

卵管における卵黄膜外層タンパク質の分泌部位の解析

内藤 洋子, 橋本 康代, 木戸 詔子

The Secretary Regions of Vitelline Membrane Outer Layer Proteins in the Oviduct

Yoko Naito, Yasuyo Hashimoto and Shoko Kido

To clarify the formation of the vitelline membrane outer layer we examined the proteins secreted from hen oviduct by using Western blotting analysis. Antibodies were elicited against vitelline membrane outer layer protein-I (VMO-I) and against the one of subunit (S8) of ovomucin obtained from albumen. It was found that VMO-I was mostly secreted from the middle region of the infundibulum. On the contrary, S8 was secreted from the lower region of the infundibulum over the lower region of the magnum. These findings indicated that 1) VMO-I is present in the infundibulum prior to the formation of the outer layer, 2) the chalaziferous layer is formed at the upper region in the magnum, 3) the albumen is formed at the middle region to the lower region in the magnum.

ニワトリの卵黄膜は卵黄を包む半透明な膜で、卵白と卵黄を仕切る境界膜としての役割を果たすだけでなく、胚の発生に重要な栄養の運搬や受精の際の精子の認識¹⁻⁴⁾、多受精防止^{5,6)}など、多くの重要な役割を担っている。

卵黄膜 (vitelline membrane) は、卵黄に接する卵黄膜内層 (内層: inner membrane) と卵白に接する卵黄膜外層 (外層: outer membrane) の2層から構成され、この2層の間には極めて薄い連続層 (continuous membrane) が存在する^{7,8)}。内層は太い繊維の三次元的網目構造をとっているのに対し、外層は微細な繊維からなる二次元的格子構造が重層した構造をとり、それぞれ約4 μ mの厚さをもっている^{8,9)}。卵子 (卵黄) は卵巣で成熟し、排卵後に卵管の最上部の漏斗部で受け取られる。排卵前の成熟卵には内層が既に存在しているが、外層は漏斗部を通過するわずか15~25分間に形成されると考えられている¹⁰⁾。卵黄が卵管の膨大部へ移行すると卵白タンパク質が分泌され、峡部では卵殻膜、卵殻腺部 (子宮) では卵殻が形成され放卵される¹¹⁾。

内層は4種の糖タンパク質 (GP-I~GP-IV) から構成されているが、外層はオボムシン繊維を基本骨格とし、塩基性タンパク質であるリゾチーム、

VMO-I および VMO-II (vitelline membrane outer layer protein-I, -II) がイオン結合している^{12,13)}。外層のオボムシンは、卵黄膜の外層構造に重要な役割を果たしている⁸⁾。卵白やカラザにもオボムシンは含まれており、卵白ではゲル構造の維持に関与し、カラザ層およびカラザコードでは繊維構造の維持に関与している。卵の各部位に存在するオボムシンの性質は物性に相違があるだけでなく、約10種からなるサブユニットの構成割合にも相違が認められている^{8,14)}。カラザ層は卵黄膜表面を覆う繊維層であるが、卵白と類似したタンパク質で構成されている^{15~17)}。

鳥類の受精についてはほとんどわかっておらず、卵管のどの部位で行われるのか、明らかにされていないが、外層が形成される漏斗部であろうと推察されている^{11,18)}。高等動物の受精については哺乳類のマウスでの研究が進んでおり、膨大部で受精が起こることが明らかにされている^{19,20)}。マウスの卵子の卵黄膜は透明帯 (zona pellucida) と呼ばれ、ニワトリの内層に相当し、マウスにはニワトリの外層に相当するものは存在しない。透明帯に存在する糖タンパク質は精子レセプターの機能をもつことが報告されているが^{19,20)}、ニワトリの卵黄膜内層の糖タンパク質も類似した性質をもつことが示唆されている^{21,22)}。一方、外層はオボムシン繊維が精子の侵入

の物理的障害となることで、多受精防止機能を果たすことを Bakst ら^{5,6)} は報告している。しかし最近、著者らは VMO-II にトリプシンインヒビター活性があることを見出した。実際に、精子と卵黄膜をインキュベーションしたとき、VMO-II の存在下では精子の膜溶解作用（トリプシン様作用）が阻止された。このことから、VMO-II が精子の先体反応を阻止し、鳥類の多受精防止機構に関与していることが推察された²³⁾。

そこで、卵黄膜の多受精防止機構を解明するため、外層の骨格を形成しているオボムシンとトリプシンインヒビター活性をもつ VMO-II の卵管での分泌部位を明らかにすることにより、外層タンパク質の精子先体反応におよぼす役割について検討した。また、外層タンパク質 VMO-I の分泌部位についても解析し、外層に存在するタンパク質や膜機能についても考察した。

実験方法

1. 卵管分泌タンパク質の抽出

産卵鶏から屠殺直後に卵管を分離し、1～2時間以内に図1Aに示すように漏斗部 (infundibulum) を3部位に、膨大部 (magnum) を5部位に分け、さらに各部位を2×2mmにカットし、1%食塩溶液で1時間抽出した後1% SDS 溶液でそれぞれ1時間の抽出を行った。食塩抽出画分は0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) で透析し、遠心 (10,000×g, 20分) により上清と沈殿画分に分けた。得られた上清画分を食塩画分とし、沈殿画分を酸画分とした。1% SDS 溶液で抽出した画分は SDS 画分とした。

2. 卵黄膜外層タンパク質の分離

産卵当日の新鮮卵から既報⁸⁾ に従い卵黄膜を分離し、10%食塩溶液に浸漬して外層の塩基性タンパク質を抽出し、0.2 M 酢酸緩衝液に透析後、CM-トヨパール 650 M (2.5×27 cm カラム) のイオン交換クロマトグラフィーにかけ、さらにリクロマトグラフィーを行うことにより高純度の VMO-I と VMO-II を単離した²⁾。

卵黄膜オボムシンは、10%食塩浸漬して塩基性タンパク質を除去した卵黄膜から精製した。浸漬膜を蒸留水で洗浄し、1% SDS 溶液中で15時間、マグネチックスターラーを用いて激しく攪拌溶解後、高速遠心 (10,000×g, 20分) にかけて沈殿画分にオボムシンを分離した。1% SDS 溶液で徹底的に洗浄を繰り返して、オボムシンを精製した。沈殿画分に得られた精製オボムシンは4倍量の1% SDS 溶液

を加え、5倍希釈の均一液として4°Cで保存した⁸⁾。卵白オボムシンは新鮮卵から分離した濃厚卵白を用いて調製した。卵白を最終的に6倍希釈とし、SDSを終濃度が1%となるように加え、スターラーを用いて、緩やかに15時間溶解後、高速遠心にかけ、カラザなどの不溶物を除去した上清液をセファロース CL-4B (3.6×50 cm カラム) によるゲル濾過を行い、Vo 画分に溶出するオボムシンを分離した⁸⁾。精製した卵黄膜および卵白オボムシンを2% SDS を含む500 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) に溶解し、50 mM ジチオスレイトール (DTT) で4時間それぞれ還元し⁸⁾、20 mM DTT を含む1% SDS 溶液を溶出液とし、セファロース CL-4B (3.6×50 cm カラム) によるゲル濾過を行い、卵黄膜オボムシンに特有なサブユニット S5 と卵白オボムシンに特有なサブユニット S8 を分離し、抗体作製の試料とした。ゲル濾過は280 nm の UV モニターを使用し、流速60 ml/hr 分画3 mlで行った。タンパク質濃度はLowry法²⁴⁾により求めた。各試料の純度は SDS-電気泳動で確認をした。

3. 抗体の作製

卵黄膜外層タンパク質の VMO-I, VMO-II およびオボムシンサブユニット S5 と卵白オボムシンサブユニット S8 をそれぞれ1 mg/ml に調製し、抗原として用いた。各抗原1 mg を4回に分けてそれぞれ3匹のマウスに2週間毎に注射して、10週目に脾臓のB細胞を取り出し、ミエノローマ細胞と細胞融合させて得られたハイブリドーマ細胞を培養し、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製した。

4. SDS-電気泳動およびウエスタンブロットティング

Laemmli ら²⁵⁾ の方法に従い、5～20%ポリアクリルアミドグラジェントゲルを用い、SDS-スラブ電気泳動を行い、クマジ染色によりタンパク質の検出を行った。また抗体を使用した免疫法による検出は、SDS-電気泳動後、ウエスタンブロットティングを用いてPVDF膜に転写後、アルカリホスファターゼ (ALP) 法⁶⁾ とエンハンスドケミルミネッセンス (ECL) 法により抗原の検出を行った。SDS-電気泳動の試料は目的に応じ、タンパク質5～15 μg 相当量を用いた。

実験結果

産卵鶏の卵管には通常、卵2個分の卵白タンパク質が貯えられていると報告されている¹¹⁾。図1Aに示すように卵管は上部から漏斗部、膨大部、狭部、

子宮、膣、総排泄腔と続くが、これら各部位を正確に外側から判別することは困難である。しかし、屠殺直後の卵管では、各部位の分泌腺に特徴があるので、図1Bに示すように、卵管の漏斗部最上部から狭部までを縦に切り開き、内側から組織を観察すると卵管各部位を正確に区別することができた。そこで図1Aに示したように、卵黄膜外層の形成部位と考えられている卵管最上部の漏斗部を3つの部位に、卵白タンパク質の分泌部位である膨大部を5つの部位に切断し、下記に示すように各種溶媒で抽出し、その抽出液中のタンパク質を分析することにより、卵黄膜外層タンパク質の卵管での分泌部位を検索することにした。まず、1%食塩溶液を用いて可溶化するタンパク質を抽出した。この抽出溶液を0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) で透析したところ沈殿が生じたので、遠心して上清と沈殿に分け、上清を食塩画分、沈殿を酸画分とした。食塩抽出後の卵管を1% SDS 溶液で抽出し、得られた画分を SDS 画

分とした。食塩、酸、SDS の3画分をそれぞれ SDS-電気泳動で調べたところ、卵黄膜外層タンパク質の検出は困難であったため、卵黄膜外層特有のタンパク質である VMO-I, VMO-II およびオボムシンに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製して、高感度の検出を試みることにした。ただし、オボムシンは卵白中にも存在し、卵黄膜オボムシンと共通のサブユニットを含むため、卵黄膜と卵白にそれぞれ特有なサブユニットを分離精製し、抗原として用いることにした。卵黄膜タンパク質にはリゾチームも含まれるが、卵白リゾチームと同一のタンパク質であるため、本研究では対象外とした。

1. 抗原タンパク質の精製

抗原として用いる卵黄膜外層タンパク質を精製し、純度の確認を行うために SDS-電気泳動にかけた (図2)。卵黄膜外層タンパク質の VMO-I および VMO-II は、既報^{12,13)} に従い卵黄膜の食塩抽出

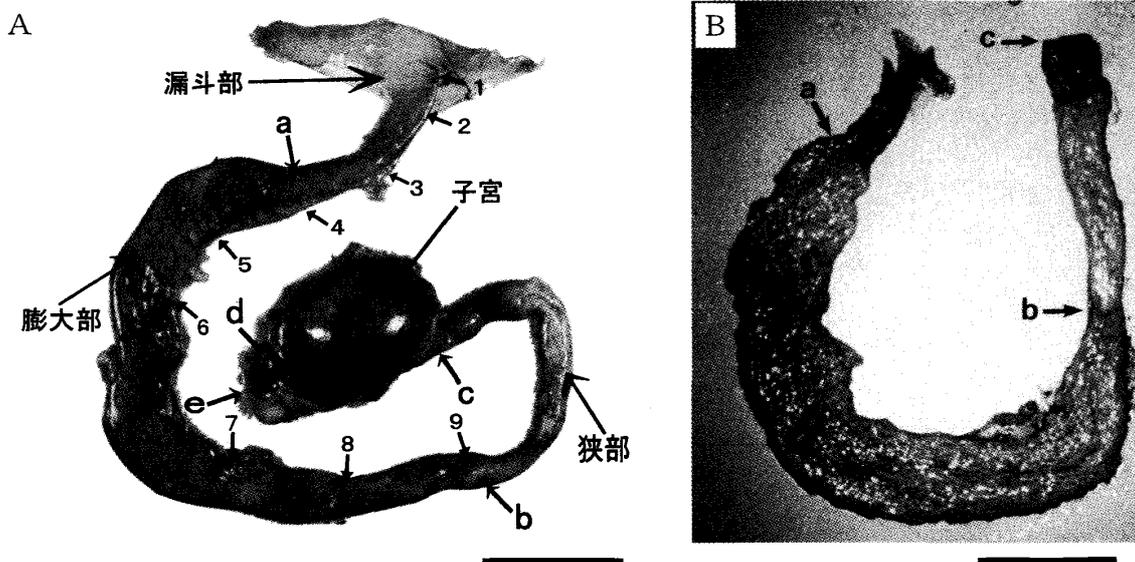


図1 産卵鶏の卵管と試料区分

A. 外側からの観察図：産卵鶏の卵管は大きく上部から漏斗部 (矢印 a まで)、膨大部 (矢印 a~b)、狭部 (矢印 b~c)、子宮 (矢印 c~d) に分けられる。矢印 e は総排泄腔を示す。卵黄膜外層タンパク質の分泌部位の検索のために、漏斗部を I~III の3部位 (矢印 1~2, 2~3, 3~4) に、膨大部を IV~VIII の5部位 (矢印 4~5, 5~6, 6~7, 7~8, 8~9) に区分した。子宮には殻付き卵が滞留している。

B. 内側からの観察図：写真 A の漏斗部最上部から狭部下端 (矢印 C) までを縦に切り開き、漏斗部、膨大部、狭部の内側にある分泌腺を観察した。漏斗部 (矢印 a まで) の上から 1/3 には分泌腺はほとんど存在しない。漏斗部の分泌腺はあまり発達しておらず、肉色を呈している。膨大部 (矢印 a~b) は分泌腺がよく発達しており、突出したひだが縦方向に配列し、分泌腺が全面に密集して存在している。狭部に近い分泌腺 (膨大部下端 2 cm) は膨大部全体の分泌腺とは形状が異なっている。狭部 (矢印 b~c) になると、分泌腺の形状は膨大部分分泌腺に比べてやや平面的になり、子宮に近い狭部下端より 3 cm の部分 (red region と呼ばれる) には分泌腺が少ない。写真 A および B の下に示した線の長さは 5 cm を示す。

画分を CM-トヨパール 650 M を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけそれぞれ分取した。さらに、両タンパク質ともリクロマトグラフィーにより精製した結果、いずれも99%以上の純度であった(図2, aの2と3)。オボムシンを精製するために卵黄膜および卵白は既報⁸⁾に従い、それぞれ1% SDS 溶液を用いて溶解した。卵黄膜の1% SDS 溶液を高速遠心にかけて沈殿するオボムシンを分取した。一方、卵白の1% SDS 溶液をセファロース CL-4B によるゲル濾過にかけ、Vo 画分に溶出するオボムシンを分離した。両オボムシンともに巨大分子であるため、SDS-電気泳動のコウムに蓄積され、5%

ポリアクリルアミドの粗孔ゲルにも入ることができない(図2, bの1とcの1)。しかし、2% SDS 存在下で50 mM ジチオスレイトール (DTT) で還元すると、両者ともに約10種類のサブユニットに分かれた(図2, bの2とcの2)。両者は共通したサブユニットも含むが、図2の矢印に示すように卵黄膜ではサブユニット S5、卵白ではサブユニット S8 がそれぞれ特異的に存在すると思われる。そこで、それぞれ還元した両オボムシンを、20 mM DTT を含む1% SDS 溶液を用いてセファロース CL-4B によるゲル濾過にかけた(図3)。得られたそれぞれの溶出ピークを SDS-電気泳動で分析した

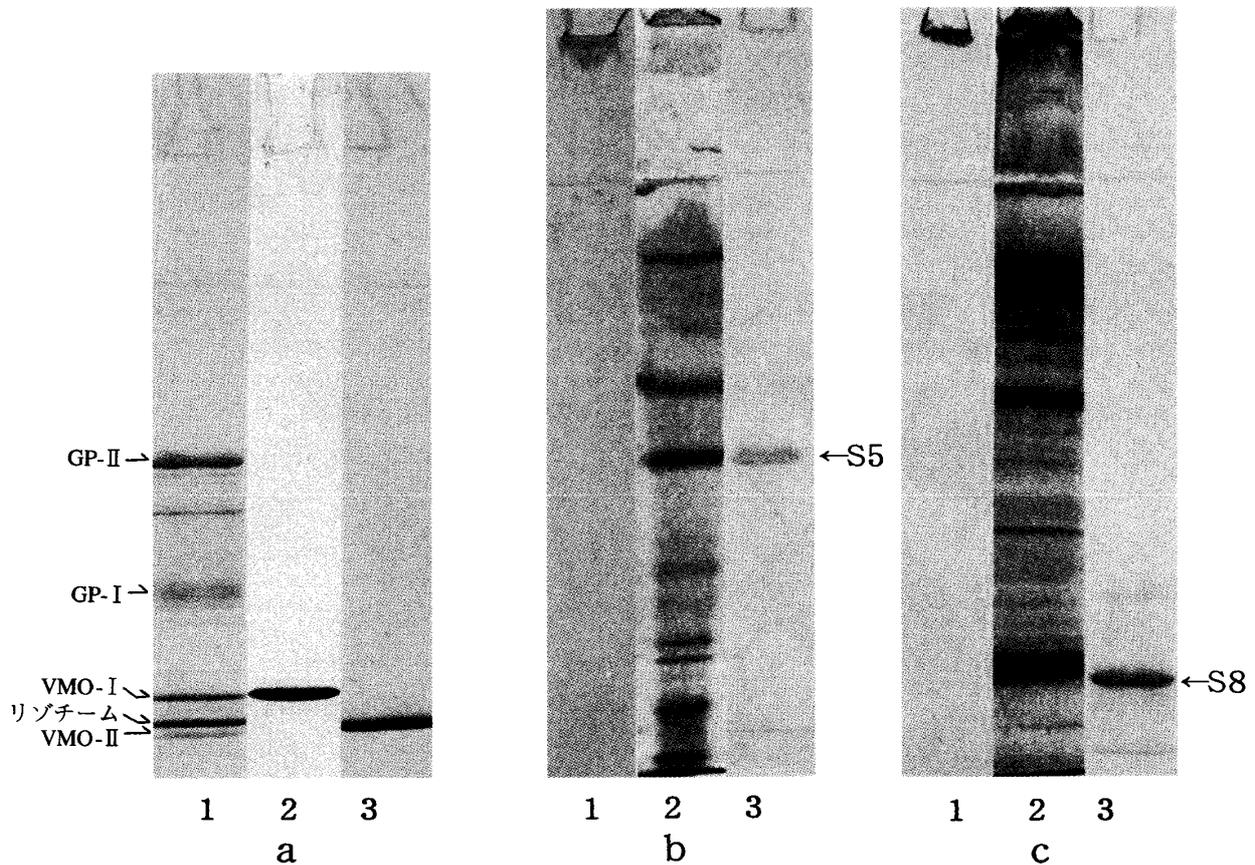


図2 抗原タンパク質の SDS-電気泳動パターン

aの1は精製卵黄膜 (タンパク質 10 μg) の SDS 可溶性タンパク質を示す。GP-I と GP-II は糖タンパク質で、両者で内層成分の約80%を占める。VMO-I、リゾチームおよび VMO-II は単純タンパク質で、3者で外層の約60%を占める。aの2と3はイオン交換クロマトグラフィーにより精製した VMO-I と VMO-II (それぞれタンパク質 5 μg) を示す。bの1は精製卵黄膜オボムシン (タンパク質 37 μg) を示し、bの2はその還元パターンを示す。cの1は卵白オボムシン (タンパク質 60 μg) を示し、cの2はその還元パターンを示す。オボムシンは糖を多く含み、卵白オボムシンは32%、卵黄膜オボムシンは50%の糖を含むため、CBB には染色されにくい。未還元の卵黄膜および卵白オボムシンは巨大分子のため、ゲルコウムに蓄積されている (bの1とcの1)。還元によって得られた両オボムシンサブユニットは全て糖タンパク質である。bの3とcの3は図3のゲル濾過クロマトグラフィーで分離したオボムシンサブユニット S5 と S8 (それぞれタンパク質 5 μg) を示す。aは5~30%ポリアクリルアミドグラジエントゲル、bとcは5~10%ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用い、CBB 染色を行った。

ところ、矢印の範囲で示す溶出位置にサブユニット S5 とサブユニット S8 が溶出していることがわかった。そこでそれらを取り出し、SDS-電気泳動にかけたところ、それぞれ約95%の純度であった(図2, bの3とcの3)。

純化した VMO-I, VMO-II およびオボムシン S5 と S8 をそれぞれ抗原として、常法に従い、それぞれのポリクローナル抗体を作製した。VMO-I については、3匹のマウスから208種のハイブリドーマが得られ、2回のクローニングを経て、6個のクローンが得られた。解析の結果、No.28 抗体が VMO-I に特異的であることがわかったので、これをプロライン A カラムを用いて純化し²⁶⁾、以下の実験に用いた。

2. 抗体の特異性

作製した各抗体の特異性を確認するために、精製した VMO-I, VMO-II および卵黄膜オボムシンサブユニット S5 と卵白オボムシンサブユニット S8 を SDS-電気泳動にかけ、ウェスタンブロッティングにより PVDF 膜に転写した後、作製した抗体を用いて ALP および ECL で染色を行った(図4, A と B)。VMO-I No.28 抗体を用いた結果、ALP 染色では VMO-I, 100 ng に対しては強く、

10 ng でも弱い陽性反応を示したが、ECL 染色では、10 ng でも明確に検出できる抗体が得られていた(図4 a)。この抗体と卵黄膜および卵白タンパク質とを交差させた結果、VMO-I のみを認識するモノクローナル抗体であった。しかし VMO-II 抗体を用いた結果では、ECL 染色においても 100 ng 以下の VMO-II を認識できる抗体は得られていなかった(図4 b)。卵黄膜オボムシンの S5 抗体を用い、卵黄膜および卵白オボムシンの両サブユニットと交差させたところ、矢印で示す卵黄膜サブユニット S5 をやや強く認識するものの、それ以外の卵黄膜および卵白サブユニットにも陽性反応を示し、S5 を特異的に認識する抗体が得られていないことがわかった(図4 c)。卵白オボムシン特有のサブユニットである S8 抗体を用いた結果、感度の高い ECL 染色では S8 以外のバンドも一部検出されたものの、S8 を強く認識するポリクローナル抗体が得られていた(図4 d の矢印)。図2 で示したように、SDS-電気泳動で両オボムシンサブユニットを比較したとき、卵白の S8 は含有量が多く、卵黄膜の S8 とは移動度にやや差があったため、これまでは S8 は卵白オボムシンに特有のサブユニットであると考えていた。しかし、ALP と ECL

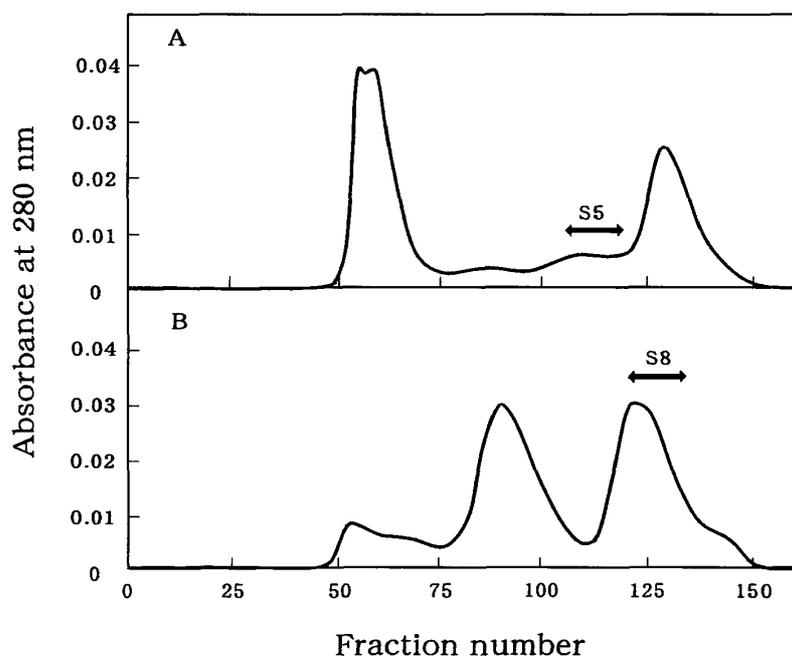


図3 卵黄膜 (A) および卵白 (B) の還元オボムシンのゲル濾過パターン

精製した卵黄膜および卵白オボムシン各 5 mg を還元後、20 mM DTT を含む 1% SDS を溶出液としてゲル濾過を行い、3 ml ずつ分画した。280 nm の UV モニターで検出して得られたピークを、それぞれ SDS-電気泳動にかけたところ、矢印で示す範囲に両オボムシンに特有なサブユニット S5 および S8 がそれぞれ溶出していることがわかったので、A の分画 No.106~118 と B の分画 No.119~131 をそれぞれ分取した。

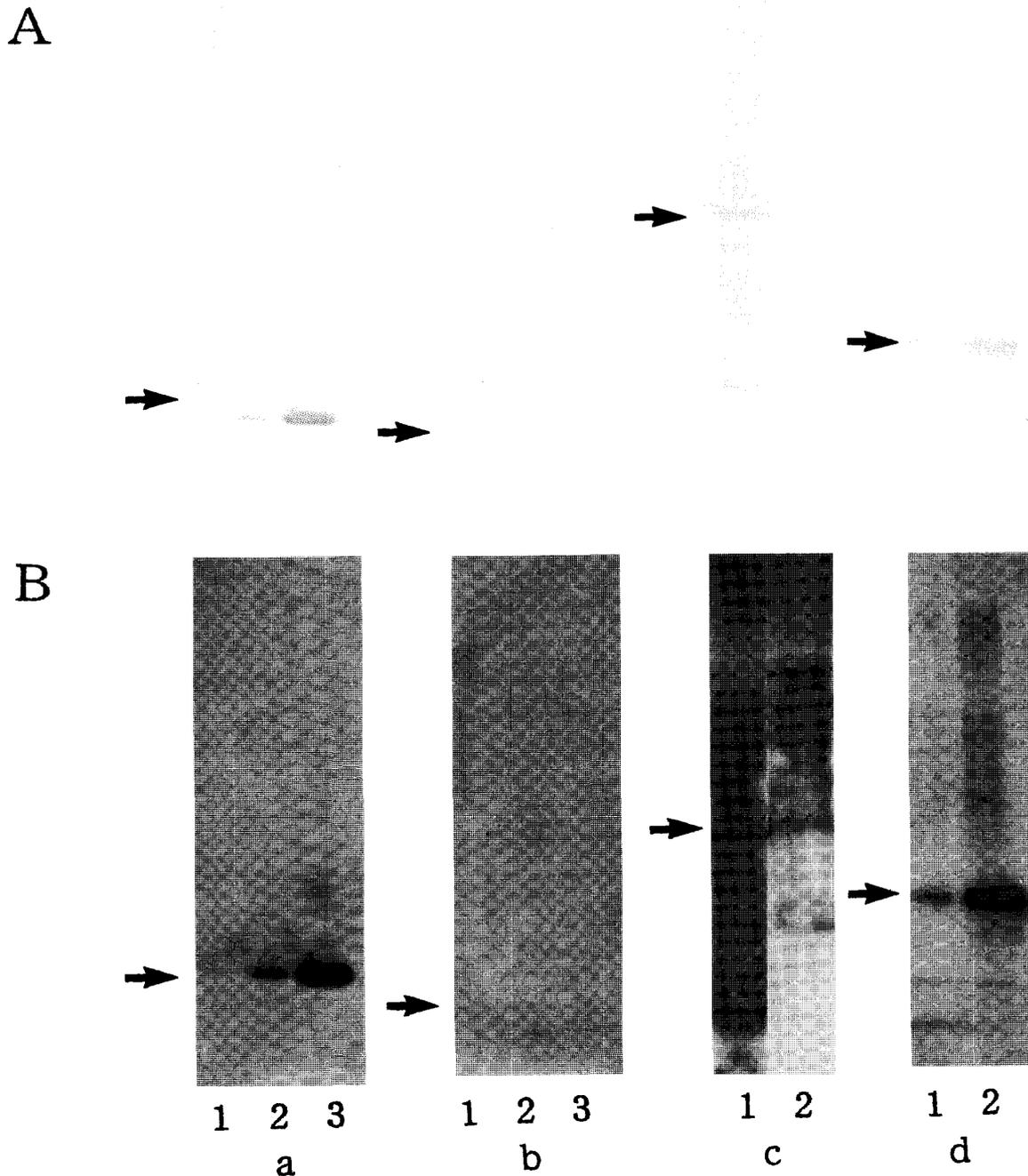


図4 ウェスタンブロッティングによる VMO-I (a), VMO-II (b), オボムシンサブユニット S5 (c) および S8 (d) 抗体の特異性

作製した各抗体の特異性を確認するために、精製 VMO-I, VMO-II および卵黄膜オボムシンと卵白オボムシンを SDS-電気泳動にかけ、ウェスタンブロッティングにより PVDF 膜に転写した後、作製した 4 種類の抗体をそれぞれ用いて ALP (A) および ECL (B) で染色を行った。a の 1, 2 および 3 は精製 VMO-I, 1 ng, 10 ng, および 100 ng をそれぞれアプライし、VMO-I No. 28 抗体を用いて染色した結果である。b の 1, 2 および 3 は精製 VMO-II, 1 ng, 10 ng および 100 ng をそれぞれアプライし、VMO-II 抗体を用いて染色した結果である。c の 1 は還元した卵黄膜オボムシン (37 μ g), c の 2 は還元した卵白オボムシン (60 μ g) をアプライし、S5 抗体を用いて染色した結果である。d の 1 は還元した卵黄膜オボムシン, d の 2 は還元した卵白オボムシンを同様にアプライし、S8 抗体を用いて染色した結果である。矢印はそれぞれの抗原タンパク質の泳動位置を示す。SDS-電気泳動は 5 ~20% ポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いた。

の両染色の結果から、図4、dの1に示すように卵黄膜オボムシン中にも、矢印で示す位置に卵白サブユニットS8と同様に陽性反応を示したことから、卵黄膜オボムシンにも含有量は少ないが、卵白オボ

ムシンS8と共通するサブユニットが存在することが明らかとなった。

以上のように、卵黄膜外層に特異的なタンパク質VMO-Iに対するモノクローナル抗体と、卵黄膜

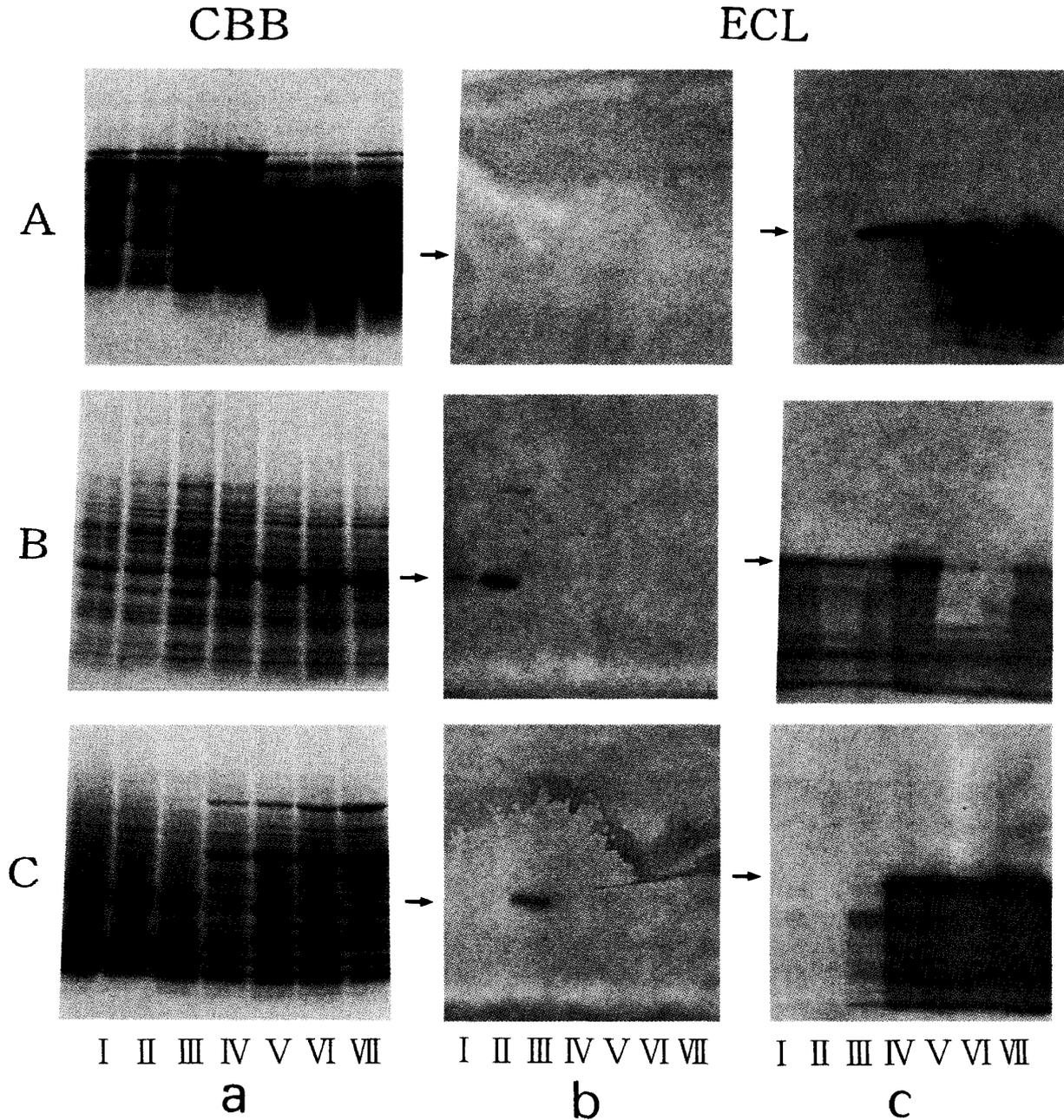


図5 SDS-電気泳動およびウェスタンブロッティングによる卵黄膜外層タンパク質の卵管分泌位置の検索
卵管のI～VIIの分泌腺中に存在する外層タンパク質を食塩(A)、酸(B)、SDS(C)で抽出し、各画分のタンパク質、15 μg相当量をSDS-電気泳動にかけ、CBB染色を行った(a)。さらに、ウェスタンブロッティングを行いPVDF膜に転写し、VMO-I抗体とS8抗体を用いてALP法とECL法でそれぞれ染色を行ったが、ALPでは弱い陽性反応しか示さなかったため、結果から省き、ECLの結果のみ示した。bはVMO-I抗体、cはS8抗体を用いてECL染色を行った。泳動パターンの下に示す数字I～VIIは卵管上部からの部位を示す。I～IIIは図1で説明したように漏斗部の上から3部位、IV～VIIは膨大部の上から4部位である。図1で示した膨大部最下部のVIIIはVIIの部位と全く同じ結果を示したので結果から省いた。

および卵白オボムシンに共通のサブユニット S 8 に対するポリクローナル抗体が得られたので、卵管各部位の分泌腺から抽出したタンパク質と交差するタンパク質を解析し、卵黄膜外層タンパク質が卵管内のどの部分で分泌されているかを検索することにした。

3. 卵黄膜外層タンパク質の分泌部位の検索

産卵鶏の卵管を 8 部位に区分し、各卵管の分泌腺中に存在する卵黄膜外層タンパク質を食塩、酸および SDS 画分別にそれぞれ SDS-電気泳動にかけ、まずクマジ (CBB) 染色を行った (図 5 a)。その結果、食塩と SDS 画分では漏斗部と膨大部ではタンパク質に明らかな相違がみられたが、酸画分のタンパク質は部位による相違はあまりみられず、卵黄膜外層を構成する VMO- I, VMO- II および卵黄膜と卵白のオボムシン特有のサブユニットに相当するバンドを判別することはできなかった。VMO- I No. 28 モノクローナル抗体とオボムシンサブユニ

ット S 8 ポリクローナル抗体を使用しウエスタンブロッティングによる解析を行った。ALP と ECL 染色を行ったところ、ALP 染色では明確な結果は得られなかったため、図 5 では ECL での検出結果のみを示した。また、実験結果から、膨大部の下部 2 部位, VII と VIII (図 1 の矢印 7 ~ 8 と矢印 8 ~ 9) は相違が認められなかったため、図 5 の結果では I ~ VII の部位までを示し、VIII の部位の結果は省いた。

VMO- I 抗体を用いた結果では、矢印で示す VMO- I に相当するバンドのみが ECL 染色で特異的に検出された (図 5 b)。VMO- I は食塩画分には全く検出されていなかったが、酸画分の I および II と、SDS 画分の III の部位のみに検出された。酸画分の I の部位に検出されたバンドは標準の抗体染色の強さと比較して 3 ng 程度であるのに対し、II の部位に検出されたバンドは 20 ng, SDS 画分の III の部位のバンドは 15 ng に相当した。オボムシンサブユニット S 8 ポリクローナル抗体を用いた結果

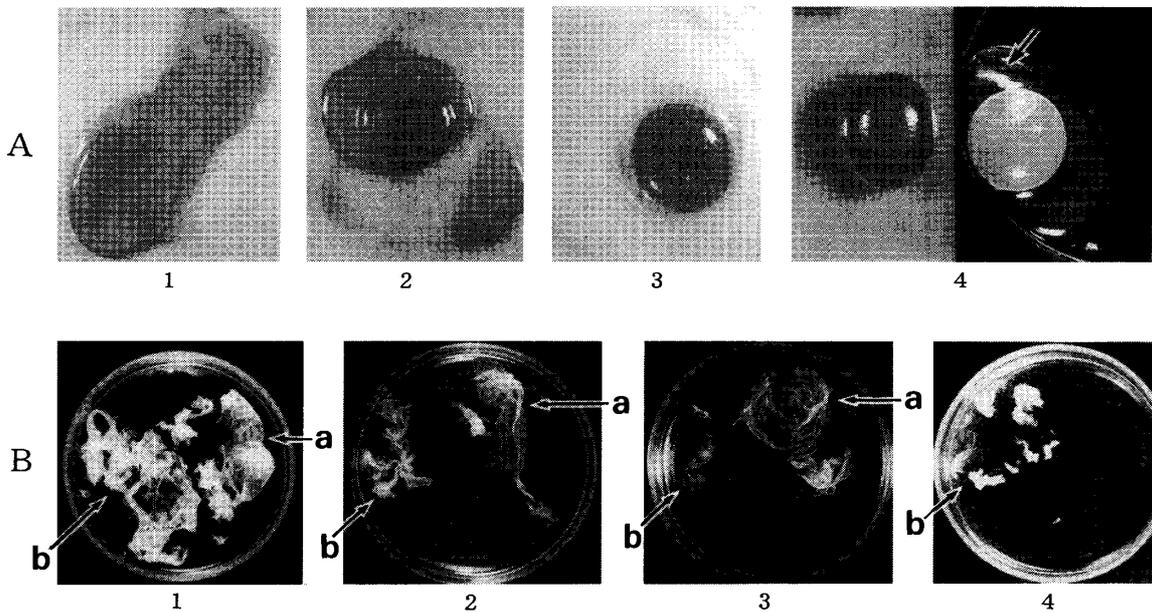


図 6 卵管各部位に滞留中の卵 (A) と分離精製した卵黄膜およびカラザ層 (B)
 屠殺直後の卵管内の各部に滞留中の卵を摘出し、卵形成過程と、各卵黄から分離した卵黄膜およびカラザを示した。写真 1 の試料は図 1 に示した矢印 5 の卵管部位に滞留中の卵で卵白は全く形成されていない。そのため卵管から卵を摘出中に、卵黄膜が破れて卵黄が流出した。この卵から分離した卵黄膜 (矢印 a) は放卵後の卵黄膜とはほぼ同じ形状を示した。しかし、卵黄膜以外にも矢印 b で示す多量の膜状の試料が得られたため、SDS-電気泳動で調べた。その結果、膨大部上部の卵は、卵黄膜が完全な状態で形成されており、その外側をカラザ層が厚く覆っていることがわかった。写真 2 の試料は図 1 に示した矢印 6 の部位に滞留中の卵で、わずかに卵白が卵黄に付着していた。カラザ層は、写真 1 の試料と比較して減少していた。写真 3 の試料は図 1 に示した矢印 8 の膨大部下部に滞留中の卵で、卵黄は卵白に完全に包まれていた。カラザ層は放卵後に近い状態であった。写真 4 の試料は狭部に滞留中の卵であり、A 4 の左の写真は卵殻膜に包まれた状態、右の写真は卵殻膜を除去した状態を示す。この部位では、カラザ層はカラザコード (A 4 の写真の矢印) に変化していた。写真 B 4 にはカラザのみを示した。写真 B の矢印 a は卵黄膜、矢印 b はカラザを示す。

では (図 5 c), 矢印で示す S 8 に相当するバンドが強く染色されるものの, S 8 より低分子の卵管抽出タンパク質ともかなり交差反応がみられた。従って S 8 抗体の特異性は低いものの, 食塩画分のⅢの部位とⅤの部位, さらに食塩画分および SDS 画分のⅥの部位に強い陽性反応を示し, 酸画分と SDS 画分のⅣの部位にも陽性反応を示した。図 5 で省略した卵管Ⅷの部位はⅥの部位と同じ結果を示した。

オボムシンは図 5 に示すように漏斗部下部の分泌の他に膨大部の上部と下部に大きく分かれて分泌していることが推察された。漏斗部の分泌は外層オボムシンであるが, 膨大部の分泌部位が 2 か所に分布している理由についてはよくわからないので, 図 6 に示すように, 卵管膨大部の上部, 中部, 下部, さらに狭部に滞留している卵を摘出し, 卵形成の状態を調べた。膨大部上部から, 卵白が全く付着していない卵黄を, 膨大部中部から卵白が付着しはじめた卵黄を, 膨大部下部から濃厚卵白によってしっかりと包まれた卵黄を, 狭部からは卵白と卵殻膜に包まれた卵黄を分離した (図 6 A)。膨大部下部から分離した卵黄に付着の卵白は濃厚卵白のみで形成され

ており, 内水様および外水様卵白は存在していなかった。各試料から卵黄膜を分離したところ, 膨大部上部の卵からは, 卵黄膜外層の他に膜状の組織が得られた。この組織は卵黄膜の外側に付着しており, 写真に示すようにバルキーな厚い層が分離された (図 6, 写真 B 1 の矢印 b)。SDS-電気泳動の結果, この層の構成タンパク質は卵黄膜の構成タンパク質とは全く異なり, 卵白の構成タンパク質と類似したことから, カラザ層であることが判明した。このカラザ層は, 膨大部を通過するに従って減少し, 狭部に入るとカラザコードに変化した (図 6 A, 写真 4 の矢印)。

そこで, 図 5 の食塩, 酸および SDS の 3 画分に検出された VMO-I とオボムシンの分泌量をそれぞれ総計して I ~Ⅷの部位別に図 7 に示した。オボムシンの膨大部での分泌部位は図 6 の結果からカラザ層と卵白の分泌部位が異なることが明らかとなったので, 区別して示した。

卵黄膜外層の構成タンパク質 VMO-I は主に漏斗部中部から下部でのみ分泌されており (図 7 a), 外層オボムシンは漏斗部下部で分泌されていた (図 7 b)。卵黄膜の外側に付着しているカラザ層は,

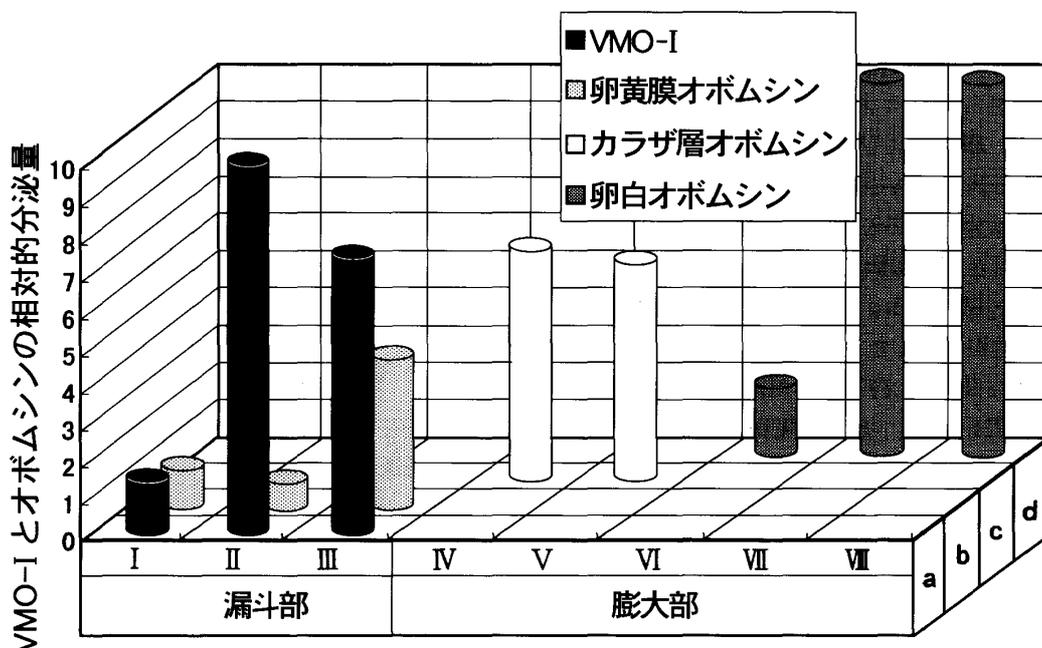


図 7 ニワトリ卵管の漏斗部および膨大部における VMO-I とオボムシンの相対的分泌量
 図 5 の抗体染色で得られた卵管各部位別の VMO-I およびオボムシンの総分泌量 (抽出画分 A~C の総和) をそれぞれ求め, 相対的に示した。また, オボムシンは卵黄膜, カラザ層, 卵白別に分類して示した。横軸に示した I ~Ⅷの数字は図 1 で区分した卵管の部位を示す。図 5 で省いた卵管Ⅷの結果もあわせて示した。a, b, c および d はそれぞれ VMO-I, 卵黄膜オボムシン, カラザ層オボムシン, 卵白オボムシンを示す。相対的分泌量は VMO-I とオボムシンの最大分泌量をそれぞれ 10 として表した (VMO-I は卵管 II, オボムシンは卵管 VII および VIII を 10 とした)。

放卵後の卵ではほとんどがカラザに変化しているため観察されにくい。膨大部上部でカラザ層オボムシンが分泌されていることを確認した(図7c)。膨大部中部から下部にかけて卵白オボムシンが分泌されていた(図7d)。

このことから、外層 VMO-I は外層オボムシンよりも早く分泌されていること、膨大部上部の分泌オボムシンはカラザ層オボムシン、膨大部中部から下部にかけての分泌オボムシンは卵白オボムシンであることが明らかとなった。

考 察

卵黄膜外層のオボムシンは膜構造の維持に重要な役割をもち⁸⁾、リゾチームは卵白リゾチームと同様に溶菌作用をもつことが明らかにされている。しかし VMO-I, VMO-II およびオボムシンの生理的機能はよくわかっていない。そこでこれらの機能を解析するために卵管のどの部位で外層タンパク質が分泌されているかを免疫学的手法を用いて検討した。

VMO-I に対する抗体は高感度で特異性の高い抗体が得られ、これを用いて分析した結果、VMO-I は漏斗部中部から下部にかけて分泌されていることを確認した。なお、VMO-I については数種のクローンが得られたので、VMO-I の高次構造上の機能解析などに利用できるようになった。卵白から得たオボムシンサブユニット S8 ポリクローナル抗体は、卵白および卵黄膜オボムシン S8 を強く認識する抗体であった。

VMO-II は分子量が9,289と小さいため、マウスの体内で抗原として認識されず、抗体が産生されなかったものと思われる。卵黄膜オボムシン S5 抗体は、特異性が低かった(図4c)。これは試料の調製に使用した SDS を巻き込んだ形で抗体が生成されたためと思われる。そこで現在、VMO-II の会合体および SDS を完全に除去した卵黄膜オボムシンを調整し、両者に対する抗体を作製中である。

卵黄膜外層に特有なタンパク質である VMO-I は漏斗部中部から下部で分泌されており、膨大部では分泌されていないこと、また外層の骨格であるオボムシンは漏斗部下部分で分泌されていることから、卵黄膜外層は漏斗部を通過する20分前後の間に形成されることを確認した。

鳥類の受精は卵管のどの部位で行われているか、詳しいことはほとんどわかっていない。哺乳類の精子受精能力は一般に24~48時間であるが、多産の鳥

類では2週間前後と著しく長い。これは漏斗部と子宮腔移行部の2か所に sperm storage tubule という名称で呼ばれている腺腔中に精子が滞留することにより長期生存し、受精能力を維持していると報告されている¹⁸⁾。漏斗部で卵黄膜外層の骨格が形成されてしまうと精子は内層のレセプターと結合しにくくなり、物理的に受精は起こりにくくなる。

外層のオボムシンが先に分泌され、外層の骨格ができたところに VMO-I や VMO-II が分泌されるのか、その逆に分泌されるのかを明らかにすることができれば、鳥類特有の外層の機能(多受精防止機構など)を解明することができる。図7に示すように VMO-I は、漏斗部の中部から下部にかけて分泌されていたが、卵黄膜オボムシンは漏斗部の下部に集中して分泌されていることがわかった。VMO-I は既に報告したように、糖合成活性¹²⁾ や細胞の伸張成長促進および接着因子の作用をもつ²⁶⁾ ことから、外層の基本骨格となるオボムシン繊維の形成に寄与していることが示唆された。このオボムシン繊維は物理的障壁となり、精子の侵入を阻止していることが報告されている^{5,6)}。最近、著者らは卵黄膜内層と精子をインキュベーションしたとき、VMO-II の存在下では明らかに精子が内層を加水分解する作用を阻止することを見出した²³⁾。この観点からも、VMO-II の分泌がオボムシン繊維が形成される前であるか、あるいは後であるかはかなり重要な問題になる。つまり、VMO-II の分泌がオボムシンより先であれば、VMO-II は精子先体反応に対するインヒビション効果を優位にもち、多受精防止に大きく寄与していることになる。そこで現在、VMO-II の漏斗部での詳細な分泌部位について分析を行っている。

要 約

鳥類特有の卵黄膜外層の機能を解明する手がかりを得るために、外層タンパク質の卵管での分泌部位を分析を行った。

免疫学的手法を用いて分析を行うために、外層タンパク質の VMO-I, VMO-II および卵黄膜に特異的なオボムシン S5 と、卵白に特異的なオボムシン S8 に対する抗体の作製を試みたところ、VMO-I モノクローナル抗体とオボムシン S8 ポリクローナル抗体を得ることができた。分析の結果、卵白オボムシンに特有のサブユニットと考えられていた S8 は、卵黄膜オボムシンにも存在することがわかった。

卵管の漏斗部を3部位、膨大部を5部位に分け、タンパク質を抽出し、得られた2種の抗体を用いて外層タンパク質の分泌部位の検索を行った結果、VMO-Iは漏斗部中部から下部で、オボムシンは漏斗部下部で分泌されており、膨大部では全く分泌されていないことがわかった。この結果から、卵黄膜外層は、排卵されて漏斗部を通過するわずか20分前後で形成されることが明らかとなった。また、VMO-Iは、細胞接着因子などの作用をもつことを考慮すると、外層の基本骨格であるオボムシン繊維の形成に寄与していることが示唆された。

S8抗体を用いて卵白オボムシンの分泌部位の解析を行った結果、膨大部の上部と下部に大きく分かれて分泌されていることがわかった。膨大部での卵形成過程を調べた結果、膨大部上部で分泌されているオボムシンはカラザ層に由来したもの、膨大部中部から下部にかけて分泌されているオボムシンは卵白に由来したものであることがわかった。

文 献

- 1) B. B. Langford, and B. Howarth: *Poultry Sci.*, **53**, 834 (1974)
- 2) J. J. L. Ho, and S. Meizel: *J. Exp. Zool.*, **194**, 429 (1978)
- 3) F. Okamura, and H. Nishiyama: *Cell Tissue Res.*, **188**, 497 (1978)
- 4) B. Howarth: *Poultry Sci.*, **69**, 1012 (1990)
- 5) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 361 (1977)
- 6) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 370 (1977)
- 7) R. Bellairs, M. Harkness, and R. D. Harkness: *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 339 (1963)
- 8) S. Kido, and Y. Doi: *Poultry Sci.*, **67**, 478 (1988)
- 9) J. F. Back, J. M. Bain, D. V. Vadehra, and R. W. Burley: *Biochim. Biophys. Acta*, **705**, 12 (1982)
- 10) J. M. Bain, and J. M. Hall: *Aust. J. Biol. Sci.*, **22**, 653 (1969)
- 11) A. B. Gillbert: *Form and Function in Birds* (A. S. King, and J. McLelland ed.), **1**, 237, Academic Press, London (1979)
- 12) S. Kido, Y. Doi, F. Kim, E. Morishita, H. Narita, S. Kanaya, T. Ohkubo, K. Nishiyama, T. Yao, and T. Ooi: *J. Biochem.*, **117**, 1183 (1995)
- 13) S. Kido, A. Morimoto, F. Kim, and Y. Doi: *Biochem. J.*, **286**, 17 (1992)
- 14) 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)
- 15) H. M. Scott, and W-L. Huang: *Poultry Sci.*, **20**, 402 (1941)
- 16) S. Fujii, T. Tamura, and T. Okamoto: *J. Fac. Fish. Anim. Husb., Hiroshima Univ.*, **11**, 1 (1972)
- 17) A. B. Gillbert: *Physiology and Biochemistry of Domestic Fowl* (D. J. Bell, and B. M. Freeman ed.), **3**, 1394, Academic Press, London, New York (1971)
- 18) R. J. Etches: *Reproduction in Poultry*. (G. J. King ed.) *Animal Reproduction*, The Charlesworth Group, Huddersfield, UK (1993)
- 19) P. M. Wassarman: *Sci. American*, **256**, 78 (1988)
- 20) J. D. Bleil, and P. M. Wassarman: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **85**, 6778 (1988)
- 21) 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)
- 22) J. Pan, T. Sasanami, S. Nakajima, S. Kido, Y. Doi, and M. Mori: *Mol. Reprod. Develop.*, **35**, (1999) (in press)
- 23) S. Kido, Y. Doi, M. Mori, and T. Ooi: Vitelline membrane outer layer protein II, VMO-II: an inhibitor of spermatozoal perforation during avian fertilization (in press)
- 24) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 25) U. K. Laemmli: *Nature*, **277**, 680 (1970)
- 26) 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 No. 4, すかいらくフードサイエンス研究所学術助成研究報告書, p. 59 (1991)