

家禽の卵胞顆粒膜細胞の増殖と分化におけるシグナル伝達機構の解析

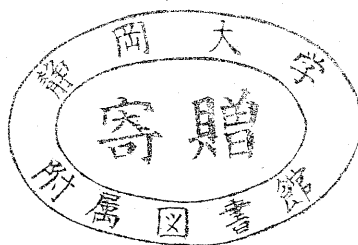
メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2009-02-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 誠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/2998

家禽の卵胞顆粒膜細胞の
増殖と分化における
シグナル伝達機構の解析

(研究課題番号 05806035)

平成6年度科学研究費補助金(一般研究C)

研究成果報告書



平成7年3月

静岡大学附属図書館



030850259 0

研究代表者 森 誠

(静岡大学・農学部・教授)

4

2

静岡大学附属図書館

は し が き

本報告書は平成5, 6年度の2ヶ年にわたる科学研究費補助金(一般研究C)『家禽の卵胞顆粒膜細胞の増殖と分化におけるシグナル伝達機構の解析』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の機能分化とシグナル伝達について、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ている。細胞の増殖と分化という2つの現象が、どのような要因で分かれるのかを、おもにプロゲステロン合成から検討した。

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・教授)

研究経費	平成5年度	1100千円
	平成6年度	800千円
	計	1900千円

研究発表

(1) 学会誌等

1) 森 誠

卵黄膜の科学

日本家禽学会誌, 30(4): 249-262 (1993年7月)

2) Makoto Mori and Nobuyoshi Masuda

Proteins of the vitelline membrane of quail (Coturnix coturnix japonica) eggs.

Poultry Science, 72(8): 1566-1572 (1993年8月)

3) Makoto Mori and Daisuke Sudo

Polarized secretion of progesterone by granulosa cells of the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica).

Japanese Poultry Science, 30(6): 396-402 (1993年11月)

4) 李 権隆, 縣 和則, 森 誠

ウズラ顆粒膜細胞の増殖と分化に及ぼす各種ホルモンの効果

日本家禽学会誌, 30(6): 430-436 (1993年11月)

5) Masayo Kuroki and Makoto Mori

Origin of vitelline membrane of quail egg: Immunological studies.

Biology of Reproduction, (in press)

(2) 口頭発表

1) 黒木 雅代・森 誠

ウズラの卵黄膜内層を構成するタンパクの産生部位

日本家禽学会 平成5年度秋季大会 (1993年10月)

2) 黒木 雅代・森 誠

各種家禽卵の卵黄膜を構成するタンパクの比較

日本家禽学会 平成6年度秋季大会 (1994年10月)

3) 甲斐 藏・曾根 寛文・深瀬 朝江・森 誠・今井 清

日本ウズラの卵黄膜の免疫組織化学的観察

日本家禽学会 平成6年度秋季大会 (1994年10月)

4) 黒木 雅代・森 誠

ウズラ卵黄膜と精子の接着

第19回鳥類内分泌研究会 (1994年10月)

5) 河野 希代子・黒木 雅代・笹浪 知宏・小林 里美・森 誠

顆粒膜細胞による卵黄膜タンパクの合成

第19回鳥類内分泌研究会 (1994年10月)

6) 青島 有美・森 誠・浅井 辰夫・土井 廣・中田 史雄

牛糞の堆肥化に及ぼすコーヒーカスの効果

東海畜産学会 平成6年度秋季研究発表会 (1994年11月)

目 次

1. 緒 言	1
2. 材料および方法	2
3. 結 果	4
4. 附 図	6
5. 考 察	10
6. 引用文献	13

緒 言

家禽の卵巣にはさまざまな大きさの卵胞が数多く含まれている。これらの卵胞は卵胞膜と顆粒膜の2層の細胞性の膜が卵子を取り囲んでいる構造をしているが、卵胞の成熟過程で顆粒膜細胞は機能的に大きく変化することが知られている(森, 1986)。

小さな卵胞の顆粒膜細胞ではプロゲステロンの合成分泌は盛んではないが、成熟した卵胞の顆粒膜細胞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・脱水素酵素の活性が高く、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できるように分化している(Huang et al., 1979; Scanes and Fagioli, 1980; Asem et al., 1983; Mori et al., 1984)。この反応は卵胞の成熟とともに増加し、排卵の数時間前に最大となっている(Mori and Kantou, 1987)。一方、顆粒膜細胞の数も卵胞の成熟にしたがって増加するが、全細胞に対する分裂中の細胞の割合は減少しているので、増殖速度は次第に遅くなる(Marrone and Crissman, 1988)。

また顆粒膜細胞は卵黄膜内層を通して卵子と接触しているが(Bellairs et al., 1963)、胚盤表面に位置する細胞の分裂頻度が他の部分より高く、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)。ところがプロゲステロンの合成分泌は胚盤表面の顆粒膜細胞では低いことが観察されている(Marrone et al., 1990)。

このように顆粒膜細胞のプロゲステロン産生能、つまり細胞の分化と細胞の増殖は反比例していると考えられるので、本研究ではこの点に焦点をあて、卵胞の成熟に伴う変化の要因とそれに関するシグナル伝達機構を探ることにした。このためにウズラの顆粒膜細胞の初代培養を試み、細胞増殖と分化に対する各種ホルモンの影響、特にLH、卵胞刺激ホルモン(FSH)、上皮成長因子(EGF)の効果について検討した。

材 料 お よ び 方 法

日本ウズラは東海企業（豊橋市）より購入し、14L:10Dの光条件下で飼育した。毎日産卵時刻を記録し、少なくとも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個体を実験に供した。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、第2および第3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、ハンクス平衡塩類溶液に溶解した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。次にカルシウムイオンとマグネシウムイオンを含んでいないハンクス平衡塩類溶液を2ml加え、86×g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、さらに下記の培養液を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、最終的に得られた細胞の沈澱は、最大卵胞の顆粒膜細胞では培養液1mlに、第2および第3卵胞の顆粒膜細胞では0.5mlに懸濁した。この細胞懸濁液をトリパンプルー溶液で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100万個の生存細胞が含まれるように培養液を加えた。

培養には24穴のマルチウェル培養皿（Falcon）を用い、特に明記していない限り1ウェルあたりの生存細胞が10万個になるように細胞を播種し、41℃、5%炭酸ガス-95%空気の気相の条件で培養した。培養液量は1ウェルあたり0.8mlとした。

培養液としてはマッコイ5a（ギブコ・オリエンタル）とハムF12（日水製薬）の等量混合液に、2mMグルタミン、10mMヘペス、100μg/mlストレプトマイシン、100単位/mlペニシリンを添加し、7.5%重炭酸ナトリウム溶液でpHを7.35に調製したものを濾過滅菌して使用した。培養開始後6時間まではこの培養液に牛胎児血清（ギブコ・オリエンタル）を10%になるように添加して使用した。

細胞に対する影響を調べる培養液は、培養開始後6時間目の最初の培養液の交

換から使用した。第2回目の培養液の交換は培養開始後48時間目におこない、その後は原則として48時間毎に交換した。

羊FSH (NIADDK-oFSH-17)、マウスEGF (SIGNA)、およびジブチリルサイクリックAMP (SIGMA)は上記の培養液に直接溶解した。

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、21mMヘペス、22.2mMグルコースおよび0.1%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41℃でインキュベーションし、つぎに100ng/mlの羊LH (NIADDK-oLH-25)を添加した溶液で同じく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で測定し、前者をプロゲステロンの基礎産生量、後者をLHの刺激による産生量とした。

培養またはインキュベーション終了後に低張のクリスタルバイオレット溶液でウェルを10~20分間インキュベーションすることにより細胞を破壊し、核数を血球計算盤によって計数し、これを細胞数とした (Patterson, 1979)。

結 果

1. 細胞の増殖におよぼす牛胎児血清の効果

最大卵胞、第2卵胞および第3卵胞から得た顆粒膜細胞を10%牛胎児血清を含む培養液で6時間培養して細胞をウェルに接着させた。その後さまざまな濃度の牛胎児血清を含む培養液に変えて経時的に細胞数を測定した。その結果、図1に示すように牛胎児血清の濃度が0.1%以下の場合には細胞の増殖は認められなかったが、牛胎児血清の濃度を5%以上にすると144時間の培養期間中ほぼ直線的に細胞数は増加した。牛胎児血清の濃度が1%または0.5%の場合には細胞の増殖は中間的な値となったので、以降の実験では培養6時間目からは1%の牛胎児血清を添加した培養液を用いることとした。

2. 細胞増殖におよぼすEGFの効果

最大卵胞、第2卵胞および第3卵胞から得た顆粒膜細胞を、さまざまな濃度のEGFを含んだ培養液で培養し、72時間目に細胞数を測定した。結果は、EGFを含んでいない培養液で培養した場合の細胞数に対する相対的細胞数として図2に示した。EGFの濃度が30pg/mlでも細胞の増殖に効果があったが、濃度を高めるにしたがって細胞数は増加し、10ng/mlの濃度で細胞は2倍以上に増殖した。

3. 細胞増殖におよぼす各種ホルモンの効果

最大卵胞、第2卵胞および第3卵胞から顆粒膜細胞を別々に調製し、LH (100ng/ml)、FSH (100ng/ml)、ジブチリルサイクリックAMP (1mM)、またはEGF (10ng/ml)を含んだ培養液、およびこれらのホルモンを添加していない培養液で72時間培養し、細胞数を測定した。結果はホルモンを含んでいない培養液で培養した場合の細胞数に対する相対的細胞数として表した。

図3に示すように、LH、FSHおよびジブチリルサイクリックAMPは最大卵胞と第2卵胞の顆粒膜細胞の増殖には効果がなかった。第3卵胞から得た顆粒膜細胞はLHとFSHによって若干増殖した(ホルモン無添加群と比較して5%

有意)。EGFはどの卵胞から得た顆粒膜細胞にも増殖効果が認められたが、小さな卵胞の顆粒膜細胞ほどその効果が大きい傾向にあった。

4. LHによるプロゲステロン産生の促進に対する各種ホルモンの効果

最大卵胞、第2卵胞および第3卵胞から顆粒膜細胞を別々に調製し、FSH (100 ng/ml)、EGF (10 ng/ml)、この両者を含んだ培養液、およびこれらのホルモンを添加していない培養液で72時間培養した。その後、プロゲステロンの基礎産生量およびLHの刺激による産生量を測定した。これらのプロゲステロン量は細胞あたりに換算し、図4にその結果を示した。

ホルモン無添加の培養液では、どの卵胞から得た顆粒膜細胞もLHに反応してプロゲステロンを産生するが、この反応は最大卵胞から得た細胞が最大で、小さな卵胞ほど小さくなっていた。FSHを添加した培養液で培養した細胞は、LHに対する反応性が著しく増加したが、卵胞による違いは認められなかった。一方、EGFを添加して培養した場合には、細胞はLHにまったく反応しなくなった。これはEGFとFSHの両者を添加して培養した場合でも同様で、LHに対する反応性は完全に消失していた。

図1. 顆粒膜細胞の増殖におよぼす牛胎児血清の効果。1ウェルあたり5万細胞を播種し、培養6時間目までは10%牛胎児血清を含んだ培養液で培養した。右の数字は6時間目以降に用いた牛胎児血清の濃度を示し、各点は3回の計測の平均値である。

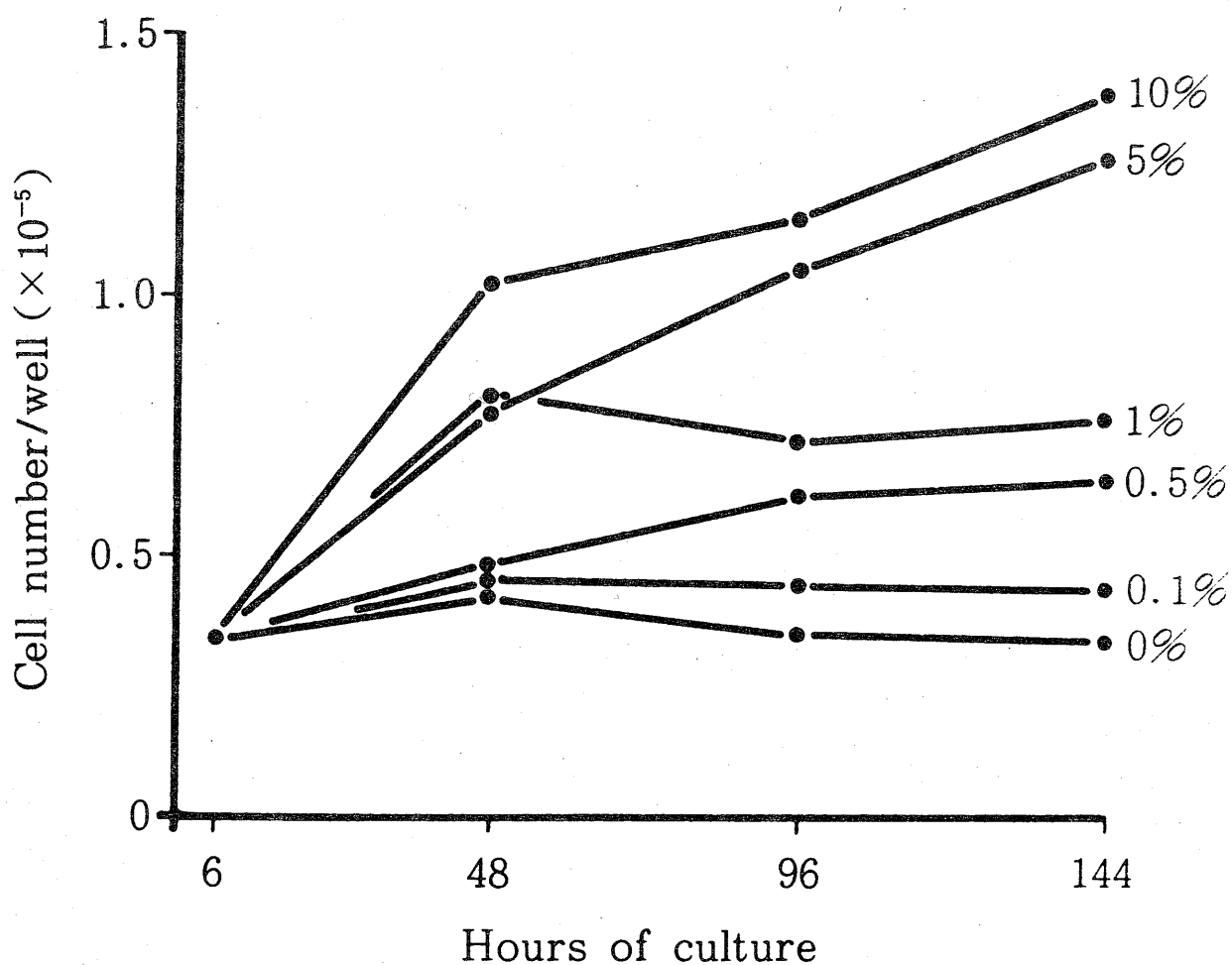


図2. 顆粒膜細胞の増殖におよぼすEGFの効果。培養6時間目から72時間目までさまざまな濃度のEGFを添加して培養した。各点は2回の実験の平均値で示してある。

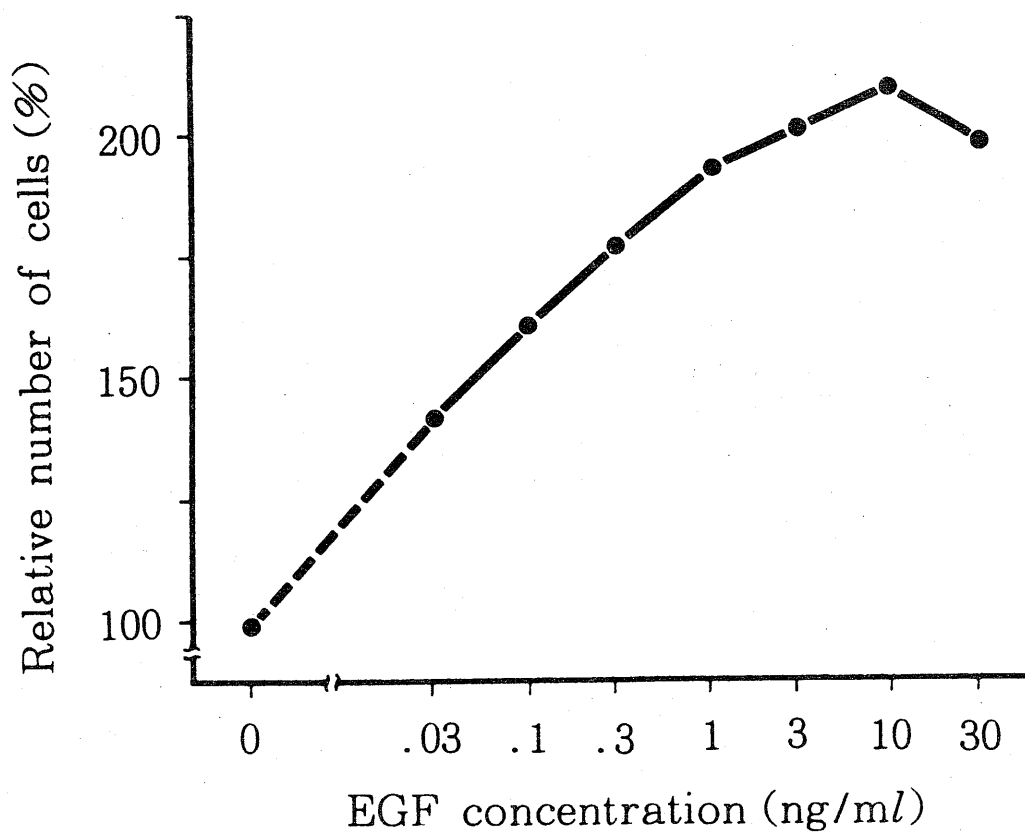


図3. 顆粒膜細胞の増殖におよぼす各種ホルモンの効果。最大卵胞 (F1)、第2卵胞 (F2) および第3卵胞 (F3) から得た顆粒膜細胞を、培養6時間目から72時間目まで100 ng/ml羊LH (LH)、100 ng/ml羊FSH (FSH)、1 mMジブチリルサイクリックAMP (AMP)、または10 ng/mlマウスEGF (EGF) を含んだ培養液で培養した。各カラムは図中に示した実験回数の平均値と標準誤差を表し、★および★★はホルモン無添加の培養液で培養した場合の細胞数に対して5%および1%水準で有意差があることを示す。

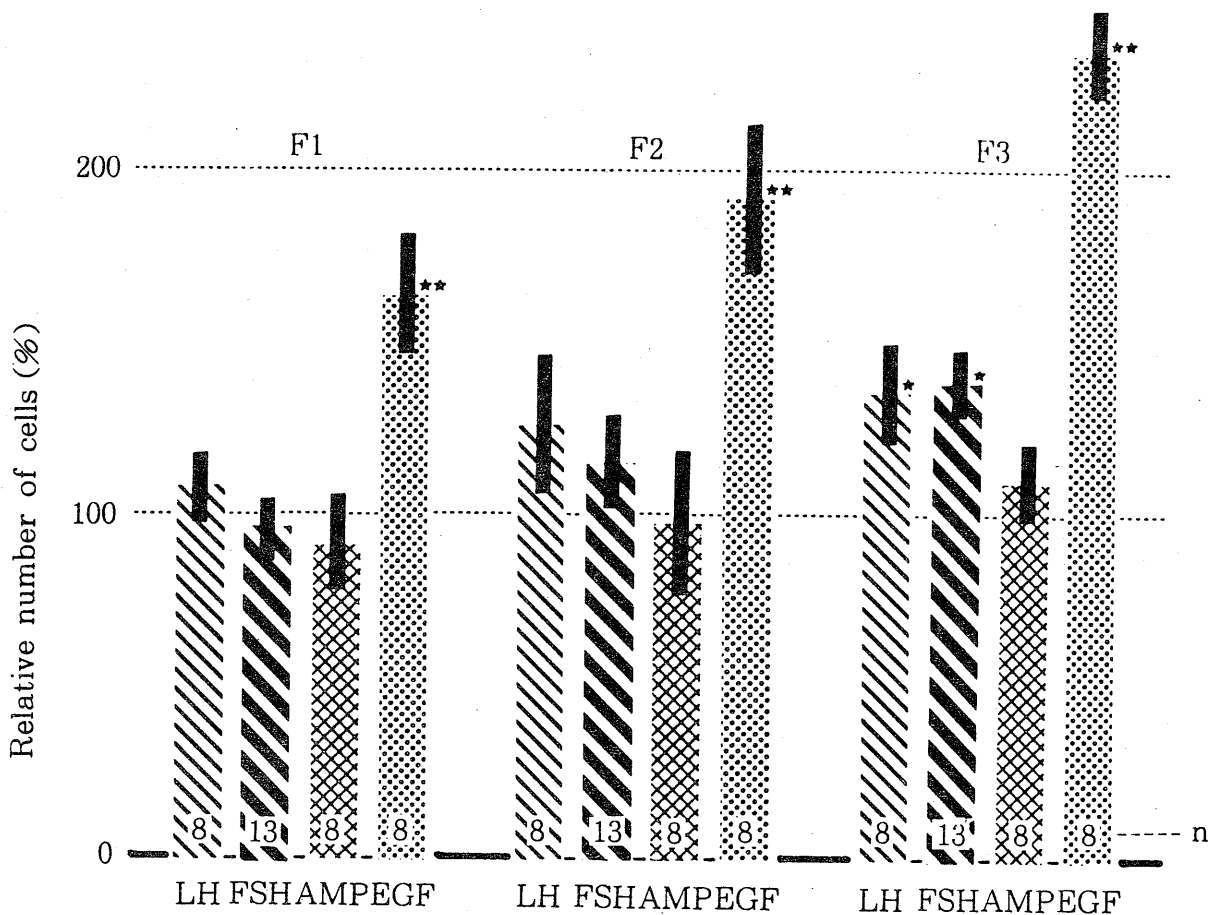
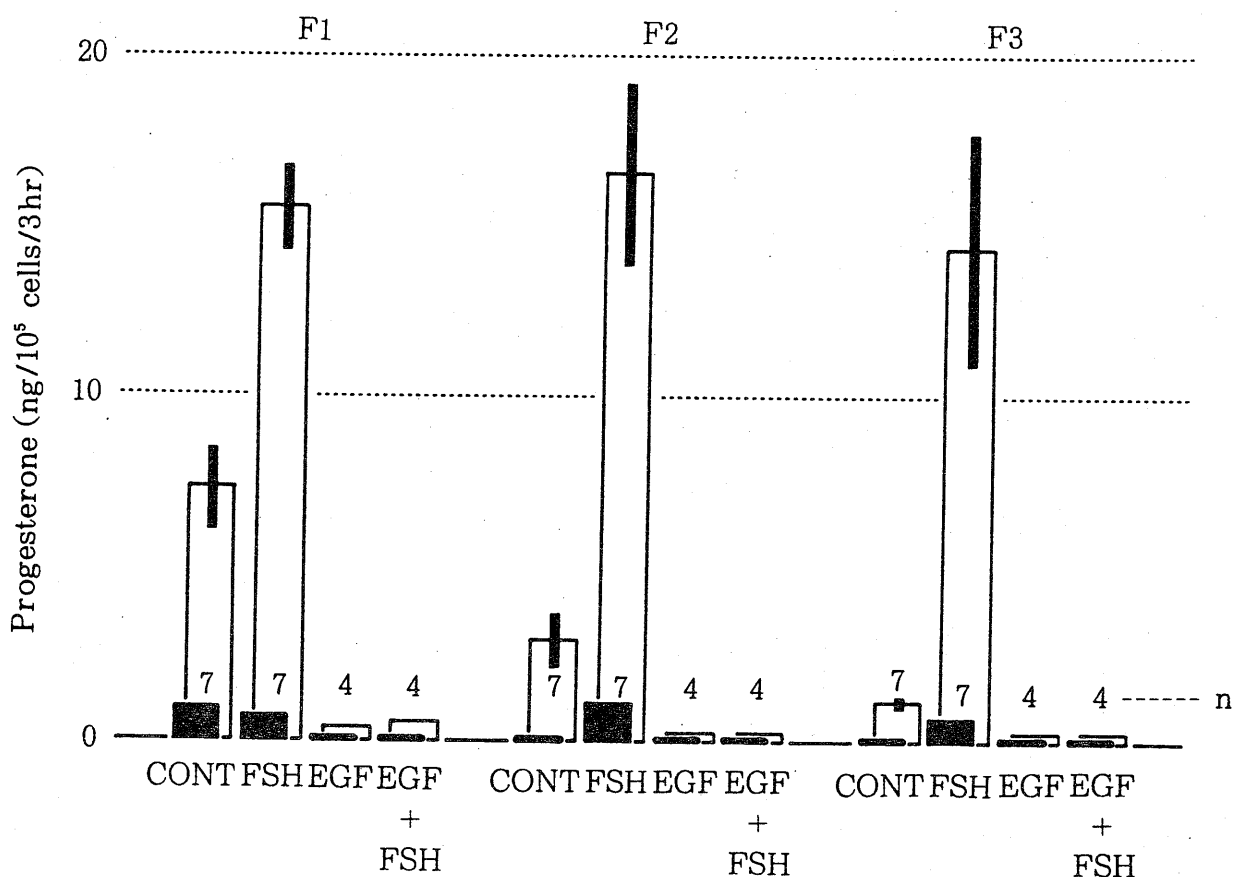


図4. LHによるプロゲステロン産生の促進に対する各種ホルモンの効果。最大卵胞 (F1)、第2卵胞 (F2) および第3卵胞 (F3) から得た顆粒膜細胞を、培養6時間目から72時間目まで100 ng/ml羊FSH (FSH)、10 ng/mlマウスEGF (EGF)、この両者を含んだ培養液 (EGF+FSH)、およびこれらのホルモンを添加していない培養液 (CONT) で72時間培養した。その後、プロゲステロンの基礎産生量 (黒塗のカラム) およびLHの刺激による産生量 (白抜きのカラム) を測定した。実験回数は図中にnで表示し、各カラムと棒は平均値と標準誤差を示している。標準誤差の棒が表示されていないものはカラムの線の太さ以下であったためである。



考 察

最大卵胞の顆粒膜細胞はLHの刺激によってプロゲステロンを産生する。LHの刺激は細胞膜表面の受容体を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のサイクリックAMP濃度を上昇させる(森、1986)。サイクリックAMPはプロゲステロンの材料となるコレステロールがミトコンドリアへ移動する機構を促進する(Mori et al., 1989)。最大卵胞の顆粒膜細胞にはコレステロール側鎖切断酵素と $\Delta 5-3\beta$ -ステロイド水酸基・脱水素酵素の高い活性があるので、移動したコレステロールから速やかにプロゲステロンが産生される。

本研究では顆粒膜細胞がLHに反応してプロゲステロンを産生する点を細胞の分化の指標とし、培養終了後の顆粒膜細胞をLHとインキュベーションすることによってこれを測定した。その結果、顆粒膜細胞はFSHによって分化することが明らかとなったが、これは第2卵胞や第3卵胞の顆粒膜細胞でも同じ程度であった。Tilly et al. (1991)は、小卵胞から得た顆粒膜細胞をFSHと24時間培養すると、コレステロール側鎖切断酵素が誘導されて、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。さらに彼らは、蛋白キナーゼCを活性化するような物質(phorbol ester)が存在するとFSHの効果がなくなることを指摘している。つまり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されていると思われる。本研究で示したように、EGFがFSHの細胞分化に対する効果を抑制すること、またニワトリの顆粒膜細胞のプロゲステロン産生をEGFが抑制すると報告されていること(Pulley and Marrone, 1986)を考え合わせると、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はEGFをあげることができるであろう。そしてFSHとEGFの両者の相互作用によって、中小卵胞の顆粒膜細胞は増殖したり、分化するものと思われる。

本研究ではFSH、LH、およびジブチリルサイクリックAMPのいずれもが細胞増殖効果を示さなかった。Yoshimura and Tamura (1988)はニワトリの第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EGFによって細胞の増殖が盛んになることを報告している。この違いについては培養条件等の検討が必要であるが、本研究で用いた培養

液（マッコイ5aとハムF12の等量混合液+グルタミン+ヘペス）は顆粒膜細胞の機能を調べる上ではさらに改良を必要とする。なぜならこの培養液のみでは最大卵胞の顆粒膜細胞のLHに対する反応性を高いままで維持することができないからである。ウズラの最大卵胞から得た新鮮な顆粒膜細胞は、LHに反応して3時間のインキュベーションで細胞10万個あたり約100ngのプロゲステロンを産生するが（Mori et al., 1984）、本研究で用いた培養条件では48時間以内にその反応性が徐々に減少し72時間後には10分の1以下になってしまった。Schwartz et al. (1989) も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。また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。つまり最大卵胞の顆粒膜細胞の反応性を維持できる培養条件は、まだ確立されていないということである。細胞の増殖を調べるにあたって、最大卵胞の顆粒膜細胞の反応性を維持できる培養条件でおこなうことが重要だと思われ、この点が解決されれば、今後の研究に大いに寄与することになるであろう。

要約

家禽の卵胞顆粒膜細胞は卵胞の成熟とともに増殖するが、卵胞が最大になると黄体形成ホルモン（LH）の刺激によりプロゲステロンを産生できるように分化する。この機構を探るためにウズラの顆粒膜細胞を培養し、その増殖と分化におよぼす各種ホルモンの効果について検討した。

培養液はグルタミン、ヘペス、抗生物質を含んだマッコイ5aとハムF12の等量混合液で、培養開始後6時間までは牛胎児血清を10%添加して細胞を接着させ、その後は1%として培養した。培養終了時の細胞のLHに対する反応性を調べるにあたっては、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、次にLHを添加した溶液で3時間インキュベーションし、それぞれの溶液中のプロゲステロン量を測定した。

その結果、卵胞刺激ホルモン（FSH）を添加した培養液で72時間培養しても細胞の増殖には効果は認められなかったが、LHに対する反応性は卵胞の大きさとは無関係に増加した。一方、上皮成長因子（EGF）を添加すると細胞の著しい増殖が観察されたが、これらの細胞ではLHに対する反応性が消失していた。以上の結果からEGFは細胞の増殖に作用し、FSHは細胞の分化に作用していると推察され、両ホルモンが卵胞の成熟過程における顆粒膜細胞の増殖と分化の制御に関与している可能性が示唆された。

引用文献

- Asem, E. K., F. Lintner, H. V. Biellier, W. H. Burke and F. Hertelendy (1983) Comparison of turkey luteinizing hormone (LH)- and ovine LH-induced progesterone production in granulosa cells of the turkey (Meleagris gallopavo) and of the domestic fowl (Gallus domesticus). *General and Comparative Endocrinology*, 52 : 445-451.
- Bellairs, R., M. Harkness and R. D. Harkness (1963) The vitelline membrane of the hen's egg: A chemical and electron microscopical study. *Journal of Ultrastructure Research*, 8 : 339-359.
- Huang, E. S. -R., K. J. Kao and A. V. Nalbandov (1979) Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biology of Reproduction*, 20 : 454-461.
- Marrone, B. L. and H. A. Crissman (1988) Characterization of granulosa cell subpopulations from avian preovulatory follicles by multi-parameter flow cytometry. *Endocrinology*, 122 : 651-658.
- Marrone, B. L., M. Jamaluddin and F. Hertelendy (1990) Regional pattern of cell maturation and progesterone biosynthesis in the avian granulosa cell layer. *Biology of Reproduction*, 42 : 405-412.
- 森 誠 (1986) 家禽の排卵とステロイドホルモン. *日本家禽学会誌*, 23 : 247-264.
- Mori, M., K. Kohmoto and Y. Shoda (1984) Role of granulosa and theca cells on in vitro progesterone production in preovulatory follicles of the Japanese quail. *Japanese Poultry Science*, 21 : 206-214.
- Mori, M. and T. Kantou (1987) Changes in progesterone production in granulosa cells during the ovulatory cycle of the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *General and Comparative Endocrinology*, 68 : 57-63.
- Mori, M., N. Ikeda, T. Kawana and Y. Tanabe (1989) The dynamics of progesterone output in perfused granulosa layer of the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica): Response to adenosine 3',5'-cyclic

- monophosphate and aminoglutethimide. *Journal of Steroid Biochemistry*, 33 : 1173-1179.
- Patterson, M. K. (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods in Enzymology*, 58 : 141-152.
- 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. *Journal of Anatomy*, 127 : 379-392.
- 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.
- Scanes, C. G. and J. H. Fagioli (1980) Effects of mammalian and avian gonadotropins on in vitro progesterone production by avian ovarian granulosa cells. *General and Comparative Endocrinology*, 41 : 1-7.
- 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.
- Tilly, J. L., K. I. Kowalski and A. L. Johnson (1991) Cytochrome P₄₅₀ side-chain cleavage (P₄₅₀SCC) in the hen ovary. II. P₄₅₀SCC messenger RNA, immunoreactive protein, and enzyme activity in developing granulosa cells *Biology of Reproduction*, 45 : 967-974.
- Yoshimura, Y. and T. Tamura (1988) Effects of gonadotrophins, steroid hormones, and epidermal growth factor on the in vitro proliferation of chicken granulosa cells. *Poultry Science*, 67 : 814-818.
- Zobell, R. L. and F. Hertelendy (1986) Metabolism of progesterone by cultured avian granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 34 (suppl.1) : 162.