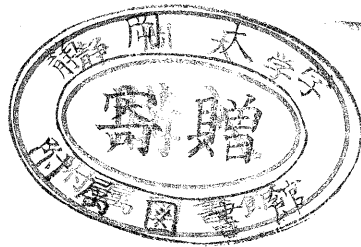


家禽卵胞の  
顆粒膜細胞と卵胞膜細胞の  
機能分化に関する研究

(研究課題番号 02660273)

平成3年度科学研究費補助金(一般研究C)

研究成果報告書



平成4年3月

静岡大学附属図書館



030850216 0

研究代表者 森 誠

(静岡大学・農学部・助教授)

## は し が き

本報告書は平成2, 3年度の2ヶ年にわたる科学研究費補助金(一般研究C)『家禽卵胞の顆粒膜細胞と卵胞膜細胞の機能分化に関する研究』の研究成果をまとめたものである。

本研究では、家禽卵胞の顆粒膜細胞と卵胞膜細胞の機能分化について、特に卵胞成熟にともなうステロイド産生能の変化に焦点をあてた。また卵子成熟に対する役割を明らかにするため、卵成熟促進因子(MPF)についても解析を加えた。MPFはひろく細胞分裂の制御に対して重要な役割を担う因子として注目を集めている。そこでMPFを比較内分泌学的に明らかにするために、マウス卵子のMPFについても検討を加えた。

家禽の産卵現象は複雑であるが、本研究では顆粒膜細胞と卵胞膜細胞、および卵子の相互関係を分子レベルで解明することによって少しでも理解を深めようと努力した。本報告書が、産卵生理学を研究するものにとって参考になれば幸いである。

---

### 研究組織

研究代表者: 森 誠 (静岡大学・農学部・助教授)

研究経費	平成2年度	1200千円
	平成3年度	600千円
	計	1800千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) Sugiyama, K., Y. Kawashima, M. Hattori and M. Mori  
Effects of testicular grafts on reproductive organs and body weight  
in female chickens.  
Proceedings of VIII European Poultry Conference, 1:756-759 (1990年  
6月)
- 2) 森 誠  
書評: Endocrinology of Birds - Molecular to Behavioral.  
生物科学ニュース, 225:9 (1990年8月)
- 3) Mori, M., M. Yamashita, S. Fukada and Y. Nagahama  
Maturation-promoting factor during oocyte maturation in the Japanese  
quail.  
Proceedings of the Japan Society for Comparative Endocrinology, 5:5  
(1990年11月)
- 4) Mori, M., M. Yamashita, M. Yoshikuni, S. Fukada and Y. Nagahama  
Maturation-promoting factor and p34<sup>cdc2</sup> kinase during oocyte  
maturation of the Japanese quail.  
Developmental Biology, 146(1):246-249 (1991年7月)
- 5) Choi, T., F. Aoki, M. Mori, M. Yamashita, Y. Nagahama and K. Kohmoto  
Activation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase activity in meiotic and mitotic  
cell cycles in mouse oocytes and embryos.  
Development, 113(3):789-795 (1991年11月)
- 6) Aoki, F, T. Choi, M. Mori, M. Yamashita, Y. Nagahama and K. Kohmoto  
A deficiency in the mechanism for p34<sup>cdc2</sup> protein kinase activation  
in mouse embryo arrested in 2-cell stage.  
Developmental Biology, 発表予定
- 7) Mori, M. and N. Masuda  
Changes of vitelline membrane of quail eggs during storage.  
Poultry Science, 発表予定

### (2) 口頭発表

- 1) 森 誠・森岡 伸光  
ウズラ卵胞顆粒膜細胞の初代培養とLHに対する反応性  
日本家禽学会 平成2年度春季大会 (1990年4月)
- 2) 森 誠・森岡 伸光  
ウズラ卵胞顆粒膜細胞の初代培養とプロゲステロン代謝酵素の変動  
日本畜産学会 第83回大会 (1990年4月)

- 3) 森 誠・山下 正兼・深田 幸子・長浜 嘉孝  
ウズラの卵成熟促進因子 (MPF) について  
日本比較内分泌学会 第15回大会 (1990年11月)
- 4) 森 誠・山下 正兼・深田 幸子・P. Nurse・長浜 嘉孝  
ウズラ卵子の卵成熟促進因子  
日本畜産学会 第84回大会 (1991年3月)
- 5) 森 誠・須藤 大介  
顆粒膜細胞の裏と表  
第16回鳥類内分泌研究会 (1991年10月)
- 6) 森 誠・増田 信義  
ウズラ卵の卵黄膜タンパクの貯蔵中の変化  
日本畜産学会 第85回大会 (1992年3月)

## 目 次

1. 緒論	.....	1
2. 材料及び方法	.....	2
3. 結果	.....	3
4. 附図および表	.....	7
5. 考察	.....	15
6. 引用文献	.....	16

## 緒 論

産卵性を向上させるように高度に家畜化された鳥類の卵巣には、さまざまな大きさの卵胞が無数に存在している。そのうちの小さな白色卵胞のいくつかは、血中からビテロゲニンを取り込みはじめ、黄色卵胞となって排卵にいたる。この過程は卵胞の成熟と呼ばれている。卵胞の構造をみると、中心には卵子があり、これを卵胞膜と顆粒膜の2層の細胞性の膜が取り囲んでいる。卵胞の成熟過程にはこれらの細胞の機能的変化が重要な役割を果たしているが、そのメカニズムについてはまだ不明な点が多い (Johnson, 1983)。

卵胞の成熟の最終的段階である排卵の数時間前から、卵子の成熟が始まる。孵卵中のウズラやニワトリの卵原細胞は、体細胞分裂によって増殖しているが、孵卵10日目頃に増殖を停止し、減数分裂の過程に入り、一次卵母細胞と呼ばれるようになる。そして第一減数分裂前期の細糸期、合糸期、太糸期を経て、孵化時には複糸期に到達している。卵子の減数分裂はここで一旦中断し、次に移動期を経て第一減数分裂中期に移行するのは排卵の数時間前である。この時期には卵子の核膜の消失、すなわち卵核胞崩壊 (GVBD) が観察される。その後第一極体を放出して第二減数分裂中期まで進行し、成熟卵となって排卵される。卵子成熟と呼ばれている現象は、卵核胞の崩壊から第二減数分裂中期の過程をさしている。この過程についても卵胞膜や顆粒膜の細胞の機能的変化が重要な役割を果たしているが、卵胞の成熟と同様、その詳細についてはまだ不明な点が数多くある (Olsen and Fraps, 1950; Callebaut, 1973)。

卵胞の成熟および卵子の成熟過程で、形態的にも機能的にも大きな変化がみられるのは顆粒膜細胞である。この細胞にはコレステロール側鎖切断酵素や $\Delta 5-3\beta$ -ステロイド水酸基・脱水素酵素が存在し、下垂体前葉から放出される黄体形成ホルモン (LH) の刺激によってプロゲステロンを合成分泌する (Mori, 1986)。この反応は卵胞の成熟とともに増加し、卵核胞崩壊の時期に最大となっている (Mori and Kantou, 1987)。一方、卵胞の成熟にしたがって顆粒膜細胞の細胞数は増加するが、全細胞に対する分裂中の細胞の割合を測定すると、卵胞の成熟とともに減少しているので、増殖速度は次第に遅くなると考えられている (Marrone and Crissman, 1988)。また顆粒膜細胞は卵膜を通して卵子と接触しているが、特に胚盤に接した細胞の分裂頻度が高く、ここが顆粒膜細胞の増殖の中心と考えられている (Perry et al., 1978)。一方、プロゲステロンの合成分泌は胚盤に

接した顆粒膜細胞では低いことが観察されており (Marrone et al., 1990)、細胞の増殖とプロゲステロン産生は反比例すると思われる。

そこで著者は、顆粒膜細胞の増殖とプロゲステロンの合成分泌に焦点をあて、卵胞の成熟に伴う変化の要因を探ることにした。このためにウズラの顆粒膜細胞の単層培養を無血清培養液を用いて試み、培養中に起こる変化を経時的に観察した。

## 材 料 及 び 方 法

毎日定期的に産卵時刻を観察し、2週間以上一定時刻に産卵を繰り返し、クラッチパターンのはっきりしている日本ウズラを実験動物として用いた。排卵予定時刻の8~10時間前、すなわち内因性のLHサージの起こる前にウズラを断頭屠殺し、体表面を1%フェノール溶液でよく洗浄した後に滅菌した解剖用具で開腹し、最大卵胞と第2卵胞を採取した。生理食塩水中で卵黄と卵胞膜から顆粒膜を分離し、ハンクス平衡塩溶液に溶解した500単位/mlのコラゲナーゼ溶液中で37℃で10分間インキュベーションして顆粒膜細胞を単離した。この間3分毎に合計3回激しく攪拌した。この操作終了後にカルシウムとマグネシウムを含まないハンクス平衡塩溶液を2ml加え、86xgで3分間遠心して細胞を沈澱させ、沈澱を5%牛血清アルブミン3滴に懸濁し、さらにホルモンを含まない基礎培養液を2ml加えて遠心した。この操作をもう一度繰り返すことによって細胞を洗浄し、得られた細胞の沈澱は、最大卵胞の場合には基礎培養液1mlに、第2卵胞の場合には0.5mlに懸濁した。この懸濁液をトリパンブルー溶液で2倍に希釈して染色細胞と非染色細胞を計数し、1mlあたり $1.0 \times 10^5$ 個の生存細胞が含まれるように調製した。

培養は1ウェルあたり2 $\mu$ gの牛血漿由来フィブロネクチンで表面処理を施した24穴のマルチウェルプレートを用い、1ウェルの生存細胞が $1 \times 10^5$ 個になるように細胞を加え、培養液は全体で0.8mlとした。このようにすると細胞密度は $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>となる。

基礎培養液としてはマッコイ5aとハムF12の等量混合液に、グルタミン、HEPES、牛血清アルブミン、および抗生物質としてストレプトマイシン、ペニシリンを添加し、重炭酸ナトリウムでpHを7.4に調製したものを使用した。

すべての細胞は培養開始後6時間まではこの基礎培養液を用いて細胞を接着させた。

細胞に対する影響を調べる培養液は6時間後の最初の培養液の交換から使用した。無血清培養液としては、基礎培養液にインスリン、トランスフェリン、コルチコステロンを添加したもので、コルチコステロンの溶媒として使用したエタノールの最終濃度は0.05%以下となるよう調製した。牛胎児血清や合成血清(ダイゴGF21, 日本製薬)を用いる場合には、これらを基礎培養液に添加した。第2回目の培養液の交換は培養開始後24時間におこない、以降は原則として2日間隔でおこなった。

LHに対する反応性を調べるにあたっては、それまでの培養液を除去した後に、HEPES、グルコースおよび牛血清アルブミンを含むクレブスリンガー溶液中で細胞を3時間インキュベーションし、つぎに上記の溶液に100ng/mlの羊LHを添加して同じく3時間インキュベーションした。それぞれの溶液中に放出されたプロゲステロン量をラジオイムノアッセイ法で測定し、前者をプロゲステロンの基礎放出量、後者をLHの刺激による放出量とした。

培養終了後の細胞数の測定は、EGTAとトリプシンの溶液でウェルを10~20分間インキュベーションすることによって細胞を剥離することによっておこなった。またDNAの定量は、細胞をエタノールで固定した後、風乾し、サケ精巢DNAを標準品として3,5-ジアミノ安息香酸法によりおこなった。

## 結 果

### 培養中の顆粒膜細胞が分泌するプロゲステロン量の経時的変化

顆粒膜細胞を無血清培養液中で培養し、一定時間毎に回収した培養液に含まれるプロゲステロン量の変化を測定した。1ウェルあたり $2 \times 10^5$ の顆粒膜細胞を0.8mlの無血清培養液中で、39℃に設定した炭酸ガス培養装置(気相:5%炭酸ガス-95%空気)内で培養したところ、最大卵胞の顆粒膜細胞では、8ページ上図のように培養0~24時間の培養液中のプロゲステロン量が多くなり、ついで培養24~48時間であった。培養48~72時間ではきわめて少量になっている。培養開始から48時間まで培養液を交換せずに続けて培養した場合、もし培養液中に分泌されたプロゲステロンがそのまま蓄積されているのであ



れば、培養0～48時間の培養液中のプロゲステロン量は0～24時間と24～48時間のプロゲステロン量の合計量になるはずである。しかし培養0～48時間の培養液中のプロゲステロン量は非常に低い値となっていた。培養0～72時間のプロゲステロン量についても同様で、いったん培養液中に放出されたプロゲステロンが他のものに代謝されている可能性を示唆する結果となった。

第2卵胞の顆粒膜細胞の培養液中のプロゲステロン含量の経時的变化も調べたが、8ページ下図のように、最大卵胞の顆粒膜細胞の場合と比較すると、量的には少ないが同じ様な傾向であった。

#### LHの刺激によって分泌されるプロゲステロン量の経時的变化

上記の培養条件と同様の条件下で、最大卵胞と第2卵胞の顆粒膜細胞がLHの刺激によってどれくらいプロゲステロンを分泌するかを培養時間を追って調べた。最大卵胞の顆粒膜細胞では、9ページ上図のように培養開始後6時間では $10^5$ 細胞あたり約100ngのプロゲステロンを分泌し、培養開始後24時間でも少しは減少するもののほぼ同様であった。これらの値は培養前の顆粒膜細胞とほぼ匹敵する値であり、LHに対する反応性が充分にあることがわかる。ところが培養開始48時間以降ではこのようなLHに対する反応性は認められなくなった。

第2卵胞の顆粒膜細胞の場合にも同様で9ページ下図のように、培養6時間後や24時間後には有意に認められた反応性は、培養開始48時間以降ではほとんど検出できなくなってしまった。

#### 培養中のプロゲステロンの代謝

前の実験結果から、この培養条件では24時間までしかLHに対する反応性を維持できないことが明らかになった。また一旦培養液中に分泌されたプロゲステロンが培養中に他の物質に代謝されてしまう可能性も示唆された。そこで放射性炭素で標識したプロゲステロンをトレーサーとして培養液に添加し、プロゲステロンの代謝を経時的に調べた。培養液に放射性プロゲステロンを添加した以外は前の実験とほぼ同じ培養条件で顆粒膜細胞を培養した。培養終了後、塩化メチレンでステロイドを培養液から抽出し、薄層クロマトグラフィーで代謝物を分離し、オートラジオグラフィーによって放射性代謝物の位置を検出した。その結果、最大卵胞の顆粒膜細胞も、第2卵胞の顆粒膜細胞も、量的な違いはあるがプロゲス

テロンを2種類の代謝物に代謝することがわかった。10ページ上左図は最大卵胞の顆粒膜細胞の0~24時間、24~48時間、48~72時間のそれぞれに加えた放射性プロゲステロンの代謝パターンを、オートラジオグラムをデンシトメータで読み取ることによって表したものである。Pとあるのが基質として加えたプロゲステロンの位置で、同じ24時間でも培養時間が長いほど代謝され易くなることがわかる。代謝物のひとつ(Pの右のピーク)は薄層クロマトグラム上でプロゲステロンよりも早い移動度を示し、クロム酸では酸化されないこと、またアセチル化も受けないことから、水酸基を持っていないことがわかった。薄層クロマトグラム上での移動度をさまざまな標準品と比較した結果、この代謝物はプロゲステロンのA環の2重結合が還元された5 $\beta$ -プレグナン-3, 20-ダイオンであると推定した。他のひとつの代謝物(Pの左のピーク)はクロム酸によって5 $\beta$ -プレグナン-3, 20-ダイオンに酸化されたので、ステロイド骨格の3または20、またはその両方の位置に水酸基が導入されたと考えられ、さまざまな標準品との薄層クロマトグラム上での移動度の比較から、この代謝物は3 $\alpha$ -ヒドロキシ-5 $\beta$ -プレグナン-20-オンであると推定した。最終的な同定はこれらの放射性代謝物を標準品と混合し、いろいろな組合せの溶媒系を使って結晶化を繰り返し、得られた結晶の放射比活性が変化しないことによって確認した。10ページ下表にその結果を示した。

この2種類の代謝物の構造から、培養中の顆粒膜細胞では、プロゲステロンは5 $\beta$ -水素添加酵素の作用を受けて5 $\beta$ -プレグナン-3, 20-ダイオンになり、次に3 $\alpha$ -ステロイド水酸基・脱水素酵素の働きで3 $\alpha$ -ヒドロキシ-5 $\beta$ -プレグナン-20-オンに代謝されることが考えられる(10ページ上右図)。そこで5 $\beta$ -水素添加酵素の活性をこの2種類の代謝物の量から求めたところ、11ページ上図のように培養6時間後の細胞ではこの酵素の活性は弱いですが、培養時間とともに活性が上昇することがわかった。

#### 顆粒膜細胞のプロゲステロン産生に対する抗酸化剤の効果

培養中の顆粒膜細胞ではプロゲステロンが5 $\beta$ -水素添加酵素の作用を受けて他の物質に代謝されることがわかったので、培養中の細胞に対する抗酸化剤の影響を調べた。

培養6~72時間までさまざまな濃度の抗酸化剤を添加して培養をおこない、

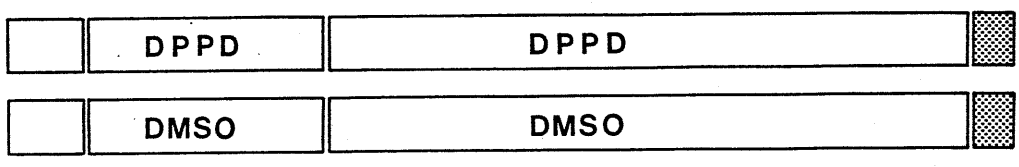
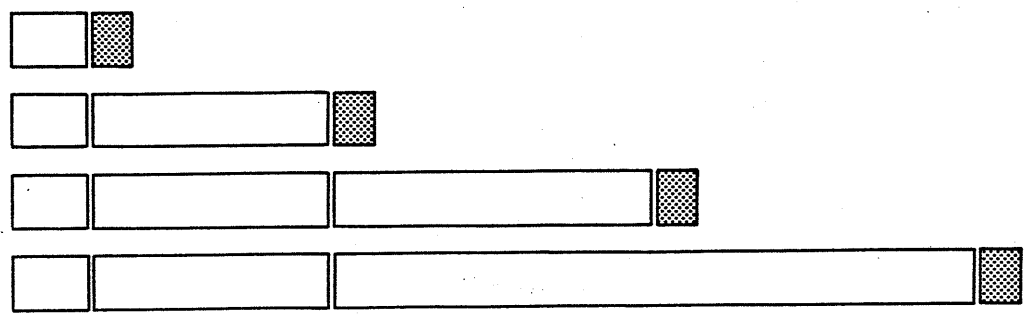
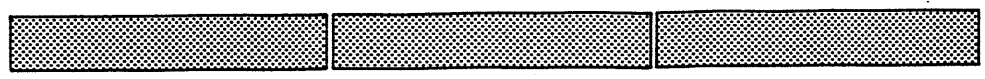
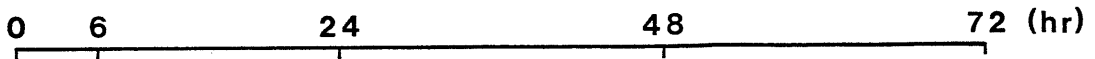
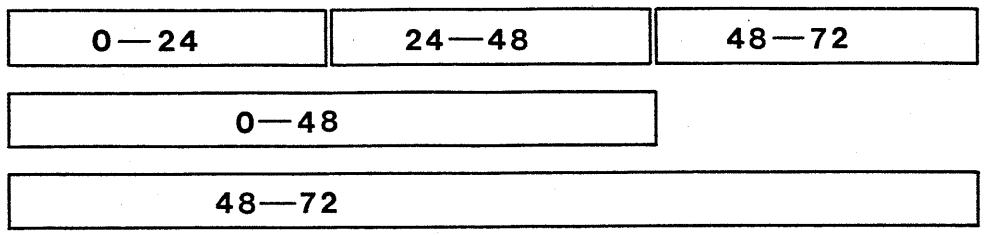
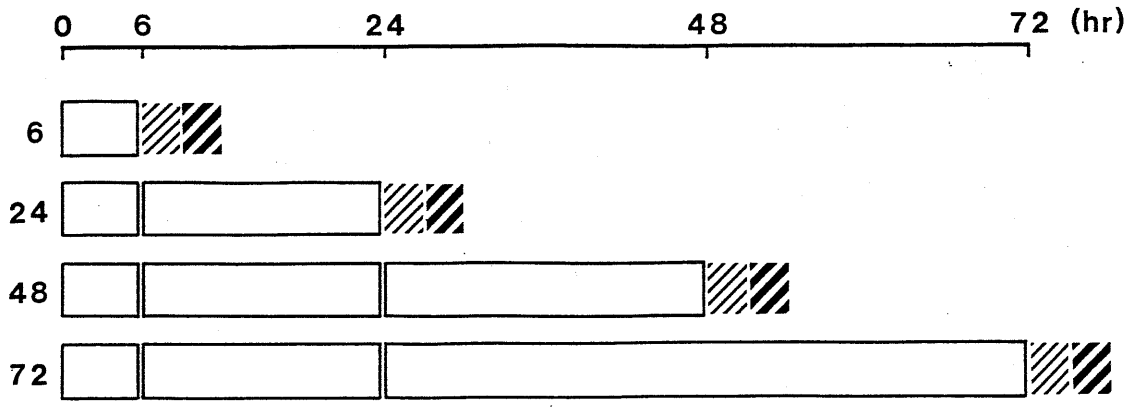
72時間後にLHに対する細胞の反応性を調べたのが11～12ページの図である。ジフェニールフェニレンジアミン(11ページ下図)、亜セレン酸ナトリウム(12ページ上図)の両者は添加量に呼応してLHに対する反応性は増加するが、最大量加えてもプロゲステロンの産生量は培養6時間目の値の十分の一以下であった。 $\alpha$ -トコフェロールおよびアスコルビン酸についても同様の実験をおこなったが、添加の効果はほとんど認められなかった。一方、ジメチルスルフォキシドについては、12ページ下図のように、25mMまでは添加の効果は小さかったが、100mM添加することによって6時間目の反応と同程度の反応性が認められた。

#### 培養中の顆粒膜細胞の $5\beta$ -水素添加酵素に対する抗酸化剤の効果

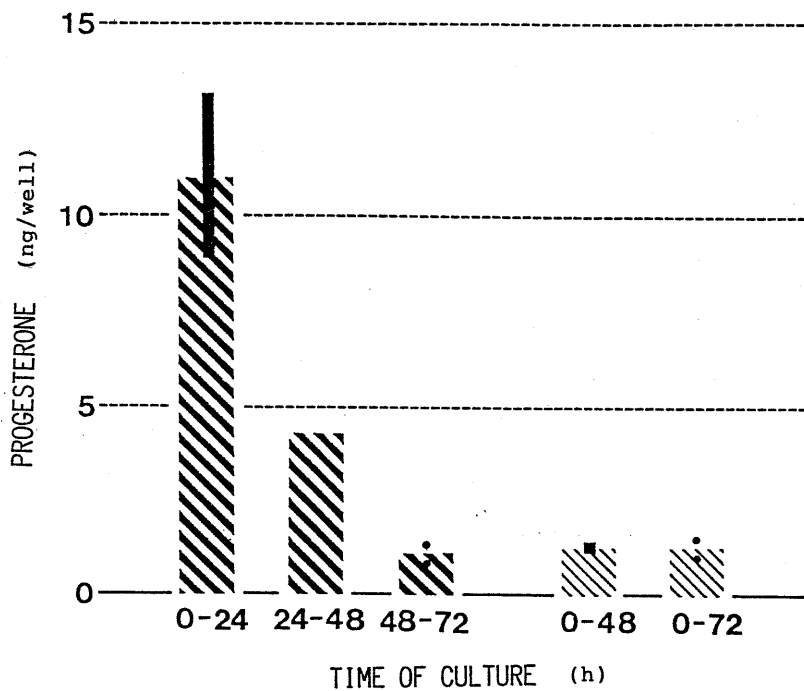
顆粒膜細胞に対する抗酸化剤の効果を詳しく調べるために、培養6～72時間までジフェニールフェニレンジアミン(DPPD)またはジメチルスルフォキシド(DMSO)を添加した培養液で顆粒膜細胞を培養し、72時間目から放射性プロゲステロンを加えて3時間インキュベーションした。放射性ステロイドを塩化メチレンで抽出し、代謝物を薄層クロマトグラフィーで分離し、 $5\beta$ -プレグナン-3, 20-ダイオンと $3\alpha$ -ヒドロキシ- $5\beta$ -プレグナン-20-オンの放射活性から $5\beta$ -水素添加酵素の活性を測定したところ、最大卵胞も第2卵胞も、どちらの顆粒膜細胞も何も入れないコントロールに比べてジメチルスルフォキシドを添加するとこの酵素活性は低い値に抑えられていた(13ページ上図)。

#### FSHによる顆粒膜細胞の反応性の出現

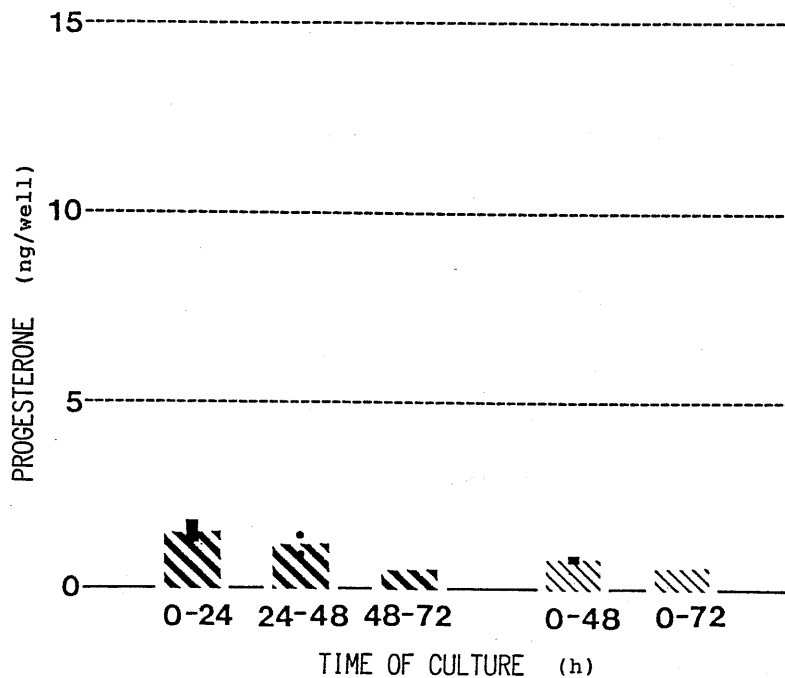
最大卵胞および第2卵胞から得た顆粒膜細胞を、ジフェニールフェニレンジアミンまたはジメチルスルフォキシドの存在下でFSHを添加した培養液で培養し、72時間後のLHに対する反応性を調べた。最大卵胞の顆粒膜細胞では、14ページ上図のように、培養することによっておこる反応性の低下はジメチルスルフォキシドの存在で抑えることができる。ただしこの場合にはFSHの効果はみられなかった。一方、第2卵胞の顆粒膜細胞はジメチルスルフォキシドを含んだ培養液で培養すると、FSHによってLHに対する反応性の増加を観察することができ(14ページ下図)、最大卵胞の顆粒膜細胞と同じようにプロゲステロンを分泌できるようになった。



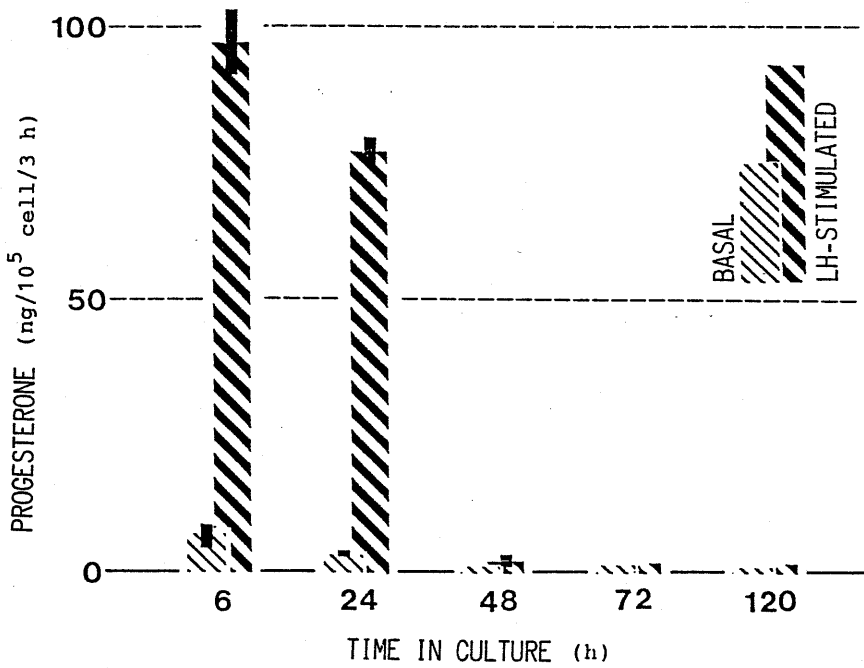
PROGESTERONE CONTENT IN CULTURE MEDIUM OF F1 GRANULOSA CELLS



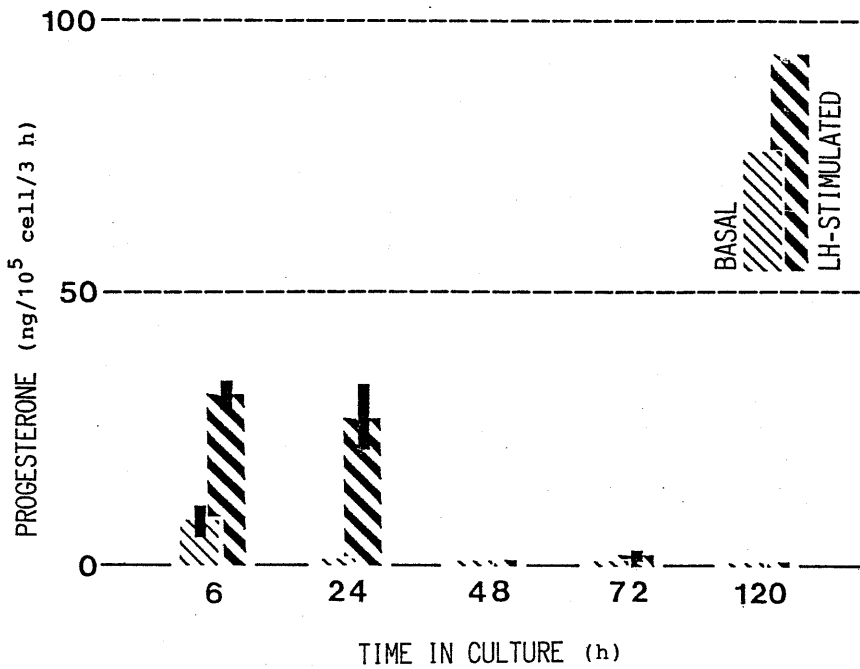
PROGESTERONE CONTENT IN CULTURE MEDIUM OF F2 GRANULOSA CELLS

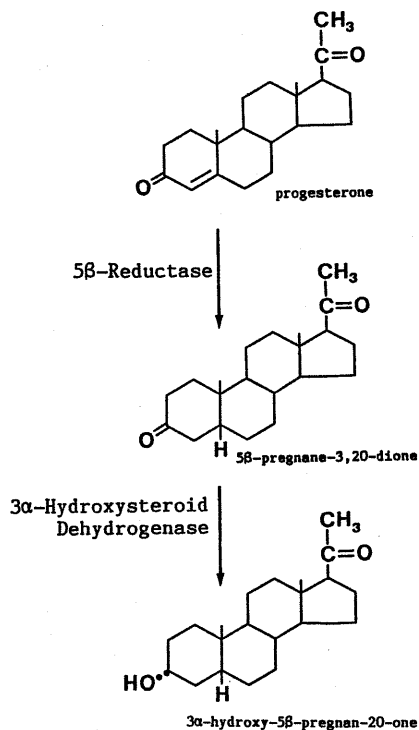
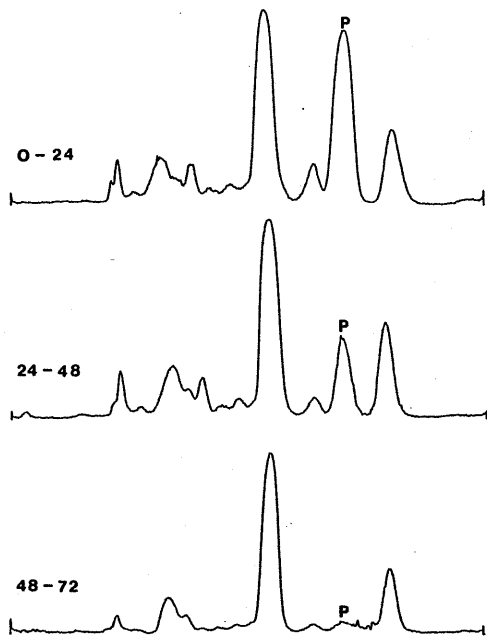


LH-STIMULATED PROGESTERONE PRODUCTION BY F1 GRANULOSA CELLS



LH-STIMULATED PROGESTERONE PRODUCTION BY F2 GRANULOSA CELLS





$5\beta$ -pregnane-3,20-dione

---

Before recrystallization	418 cpm/mg
1. dichloromethane : n-heptane	418
2. acetone : n-heptane	423
3. ethanol : water	424
4. ethanol : water	418
5. methanol : water	419

---

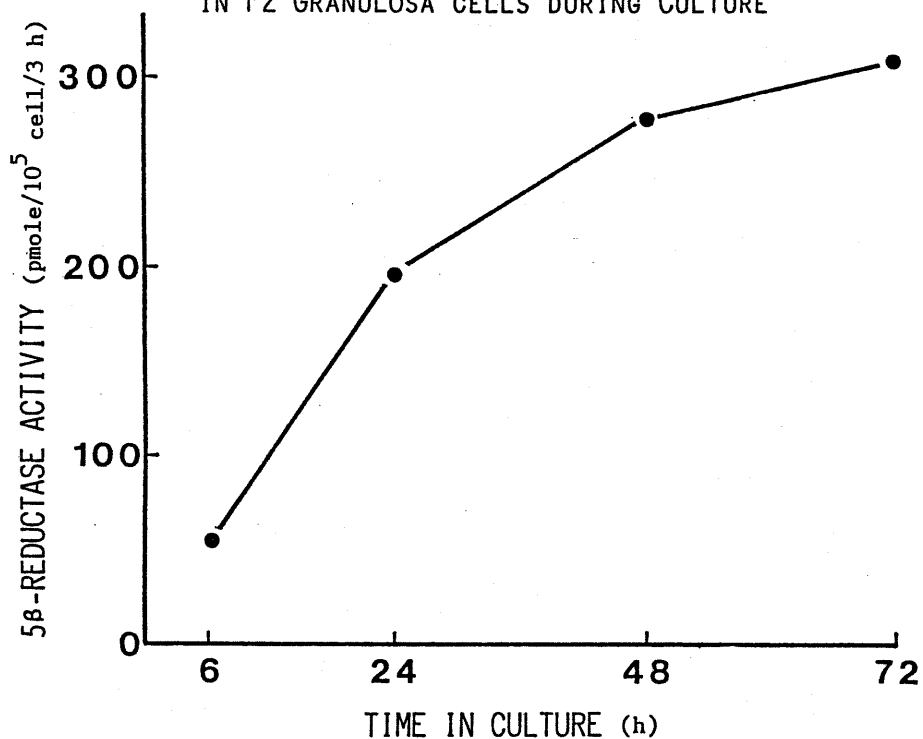
$3\alpha$ -hydroxy- $5\beta$ -pregnan-20-one

---

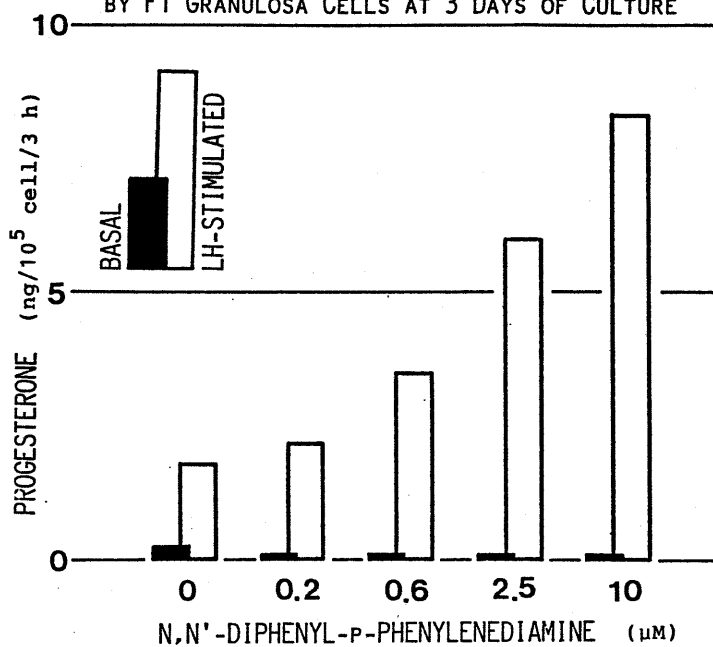
Before recrystallization	1112 cpm/mg
1. dichloromethane : n-heptane	1175
2. ethylacetate : n-heptane	1101
3. acetone : n-heptane	1147
4. ethylacetate : n-hexane	1131
5. ethanol : water	1120

---

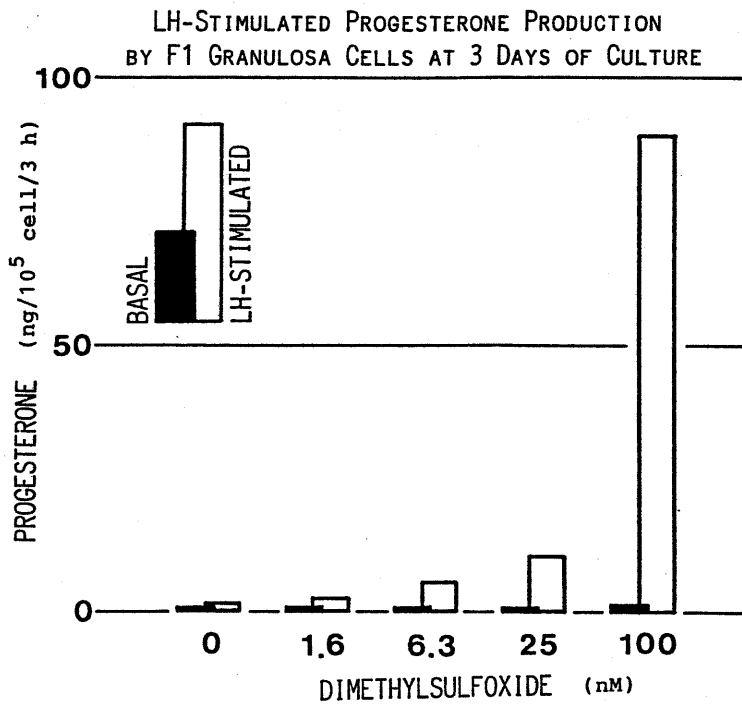
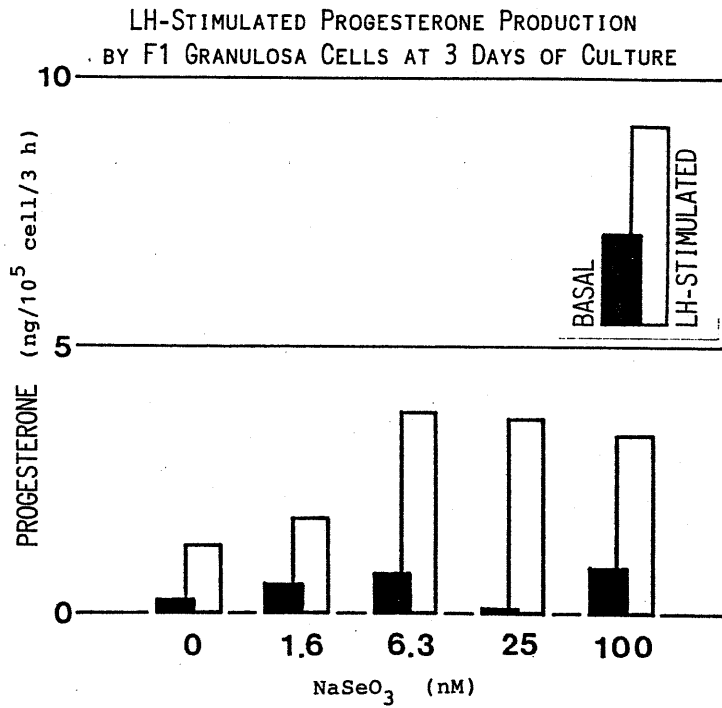
INCREASE IN 5 $\beta$ -REDUCTASE ACTIVITY  
IN F2 GRANULOSA CELLS DURING CULTURE



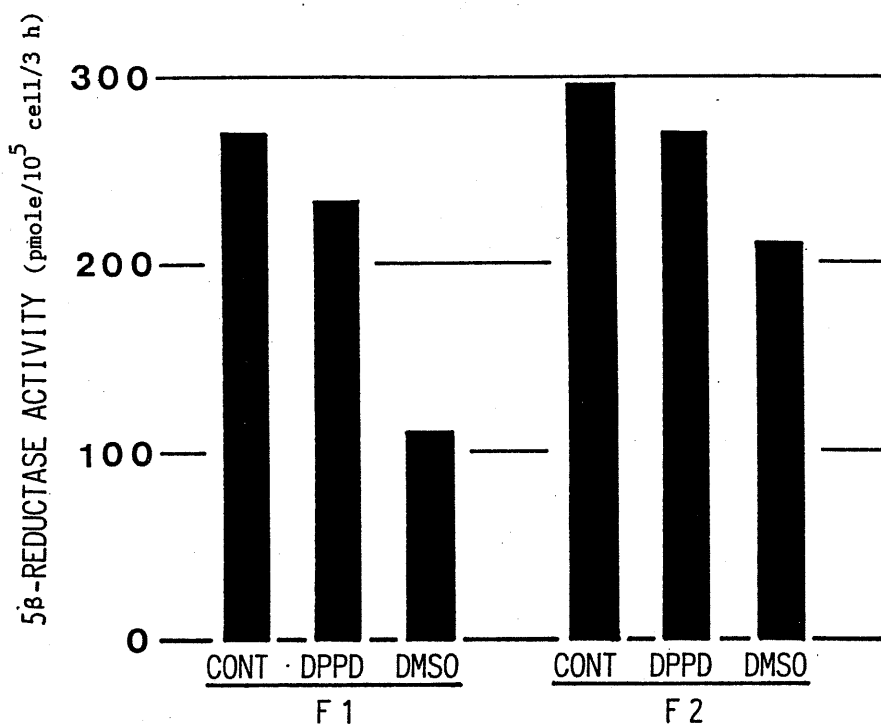
LH-STIMULATED PROGESTERONE PRODUCTION  
BY F1 GRANULOSA CELLS AT 3 DAYS OF CULTURE



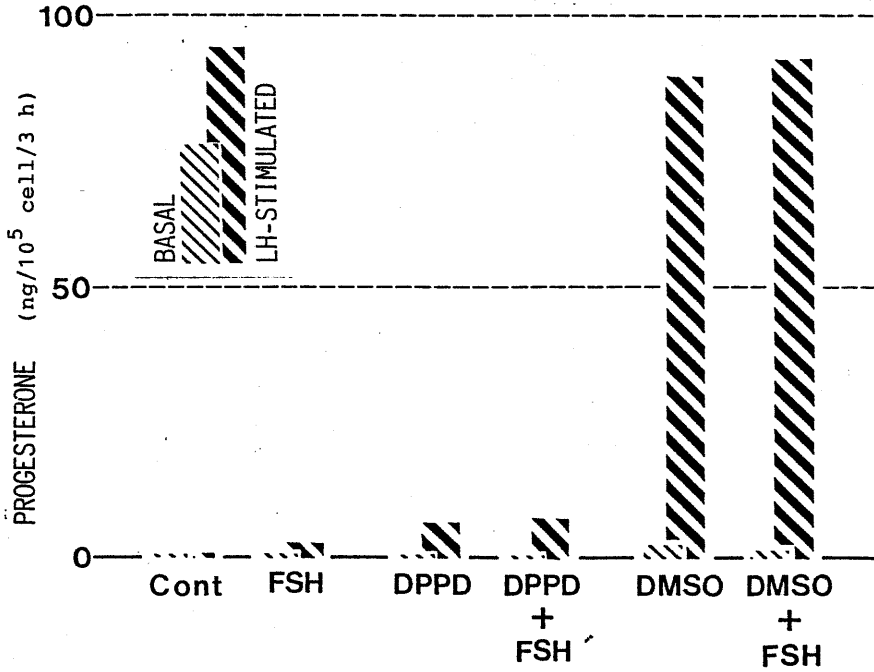




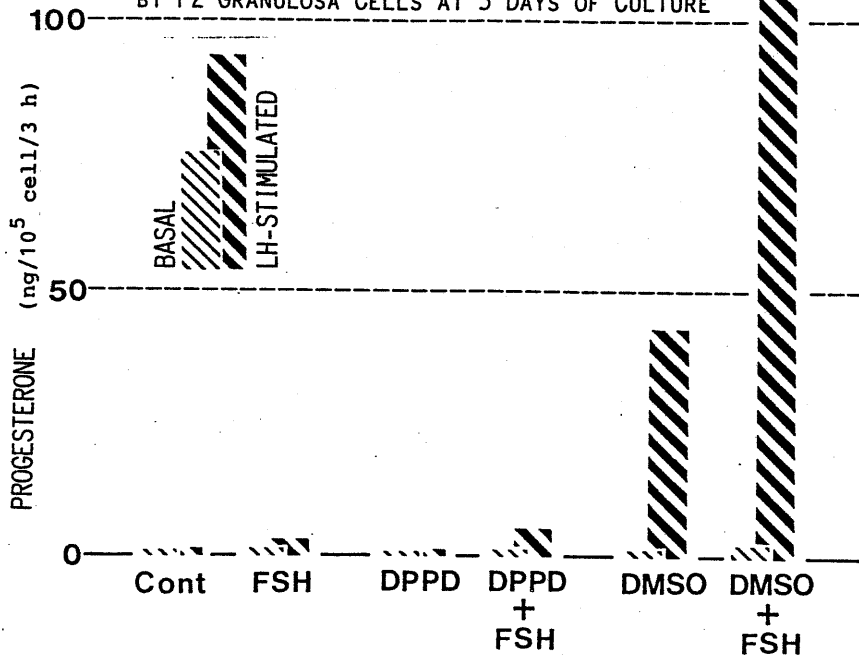
5 $\beta$ -REDUCTASE ACTIVITY IN GRANULOSA CELLS  
CULTURED FOR 3 DAYS WITH ANTIOXIDANTS



EFFECTS OF ANTIOXIDANTS AND FSH  
ON LH-STIMULATED PROGESTERONE PRODUCTION  
BY F1 GRANULOSA CELLS AT 3 DAYS OF CULTURE



EFFECTS OF ANTIOXIDANTS AND FSH  
ON LH-STIMULATED PROGESTERONE PRODUCTION  
BY F2 GRANULOSA CELLS AT 3 DAYS OF CULTURE



## 考 察

本報告では、ウズラの顆粒膜細胞を無血清培養液を用いて、5%炭酸ガスを含む空気中で培養した。最大卵胞の顆粒膜細胞は、培養開始時にはLHに反応してプロゲステロンを分泌するが、この条件下で培養すると48時間以内にその反応性が消失することを観察し、その原因のひとつとして5 $\beta$ -水素添加酵素の活性の上昇を認めた。Schwartz et al. (1989)はニワトリの顆粒膜細胞を10%牛胎児血清を含むM199培養液で培養し、培養42時間まではLHに対する反応性が残っているが、65時間以上培養すると反応性が失われること報告している。さらにZobell and Hertelendy (1986)も、ニワトリの顆粒膜細胞を長期間培養するとプロゲステロンを代謝する酵素の活性が上昇することを認めているが、代謝物の同定には至っていない。代謝物を同定し、酵素活性の変動を調べたのは本報告が初めてである。また本報告では、培養液に抗酸化剤を添加することによってこの酵素の活性上昇を抑え、LHに対する反応性の低下を防ぐことができることを示した。これは細胞培養で一般に用いられている気相が、顆粒膜細胞にとっては酸素分圧が高すぎる条件であることを示唆している。動脈血中の酸素分圧は100 mmHg前後であり、また細胞内ではその5分の1程度になること、さらに鳥類の顆粒膜細胞は血管分布に乏しいこと、等を考え合わせると、生体内で細胞が置かれていた状態を再現するためには酸素分圧を低く抑えるべきであろう。この点については研究を継続中であり、特に酸素分圧を低くした培養条件、すなわち5%炭酸ガスと5%酸素を含んだ窒素ガス中での反応性の変化に焦点を当て、5 $\beta$ -水素添加酵素の活性の変動とともに今後検討を加える予定である。

Chotesangasa et al. (1988)はニワトリの最大卵胞の顆粒膜細胞を本報告と同じ培養液で4日間培養し、LHに対するプロゲステロン産生の反応を調べているが、ノルエピネフリンで2日間培養することによってLHに対する反応が高くなることを観察しており、最大卵胞の顆粒膜細胞でプロゲステロン産生が高くなるのはノルエピネフリンが関与していると考察している。またTilly et al. (1991)は、小卵胞から得た顆粒膜細胞をFSHと短時間インキュベートすることによって、LHに反応してプロゲステロンを分泌できるようになることを示した。本報告でも第2卵胞の顆粒膜細胞がFSHによって最大卵胞の顆粒膜細胞のように分化することを認めたが、これがその他の小さな卵胞から得た顆粒膜細胞でもおこることか否かに関してはまだ明らかではない。Tilly et al. (1991)が示した

ように、本当に小卵胞の顆粒膜細胞でもFSHによってコレステロール側鎖切断酵素の誘導が起こるのならば、なぜ生体内では卵胞が充分成熟し、排卵が近くなるまでコレステロール側鎖切断酵素の誘導が起こらないのかという大きな疑問が生じてくる。卵巢の中にあるさまざまな成熟段階の卵胞は毎日一定の時刻にFSHの刺激を受けているはずである。同じ論文の中でかれらは、蛋白キナーゼCを活性化するような物質が存在するとFSHの効果がなくなることを指摘しているが、この点を考慮すると、小卵胞の顆粒膜細胞では、FSHによるコレステロール側鎖切断酵素の誘導が蛋白キナーゼCを活性化するような物質によって抑制的に支配されていると思われる。

成熟途中の卵胞では顆粒膜細胞の増殖が盛んであるが、Yoshimura and Tamura (1988)は第2卵胞の顆粒膜細胞を10%子牛血清を含むイーグルMEM培養液で7日間培養し、FSH、LH、および上皮成長因子によって細胞の増殖が盛んになることを報告している。上皮成長因子がニワトリの顆粒膜細胞のプロゲステロン産生を抑制すること(Pulley et al., 1986)と考え合わせると、蛋白キナーゼCを活性化することによって細胞の分化を抑えながら増殖を刺激する物質として上皮成長因子をあげることができであろう。この点について今後検討する予定である。またインターロイキン-1は豚の顆粒膜細胞の増殖を刺激し、プロゲステロン産生を抑制するので(Fukuoka et al., 1989)、この因子の効果についてもウズラの顆粒膜細胞で検討する必要があると思われる。

## 引用文献

- (1) Johnson, A. L. (1983) Reproduction in the female. In "Avian Physiology" (P. D. Sturkie, ed.) Springer-Verlag:New York, pp. 403-431.
- (2) Olsen, M. W. and R. M. Fraps (1950) Maturation changes in the hen's ovum. J. Exp. Zool., 114:475-489.
- (3) Callebaut, M. (1973) Correlation between germinal vesicle and oocyte development in the adult Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). A cytochemical and autoradiographic study. J. Embryol.

exp. Morph., 29:145-157.

- (4) 森 誠 (1986) 家禽の排卵とステロイドホルモン 家禽会誌, 23:247-264.
- (5) Mori, M. and T. Kantou (1987) Changes in progesterone production in granulosa cells during the ovulatory cycle of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Gen. Comp. Endocrinol., 68:57-63.
- (6) Marrone, B. L. and H. A. Crissman (1988) Characterization of granulosa cell subpopulations from avian preovulatory follicles by multiparameter flow cytometry. Endocrinology, 122:651-658.
- (7) Perry, M. M., A. B. Gilbert and A. J. Evans (1978) The structure of the germinal disc region of the hen's ovarian follicle during the rapid growth phase. J. Anat., 127:379-392.
- (8) Marrone, B. L., M. Jamaluddin and F. Hertelendy (1990) Regional pattern of cell maturation and progesterone biosynthesis in the avian granulosa cell layer. Biol. Reprod., 42:405-412.
- (9) Schwartz, J. -L., E. K. Asem., G. A. R. Mealing, B. K. Tsang, E. C. Rousseau, J. F. Whitfield and M. D. Payet (1989) T- and L-calcium channels in steroid-producing chicken granulosa cells in primary culture. Endocrinology, 125:1973-1982.
- (10) Zobell, R. L. and F. Hertelendy (1986) Metabolism of progesterone by cultured avian granulosa cells. Biol. Reprod., 34 (suppl.1):162.
- (11) Chotesangasa, R., M. Kamiyoshi, K. Tanaka, H. Tomogane and A. Yokoyama (1988) Enhancement of the response of hen granulosa cells to LH with norepinephrine in vitro. Comp. Biochem. Physiol., 90C:225-229.
- (12) Tilly, J. L., K. I. Kowalski and A. L. Johnson (1991) Cytochrome P<sub>450</sub> side-chain cleavage (P<sub>450</sub>SCC) in the hen ovary. II. P<sub>450</sub>SCC messenger RNA, immunoreactive protein, and enzyme activity in

- developing granulosa cells. Biol. Reprod., 45:967-974.
- (13) Yoshimura, Y. and T. Tamura (1988) Effects of gonadotrophins, steroid hormones, and epidermal growth factor on the in vitro proliferation of chicken granulosa cells. Poult. Sci., 67: 814-818.
- (14) Pulley, D. D. and B. L. Marrone (1986) Inhibitory action of epidermal growth factor on progesterone biosynthesis in hen granulosa cells during short term culture: Two sites of action. Endocrinology, 118:2284-2291.
- (15) Fukuoka, M., K. Yasuda, S. Taii, K. Takakura and T. Mori (1989) Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. Endocrinology, 124:884-890.