

鳥類における産卵誘起ペプチドの同定とその作用機構*

李 丹

広島大学大学院生物圏科学研究科

Identification of an Oviposition-Inducing Peptide and Its Action in the Bird

Dan LI

*Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan*

要 旨

序 論

鳥類の卵管は漏斗部、膨大部（卵白分泌部）、峡部、子宮部（卵殻腺部）及び膣部よりなる。卵巣が排卵した卵は漏斗部で受け取られ、膨大部で卵白が分泌され卵黄膜に密着する。峡部で卵白を覆うように卵殻膜が形成され、子宮部で卵殻膜の表面に卵殻が作られる。

鳥類の産卵は卵管子宮部（卵殻腺部）にある卵が膣部を経て体外に放出される現象であり、子宮や膣の激しい筋収縮により導かれる。これまでの内分泌学的研究により、鳥類の産卵にはホルモン調節が存在することが知られている。脳下垂体後葉ホルモンのアルギニンバソトシン(AVT)と卵巣で合成されるプロスタグランジン(PGE₂, PGF_{2α})が産卵調節に関与していることが明らかにされている。一方、卵管の子宮や膣の筋層には多くの神経線維が分布することから、産卵における神経性制御が示唆されていたが、その制御機構は永く不明であった。本研究は産卵の神経制御機構を解明することを目的として、鳥類の卵管に投射するニューロンに存在する神経ペプチドを同定し、その作用機構を解析した。

第1章：産卵誘起ペプチドの単離・同定と卵管内局在

卵管に投射するニューロンの終末から放出され子宮の筋収縮を導く神経ペプチドを同定した。まず、成熟したウズラの卵管から、逆相系 HPLC と陽イオン交換 HPLC を用い、卵管の子宮と膣の筋収縮を導くペプチドの単離を試みた。その結果、子宮や膣の筋収縮を著しく増強するペプチドが

広島大学総合科学部紀要IV理系編、第26巻（2000）

*広島大学審査学位論文

口頭発表日：2000年2月21日、学位取得日：2000年3月24日

単離された。アミノ酸配列分析と質量分析により、単離したペプチドの一次構造を解析したところ、Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Val-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-Asn-Asp-Lys-His-Gly-Phe-Thr-NH₂と推定された。推定構造に基づき合成したペプチドと天然ペプチドのクロマトグラム上の挙動を比較したところ、合成ペプチドは天然ペプチドと同じ挙動を示した。さらに、合成ペプチドには天然ペプチドと同様に子宮と膣の筋収縮を誘起する作用があり、推定された構造が正しいことが確認された。また、効果の閾値は子宮では 10^{-10} から 10^{-9} M、膣では 10^{-9} から 10^{-8} Mであった。

このペプチドの構造はすでにニワトリの腸管から単離されていた鳥類のガラニンの構造と同じであった。ガラニンは、脳腸ペプチドとして、ヒト、ブタ、ヒツジ、ウシなど数種の哺乳類からも単離・同定されている。鳥類のニワトリとウズラのガラニンは同じ構造であるが、哺乳類のガラニンとはC-末端側のアミノ酸の配列が少し異なる。ガラニンが脊椎動物の生殖腺系に存在していることは本研究により初めて明らかになった。

ガラニンの産卵調節への関与が以上の結果から示唆されたので、本研究ではさらに、合成ガラニンを通常の産卵の4~7時間前のウズラに投与して産卵の有無を個体レベルで解析した。その結果、予想どおりガラニン投与個体の多くは直ちに産卵を行い、その効力は用量に依存して増加した。

卵管から産卵を誘起するペプチドを同定したので、次にこのペプチドの卵管内局在を解析した。ペプチドの抗体を作成して免疫組織化学的解析を行った。その結果、免疫反応は卵管内では部位特異的に検出され、ガラニンは子宮や膣の筋層に投射する神経繊維に存在していることがわかった。さらに詳しく解析したところ、卵管内には免疫陽性の細胞体は確認されなかった。

第2章：卵管における産卵誘起ペプチド受容体の検出と卵管内局在

鳥類の産卵は卵管の子宮筋層に投射するニューロンの終末からガラニンが放出され、ガラニンが子宮の激しい筋収縮を導くことで産卵を誘起すると考えられる。以上の仮説を証明するには、卵管子宮部に存在するガラニン受容体を検出する必要がある。

そこで、ウズラの卵管から単離したガラニンと同じ構造のペプチドを合成し、これを¹²⁵Iで標識して卵管組織との*in vitro*の結合実験（ラジオレセプター・アッセイ法）を行った。成熟した卵管の粗膜分画を¹²⁵I-ガラニンとインキュベーションして平衡状態に達したところでガラニン結合量を調べたところ、卵管に高い結合量が検出された。このガラニン結合は、20°Cの反応では1時間で最高値を示し、トリのガラニンにより競争的に阻害された。スキッチャード・プロット解析により解離の平衡常数(K_d)を算出したところ、0.249nMであった。以上の解析により、成熟したウズラの卵管には高親和性のガラニン受容体が存在することが明らかになった。

次に、ガラニン受容体の卵管内局在を調べるために、卵管を構成する膣部、子宮部、峽部、膨大部の各粗膜分画と¹²⁵I-ガラニンをインキュベーションしてガラニン結合量を比較した。膣部と子宮部に高いガラニン結合量が検出され、峽部や膨大部の結合量は極めて低かった。以上の結果により、子宮の筋層に投射する神経終末から放出されたガラニンは、子宮に存在するガラニン受容体を介して子宮の筋収縮を直接導くことが明らかになった。

第3章：産卵誘起ペプチド受容体の卵管発達過程における変動と性ステロイド調節

卵管子宮部の発達過程におけるガラニン受容体の発現する時期とその後のガラニン受容体の変動

を解析した。発達の異なるウズラの卵管子宮部の粗膜分画と¹²⁵I-ガラニンをインキュベーションしてガラニン結合量を測定した。子宮部が分化する前の時期の4週齢の未発達卵管にはガラニン結合が僅かに検出された。その後、子宮部が分化してその重量が増加していく過程では、ガラニン結合量は著しく増加した。スキッチャード・プロット解析により、子宮の発達過程で認められた子宮へのガラニン結合の増加は、親和性の変化ではなくガラニン受容体数の増加によることがわかった。

以上の解析から、高親和性のガラニン受容体は未発達卵管には僅かしか存在しないこと、以後の卵管の発達過程に伴い子宮部では高親和性のガラニン受容体が著しく増加することなどが明らかになった。

次に、子宮の発達過程で生じるガラニン受容体の増加を誘導する分子を探索した。これまでの内分泌学的研究により、卵管の発達は卵巣が合成・分泌する性ステロイドに依存しており、特にエストラジオールが主要な働きをすることが知られている。そこで、卵巣がつくる性ステロイドのガラニン受容体誘導作用を解析した。

4週齢の未発達卵管を有するウズラにエストラジオールの混入したサイラスチック・プレート(10 mg/プレート)を移植し、1週間後に子宮のガラニン受容体を解析した。その結果、エストラジオールには子宮重量の増加に加え、子宮のガラニン結合量を増加させる働きがあることがわかった。また、卵巣がつくる別の性ステロイドであるプロゲステロンを同様の方法によりウズラに投与したところ、子宮重量は増加しないが、子宮のガラニン結合量が増加した。さらに、エストラジオールとプロゲステロンの同時投与では、子宮のガラニン結合量が相対的に増加した。スキッチャード・プロット解析の結果、性ステロイド投与による子宮のガラニン結合量の増加は高親和性ガラニン受容体の増加によることが示された。

以上の解析により、卵管の発達過程で生じる子宮内のガラニン受容体の増加は卵巣が発達して分泌する性ステロイドの作用により導かれることが明らかになった。子宮の筋収縮でなされる鳥類の産卵には、その時期に卵管子宮部にガラニン受容体が多く存在する必要がある。卵巣の性ステロイドはガラニン受容体を誘導することで産卵に関与しており、卵管と卵巣の機能は密接に連動しているといえる。

第4章：産卵誘起ペプチドの卵管発達過程における変動と性ステロイド調節

これまでの研究から、ガラニンは卵管子宮部のガラニン受容体を介して強い筋収縮作用を導くことを明らかにした。また、ガラニン受容体は、卵管の発達に伴い、性ステロイドの作用により著しく増加することを見出した。本研究ではさらに、卵管の発達過程における子宮内のガラニンの変動とその性ステロイド調節を調べた。4、6、10、13週齢の発達の異なるウズラの卵管子宮部からペプチドを抽出し、ELISAにより子宮に存在するガラニン量を測定した。その結果、卵管の発達に伴い、子宮内のガラニンが増加することが明らかになった。

次に、卵管の発達過程で生じる子宮内のガラニンの増加を導く分子を探索した。4週齢の未発達卵管を有するウズラに性ステロイドの混入したサイラスチック・プレート(10mg/プレート)を移植し、1週間後に子宮内のガラニン量を測定した。その結果、性ステロイドのエストラジオールが子宮内のガラニンの増加を導くことが見出された。性ステロイドはガラニン受容体に加えガラニンも誘導することが明らかになった。

まとめ

これまで、鳥類の産卵には卵巢で合成・分泌されるPGE₂やPGF_{2α}と脳下垂体後葉から放出されるAVTによるホルモン調節が知られていたが、一連の研究により、産卵には神経制御が存在することが新しく見出された。その機構は次のように要約される。卵管の発達過程において、卵巢の性ステロイドの作用によりガラニン受容体が子宮で誘導され、一方、子宮筋層に投射するニューロンが産卵誘起ペプチドであるガラニンを産生する。ある刺激により、子宮筋層に投射するニューロンの終末からガラニンが放出され、放出されたガラニンはそこに存在するガラニン受容体と結合して子宮筋の激しい収縮を導く。その結果、子宮部の卵が膣部を経て体外に放出される。