

# ニワトリ卵巣での卵成熟に伴う 卵黄膜内層タンパク質の変化

橋本 康代, 木戸 詔子

## Changes in Proteins Forming the Vitelline Membrane Inner Layer during the Ovum Maturation in the Hen Ovary

Yasuyo Hashimoto and Shoko Kido

To clarify the formation of the vitelline membrane, we investigated changes in the proteins constituting the inner layer of the vitelline membrane during the ovum maturation in the hen ovary. The vitelline membranes were isolated from yellow yolk follicles at the different growth stages, identified as F<sub>1</sub> to F<sub>8</sub>, and their protein compositions were examined by SDS-PAGE in both the presence and the absence of reducing agent. One of the major glycoproteins found in the matured ovum, GP-I, appears to exist as monomer from the early stage of the yolk deposition (F<sub>1</sub>). The other glycoprotein, GP-II, appears as protomer of its precursor with higher molecular weight at slightly later stage (F<sub>3</sub>) and appears to be converted into the homodimeric form at later stages (F<sub>7</sub>~F<sub>8</sub>). Staining the gel for the carbohydrate moiety supports this notion. The GP-I fraction prepared from the vitelline membrane of the completed eggs was separated into two components, GP-Ia and GP-Ib, based on the pH dependence in their solubility. They have similar molecular weights but different elution volumes in cation-exchange chromatography. A similar but different heterogeneity in the GP-I fraction prepared from the follicle vitelline membrane was identified. These results indicate that proteins constituting the vitelline membrane, at least GP-I and GP-II, are processed to a great extent during the ovum maturation as well as after the ovulation.

ニワトリ卵の卵黄を包む半透明な卵黄膜 (vitelline membrane) は、卵黄と卵白を仕切る膜としての物理的な役割<sup>1-4)</sup> 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<sup>5-8)</sup>、多受精防止<sup>9,10)</sup> など、生理的に重要な役割を担っている。しかし、これらの作用機構については不明な部分が多く、卵黄膜タンパク質の詳細な合成過程についてもわかっていない。

放卵後の卵黄膜は、形態および成分の異なる二層からなる。卵黄に接する卵黄膜内層 (内層: inner membrane) は排卵前の卵巣で形成され、卵白に接する卵黄膜外層 (外層: outer membrane) は排卵後に卵管最上部の漏斗部で形成され、両者の間には極めて薄い連続層 (continuous membrane) が存在

している<sup>4,11)</sup>。内層は太い繊維が三次元的網目構造を形成しているのに対し、外層は微細な繊維が二次元的格子構造を形成し、それがさらに重層した構造をとり、厚さはともに約 4 μm である<sup>4,12)</sup>。

内層は、4種類の糖タンパク質 (glycoproteins, GP; GP-I, GP-II, GP-III, GP-IV) から構成されており、その約80%を GP-I (分子量 32 kDa) と GP-II (分子量 183 kDa) が占める。この2種類のタンパク質により内層構造の基本骨格が形成され、イオン結合や疎水結合により内層繊維が構築されていることが示唆されている<sup>4,13-15)</sup>。内層主成分である GP-I は、排卵後の卵管漏斗部で特異的にプロセッシングを受けて低分子化されることが明らかにされている<sup>16)</sup>。また、同時に一部の糖鎖も欠落することが示唆されており<sup>16)</sup>、内層の受精機能との関わりからも興味深い。ニワトリの受精は、卵黄膜外層が

形成される前の排卵直後の僅かな時間に起こると考えられているが、詳しいことはわかっていない。受精機構については高等動物のマウスでの研究が進んでいる<sup>17,18)</sup>。マウスにはニワトリの内層に相当する透明帯 (zona pellucida, ZP) が存在し、ニワトリの外層に相当するものは存在しない。透明帯は、ZP-1, ZP-2 および ZP-3 と称する3種類の糖タンパク質から構成されている。ZP-3 は精子レセプターであり、ZP-2 は先体反応を起こした精子を透明帯に保持し、他の精子の結合を阻止する機能をもつといわれている<sup>17,18)</sup>。ニワトリの内層タンパク質の受精に関わる機構は殆ど解明されていないが、マウスの透明帯と同様に内層タンパク質のいずれかが受精に関わる重要な役割をもつと考えられている<sup>16,19)</sup>。内層と精子をインキュベーションすると内層に精子が付着し、直径 9  $\mu\text{m}$  の孔が開き精子が通過して受精が起こる<sup>8)</sup>。さらに興味深いことに、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は結合しないという報告からも<sup>7)</sup>、内層の酸可溶性タンパク質は精子認識機能を有すると推察される。排卵後の卵黄膜を Britton-Robinson's 緩衝溶液 (以下、BRB と略する)、pH 2 に浸漬すると内層主成分の GP-II と GP-I の一部が溶出し、残りの GP-I は BRB, pH 8 で溶出する<sup>20)</sup>。この GP-I の不均一性は、排卵前の卵成熟過程で生じるのか、排卵後に生じるのか明らかでない。

産卵鶏の卵巣表皮には卵母細胞を包み込んでいる卵胞 (follicle) が存在し、卵胞組織内に胚発生時の栄養源となる卵黄成分を蓄積していく。産卵鶏の卵巣では、休止段階にある多数の白色小卵胞のうち、1個がある時期から急速に卵黄を蓄積し始める。直径 5~6 mm 以下のものでは白色卵黄を蓄積し、直径 10 mm 以上に成長すると黄色卵黄を蓄積し、7~12日間で直径 30~35 mm, 重量 17~23 g 程度の最大卵胞に成熟すると排卵され卵管へ落下する。内層タンパク質は卵胞の成長とともに卵胞顆粒細胞で合成され、分泌されたタンパク質分子が会合して卵黄周囲に付着すると考えられているが、白色卵胞には卵黄膜は存在しないといわれている<sup>21-23)</sup>。

排卵前の成熟卵は、排卵後と同じ構造の内層で包まれており、内層の外側は顆粒細胞、基底膜、さらに厚い数層の卵胞膜からなる卵胞壁で包まれ、そして卵胞壁の外側は網状の結合組織の表皮で覆われている。排卵は、卵胞組織のステigma (stigma, 排卵溝) の部分で開裂が起こり、卵は顆粒細胞との間で分離され、卵黄膜内層に包まれた状態で排卵され

る<sup>24,25)</sup>。排卵後の卵は、卵管最上部の漏斗部に受け取られ、この部分を通過する僅か15~20分間に卵黄膜外層が形成される<sup>26~28)</sup>。その後、卵は卵管膨大部へ移行して卵白が形成され、狭部では卵殻膜、子宮 (卵殻腺部) では卵殻が形成され、膣を通過した後、総排泄腔から放卵される。

上述のように卵黄膜内層は、排卵前の卵巣組織の卵胞が成長して黄色卵胞になると形成され始める。しかし、排卵までの卵成熟過程において卵黄膜内層タンパク質がどのように合成され、膜が構築されていくのか、また GP-I の不均一性は卵成熟過程で生じるのか、排卵後に生じるのか明らかにされていない。そこで本研究では、排卵前の卵成熟過程の卵胞から分離した卵黄膜 (以下、卵胞卵黄膜) と卵管に滞留中の卵から分離した卵黄膜 (以下、卵管卵黄膜) および放卵後の卵から分離した卵黄膜 (以下、放卵卵黄膜) を調製し、それらの内層構成タンパク質を詳しく分析することにした。

## 実験方法

### 1. 卵黄膜の分離

京都市内の養鶏場から産卵当日の新鮮卵を入手し、既報<sup>4,28)</sup>に従い、0.8%食塩溶液 (4°C) を用いて卵黄膜を分離し、これを放卵卵黄膜とした。また、排卵後の卵管膨大部上部に滞留している卵白のみに包まれた卵黄を、放卵直後の産卵鶏の卵管から摘出し<sup>28)</sup>、上述と同様の方法で卵管卵黄膜を分離した。

一方、放卵直後の産卵鶏の卵巣から摘出した卵胞を大きさ別に区分し、以下に示す手順に従い、卵胞卵黄膜を分離した。卵巣と卵胞を連結している卵胞茎から卵胞を切断し、血管が分布している網状の結合組織の卵胞表皮を取り除いた後、10%食塩溶液 (4°C) を入れたシャーレに移し、数回洗浄した。卵胞壁の頂点部にピンセットの先を差し入れ、1/2周破膜して卵黄を押し出した後、付着している卵黄を10%食塩溶液中でリンスして卵胞組織を得た。次に、この組織に付着している食塩溶液をキムワイブを用いて除去した後、蒸留水 (4°C) 中に3分程度浸漬した。卵黄膜の外側に付着している顆粒細胞が低張溶液に浸漬することにより破裂し、卵胞組織から剝離してきた半透明の薄い卵黄膜内層を得た。これを蒸留水でリンスし、卵胞から分離した卵黄膜内層とした。

### 2. 卵黄膜内層タンパク質の溶解性

卵胞卵黄膜および放卵卵黄膜を 0.2 M BRB, pH 2 に浸漬し、室温下でローテーターを用いて約15時

間緩やかに振盪した後、高速遠心 (4°C, 10,000 rpm, 15分) を行ない、この上清を酸可溶画分として分離した。さらに沈澱画分の膜を 0.2 M BRB, pH 2 でリンスした後、0.2 M BRB, pH 8 を添加し、室温下で約15時間緩やかに振盪したものを高速遠心にかけて、得られた上清を pH 8 可溶画分とした。ただし、この画分を保存する場合には、pH 2 に調製して冷蔵 (4°C) 保存した。

また、BRB の他に、難溶解性の生体膜タンパク質を溶解するフェノール、ギ酸、リン酸、ピリジンなどの酸性溶液を同様に用いて、卵黄膜内層タンパク質の溶解性を調べた。各溶液に対するタンパク質の溶解度は、可溶画分と不溶画分を SDS-電気泳動にかけて分析した。

### 3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

Laemmli らの方法に従い<sup>29)</sup>、5~20%および5または30%グラジェントポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-電気泳動を行ない、クマシーブリアントブルー R-250 (CBB) 染色によりタンパク質の検出を、また過ヨウ素酸-シッフ (PAS) 染色により糖の検出を行なった。酸化条件下で泳動を行なう場合は、試料調製用緩衝液にメルカプトエタノールを添加せず、他は Laemmli らの方法に従った。電気泳動の試料は、タンパク質 5  $\mu$ g または 20  $\mu$ g 相当量を目的に応じて用いた。タンパク質濃度は Lowry 法<sup>30)</sup> により求めた。

### 4. イオン交換クロマトグラフィー

卵胞卵黄膜および放卵卵黄膜を 0.2 M BRB にそれぞれ浸漬し、溶出した画分を試料として CM-トヨパール 650 M のイオン交換体を用いてカラムクロマトグラフィー (1.6×16.0 cm) を行なった。0.07 M BRB, pH 2 で平衡化を行ない、タンパク質濃度を 80  $\mu$ g/ml に調製した試料を吸着させた後、BRB のイオン強度を 0.116 M, 0.125 M, 0.25 M および 0.4 M に段階的に変化させ、流速 80 ml/hr, 分画容量 4 ml で溶出した。検出には 280 nm の UV モニターを用いた。

## 実験結果および考察

卵黄膜内層は、排卵前に形成され、放卵後の卵黄膜内層と同じ構造をもつといわれている。しかし、排卵までの卵成熟過程で内層タンパク質がどのように合成され、内層がどのように形成されていくのか、また放卵後にみられる内層タンパク質 GP-I の不均一性がどの過程で起こるのか不明である。そこで、排卵前の卵成熟中の卵胞卵黄膜、排卵後の卵管

膨大部に滞留中の卵管卵黄膜および放卵後の放卵卵黄膜を分離し、内層構成タンパク質を分析するとともに、内層の形成過程および放卵までの過程で起こる内層タンパク質の性状変化について調べた。

### 1. 卵胞卵黄膜の分離

排卵前の卵を得るために 9羽の産卵鶏の卵巣から卵胞を摘出した。図1の A に示すように、卵は排卵直前に急激に成長して成熟する。図1の A の矢印は、最大成熟卵胞を示す。卵胞には白色卵胞と黄色卵胞の2種類が存在するが、卵黄膜内層が形成され始める黄色卵胞のみを分離した。大小種々の黄色卵胞を卵胞茎から1個ずつ切断し、卵胞の成長曲線を参考にして図1の B に示すように大きさ別に区分した。図1の B に示すように排卵7~8日前の黄色卵胞の最小卵胞を F<sub>1</sub>、排卵当日の最大卵胞を F<sub>8</sub> として8段階に区分した。さらに、区分した卵胞の重量および直径 (長径と短径) を測定し、それぞれの平均値を表1に示した。また、排卵7~8日前よりもさらに小さい白色卵胞を F<sub>0</sub> として示した (図1, B の F<sub>0</sub>)。排卵前の約1週間で、卵胞中に卵黄が急激に蓄積されている。卵胞の卵黄は卵黄膜内層に包み込まれており、その外側は、顆粒細胞、基底膜および厚い数層の卵胞膜からなる卵胞壁で包まれ、さらに卵胞壁は卵胞茎から発達した血管や神経が伸張している表皮組織により覆われている。そこで、Kuroki らの方法<sup>31)</sup> を用いて卵胞卵黄膜を分離した。図1の C の 1 に示す卵胞表皮を除去し、10%食塩溶液中で付着の血液などを洗浄した後、卵胞壁を裂き、卵胞内に蓄積されている卵黄を押し出した。これを10%食塩溶液中で卵胞壁に付着している卵黄を完全にリンスし、付着の食塩溶液を除去した後、蒸留水 (4°C) に3分間程度浸漬した。低張溶液に浸漬することにより内層と基底膜の間にある顆粒細胞が破裂し、卵胞壁 (図1, C の 2) から自然に剝離してきた卵胞卵黄膜を分離することができた (図1, C の 3)。卵胞壁は黄褐色をした弾力性のある不透明な厚い膜であるのに対し、卵黄膜内層は半透明の非常に薄い膜であり、外層が形成されていない卵黄膜は非常に弱く、膜洗浄中に切断されやすいため、注意深く取り扱う必要があった。小さい卵胞から分離した卵黄膜ほど弱く、破片化した状態でしか採取できなかった。

### 2. 卵成熟に伴う卵黄膜内層の構成タンパク質の分析

卵胞 F<sub>1</sub>~F<sub>8</sub> から分離した各卵黄膜および卵管卵黄膜 (O<sub>1</sub>) と放卵卵黄膜 (O<sub>2</sub>) を、タンパク質濃度

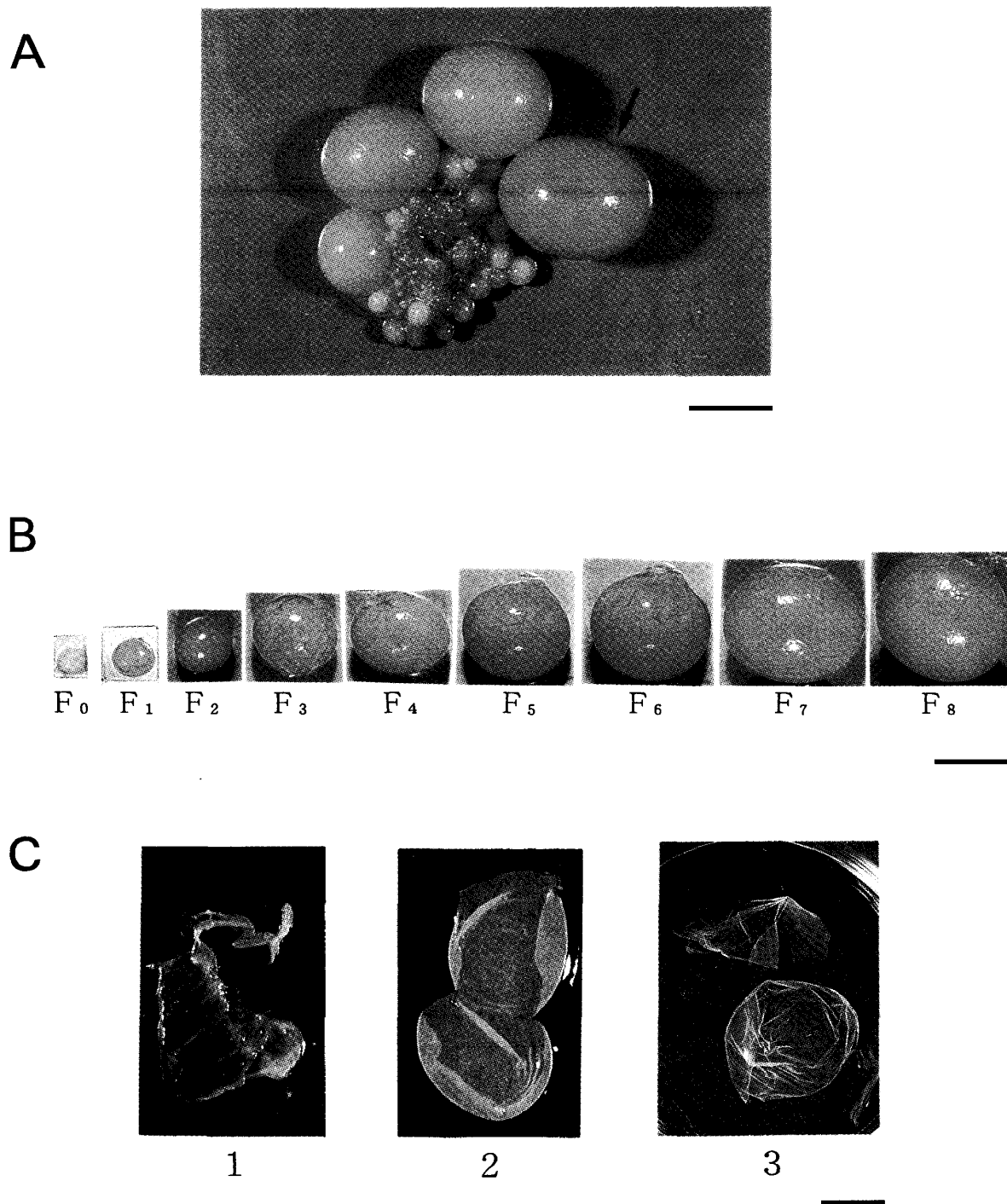


図1 産卵鶏の卵巣とその卵胞試料の区分および卵胞卵黄膜内層の分離

- A. 産卵鶏の卵巣。矢印は排卵前の最大卵胞を示す。
- B. 産卵鶏の卵巣から摘出した卵胞の試料区分。卵胞 F<sub>0</sub> は白色卵胞, F<sub>1</sub>~F<sub>8</sub> は表1に示した排卵から約1週間前の成熟過程にある黄色卵胞を示す。
- C. 最大卵胞 F<sub>8</sub> からの卵胞卵黄膜の分離。写真1は卵胞茎から発達した卵胞上皮組織を示す。この組織は卵胞全体を覆っている弾力性のある網状の結合組織で、血管や神経が発達している。写真2と3は、卵胞表皮組織(写真1)を除去した後、卵胞の卵胞壁を破り、冷10%食塩溶液中で付着の卵黄をリンスし、冷蒸留水に浸漬して顆粒細胞が破裂することにより分離した卵胞壁(写真2)と卵胞卵黄膜(写真3)を示す。卵胞壁は、黄褐色をした弾力性のある不透明の厚い膜であり、卵胞卵黄膜は半透明の非常に薄い膜である。

写真 A, B および C の下部に示した線の長さはそれぞれ 2 cm を表す。

表1 産卵鶏の卵巣から分離した卵胞試料\*

試料区分	採取個数	平均重量 (g)	平均直径 (cm)		排卵までの日数**
			長径	短径	
F <sub>1</sub>	9	0.54	0.91	0.84	7～8日
F <sub>2</sub>	6	1.99	1.52	1.30	5～6日
F <sub>3</sub>	6	4.13	2.02	1.81	4～5日
F <sub>4</sub>	6	6.94	2.44	2.13	3～4日
F <sub>5</sub>	7	9.84	2.72	2.38	2～3日
F <sub>6</sub>	5	12.64	2.95	2.55	2日
F <sub>7</sub>	5	15.81	3.19	2.89	1日
F <sub>8</sub>	1	19.54	3.50	3.50	当日

\* 9羽の産卵鶏の卵巣から摘出した卵胞を用いた。

\*\* 卵胞の成長曲線から排卵までの日数を推定した。

が約 1 μg/μl となるように、1% SDS 溶液を添加して室温下で約15時間激しく攪拌溶解し、高速遠心して得られた上清を電気泳動の試料とした。各試料のタンパク質 5 μg 相当量をアプライし、Laemmli

らの方法<sup>29)</sup>に従い、5～20%グラジエントゲルを用いて還元剤非存在下と存在下で SDS-電気泳動を行なった(図2, A と B)。CBB 染色の結果、GP-I は F<sub>1</sub> から F<sub>2</sub> (排卵 5～8 日前)にかけて合

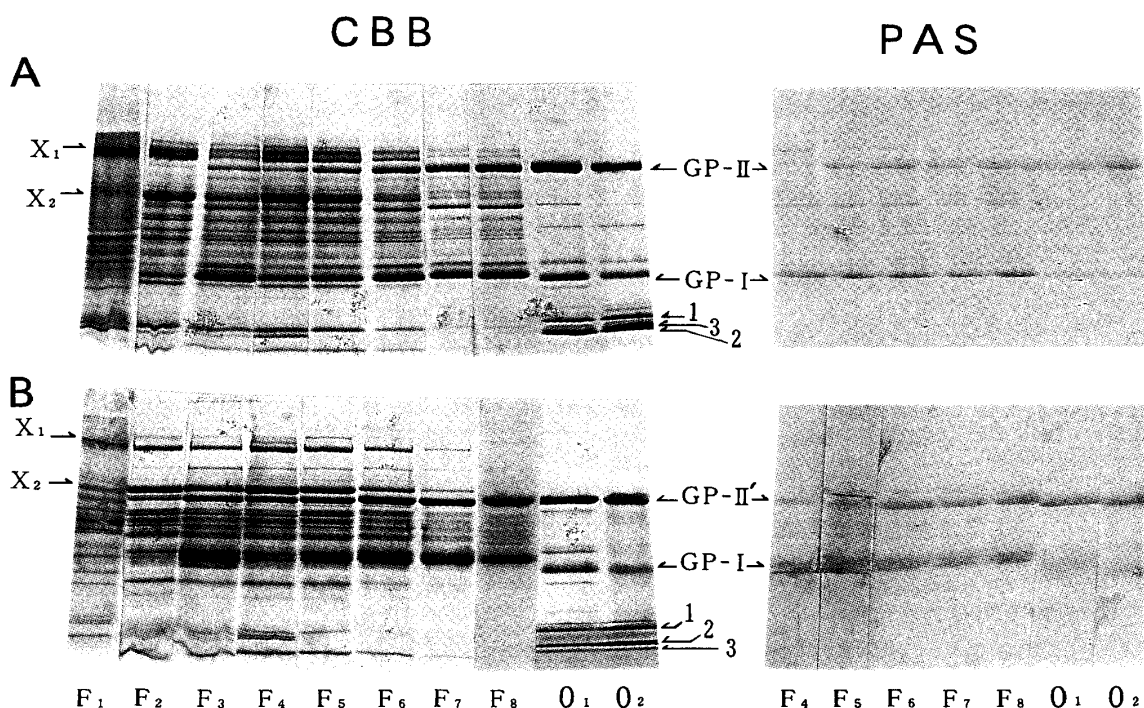


図2 卵成熟過程に伴う卵胞卵黄膜の SDS-電気泳動パターン  
 卵胞 F<sub>1</sub>～F<sub>8</sub> から分離した卵黄膜を 1% SDS 溶液を用いて溶解した試料を、還元剤非存在下 (A) および存在下 (B) で SDS-電気泳動を行ない、タンパク質を CBB, 糖を PAS で染色した。PAS 染色の F<sub>1</sub>～F<sub>3</sub> は染色され難かったため、ここでは省いた。O<sub>1</sub> と O<sub>2</sub> は、卵管卵黄膜と放卵卵黄膜の泳動パターンである。CBB と PAS 染色のために、各タンパク質を 5 μg と 20 μg 相当量に調製し、5～20%グラジエントポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行なった。GP-II は還元剤存在下ではサブユニットに分離し、分子量が 1/2 の均一な単量体 GP-II' になる<sup>13,15)</sup>。CBB 染色のバンド 1～3 は卵黄膜外層タンパク質の VMO-I, リゾチームおよび VMO-II を示す。X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> は GP-II の前駆体と思われる糖タンパク質を示す。

成され始め、内層成分として存在しており、F<sub>3</sub> (排卵4～5日前) から F<sub>8</sub> (排卵当日) の成熟していく過程では、ほぼ同じ構成割合の GP-I が存在していることを確認した。一方、GP-II は F<sub>3</sub> (排卵4～5日前) 頃から明確に現われ、F<sub>3</sub> から F<sub>8</sub> (排卵当日) にかけて徐々に合成され、排卵直前までその構成割合が増加していくことが明らかとなった。つまり、卵黄膜内層中の GP-I は、卵成熟開始の初期の排卵5～6日前から排卵4～5日前の間に急激に合成され、卵黄膜の構成タンパク質として存在するが、GP-II は、GP-I が形成された後、排卵直前まで徐々に合成され、内層が形成されていくことが判明した。排卵後の卵黄膜内層は太い繊維構造をとるが<sup>4)</sup>、卵巣で内層が形成される初期には GP-I しか存在せず、前述のように膜構造は極めて不安定であるが、GP-II が膜の構成成分として増加するに従

ってその構造が安定することから、卵胞卵黄膜内層の GP-II は繊維の架橋的な役割を果たすものと推察した。

次に、卵成熟過程の卵胞卵黄膜の構成タンパク質と卵管卵黄膜 (O<sub>1</sub>) および排卵卵黄膜 (O<sub>2</sub>) のタンパク質を比較した。GP-I は、排卵後の卵管漏斗部に滞留中にオビダクチン様のタンパク質分解酵素の作用を受け、N 末端から26残基目のアミノ酸からなるペプチドが切断されることが報告されている<sup>16)</sup>。図2の B に示すように GP-I の分子量は排卵前の分子量よりも約10,000低分子化される (図2, CBB, B の F<sub>8</sub> と O<sub>1</sub>)。GP-I の N 末端から26残基目までのペプチドの分子量は約4,000に相当するので、GP-I の C 末端側でも切断されている可能性が推察されている<sup>16)</sup>。

GP-I および GP-II は約10%の糖を含む<sup>14,15)</sup>。そ

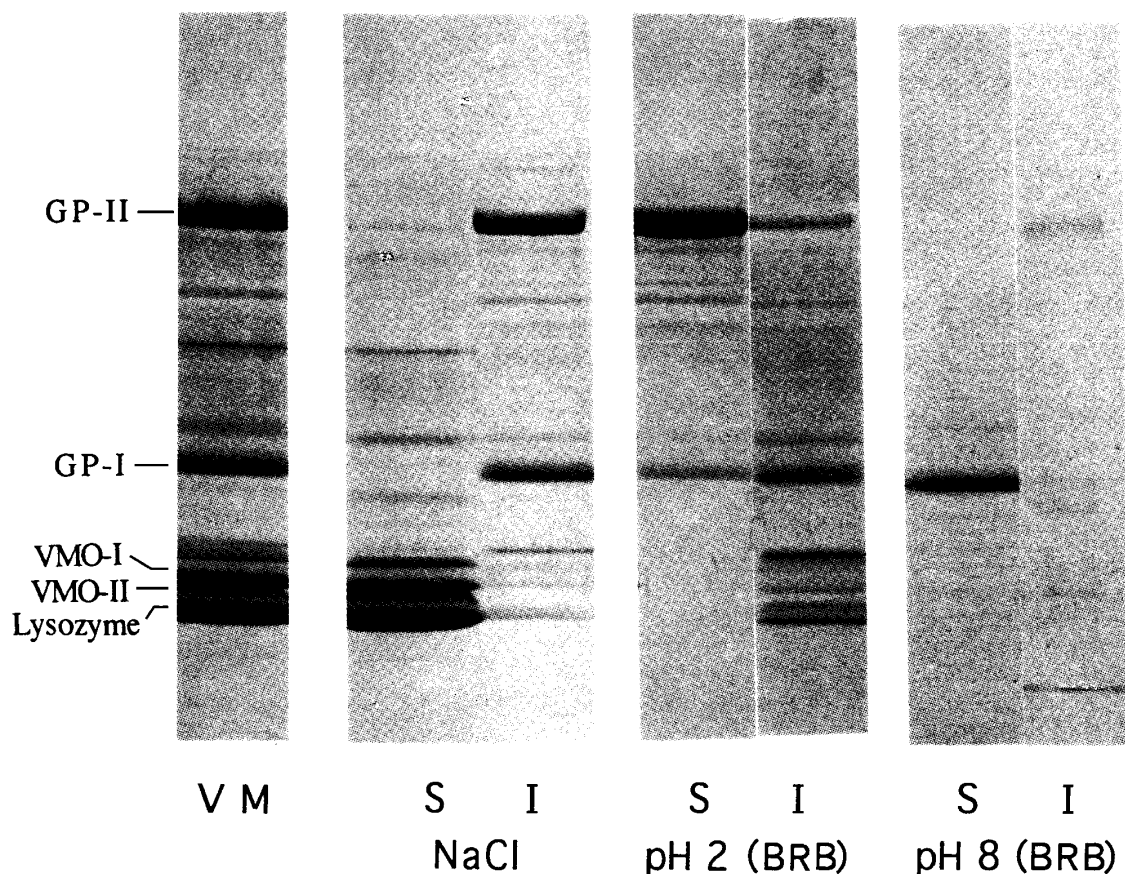


図3 排卵卵黄膜から可溶化したタンパク質の SDS-電気泳動パターン  
VM は、排卵卵黄膜を SDS で可溶化し、CBB 染色を行ない検出したもので卵黄膜全タンパク質のパターンを示す。NaCl は、排卵後の精製卵黄膜を10%食塩溶液に1時間浸漬することで可溶化した外層タンパク質 (S) と不溶膜画分 (I) を示す。pH 2 (BRB) は、0.2 M BRB, pH 2 に15時間浸漬することで可溶化した内層タンパク質 (S) と不溶膜画分 (I) を示す。pH 8 (BRB) は、0.2 M BRB, pH 2 に浸漬した膜 (I) をさらに0.2 M BRB, pH 8 に浸漬することで可溶化した内層タンパク質 (S) と不溶膜画分 (I) を示す。いずれも5～30%グラジエントポリアクリルアミドゲルを用い、還元剤非存在下で行なった。

ここで、卵成熟に伴う卵黄膜内層の GP-I と GP-II の糖鎖の変化を調べた。CBB 染色と同様に試料を調製し、タンパク質 20  $\mu$ g 相当量を用いて SDS-電気泳動にかけ、PAS 染色を行なった。卵胞卵黄膜内層の F<sub>1</sub> から F<sub>3</sub> については GP-I と GP-II の含有量が少なく、糖の検出が困難であったため、ここでは F<sub>4</sub>~F<sub>8</sub> について示した (図 2, PAS)。F<sub>4</sub> (排卵 3~4 日前) から F<sub>8</sub> (排卵当日) の卵成熟過程では CBB 染色と同様の傾向を示し、GP-I の糖染色強度には変化がみられず、GP-II も CBB 染色と同様、F<sub>4</sub> から F<sub>8</sub> にかけてタンパク質の合成に伴って、徐々に強く染色された。

さらに排卵前後の卵黄膜の PAS 染色による糖の比較を行なった。その結果、GP-II では殆ど変化がみられなかったが、GP-I では排卵されると PAS 染色の反応が弱くなったことから、排卵後には GP-I から糖鎖の一部が欠落していくことが推定される (図 2, PAS の F<sub>8</sub> と O<sub>1</sub>)。排卵に伴い GP-I の精子レセプターの認識部位である糖鎖が欠落するのであれば、排卵後に起こるプロセッシングは鳥類の多受精防止の機能に関与していることになり、興味深い結果である。

また、図 2 の CBB および PAS 染色に示すように、GP-I と GP-II とは明らかに移動度の異なる未知の糖タンパク質が検出されたので、これを X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> として示した。X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> は、卵胞 F<sub>1</sub> から F<sub>6</sub> にかけて存在し、卵の成熟に伴い GP-II の合成が進

行するに従って消失した。X<sub>1</sub> および X<sub>2</sub> の内層構造における関わりについては不明であるが、GP-II および GP-II' より僅かに高分子の糖タンパク質であり、上述のように GP-II の形成により消失していくことから、GP-II の前駆体物質である可能性が高いと思われる。

### 3. 卵黄膜内層タンパク質 GP-I の不均一性

放卵卵黄膜を各種溶媒に浸漬すると、外層構成タンパク質のうち塩基性タンパク質である VMO-I (vitelline membrane outer layer protein-I), VMO-II (vitelline membrane outer layer protein-II) およびリゾチームは、イオン強度や pH を変化させることにより容易に膜から離脱する<sup>4)</sup>。例えば、図 3 に示すように、10%食塩溶液に 1 時間浸漬することで外層の基本骨格を形成しているオボムシン繊維から 3 種類の塩基性タンパク質はほぼ完全に溶出する。しかし、内層タンパク質は既に報告したように、タンパク質変性剤である SDS 以外には溶出し難い<sup>4,20,32)</sup>。GP-I は 0.5% SDS 溶液で溶解するが、GP-II は 1% SDS 溶液で溶解し、尿素やグアニジン-塩酸溶液では会合体の形でしか溶解しない<sup>13)</sup>。そこで放卵卵黄膜を用いて、表 2 に示すように難溶性の生体膜を溶解する各種酸溶液に浸漬し、卵黄膜内層タンパク質の溶解性を調べた。その結果、既に報告したように<sup>4)</sup>、0.01 N 塩酸溶液のように単に pH を 2 に調製しても、内層タンパク質は溶出しませんが、表 2 に示すような各種酸溶液に浸漬すると、

表 2 放卵卵黄膜内層タンパク質の各種酸溶液に対する溶解性 (%)

溶 媒	GP-I	GP-II
0.2 M BRB*(pH 2)	30	100
• 0.05 M リン酸溶液 (pH 2)	n.d.**	90
• 0.04 M ホウ酸溶液	n.d.**	0
• 0.04 M ホウ酸溶液-酢酸*** (pH 2)	n.d.**	60
• 0.04 M リン酸溶液-酢酸*** (pH 2)	n.d.**	95
70%フェノール溶液-20%酢酸溶液 (pH 1)	30	100
90%ギ酸溶液	50	35
90%ギ酸溶液-0.01 M 食塩溶液 (pH 5.4)	0	65
80%酢酸溶液	25	65
33%ピリジン溶液-酢酸*** (pH 5.6)	30	35
0.01 N 塩酸溶液 (pH 2)	0	0
ホルマリン***-0.01 N 塩酸溶液 (1:1)	30	65

\* Britton-Robinson's Buffer (リン酸, 酢酸およびホウ酸の混合溶液に水酸化ナトリウム溶液を添加して調製)

\*\* 未測定

\*\*\* 市販の試薬を使用した。

GP-I と GP-II の一部が溶出した。図 3 に示す SDS-電気泳動の結果より、BRB, pH 2 で GP-I の一部と全ての GP-II が遊離の状態に溶出した。しかし、BRB 以外の溶媒では GP-I と GP-II の状態は不安定で会合する場合もあった。BRB, pH 2 のイオン強度を 0.2 M に上げることで GP-I と GP-II は最も溶解することがわかった。なお、BRB の成分のうちでは、リン酸溶液に対する溶解性が最も優れていた。0.2 M BRB, pH 2 で保存した内層タンパク質 GP-I と GP-II は、少なくとも数か月は安定であった。

次に図 4 の A に示すように、0.2 M BRB の pH を 2 から 8 に変化させて内層タンパク質の溶解性を調べた。その結果、pH 3.5 以上では GP-I および GP-II は全く溶出できなかった。0.2 M BRB, pH 2 に浸漬すると、内層タンパク質の主成分である GP-II は全て溶出したが、GP-I は、そのイオン強度を上げたり、浸漬時間を延長しても、全 GP-I の 30% 程度しか溶出できなかった。そこで、次に残りの GP-I が溶出する条件を調べた。0.2 M BRB, pH 2 に 15 時間浸漬した膜を同 BRB でリンスし、新たに 0.2 M BRB, pH 3 から pH 8 に浸漬してみた (図 4, B)。その結果、残りの GP-I は pH が 5 以上になると徐々に溶出し、pH 8 で全て溶出することがわかった (図 3, pH 8 の S)。つまり、放卵卵黄膜の GP-I には、pH 2 に溶出する分子種と pH 8 に溶出する分子種が存在し、GP-I の不均一性が明らかとなった。そこで、BRB, pH 2 に溶出する GP-I を酸性 (acidic) で溶解する意味で GP-Ia, pH 8 に溶出する GP-I を塩基性 (basic) で溶解するので GP-Ib と命名して区別することにした。GP-Ia は GP-Ib よりも分子量が僅かに大きいようである (図 3, pH 2 の S と I)。この GP-I の不均一性は、後述のイオン交換クロマトグラフィーにおいても明確な相違が認められた。なお、放卵卵黄膜を pH 2 の BRB で浸漬することなしに、pH 8 の BRB に直接浸漬しても GP-Ib は溶出されなかったことから、GP-Ib と GP-II あるいは GP-Ia との相互作用が示唆された。

続いて、排卵前の卵胞卵黄膜タンパク質の BRB に対する溶解性を調べることにした。排卵当日の最大卵胞 F<sub>8</sub> から分離した卵黄膜を用い、0.2 M BRB, pH 2 に浸漬し、その膜形態を観察後、浸漬溶液に溶出してくるタンパク質の分析を行なった。卵胞卵黄膜 (図 5, A の写真 1, 右側) は、排卵後の卵管卵黄膜 (図 5, A の写真 1, 左側) と比較して、よ

り透明で薄く、膜強度が極端に弱かった。0.2 M BRB, pH 2 に卵胞卵黄膜を浸漬したところ、浸漬直後から膜は溶け始め、2 分から 10 分にかけて膜は徐々に溶解して透明になり、30 分後には膜の形状を認識することは困難となり、薄くなった膜は水面に浮上してきた。40 分後になると膜は断片化し、60 分後には僅かに小片が残っていたものの、2 時間後には外観上ほぼ溶解した (図 5, A の写真 2~5)。

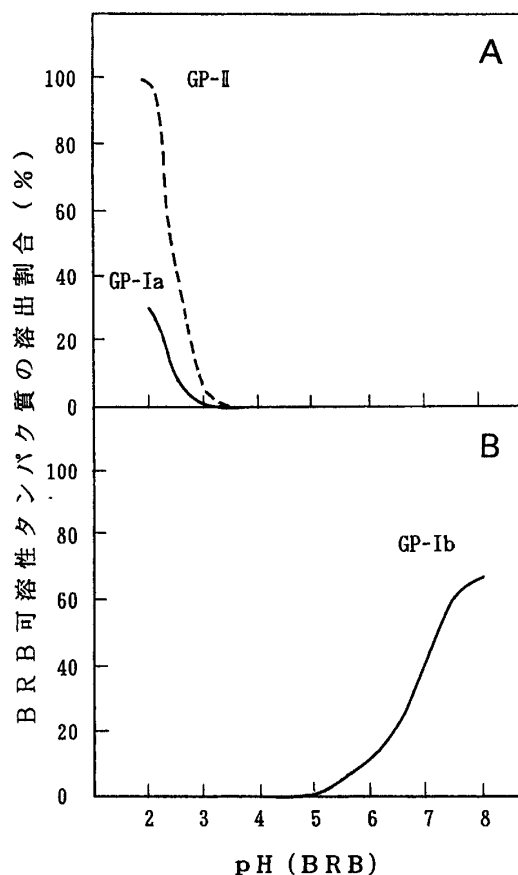
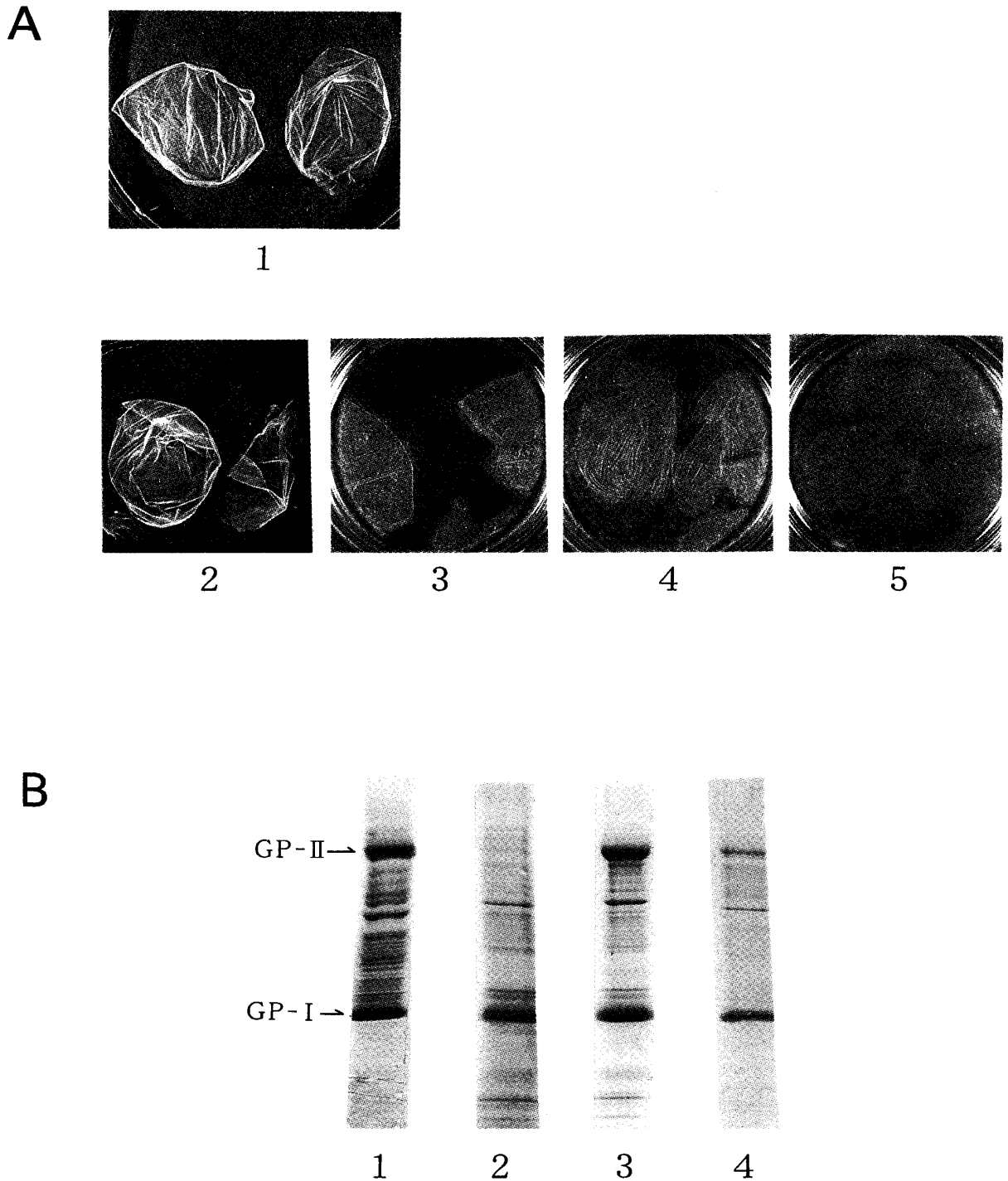


図 4 放卵卵黄膜タンパク質の BRB, pH 2 から pH 8 に対する溶解性  
 A. 放卵卵黄膜を 0.2 M BRB, pH 2~pH 8 に 15 時間浸漬し、溶出した内層タンパク質 GP-I および GP-II の割合を SDS-電気泳動の結果より求め、プロットした。この画分に溶出した GP-I を GP-Ia として示した。  
 B. 0.2 M BRB, pH 2 に 15 時間浸漬した放卵卵黄膜を、さらに 0.2 M BRB, pH 3~pH 8 に浸漬し、新たに溶出した GP-I を GP-Ib として示した。GP-II は、BRB, pH 2 浸漬により全て溶出してしまうため、この画分には存在しない。  
 グラフ A と B では、放卵卵黄膜内層に存在する GP-I および GP-II の含有量をそれぞれ 100 とし、BRB で溶出した両タンパク質の割合を相対的に表した。





**図5** 卵胞卵黄膜内層のBRB, pH 2 浸漬による膜構造への影響および卵胞卵黄膜タンパク質の溶解性  
**A.** BRB, pH 2 浸漬による卵胞卵黄膜の膜構造に与える影響。写真1の左は、卵管卵黄膜 ( $O_1$ ) を示す。この時点の膜には既に外層が形成されている。写真1の右は、最大卵胞 ( $F_8$ ) から分離した卵胞卵黄膜を示す。写真2～5は最大卵胞 ( $F_8$ ) の卵黄膜を0.2 M BRB, pH 2 に浸漬した直後と浸漬2分, 浸漬10分および浸漬30分後の膜の状態を示す。  
**B.** BRB, pH 2 浸漬により可溶化した卵胞卵黄膜タンパク質のSDS-電気泳動パターン。卵胞  $F_8$  の卵黄膜のSDS可溶画分(1), 膜をBRB, pH 2 に浸漬して10分後と15時間後のBRB可溶画分(2と3)およびBRB不溶画分(4)のSDS-電気泳動パターンを示す。還元剤非存在下で, 5～20%グラジェントポリアクリルアミドゲルを用い, タンパク質5  $\mu\text{g}$  相当量をアプライし, 電気泳動後にCBB染色を行なった。

なお40分以降は膜の存在が認められなかったので、図5のAには膜浸漬直後、浸漬2分、10分および30分後の写真のみ示した。

図5のBの2と3には、最大卵胞F<sub>8</sub>の卵黄膜をBRB, pH 2に浸漬して可溶化した内層タンパク質のSDS-電気泳動パターンを示した。10分間の膜浸漬ではGP-Iのみが溶出され、GP-IIは溶出されなかった(図5, Bの2)。15時間後には、GP-IとGP-IIがともに溶出されていた(図5, Bの3)。放卵卵黄膜の場合、GP-IIはGP-Ia同様BRBによって容易に溶出されるので、この卵胞卵黄膜GP-IIと放卵卵黄膜GP-IIの溶解性の違いは、GP-IIもGP-Iと同様に、排卵後に何らかの修飾を受けて、その溶解性が変化している可能性が考えられる。この際の修飾は図2で示されているように分子量や糖鎖構造の大きな変化を伴わない。今後BRBによるGP-IおよびGP-IIの溶出速度の変化などを詳しく調べなければならないが、図4に示す放卵卵黄膜GP-IのBRBに対する溶解性の結果から考えると、卵胞卵黄膜から最初に溶出したGP-Iは、GP-Iaに相当する可能性が大きい。卵胞卵黄膜は、外観上0.2 M BRB, pH 2にほぼ溶解したが、微量の不溶物質が存在する可能性があった。そこで、BRB, pH 2浸漬後の膜溶液を高速遠心にかけてところ、微量の半透明の沈澱物質が得られた。この沈澱画分をBRB不溶画分として分取し、1% SDS溶液を添加した後、室温下で15時間激しく攪拌溶解して、SDS-電気泳動にかけて(図5, Bの4)。BRB不溶画分には、一部BRB可溶性タンパク質が残っているものの、GP-IIに比べてGP-Iの割合が非常に高いことがわかった。このことから、卵胞卵黄膜にも、BRB, pH 2可溶性と不溶性の溶解性の異なる2種類のGP-Iが存在することが判明した。また、電気泳動のバンドを詳しく比較したところ、BRB可溶画分のGP-Iの移動度と不溶画分のGP-Iの移動度には若干の差異がみられ、不溶画分の方がやや低分子であった(図5, Bの3と4)。以上の結果から、卵胞卵黄膜のBRB可溶画分は放卵後のGP-Iaに相当し、不溶画分のGP-Iは、放卵後のGP-Ibに相当する可能性が示唆され、上述の放卵卵黄膜GP-Iの不均一性は、排卵前の卵胞卵黄膜の時点から存在していることが判明した。

#### 4. イオン交換クロマトグラフィーによる卵黄膜内層タンパク質の分析

放卵卵黄膜にはBRB, pH 2で溶解するGP-IaとpH 8で溶解するGP-Ibの2種類の存在が明ら

かとなった。そこで、放卵卵黄膜を用いて、上述のように0.2 M BRB, pH 2に15時間浸漬して得られたpH 2に可溶性のGP-Ia画分と、pH 2に浸漬後の膜を新たにpH 8に浸漬して溶出したGP-Ib画分をそれぞれ試料とし、CM-トヨパール650 Mカラムクロマトグラフィーにかけた。タンパク質の溶出は、BRBのイオン強度を0.116 M, 0.125 M, 0.25 Mおよび0.4 Mと段階的に上げ、280 nmのUVモニターで溶出ピークを得た(図6, AとB)。図7のAの左端に示すように放卵卵黄膜のBRB, pH 2溶出画分にはGP-IaとGP-IIが含まれるが、クロマトグラフィーにかけると、図6のAに示すように0.125 M, 0.25 Mおよび0.4 Mで溶出する3つのピークが確認された。ピーク1, 2および3をSDS-電気泳動にかけた結果、0.125 Mのピーク1にはGP-Iaが(図7, Aの1), 0.25 Mのピーク2にはGP-IとGP-IIの間に存在するタンパク質が(図7, Aの2), そして、0.4 Mのピーク3にはGP-IIが溶出(図7, Aの3)していることがわかった。一方、pH 8の溶出画分にはほぼ純粋なGP-Ibのみが含まれるが(図7, Bの左端), 図6のBに示すようにクロマトグラフィーでは、GP-Iaの溶出位置にはピークは検出されず、0.25 Mにシャープなピークが得られ(図6, Bのピーク2), 電気泳動の結果、このピークにはGP-Ibが溶出することがわかった(図7, Bの2)。なお、図6のBの実験で0.4 M BRB, pH 2後に0.2 M BRB, pH 8での溶出を試みたが、溶出するタンパク質は存在しなかった。以上の結果から、放卵卵黄膜のGP-Iaは、0.125 Mで溶出し、GP-Ibは、0.25 Mで溶出することから、両者の性質は明らかに異なり、GP-IaよりもGP-Ibの方がやや塩基性であることがわかった。

放卵卵黄膜GP-Iは上述のようにイオン交換によりGP-IaとGP-Ibに分離できることが判明したので、次に排卵前の卵胞F<sub>4</sub>~F<sub>8</sub>から分離した卵胞卵黄膜を0.2 M BRB, pH 2に浸漬し、溶出した画分のイオン交換クロマトグラフィーを放卵後と同条件で行なった(図6, C)。その結果、卵胞卵黄膜のBRB, pH 2で可溶化されるタンパク質は0.25 Mと0.4 Mで溶出した。各ピークに溶出しているタンパク質を電気泳動にかけた結果、0.25 Mのピーク2 aではGP-IIの一部ならびにGP-IとGP-IIの間に存在するタンパク質が溶出していた(図7, Cの2 a)。ピーク2 bでは比較的多くのGP-IIが、またGP-Iよりも分子量のやや大きい卵

胞卵黄膜に特有のタンパク質が溶出していた (図7, Cの2 b)。0.4 Mのピーク3 aでもGP-IIが溶出していた (図7, Cの3 a)。さらに興味深いことに, 排卵前のGP-Iは, 排卵後の2種類のGP-

IaやGP-Ibの溶出とは全く異なり, またGP-IIの溶出よりもさらに遅れて, ピーク3 bに溶出することがわかった (図7, Cの3 b)。卵胞卵黄膜タンパク質のGP-Iは, 排卵後に起こるプロセシ

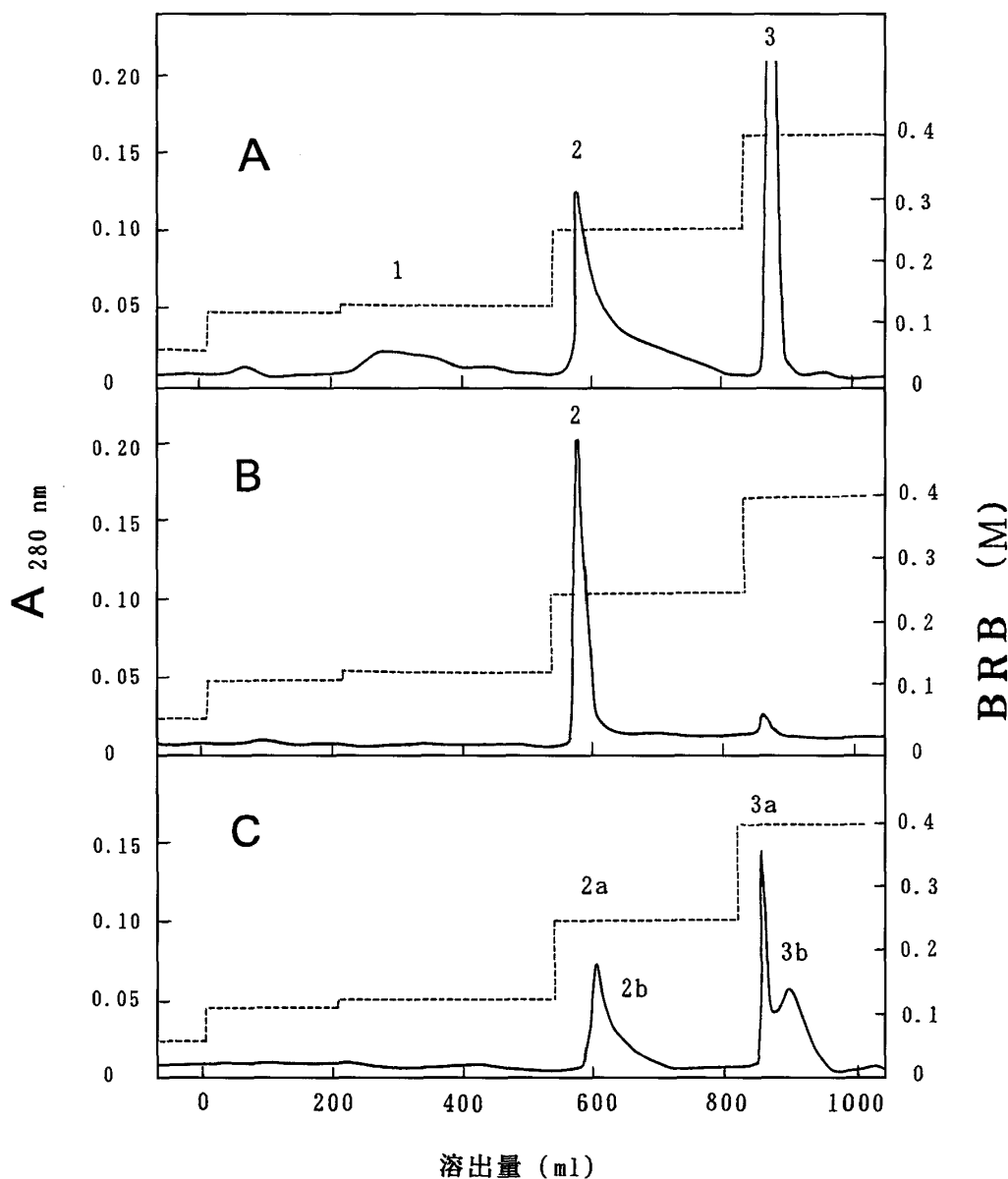


図6 CM-トヨパールイオン交換クロマトグラフィーによる放卵卵黄膜および卵胞卵黄膜のBRB可溶性タンパク質の溶出パターンの比較

産卵当日の新鮮卵20個から分離した放卵卵黄膜をBRB, pH 2に浸漬して得られた可溶画分のタンパク質の溶出パターン (A)とpH 2に浸漬後の膜をさらにBRB, pH 8に浸漬して得られた可溶画分のタンパク質の溶出パターン (B)を示す。また, 産卵鶏3羽分の卵胞F<sub>4</sub>~F<sub>8</sub>から分離した卵胞卵黄膜内層をBRB, pH 2に浸漬して得られた可溶画分のタンパク質の溶出パターン (C)を示す。0.07 M BRB, pH 2で平衡化を行ない, 試料を吸着後, 破線に示すようにBRB, pH 2のイオン強度を順次0.116 M, 0.125 M, 0.25 Mおよび0.4 Mに変更し, 280 nmのUVモニターを用いて溶出パターンを得た。0.125 Mで得られたピークを1, 0.25 Mで得られたピークを2, 0.4 Mで得られたピークを3として示した。なお, Cについては, AとBの溶出パターンと比較すると不均一であったため, ピークをaとbに分けて分析した。A~Cの溶出パターンは, 各試料を0.07 M BRB, pH 2で透析後, タンパク質濃度を80 µg/mlに調製してカラムにアプライし, 流速80 ml/hr, 分画容量4 mlの同条件下で行ない, 得られたものである。

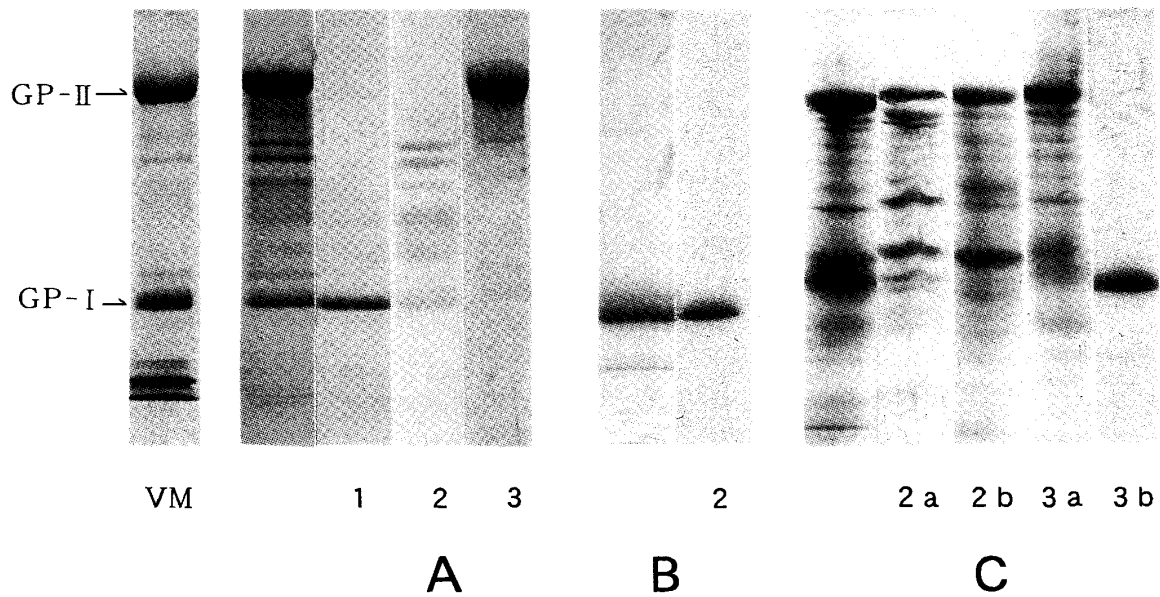


図7 放卵卵黄膜および卵胞卵黄膜から分離したタンパク質の SDS-電気泳動パターン  
 図6の A~C のイオン交換クロマトグラフィーで溶出した内層タンパク質を還元剤非存在下で SDS-電気泳動にかけ、CBB 染色により得られたパターンを示す。A, B および C の各左端に示すパターンは、図6のイオン交換クロマトグラフィーのために調製した試料中に含まれている全タンパク質を示す。各泳動パターンの下部に示す数字は、図6の A, B および C に示した各溶出ピークの数字を示す。5~20% グラジエントポリアクリルアミドゲルを用い、タンパク質 5 μg 相当量をアプライした。

ングを受けてないので、放卵後の GP-I には存在しない糖ペプチドが存在する<sup>16)</sup>。従って、欠落する糖ペプチドの部分が存在するか、存在しないかによって、GP-I の性質が大きく変化することが判明した。

卵黄膜内層には精子が特異的に結合し、内層に孔を開け、精子が通過して受精が起こること<sup>8)</sup> や酸可溶性の内層成分と結合した精子を内層とインキュベーションしても内層にその精子は結合しないことが報告されている<sup>7)</sup>。本研究の結果、ニワトリの卵黄膜内層には酸可溶性 GP-Ia が存在していることが明らかとなった。また、GP-I は、マウスの精子レセプターである ZP-3 とのアミノ酸配列の相同性が高いことが報告されている<sup>16)</sup>。従って、GP-I の中でも酸可溶性の GP-Ia が精子レセプターである可能性が示唆された。卵胞卵黄膜の GP-I と GP-Ia の詳細な関連はこれからの研究に待たなければならないが、排卵後にプロセッシングを受け、欠落する糖ペプチドの部分が精子レセプターの結合に関与するのであれば、GP-I のプロセッシングは、ニワトリ、広義には鳥類の多受精防止機能の獲得を意味する。

現在、認識の異なるレクチンを用いて卵黄膜内層タンパク質 GP-I の糖鎖の解析を行なっている。さらに、GP-Ia や GP-Ib のモノクローナル抗体を

作製し、排卵前の GP-I の不均一性や GP-I の精子レセプターとしての機能を解明しようと考えている。

### 要 約

鳥類の卵黄膜内層は、受精の際に重要な生理機能を担っていることが示唆されているものの、その詳細は殆どわかっていない。そこで本研究では、内層の機能を解明する手掛かりを得るために、まず卵巣での卵成熟過程で内層の主要タンパク質である糖タンパク質の GP-I と GP-II がどのように合成され、卵黄膜内層を形成するののかを調べるとともに、排卵後のプロセッシングによる両タンパク質の変化について調べた。

産卵鶏の卵巣の成熟期にある卵胞を摘出し、排卵 7~8 日前の黄色卵胞 (F<sub>1</sub>) から排卵当日の最大成熟卵胞 (F<sub>8</sub>) までを 8 段階に区分し、各卵胞から卵黄膜内層を分離した後、卵成熟に伴う内層タンパク質 GP-I と GP-II の構成割合を調べた。その結果、黄色卵胞が急速に成長し始める初期 (排卵 5~8 日前まで) に GP-I の合成が完成し、GP-II の合成は遅れて始まり、徐々に増加して排卵直前に放卵後の内層と同じ割合になることが判明した。さらに、GP-II の合成初期には GP-II よりもさらに高分子の糖タンパク質 2 種類が存在しており、GP-II の合成

が進むとこの糖タンパク質は消失していくことから、GP-IIの前駆体であることが示唆された。

放卵後の卵黄膜をBRB, pH 2に浸漬すると、内層の主成分GP-IIは全て溶出したが、GP-Iは約30%しか溶出しなかった。しかし、この膜をさらにpH 8に浸漬すると残りのGP-Iが全て溶出したので、前者をGP-Ia、後者をGP-Ibとして区別した。GP-Iの不均一性はイオン交換クロマトグラフィーでも明確に表れ、GP-Iaは0.125 M BRBで溶出し、GP-Ibは0.25 M BRBに溶出した。このGP-IaとGP-IbをSDS-電気泳動にかけると、GP-Iaの方が僅かに移動度が小さいことがわかった。

排卵前の最大成熟卵胞(F<sub>9</sub>)から分離した卵黄膜内層を放卵後の卵黄膜と同様にBRB, pH 2に浸漬したところ、浸漬直後にGP-Iのみが最初に溶出し、次いでGP-IIが溶出した。このBRB, pH 2不溶画分を電気泳動により調べたところ、GP-Iの存在が認められたこと、さらに可溶画分のGP-Iよりも僅かに移動度が大きかったことから、GP-Iの不均一性は排卵前から存在していることが示唆された。卵胞卵黄膜のBRB, pH 2に可溶した画分をイオン交換クロマトグラフィーにかけたところ、排卵後にプロセッシングを受けたGP-IaやGP-Ibとは全く異なるBRB濃度(0.4 M)で溶出した。また、GP-Iは排卵時に糖鎖がかなり欠落することが明らかとなった。

これまでにニワトリの卵黄膜内層に精子レセプターが存在することが示唆されていたが、本研究の結果から、内層主要タンパク質GP-Iのうち含有量の少ない酸可溶性のGP-Iaがレセプターであることが示唆された。また、排卵後、卵管最上部の漏斗部でプロセッシングを受けると、GP-Iaの性質はかなり変化することがわかった。このことから、GP-Iaのプロセッシングは精子レセプターとしての機能性を変化させ、受精をコントロールしている可能性があることが示唆された。

## 文 献

- 1) R. E. Feeney, J. M. Weaver, J. R. Jone, and M. B. Rhodes: *Poult. Sci.*, **35**, 1061 (1956)
- 2) D. Fromm: *Poult. Sci.*, **43**, 1240 (1964)
- 3) D. Fromm, and G. Martone: *Poult. Sci.*, **41**, 1516 (1962)
- 4) S. Kido, and Y. Doi: *Poult. Sci.*, **67**, 476 (1988)
- 5) B. B. Langford, and B. Howarth: *Poult. Sci.*, **53**, 834 (1974)
- 6) J. J. L. Ho, and S. Meizel: *J. Exp. Zool.*, **194**, 429 (1975)
- 7) F. Okamura, and H. Nishiyama: *Cell Tissue Res.*, **188**, 497 (1978)
- 8) B. Howarth: *Poult. Sci.*, **69**, 1012 (1990)
- 9) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 361 (1977)
- 10) M. R. Bakst, and B. Howarth: *Biol. Reprod.*, **17**, 370 (1977)
- 11) R. Bellairs, M. Harkness, and R. D. Harkness: *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 339 (1963)
- 12) J. F. Back, J. M. Bain, D. V. Vadehra, and R. W. Burley: *Biochem. Biophys. Acta.*, **705**, 12 (1982)
- 13) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **78**, 261 (1975)
- 14) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **79**, 1351 (1976)
- 15) S. Kido, M. Janado, and H. Nunoura: *J. Biochem.*, **80**, 1543 (1977)
- 16) J. Pan, T. Sasanami, S. Nakajima, S. Kido, Y. Doi, and M. Mori: *Mol. Reprod. Dev.*, **55**, 175 (2000)
- 17) P. M. Wassarman: *Sci. American*, **256**, 78 (1988)
- 18) J. D. Bleil, and P. M. Wassarman: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **85**, 6778 (1988)
- 19) 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)
- 20) 木戸詔子: 京都女子大学食物学会誌, **52**, 1 (1997)
- 21) K. Imai: Proc. 16 th World's Poult. Conger., **13**, 32 (1978)
- 22) A. H. Zakaria, T. Miyaki, and K. Imai: *Poult. Sci.*, **62**, 670 (1983)
- 23) R. Bellairs: *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **13**, 215 (1965)
- 24) S. Fujii, and Y. Yoshimura: *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, Hiroshima Univ., **18**, 185 (1979)
- 25) A. L. Johnson: *Reproduction in the female. In "Avian physiology"*, 4 th ed., (P. D. Sturkie ed.), 403, Springer-Verlag, New York (1986)
- 26) J. M. Bain, and J. M. Hall: *Aust. J. Biol. Sci.*,

- 22, 653 (1969)
- 27) A. B. Gillbert: *Form and Function in Birds* (A. S. King, and J. McLelland ed.), 1, 237, Academic Press, London (1979)
- 28) 内藤洋子, 橋本康代, 木戸詔子: 京都女子大学食物学会誌, **54**, 31 (1999)
- 29) U. K. Laemmli: *Nature.*, **277**, 680 (1970)
- 30) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 31) M. Kuroki, and M. Mori: *Develop. Growth Differ.*, **37**, 545 (1995)
- 32) 木戸詔子, 土居幸雄, 謝名堂昌信: 日本農芸化学学会誌, **71**, 臨時増刊号, 103 (1997)