層は主として透過性のコントロール、外層は主として膜強度を維持する役割をもつ⁹⁾。貯蔵卵の膜劣化の機構については、次回に述べることにするが、貯蔵に伴う卵黄係数の低下は膜強度の低下と密接な関係がある^{3,9)}。また、貯蔵卵で、膜の透過性が変化し、黄斑 (卵白から卵黄中へ水が入り、卵黄表面に現れる薄い斑点) が現れることがある⁶⁸⁾。黄斑は新鮮卵にも代謝異常のため現れることがある。このような卵では卵黄中に卵白タンパク質のオボアルブミンやコンアルブミンが検出され、卵黄の水分含有量も高くなり、卵黄の乳化性や卵白の起泡性への影響は大きい^{7,69)}。また、卵黄膜には前述の通り熱に極めて抵抗性の高いタンパク質 (VMO-II) なども存在するため^{9,59)}、近年、深刻な社会問題となっているアレルゲンタンパク質としての膜タンパク質の性質も明らかにする必要がある。

卵は発生に必要な全ての物質を含んでいるが、その中で、現在有効利用されている物質は少なく、まだ様々な未知の生理活性物質が埋もれている可能性が高いので、今後の研究開発により、多くの分野への有効利用を期待する。

文 献

- 1) J. N. Dumont, and A. R. Brummett: *Developmental Biology: a comprehensive synthesis* (L. W. Browder, ed.), 1, p. 235, Plenum Press, New York (1985)
- 2) E. H. McNally: *Poultry Sci.*, **22**, 1545 (1943)
- 3) R. E. Feeney, J. M. Weaver, J. R. Jones, and M. B. Rhodes: *Poultry Sci.*, **35**, 1061 (1956)
- 4) D. Fromm: *Poultry Sci.*, **43**, 1240 (1964)
- 5) R. Bellairs, M. Harkness, and R. D. Harkness: *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 339 (1963)
- 6) C. Jensen: *J. Embryol. Exp. Morph.*, **21**, 467 (1969)
- 7) W. M. Britton: *Poultry Sci.*, **52**, 459 (1973)
- 8) D. Fromm, and G. Martone: *Poultry Sci.*, **41**, 1516 (1962)
- 9) S. Kido, and Y. Doi: *Poultry Sci.*, **67**, 476 (1988)
- 10) A. L. Romanoff, and A. J. Romanoff: *The avian egg*, Wily, New York (1949)
- 11) D. Fromm: *Poultry Sci.*, **45**, 374 (1966)
- 12) F. S. Shenstone: *Egg quality: a study of the hen's egg* (C. Carter ed.), Oliver and Boyd, Edinburgh (1968)
- 13) J. L. Heath: *Poultry Sci.*, **55**, 936 (1976)
- 14) J. L. Heath: *Poultry Sci.*, **56**, 822 (1977)
- 15) F. J. Garcia, and A. Pons: *Comp. Biochem. Physiol.*, **82A**, 289 (1983)
- 16) A. Pons, F. J. Garcia, A. Palou, and M. Alemany: *Comp. Biochem. Physiol.*, **82A**, 289 (1985)
- 17) B. B. Langford, and B. Howarth: *Poultry Sci.*, **53**, 834 (1974)
- 18) J. J. L. Ho, and S. Meizel: *J. Exp. Zool.*, **194**, 429 (1975)
- 19) F. Okamura, and H. Nishiyama: *Cell Tissue Res.*, **188**, 497 (1978)
- 20) B. Howarth: *Poultry Sci.*, **69**, 1012 (1990)
- 21) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 361 (1977)
- 22) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 370 (1977)
- 23) 今井忠平: 鶏の研究, **507**, 69 (1969)
- 24) J. St. John, and I. H. Flor: *Poultry Sci.*, **10**, 71 (1931)
- 25) F. E. Cunningham, and O. J. Cotterill: *Poultry Sci.*, **43**, 283 (1964)
- 26) F. E. Cunningham, and O. J. Cotterill: *Poultry Sci.*, **51**, 721 (1964)
- 27) O. J. Cotterill, W. E. Seideman, and E. M. Funk: *Poultry Sci.*, **44**, 228 (1965)

- 28) P. Varadarajulu, and F. E. Cunningham: *Poultry Sci.*, **51**, 542 (1972)
- 29) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **78**, 261 (1975)
- 30) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **79**, 1351 (1976)
- 31) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **80**, 1543 (1977)
- 32) S. Kido, A. Morimoto, F. Kim, and Y. Doi: *Biochem. J.*, **286**, 17 (1992)
- 33) T. Shimizu, K. Morikawa, S. Kido, and Y. Doi: *J. Mol. Biol.*, **235**, 793 (1994)
- 34) T. Shimizu, D. G. Vassylev, S. Kido, Y. Doi, and K. Morikawa: *EMBO J.*, **13**, 1003 (1994)
- 35) A. Uyeda, C. Inuzuka, Y. Doi, S. Kido, and M. Kikuchi: *Gene*, **144**, 311 (1994)
- 36) S. Kio, Y. Doi, F. Kim, E. Morishita, H. Narita, S. Kanaya, T. Ohkubo, K. Nishikawa, T. Yao, and T. Ooi: *J. Biochem.*, **117**, 1183 (1995)
- 37) R. Bellairs: *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **13**, 215 (1965)
- 38) J. M. Bain, and J. M. Hall: *Aust. J. Biol. Sci.*, **22**, 653 (1969)
- 39) A. B. Gilbert: *Form and Function in Birds* (A. S. King and J. McLelland ed.) **1**, p.237, Academic Press, London (1979)
- 40) J. F. Back, J. M. Bain, D. V. Vadehra, and R. W. Burley: *Biochim. Biophys. Acta*, **705**, 12 (1982)
- 41) J. Jordanov, I. Georgiev, and A. Boyadjieva-Mihailova: *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, **19**, 153 (1966)
- 42) S. Fujii, T. Tamura, and T. Okamoto: *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* **11**, 1 (1972)
- 43) K. Suyama, H. Nakamura, M. Ishida, and S. Adachi: *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 799 (1977)
- 44) J. E. Haaland, and M. D. Rosenberg: *Nature*, **223**, 1275 (1969)
- 45) I. Debruyne, and J. Stockx: *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **84**, 148 (1976)
- 46) S. De Boeck, and J. Stockx: *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **86**, 935 (1978)
- 47) S. De Boeck, and J. Stockx: *Int. J. Biochem.*, **18**, 623 (1986)
- 48) S. Noda, and W. Schoner: *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 395 (1986)
- 49) S. Noda, F. Horn, D. Linder, and W. Schoner: *Eur. Biochim.*, **155**, 643 (1986)
- 50) 木戸詔子, 土居幸雄, 謝名堂昌信: 日本農芸化学会誌, **71**, 臨時増刊号, 103 (1997)
- 51) 木戸詔子, 土居幸雄, 謝名堂昌信, 大井龍夫: 日本生化学会誌, **67**, 632 (1994)
- 52) R. W. Burley, and D. B. Vadehra: *The Avian Egg: chemistry and biology*, p. 166, John Wiley & Sons, Canada (1989)
- 53) G. M. Edelman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2580 (1972)
- 54) I. A. Wilson, J. J. Shehel, and D. C. Wiley: *Nature*, **289**, 366 (1981)
- 55) C. Chathian and A. G. Marzin: *Structure*, **1**, 217 (1993)
- 56) A. Z. Ge, N. I. Shivatova, and D. H. Dean: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 4037 (1989)
- 57) H. E. Schnept, K. Tomczac, J. P. Orteze, and H. R. Whitely: *J. Biol. Chem.*, **265**, 20923 (1990)
- 58) W. R. Widner, and H. R. Whitely: *J. Bacterol.*, **172**, 2826 (1990)
- 59) S. Kido, Y. Doi, M. Mori, and T. Ooi: *Characterization of vitelline membrane outer layer protein II, VMO-II: amino acid sequence and structural properties* (in press)
- 60) F. Okamura, and H. Nishiyama: *Cell Tissue Res.* **188**, 497 (1978)
- 61) P. M. Wassarman: *Sci. American*, **256**, 78 (1988)
- 62) J. D. Bleil, and P. M. Wassarman: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **85**, 6778 (1988)
- 63) 西村圭司, 竹内幸成, 青木直人, 北島 健, 松田 幹: 日本農芸化学会誌, **71**, 臨時増刊号, 178 (1997)
- 64) 成田宏史, 木戸詔子, 土居幸雄: 食に関する助成研究調査報告書(すかいらく・フードサイエンス研究所), No. **4**, 59 (1994)
- 65) 若松利男, 山浦淑子: 日本農芸化学会誌, **65**, 講演要旨, 379 (1991)
- 66) T. Shimizu, and K. Morikawa: *TIBS*, **21**, 3 (1996)
- 67) M. A. Rafrery, and T. Rand-Meir: *Biochemistry*, **7**, 3281 (1968)
- 68) C. D. Blackshear, K. N. May, and R. K. Noles: *Poultry Sci.*, **47**, 625 (1968)
- 69) F. E. Cunningham: *Poultry Sci.*, **55**, 994 (1976)