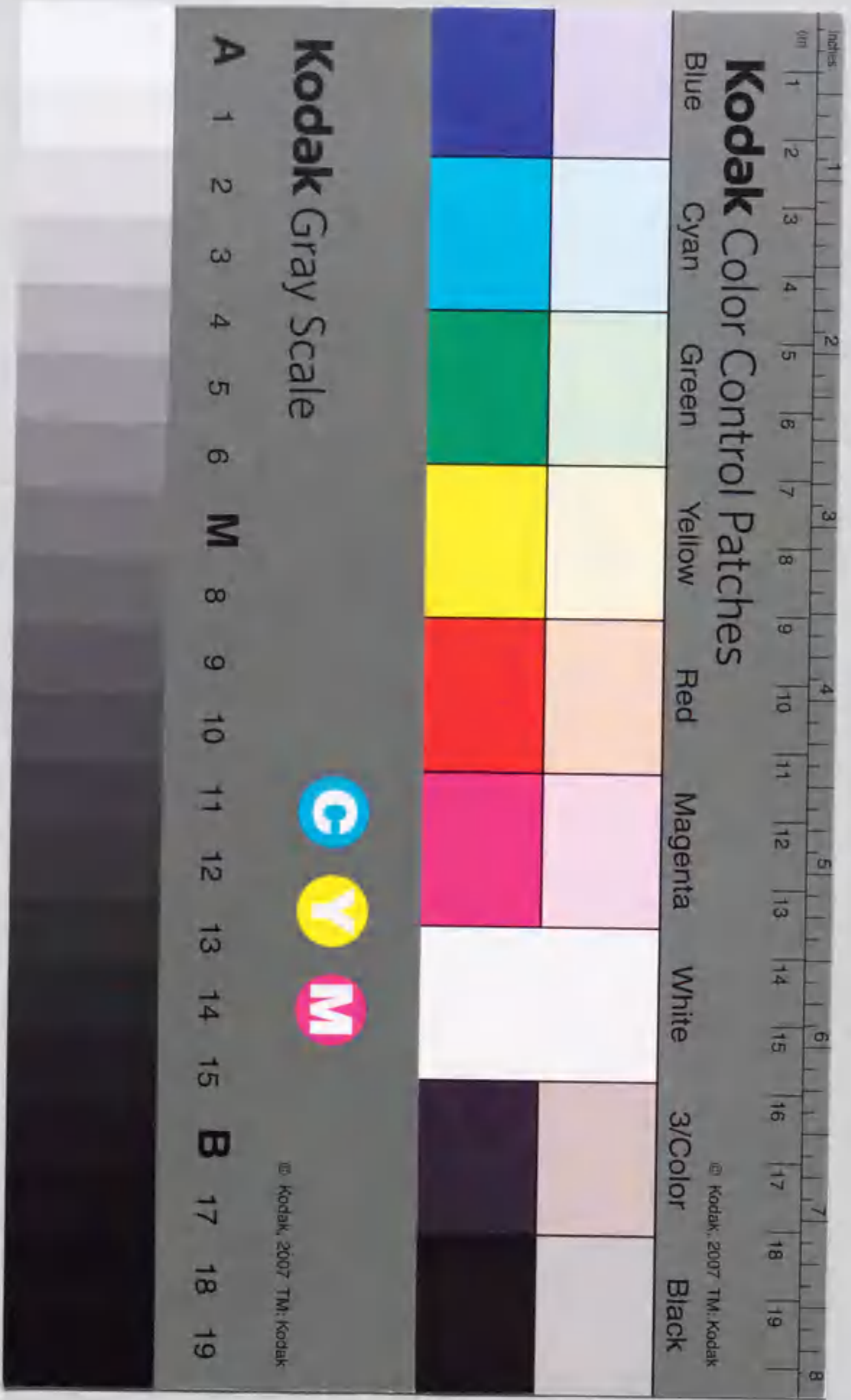


産卵期におけるクミンシロ貯存在カボツツレ指針

クンバク質(SaBE-2/21)遺伝子の発現解析

家田照子



①

報告番号 甲第 4217 号

産卵鶏におけるビタミンD依存性カルシウム結合  
タンパク質 (CaBP-D28K) 遺伝子の発現機構

名古屋大学大学院生命農学研究科

畜産学専攻

家田 照子

1999

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 排卵周期におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量の変動 と卵殻腺内の卵がCaBP-D28K mRNA量に与える影響	8
2・1 序章	8
2・2 材料及び方法	10
2・2・1 供試鶏	10
2・2・2 組織採取	10
2・2・3 total RNA抽出、ノーザン、スロットプロット分析	12
2・2・4 CaBP-D28Kのラジオイムノアッセイ	13
2・2・5 PTHレセプターアッセイ	13
2・2・6 統計処理	14
2・3 結果	14
2・3・1 CaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの定性	14
2・3・2 排卵周期におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量 の変動	15
2・3・3 排卵周期におけるCaBP-D28Kの変動	16
2・3・4 放卵遅延、早期放卵がCaBP-D28K及びVDR mRNA量に 与える影響	16
2・3・5 卵殻腺粘膜におけるPTHレセプターの存在と排卵周期中 における結合親和性の変化	17
2・4 考察	17
2・5 要約	23
図 2-1	25
図 2-2	26
図 2-3	27
図 2-4	28
図 2-5	29
図 2-6	30
図 2-7	31

図 2-8	32
第 3 章 アミアミノグルタチミド (aminoglutethimide) が産卵鶏のCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量に与える影響	33
3・1 序章	33
3・2 材料及び方法	34
3・2・1 試薬	34
3・2・2 供試鶏及び投与	35
3・2・3 total RNA抽出、ノーザンプロット分析	36
3・2・4 卵殻比率、血中カルシウム濃度測定、統計処理	36
3・3 結果	36
3・4 考察	37
3・5 要約	40
図 3-1	42
図 3-2	43
図 3-3	44
図 3-4	45
第 4 章 低カルシウム飼料給餌による卵殻質の低下と小腸及び卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA量に与える影響	46
4・1 序章	46
4・2 材料及び方法	47
4・2・1 供試鶏	47
4・2・2 total RNA抽出、ノーザンプロット分析	48
4・2・3 卵殻比率、血中カルシウム濃度測定、統計処理	48
4・3 結果	49
4・3・1 低カルシウム飼料と3.5%カルシウムの再給時が卵殻質及び血中カルシウム濃度に与える影響	49
4・3・2 低カルシウム飼料と3.5%カルシウムの再給時が小腸及び卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に与える影響	50
4・4 考察	50
4・5 要約	54
表 4-1	56

図 4-1	57
図 4-2	58
図 4-3	59
図 4-4	60
第 5 章 総合考察	61
図 5-1	67
第 6 章 要約	68
謝辞	72
参考文献	74

## 第1章

### 緒言

ビタミンDは生物の体内におけるカルシウム代謝に欠かせない大切なホルモンであり、ビタミンDの欠乏症は、クル病や骨軟化症として骨に異常が現われることが知られている。ビタミンDはもともと抗クル病因子として発見された脂溶性ビタミンであったが、その後ビタミンDの活性型代謝物である $1\alpha,25$ -ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )が発見され、パラサイロイドホルモン (PTH) と並び、生体内のカルシウム代謝に重要な役割を担っていることがわかってきた。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はステロイド骨格を持つことから他のステロイドホルモンとの作用の類似性が示唆されていた。近年、その受容体タンパク質 (VDR) が小腸から単離され、その構造からVDRはステロイド・甲状腺ホルモン受容体 (*erbA*) のスーパーファミリーに属すること、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はVDRと結合し複合体を形成すると標的遺伝子のプロモーター領域の特殊な塩基配列を認識することから、今ではステロイドホルモンの一つと考えられている (McDonnell *et al.*, 1987)。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はカルシウム調節ホルモンとして主に小腸、骨、腎臓、副甲状腺に作用する。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の生理作用には遺伝子の賦活を伴うgenomic actionと遺伝子の賦活を伴わない遺伝子非制御下のnon-genomic actionの2つあり、それぞれが研究されている。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の標的器官の中で、その作用機序が最も古くから調べられているのは小腸である。ニワトリヒナにビタミンDを投与すると、小腸でのカルシウム吸収の亢進と同時にcalbindin D28k (CaBP-D28k)合成を特異的に誘導することから、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のgenomic actionを研究する上で、CaBP-D28kは重要な研究対象となってきた (Wasserman *et al.*, 1968)。CaBP-D28kが発見された経緯は、1966年にWassermanとTaylorによってクル

病のヒヨコにビタミンDを投与すると小腸粘膜でのカルシウム結合能力が上昇することが初めて報告され、その後、この反応が28,000 mol weightのタンパク質に関係していることがわかり、CaBP-D28Kが発見された (Taylor and Wasserman, 1967; Wasserman *et al.*, 1968)。その後CaBP-D28Kについて構造的な研究が進み、細胞内カルシウム結合タンパク質スーパーファミリーの一つであることがわかった。細胞内カルシウム結合タンパク質にはカルモジュリン、パルブアルブミン、トロポニンC、S-100 タンパク質などがあり、高いカルシウム結合親和性をもつことを特徴としている ( $K_d = 10^{-8} - 10^{-6}$ , Kretsinger, 1976; Minghetti *et al.*, 1988)。CaBP-D28Kのクローニングは1983年に Hunzikerらにより初めて報告され、その後アミノ酸配列が明らかにされた (Wilson *et al.*, 1985; Fullmer and Wasserman, 1987; Hunziker, 1986)。さらにアミノ酸分析からCaBP-D28Kは261アミノ酸残基からなる、シングルポリペプチドであることが明らかとなった (Fullmer and Wasserman, 1987)。1988年にはCaBP-D28KのDNA配列も明らかにされ、11個のエクソンと10個のイントロンからなる全長18.5 kbの構造を持つことがわかった (Wilson *et al.*, 1988)。カルシウム結合タンパク質は、EFハンドと呼ばれる $\alpha$ -ヘリックス-ループ-ヘリックスのペプチド構造を特徴とする共通のカルシウム結合ドメインを持つことがわかっている (Kretsinger, 1976; Christakos *et al.*, 1989)。CaBP-D28Kもまた6個のカルシウム結合ドメインを持つが、そのうちの2個はカルシウムとの結合に必須なアミノ酸配列に変異があるため、6個のドメインのうち4個だけがカルシウムと結合すると考えられている (Hunziker, 1986)。CaBP-D28Kは鳥類以外でもヒト、ウシ、ラット、マウスなどの哺乳類、両生類、魚類と広く存在が確認されており、特にカルシウム結合部位の構造には動物種を超えて高

い配列相同性が認められる。たとえばニワトリとヒトのCaBP-D28Kホモロジーは79%、哺乳類間では98%と非常に高いホモロジーを保っている (Hunziker and Schrickel, 1988; Wilson *et al.*, 1988)。またニワトリCaBP-D28Kの抗体は他の種とも交叉反応をすることから、CaBP-D28Kは進化の過程で非常によく保存されてきたタンパク質であり、何らかの重要な役割を担っていると思われる (Sonnenberg *et al.*, 1984)。

CaBP-D28Kは鳥類の小腸 (Wasserman and Taylor, 1966)、腎臓 (Rosenberg *et al.*, 1986)、卵殻腺 (Corradino *et al.*, 1968)、骨 (Christakos and Norman, 1978)、膵臓 (Roth *et al.*, 1982)、小脳 (Taylor and Brindak, 1974) といった数多くの組織で発現している事が確認されているが、CaBP-D28Kの正確な生理的役割は今だにはっきりしてはいない。はじめCaBP-D28Kは小腸で発見されたこともあり、ビタミンDによるカルシウム吸収の亢進はCaBP-D28Kを介して起こると考えられていたが、小腸での1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によるCaBP-D28K合成の誘導がカルシウム吸収の亢進に遅れて起こることからカルシウム吸収の初期段階には関わっていないと今では考えられている (Spencer *et al.*, 1976)。しかし、小腸での1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>量とCaBP-D28K量との間にはきれいな相関関係があることから、CaBP-D28KがビタミンDに依存した小腸のカルシウム吸収機構に何らかの役割を演じていることは確かである (Theofan *et al.*, 1986)。免疫染色の結果では小腸のCaBP-D28Kは上皮細胞の膜表面ではなく細胞質に存在していることが明らかとなっている (Thorens *et al.*, 1982; Christakos *et al.*, 1989)。このことからCaBP-D28Kは小腸における食物からのカルシウム吸収と血中への排出の促進および細胞内をカルシウムが通過する際の細胞内カルシウムイオン濃度を適正なレベルに保つ緩衝剤としての役割を持っているのではないかという考えが支配的である (Murer and Hildmann,



1981; Wasserman and Fullmer, 1983; Feher *et al.*, 1992; Stein, 1992)。一般に産卵鶏の小腸および腎臓におけるカルシウムの吸収能は、成長期や産卵開始期で著しく上昇し、成長期には脳細胞も活発な増殖を繰り返すこともよく知られている。したがって、成長期にみられるCaBP-D28K産生の亢進は成体のカルシウム受容の増大に見合う現象といえる。このことから、CaBP-D28Kが細胞内のカルシウム移動に果たす役割は大きいと思われる。

先に述べたようにCaBP-D28Kは1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって発現量が増加促進を受けるが、その機構については次のようなモデルが考えられている。

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は小腸や腎臓といった標的器官の細胞内レセプター (VDR) と結合しリガンド結合受容体となる。リガンド結合受容体はnuclear accessory factor (NAF) と二量体 (ヘテロダイマー) を形成して標的遺伝子の発現調節域にある vitamin D responsive element (VDRE) に結合することによって遺伝子発現を調節すると考えられる (Tsai and Norman, 1973; Lowe *et al.*, 1992)。CaBP-D28K とVDRの組織分布は比較的良好一致し、さらに小腸のCaBP-D28K遺伝子の5'上流の調節領域にVDRが特異的に結合するビタミンDレスポンスエレメントの存在が報告されている (Minghetti *et al.*, 1989)。しかし、組織によってはCaBP-D28K遺伝子の発現に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が直接関与しない可能性もある。たとえば、小脳のプルキンエ細胞はVDRを持たないが、高濃度のCaBP-D28Kをたえず発現している (Christakos *et al.*, 1989; 尾形ら, 1993)。これとは逆にVDRを持つ多くの細胞がCaBP-D28Kをまったく発現していない。また、CaBP-D28Kの発現は他のエストロゲンや、グルココルチコイドといったステロイドホルモンによっても影響を受ける (Hall *et al.*, 1987; Corradino and Fullmer, 1991; Nys *et al.*, 1992)。このようにCaBP-D28Kの発現にはVDRが関与する場合と、関与しない場合があり、CaBP-D28Kは組織選択的に起こる転写調節機構を研究

したり、いくつかのステロイドホルモンによって単一の遺伝子が調節を受ける機構を理解する上で重要な研究材料となりうる。

ニワトリは最初にCaBP-D28Kが発見された動物であり、卵を産み、卵殻の形成にカルシウムを多量に必要とすることから、CaBP-D28Kの初期の研究にはニワトリが多く用いられてきた。卵殻の主成分は炭酸カルシウムであり、一個の卵殻を形成するために約2.0 - 2.5 gのカルシウムが卵殻腺から分泌される (Sturkie and Mueller, 1976)。卵の形成過程は以下のように行われる。卵巣から排卵後、卵は約5 - 6時間をかけて、卵管漏斗部、膨大部、峽部を經由し、卵殻腺内に到達する。このとき、卵管漏斗部で卵黄膜、膨大部で白身、峽部で卵殻膜が形成される。卵殻腺内で約18 - 20時間ほど滞留し、卵殻膜上に炭酸カルシウムが沈着して作られる。卵殻腺からのカルシウム分泌量は排卵された卵が卵殻腺内に入るくらい (排卵後約6 - 7時間) から増加しはじめ、卵殻を形成中には約100 - 150mg / hrに達し、卵殻形成が終了すると基底量に戻るが、カルシウム分泌は排卵2時間ほど前には終了することがわかっている (Eastin and Spaziani, 1978)。卵殻カルシウムの供給源は小腸から吸収される飼料中のカルシウム及び鳥類に特徴的な骨髄骨のカルシウムである。この2つのうちどちらが卵殻カルシウム供給源として重要かは飼料中のカルシウム濃度によって変化する。産卵中のニワトリは休産中のニワトリに比べ約25 %以上の飼料を必要とする (Sturkie and Mueller, 1976)。飼料中のカルシウムが3.56 %以上含まれている場合、卵殻カルシウムの大部分は小腸を通じて飼料から供給される (Hurwitz and Bar, 1969)。血中のカルシウムは卵殻腺細胞内に取り込まれ、卵殻腺腔内に分泌される。事実、血中カルシウム濃度は卵殻形成中に減少する (Etches, 1996)。卵殻腺でもCaBP-D28Kがかなり高い濃度で発現している (Corradino *et al.*, 1968)。免疫組織学的研究の結果から、卵殻腺のCaBP-D28Kは粘膜上皮細胞

の表面ではなく、管状腺細胞の細胞質にのみ発現している (Christakos *et al.*, 1989)。このことからCaBP-D28Kはカルシウム分泌に関係していると考えられている。しかし、CaBP-D28Kの生理学的役割や細胞内におけるカルシウム輸送の詳しい機構は今だにはっきりしておらず、カルシウム分泌におけるCaBP-D28Kの役割は定かではない (Etches, 1996)。

これまでの報告では、卵殻腺でのCaBP-D28K発現調節は小腸とは異なりビタミンD依存性ではないことや (Bar *et al.*, 1984)、ヒヨコにエストラジオールを投与するとCaBP-D28K遺伝子発現が増加することが報告されている (Nys *et al.*, 1992b)。しかし、ヒヨコの卵殻腺にもVDRが存在していることから (Coty, 1980)、卵殻腺のCaBP-D28K遺伝子発現調節における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の関わりや、調節機構そのものは現在も十分明らかにはなっていない。また産卵鶏の骨髄骨へのカルシウム貯蔵やエサのカルシウム消費については比較的よく論じられてきてはいるものの、卵殻腺内のカルシウム吸収及び分泌の機構についてはほとんどわかっていない。このことから、卵殻腺内のカルシウム分泌機構を理解する一助として、排卵周期や卵殻質に関連したCaBP-D28K mRNA発現量に焦点を当て、以下のことについて検討した。

(1) カルシウム分泌とCaBP-D28Kとの関係を知るために、排卵周期中の卵殻形成に関連して、小腸と卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量とタンパク質量がどのように変化するか、また卵殻腺のCaBP-D28K遺伝子の発現に対して1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が小腸と同様な促進作用を持っているかどうかを明らかにする一助として、VDR mRNA量がどのように変化するかをCaBP-D28K mRNAと同時に明らかにした。また、排卵された卵が卵殻腺に運ばれるまでは卵殻腺の筋肉運動やカルシウム分泌はほとんど起こっていないが、卵が卵殻腺に到達すると卵殻腺の筋肉運動やカルシウム分泌が上昇する。このように、卵が卵殻腺に存

在するかどうかは卵殻形成に大きな影響を与えることから、卵殻腺内の卵の物理的存在やカルシウム分泌がCaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの発現誘起におよぼす可能性を検証した。また、卵殻形成中には血中カルシウム濃度が減少することから、血中カルシウム濃度を調節する働きのあるPTHが卵殻腺に作用するかどうかを検討するために、卵殻腺粘膜におけるPTHレセプターの存在と排卵周期中における変動を検討した。

(2) ステロイドホルモン合成インヒビターであるアミノグルタチミドを産卵鶏に投与し、卵殻形成中のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNAレベルを調べることによってステロイドホルモンの発現調節調節因子としての可能性を検証した。

(3) 低カルシウム飼料 (0.5%カルシウム) を短期間産卵鶏に与えることによって血中カルシウム濃度と卵殻腺からのカルシウム分泌を減少させた時の小腸と卵殻腺CaBP-D28K mRNAレベルを調べることで、血中カルシウム濃度が減少したときのCaBP-D28K遺伝子発現に与える影響を検証した。

## 第2章

### 排卵周期におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量の変動と卵殻腺内の卵がCaBP-D28K mRNA量に与える影響

#### 2・1 序章

ニワトリは食料、特にタンパク質供給の面で重要な産業動物であり、なかでも卵は安価で栄養バランスのとれた完全食品として、食料供給に大きく貢献してきた。卵殻が薄いことによる破卵の問題は養鶏産業上大きな問題になっている。Rolandによるアメリカの調査では卵殻質に起因する破卵による損害額は全米でおよそ500万US\$ /年にも達している (Roland, 1988)。破卵の発生には鶏舎の構造や集卵法式などいろいろな要因が関係しているが、やはり卵殻自体の強度が一番の問題であろう。卵殻の強度をあげるために卵殻腺におけるカルシウム分泌のメカニズムを解明することは、破卵率の低下の方法を考える上で非常に有益であると考えられる。飼料から小腸を通じて卵殻に供給されるカルシウムの骨への貯蔵経路やそれに関係していると思われるPTHや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>についてはよく調べられてはいるものの、小腸や卵殻腺における細胞レベルでのカルシウム輸送についての分子生理学的メカニズムはほとんどわかっていない。ニワトリ卵殻腺ではCaBP-D28Kは管状腺の分泌細胞内に存在が確認されていることから、CaBP-D28Kは血中から卵殻腺分泌液へのカルシウムの輸送の促進に関係していると考えられている (Corradino *et al.*, 1968)。しかし、緒言でも述べたように卵殻腺からのカルシウム分泌におけるCaBP-D28Kの生理的役割ははっきり示されていない。また、小腸CaBP-D28K遺伝子発現はこれまでの報告から特異的に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって増加調節を受けていることがわかってい

るが (Norman *et al.*, 1982; Corradino and Fullmer, 1991; Nys *et al.*, 1992a)、卵殻腺では1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はCaBP-D28Kの発現調節に関わっていないと考えられてきた (Navickis *et al.*, 1979b; Bar *et al.*, 1984; Nys and de Laage, 1984a, b)。しかし1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の血中濃度が卵殻形成中に高くなることが示されている (Nys *et al.*, 1992)、また1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に特異的に結合するVDRが卵殻腺にも存在している (Coty, 1980)。このことから卵殻腺も1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の標的器官であることは間違いないが、先に述べた報告のようにCaBP-D28Kの遺伝子発現との関わりは明らかではない。排卵周期中に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とともに血中カルシウム濃度を上昇調節することが知られているPTHについては、排卵周期中に変動するという報告 (van de Velde *et al.*, 1984) と、卵殻腺にレセプターが存在することが報告されているが (Thiede *et al.*, 1991)、排卵周期との関わりや卵殻腺における作用については全くわかっていない。

また、卵殻形成には卵殻腺内の卵の存在も非常に重要な要因の一つである。そこで第2章では、特に産卵鶏の卵殻形成に注目して小腸と卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量とVDR mRNA量の変化を調べることによって、卵殻形成における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とCaBP-D28K遺伝子発現調節の関わりを検討した。また、卵殻腺におけるPTHレセプターをレセプターアッセイによって測定した。さらに卵殻腺内の卵はカルシウム分泌に不可欠であることから、卵殻腺内の卵自身の物理的刺激の影響を検討するために、インドメタシンおよびプロスタグランジンを用いて放卵遅延と早期放卵を誘起することによってCaBP-D28K mRNA量とVDR mRNA量の変化を検討した。

## 2・2 材料及び方法

### 2・2・1 供試鶏

実験には単冠白色レグホーンの8-12ヵ月齢の産卵鶏(1.5-1.8 kg)を79羽用いた。産卵鶏は、無窓鶏舎でそれぞれ単ケージで飼育し、市販飼料、水は自由摂取とした。光条件は14時間明期:10時間暗期(14 L:10 D)とした。それぞれのケージに水銀デジタルスイッチのついた時計を取付け、毎日産卵時刻を記録した(Shimada and Asai, 1978)。PTHレセプターの実験には20ヵ月齢の産卵鶏(1.7-2.2 kg)を52羽用いた。

### 2・2・2 組織採取

1クラッチ6個以上を規則正しく連産している産卵鶏を選び実験に用いた。実験1ではクラッチ第2から第3卵の後の排卵に沿った以下の時間帯に屠殺した。

- (1) 予想排卵0時間後(0 hr)
- (2) 予想排卵5時間後(5 hr)
- (3) 予想排卵13時間後(13 hr)
- (4) 予想排卵18時間後(18 hr)
- (5) 予想排卵22時間後(22 hr)

実験2では、産卵鶏を2群に分け、予想排卵時刻の3時間前に1群にはインドメタシン(25 mg/ml オリーブオイル, 和光純薬 K. K.)を胸筋注射した。この投与量は約8時間半は放卵を遅らせることができることがわかっている(Shimada and Asai, 1979)。もう1群はコントロール群として、オリーブオイルを1 mlを同様に投与した。その後下記の時間帯に屠殺した。

- (1) 予想排卵1時間前(-1 hr)

(2) 予想排卵0時間後 (0 hr)

(3) 予想排卵2時間後 (2 hr)

(4) 予想排卵5時間後 (5 hr)

実験3では、産卵鶏を2群に分け、排卵13時間後に1群にはプロスタグランジン ( $4 \mu\text{g PGE}_2 / 0.2 \text{ ml}$  生理食塩水, 小野薬品から提供) を尺側皮静脈に静脈注射した。その後5分以内に放卵を観察した。もう1群は生理食塩水を投与しコントロール群とした。その後下記の時間帯に屠殺した。

(1) 予想排卵12時間後 (12 hr)

(2) 予想排卵13時間後 (13 hr)

(3) 予想排卵15時間後 (15 hr)

(4) 予想排卵18時間後 (18 hr)

それぞれの組織採取は、外頸静脈を切断し放血死させた後、開腹し小腸粘膜層と卵管卵殻腺粘膜層だけを採取した。採取した組織はただちに液体窒素中に入れ凍結させ、RNA抽出に用いるまで $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

実験4では、クラッチ第2から第3卵の後の排卵に沿った以下の時間帯に屠殺した。

(1) 予想排卵0時間後 (0 hr)

(2) 予想排卵2時間後 (2 hr)

(3) 予想排卵5時間後 (5 hr)

(4) 予想排卵13時間後 (13 hr)

(5) 予想排卵18時間後 (18 hr)

(6) 予想排卵22時間後 (22 hr)

(7) 予想放卵直前 (24 hr)

産卵鶏は外頸静脈を切断し放血死させた後、開腹し卵管卵殻腺粘膜層だけを



採取した。採取した組織は氷上に置き、直ちに膜画分を採取した。

### 2・2・3 total RNA抽出、ノーザン、スロットプロット分析

total RNAの抽出はChomczynski & Sacchi (1987) の方法に準じて行った。各組織から抽出されたtotal RNAは分光光度計で濃度を測定し、10 µgもしくは20 µgをそれぞれCaBP-D28KとVDR mRNAの検出に用いた。ノーザンプロットはMolecular cloning (Sambrook *et al.*, 1989) に従って行った。抽出したtotal RNAは0.01 M MOPSを含む1.2%アガロースゲルに入れ、60 Vで電気泳動を行った。電気泳動終了後、ゲル中のtotal RNAはキャピラリープロット法によりメンブレン (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham Inc., UK) に吸着させた。スロットプロットについてもMolecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989) を多少変更し以下のように行った。total RNAはホルムアルデヒドを加え65 °Cで変性させた後、バイオドットSF (BIO-RAD, Japan) のマニホールドにメンブレンを装着した後、total RNAを吸着させた。

CaBP-D28K cDNA (ニワトリCaBP-D28Kのシークエンス179番目から946番までの767 bp, Dr. Barry. S. Komm, Arizona Univ. より提供) と VDR cDNA (ニワトリVDRのシークエンス1番目から592番までの592 bp, Dr. D. P. McDonnel, Ligand Pharmaceuticals Inc. より提供) をCaBP-D28KとVDR mRNAの検出に用いた。各cDNAはランダムプライムラベリングキット (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) を用い、[ $\alpha^{32}$ P]-dCTP (3,000 Ci/mol, ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA) でラベリングした後、 $1 \times 10^6$  cpm/µl の特異的な放射活性濃度に調節しハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーションを行った後、メンブレンを洗浄し、メンブレン

から非特異的に結合しているcDNAを除去した。メンブレンの最終洗浄条件は0.1 × SSC (0.1 % SDS)、60 °C、30分間であった。その後メンブレンはX線フィルム (Kodak X-AR, Japan) に感光させオートラジオグラムを作成し、CaBP-D28K mRNAおよびVDR mRNAの定性を行った。スロットプロットはAMBISラジオアナリティックイメージシステム (AMBIS radioanalytic image system, Inc., San Diego, USA) を用いて各スロットの放射線量を測定した。メンブレンは同様に<sup>32</sup>Pでラベルしたβ-actin cDNA (名古屋大学医学部、妹尾教授より提供) でリハイブリダイゼーションを行い、CaBP-D28K と VDR mRNA量をβ-actinに対する放射活性比で標準化した。

#### 2・2・4 CaBP-D28Kのラジオイムノアッセイ

小腸、卵殻腺、血清中の CaBP-D28Kのラジオイムノアッセイは Tohmonら (1988) の方法に従い行った。CaBP-D28Kの標準品とCaBP-D28Kの抗体は神戸大学の東門先生から提供されたものを使用した。CaBP-D28Kアッセイの検出限界は3.125 ng/mlであった。またCaBP-D28Kのアッセイ内変動係数は7.53%であった。CaBP-D28Kのタンパク質濃度はμg/mg タンパク質で表わした。小腸、卵殻腺のタンパク質量測定はローリー法に従い行った (Lowry *et al.*, 1951)

#### 2・2・5 PTHレセプターアッセイ

採取した卵殻腺粘膜はYasuokaら (1996) の方法に従い膜画分を分離した。採取した卵殻腺から粘膜だけを切りだし、氷冷したTEバッファー (50mM Tris, 2mM EDTA, pH 7.4) を加えホモゲナイズした。その後遠心分離 (800×g, 4°C, 10 min) して、上清を採取した。この上清をさらに30,000×gで遠心分離を行い

沈殿をTEバッファーで懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$ でPTHレセプターアッセイを行うまで保存した。採取した卵殻腺膜画分を用い、Yasuokaら(1996)の方法に従いPTHレセプターアッセイを行った。PTHに対する特異的結合を調べるために競合させたニワトリPTHrP、ニワトリカルシトニン(CT)、ヒトアンギオテンシンII(Ang II)、ラット副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)及びニワトリVIPは Peninsula Laboratories Inc. (Belmont, IL, USA) から、ヒトインシュリン(Ins)はSigma Chemical Co. から購入したものをを用いた。分離した卵殻腺膜画分をIodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril, Pierce Biochemicals, Rockford, IL, USA) によって $^{125}\text{I}$ でラベルしたPTH (Peninsula laboratories, USA) と $4^{\circ}\text{C}$ で2時間インキュベートした (Salacinski *et al.*, 1981)。その後遠心分離を行い、沈殿物の放射活性をガンマカウンターで測定し特異的結合を測定した。Scatchard法により平衡分離定数 ( $K_d$ ) 及び最大結合容量 ( $B_{\text{max}}$ ) を求めた (Scatchard, 1949)。

#### 2・2・6 統計処理

各群のデータは StatView (Abacus Concepts, Inc., USA) を用いて、組織ごとにScheffe's Fテストで有意差検定を行った。

### 2・3 結果

#### 2・3・1 CaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの定性

排卵周期中のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNAのノーザンプロットのオートラジオグラムを図2-1に示した。ノーザンプロットによって、3種類のCaBP-D28K mRNA (2.0, 2.8 と3.1kb) と1種類のVDR mRNA (2.6 kb) の明瞭なバンド

が産卵鶏の小腸と卵殻腺で検出された(図 2-1)。CaBP-D28K mRNAは3種類検出されたが、2.0 kbのバンドが一番放射活性が強かった(図 2-1a)。予想排卵13、18、22時間後の卵殻腺では予想排卵0時間後及び5時間後よりも強いCaBP-D28K mRNAとVDR mRNAのバンドが観察された(図 2-1, レーン1からレーン5)。

### 2・3・2 排卵周期におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量の変動

スロットプロット法により定量した排卵周期中の各ポイントにおけるCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量をグラフにしたものを図 2-2に示した。予想排卵0時間後のサンプリングのときには、排卵された卵は卵管漏斗部もしくは卵管膨大部の上部にあり、ほとんど卵白もついていなかった。予想排卵5時間後では卵は卵管峡部にあり、卵殻膜ができていた。このことから、予想排卵0時間後から5時間後はまだ卵殻形成が始まっていない時期であり、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は非常に低いか、ほとんど検出できないレベルであった。卵が卵殻腺に入って卵殻形成が始まったころから、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量が著しく上昇をはじめ、予想排卵13時間後には有意に増加した。予想排卵18時間後のCaBP-D28K mRNA量は、予想排卵0時間後の約6.5倍、予想排卵5時間後の約120倍と有意に高い値を示した( $p < 0.05$ )。予想排卵22時間後は卵殻形成がほとんど終了しはじめる時であり(Eastin and Spaziani, 1978)、CaBP-D28K mRNA量も減少した。一方、小腸のCaBP-D28K mRNA量は、排卵周期中比較的一定量を保ち、有意な変動はみられなかった(図 2-2)。卵殻腺VDR mRNA量も、CaBP-D28K mRNA量の変動と同じように予想排卵0時間後と5時間後は低い値を示した。卵が卵殻腺に入って卵殻形成が盛んな予想排卵13時間後には有意に

増加し、予想排卵18時間後に最大量に達し、予想排卵22時間後には有意に減少をはじめた ( $p < 0.05$ , 図 2-3)。予想排卵18時間後のVDR mRNA量は予想排卵5時間後の値よりも約8倍高い値を示した。小腸VDR mRNA量も小腸CaBP-D28K mRNA量と同様に排卵周期中、有意な変化はみられなかった。

### 2・3・3 排卵周期におけるCaBP-D28Kの変動

小腸と卵殻腺のCaBP-D28K量をラジオイムノアッセイによって測定し、排卵周期中の変動を図 2-4に示した。卵殻腺CaBP-D28K量は排卵周期中つねに小腸よりも高い値を示したが、小腸も卵殻腺もCaBP-D28K量に有意な変動はみられなかった。

### 2・3・4 放卵遅延、早期放卵がCaBP-D28K及びVDR mRNA量に与える影響

インドメタシン投与により、この実験では少なくとも予定放卵時刻より5時間は放卵がみられなかった。その時の卵殻腺CaBP-D28K mRNAおよびVDR mRNA量の変化を図 2-5に示した。卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は、インドメタシン投与群も、コントロール群も同様に著しく減少した。VDR mRNA量にも放卵遅延による変動はみられなかった。

図 2-6は早期放卵が、卵殻腺CaBP-D28KとVDR mRNA量の与えた影響を示したグラフである。プロスタグランジンを投与すると約5分以内に産卵鶏は放卵した。予想排卵後12時間から18時間は卵殻形成が活発なときであり、コントロール群のCaBP-D28K mRNA量は高い値を保ち続け、有意な変動はみられなかったが、プロスタグランジン投与群では、早期放卵が起こった予想排卵13時間後から有意にCaBP-D28K mRNA量は減少し、放卵5時間後にはほとんど検出

されないレベルにまで減少した ( $p < 0.05$ , 図 2-6)。VDR mRNA量も、CaBP-D28K mRNA量と同様に早期排卵直後から有意に減少した ( $p < 0.05$ )。

### 2・3・5 卵殻腺粘膜におけるPTHレセプターの存在と排卵周期中における結合親和性の変化

卵殻腺粘膜の膜画分を用い、PTHレセプターアッセイを行ったところ、PTHに特異的なレセプターが存在することが確認された(図 2-7)。Scatchardの方法により解離定数 ( $K_d$ )値と最大結合容量 ( $B_{max}$ ) を分析し、排卵周期中のそれぞれの変動を検討した(図 2-8)。卵殻腺PTHレセプター  $K_d$ 値は、卵殻形成の行われていない排卵後0、2および5時間の  $K_d$ 値よりも、卵殻形成中である排卵後13、18および22時間の  $K_d$ 値の方が有意に減少した。また、卵殻形成が終了し、排卵直前(予想排卵24時間後)になると  $K_d$ 値が有意に上昇した。 $B_{max}$ についても同様に卵殻形成中に減少する変化を示した。休産鶏についても  $K_d$ 値、 $B_{max}$ を測定したところ変動はみられなかった。

### 2・4 考察

図 2-1で示された3種類のCaBP-D28K mRNA (2.0, 2.8, 3.1 kb) と1種類のVDR mRNA (2.6 kb) のサイズは、それぞれこれまでの報告と一致しており (Mangelsdorf *et al.*, 1987; McDonnell *et al.*, 1987)、CaBP-D28K mRNAおよびVDR mRNAがそれぞれ検出されていると考えられる。3種類検出されたCaBP-D28K mRNAのうち、2.0 kbのバンドが一番濃く、主たるバンドと考えられている。この3種類のバンドの長さの違いは、異なる3'末端の部位からpoly A鎖ができる結果と考えられている (Hunziker, 1986; King and Norman,

1986)。排卵周期中における卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量は、卵殻形成の行われていない予想排卵0時間から5時間後は非常に低い値を示し、卵殻形成が活発な予想排卵13時間から18時間後には非常に高い値であったが、卵殻形成が終わりに近づいた予想排卵22時間後には有意に減少した。この結果からCaBP-D28K mRNAの発現調節は排卵周期中の特に卵殻形成と密接な関係があることが示唆された。この結果はこれまでの報告と矛盾しない (Striem and Bar, 1991; Bar *et al.*, 1992)。また、この実験で初めて排卵周期中にVDR mRNA量が変動していることが示された (図 2-3)。VDR mRNA量の変動もCaBP-D28K mRNA量と非常に似通った変動を示し、卵殻形成と非常に密接な関係をもっていることが明らかとなった。

これまでの報告によると卵殻腺CaBP-D28Kの遺伝子発現の調節には1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は関わっておらず、性成熟前のヒヨコを用いた実験ではエストロゲンによって増加調節をうけることから、卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現には1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>ではなく、エストロゲン等によって調節されていると考えられてきた (Nys *et al.*, 1989; Nys *et al.*, 1992b; Corradino, 1993; Corradino *et al.*, 1993)。しかし、これらの報告はすべてヒヨコを用いており、卵殻形成をしていないことから卵殻腺内にカルシウム分泌が起こっている訳ではない。このことからヒヨコでは産卵鶏、特に卵殻形成時におけるCaBP-D28K mRNAの調節機構を完全には説明できないと考えられる。産卵鶏を用いた実験ではBarら (1990) が1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>のレセプターアッセイによって、産卵鶏と休産鶏のVDR量に有意な差はみられなかったと報告している。さらにNysら (1992a, b) は小腸および卵殻腺のCaBP-D28K mRNAとタンパク量に対する1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の影響をみるために、産卵鶏に副甲状腺除去手術 (PTX) を行った。PTHは腎臓での1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成を促進させる事がわかっており、PTXを行うと血中PTHが減

少し血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度も減少する (Nys, 1992a)。この実験によって小腸CaBP-D28K mRNA量は減少したが、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量には影響しなかったと報告した。これらのBarら (1990) とNysら (1992a, b) の報告から、PTHおよび1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現には直接関係していないとされてきた。しかし、Barら (1990) は放卵3時間後の卵殻形成の活発でないときのみをサンプリングをしているため、一番VDR量が低い時を観察している可能性がある。また今回の実験の結果からVDR mRNA量が卵殻形成時に高くなるという連動がみられたことから (図2-3)、卵殻腺のVDR mRNA量が増加することによって、卵殻形成中に卵殻腺細胞内のVDR量が増加すると考えられる。VDR量が増加すると卵殻腺の血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に対する親和性が高くなり、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とレセプター複合体量が増加しDNAに結合することによって、CaBP-D28K mRNA転写を促進するというモデルが考えられる。事実、リガンドである1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の血中濃度は排卵周期中に変動し、特に卵殻形成時に増加していることと (Abe *et al.*, 1979; Nys *et al.*, 1986a, 1992)、ビタミンDによるVDR受容体量の増加調節があることが知られている (Costa *et al.*, 1985)。このことから従来報告されてきたのとは異なり、産卵鶏の卵殻形成時にも1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が卵殻腺CaBP-D28Kの遺伝子発現調節に関わっている可能性が考えられる。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>はステロイドホルモンスーパーファミリーの一つであることと、卵殻形成が起こるためには卵が排卵されていることが必要であることから (Nakada *et al.*, 1976; Tanaka, 1976)、排卵周期に関係した何らかのステロイドホルモンも1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と同じように卵殻腺CaBP-D28K mRNAおよびVDR mRNA発現を直接あるいは間接的に調節している可能性も考えられる。

先に述べたように1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の血中濃度は排卵周期中に変動していること



と小腸CaBP-D28K mRNA発現は1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に依存していることから、小腸でのCaBP-D28K mRNA量も排卵周期中に変動する可能性が考えられるが、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量の卵殻形成と関係した変動とは異なり、小腸CaBP-D28K mRNA量は排卵周期中変動は全くみられなかった(図2-2)。これは小腸のVDR mRNA量も排卵周期中変動してないことと(図2-3)産卵鶏は常に高いカルシウム吸収を必要とすることから、すでに小腸での1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によるCaBP-D28K mRNA転写能力が飽和しているため変動しないという可能性が考えられる。しかし、この卵殻腺と小腸の発現の違いから、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の組織ごとのCaBP-D28K遺伝子発現に与える影響を知るためにはさらにVDR mRNA量だけではなく、排卵周期中のVDRリガンド結合量及び親和性の変動を測定することが重要であろう。

また、この実験で初めて卵殻腺粘膜にPTHに特異的なレセプターが存在することと排卵周期中でPTHレセプターの親和性が変化することが示された(図2-7, 2-8)。PTHレセプターの解離定数(K<sub>d</sub>)が卵殻形成中に減少していることは、PTHに対してレセプター親和性が高くなっていることを示している。また、最大結合容量(B<sub>max</sub>)も卵殻形成中に低くなった。血中PTH濃度も排卵周期中に変動し、卵殻形成中に高くなることが報告されている(van de Velde *et al.*, 1984)。このため、B<sub>max</sub>が減少したのはPTHに対するレセプターの親和性が上昇し、*in vivo*でPTHのレセプター結合量が増加したためと考えられる。これらの結果から、PTHは卵殻形成中に卵殻腺粘膜に何らかの作用をしていると考えられる。PTHの卵殻腺に対する作用はこれまでのところまったくわかってはいないが、卵殻形成中に作用していることからカルシウムの卵殻腺への流入に関与しているのかもしれない。PTHとCaBP-D28K mRNA発現との関係も明らかではないが、CaBP-D28K mRNA量もPTHレセプターの親和性も卵殻形成に

関連して上昇するという相関が示されたことは非常に興味深い。先に述べたようにPTXを行っても、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量とタンパク質量には変化はみられないことが報告されているが (Nys *et al.*, 1992b)、血中PTH濃度が減少しても、卵殻腺ではレセプターのPTHに対する親和性が十分に高くなっているため、変化がみられなかったとも考えられる。このことからNysら (1992b) の言うように一概にPTHは卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現に関係しないとは言えないであろう。しかし、PTHのCaBP-D28K mRNA発現における直接的な関係はこれまで報告されておらず、今回はPTHレセプターの親和性とCaBP-D28K mRNA量との相関がみられただけではあるが、卵殻腺におけるPTHとCaBP-D28K mRNA発現との関係はたいへん興味深く、これからさらなる研究が必要と考えられる。

排卵周期内のCaBP-D28K mRNA量の著しい変動にもかかわらず、CaBP-D28Kタンパク質量には有意な変動がみられなかった。排卵周期中のCaBP-D28Kタンパク質量が変動しない報告はすでにあるが、その理由については不明である (Bar *et al.*, 1992)。しかし、これまでCaBP-D28Kは細胞の可溶画分のみ存在すると考えられてきたが、最近CaBP-D28Kが細胞の可溶画分だけでなく不溶画分にもかなりの量のCaBP-D28Kが存在していることが報告された (Hubbard and McHugh, 1995)。今回を含めこれまでの報告でもラジオイムノアッセイによるCaBP-D28K量は細胞の可溶画分しか測定していないため、排卵周期中にCaBP-D28Kが、可溶画分から不溶画分に移行して、可溶画分中のタンパク質量は変動していないという可能性が考えられるが、このことについてはさらなる研究が必要であろう。

インドメタシン投与により少なくとも予想排卵時刻より5時間は排卵を遅らせることができた。しかし、排卵遅延によってより長い時間、卵殻腺に滞留させ

ても卵殻質に影響はみられなかった。この結果から、放卵遅延を起こしても卵殻形成すなわちカルシウム分泌を延ばす影響はないことが示唆された (Tanaka, 1976; Nys, 1987)。図 2-5に示されているように、卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量にもインドメタシン投与群とコントロール群に差はみられず、放卵遅延の影響は全く認められなかった。卵殻形成中のカルシウム分泌は、卵が卵殻腺内にあるにもかかわらず予想放卵時刻の2時間前から3時間前には減少してしまうことがわかっていることから (Eastin, and Spaziani, 1978)、この実験でもインドメタシンにより放卵遅延を起こしてもすでにカルシウム分泌は終わっていると考えられる。したがって放卵遅延後の卵殻腺内の卵自身の存在はCaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの発現に影響しないことがわかった。またプロスタグランジンを投与することによって、卵殻形成の盛んな予想排卵13時間後に放卵させてしまい卵殻腺から卵を除いてしまうと、CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量も急激に減少してしまった (図 2-6)。これは放卵誘起をしたことにより卵がなくなってしまい、卵殻腺内にカルシウムが分泌されなくなってしまったからではないかと考えられる (Nys *et al.*, 1986b; Bar *et al.*, 1992; Nys *et al.*, 1992b)。これまでの報告でも、卵殻形成には排卵が起こっていることと、卵管上部から卵が降りてくるという物理刺激が必要なことがわかっている (Tanaka, 1976)。これにより、卵殻形成中は卵の存在はCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA発現と卵殻腺内のカルシウム分泌の開始と維持をするのに必要と考えられる。インドメタシンによる放卵遅延とプロスタグランジンによる早期放卵の実験結果から、卵殻腺内の卵の存在は卵殻形成が盛んな時のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量とカルシウム分泌を維持するのに必要であるが、卵の存在はこれらの遺伝子発現に直接影響を与えるのではなく、卵殻腺には別にこれらの遺伝子発現とカルシウム分泌が終了する機構があると考えられる。

これらの結果から、小腸CaBP-D28K mRNA量は産卵周期内で変動がみられなかったが、卵殻腺CaBP-D28Kの遺伝子発現機構は卵殻形成に関係した発現調節を受けていると考えられた。卵殻形成には排卵が必要なことから、排卵に関係したステロイドホルモンが卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現に関与していると考えられた。また卵殻腺のVDR mRNA量もCaBP-D28K mRNAと同じように卵殻形成に関連した変動を示したことにより、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>も卵殻腺のCaBP-D28K遺伝子発現に関係している可能性も示唆された。卵殻腺内に卵が存在することによる物理刺激はカルシウム分泌の開始と維持に必要であるが、CaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの発現には直接関係しないと考えられた。

## 2・5 要約

産卵鶏を用い排卵周期における小腸および卵殻腺のCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量をノーザンプロット及びスロットプロット法により定量し、CaBP-D28K量はラジオイムノアッセイによって定量した。また血中カルシウム濃度の調節ホルモンであるPTHの卵殻腺への影響を調べるために、卵殻腺粘膜におけるPTHレセプターの存在と、排卵周期中における卵殻腺PTHレセプターの結合親和性及び最大結合容量の変化を測定した。さらに、卵殻腺内にある卵がCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量に与える影響をみるために、インドメタシンによる放卵遅延とプロスタグランジンによる早期放卵の影響を検証した。排卵周期中の小腸CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量はほとんど一定量を保ち、有意な変動はみられなかった。これに対し、卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA量は卵が卵管漏斗部、膨大部、峡部にあるときは非常に低かったが、卵が卵殻腺に入り卵殻形成が盛んに始まると、CaBP-D28K mRNA量は著しく有

意に増加したことから、CaBP-D28Kは卵殻形成に非常に密接に関係した発現調節を受けていると考えられた。また、卵殻腺VDR mRNA量もCaBP-D28K mRNA量と同様に卵殻形成時に高くなったことから、CaBP-D28K mRNA発現は1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって調節されている可能性が示唆された。卵殻形成には排卵が必要であることから、卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA発現には排卵に関係したステロイドホルモンなどが直接もしくは間接的に関係している可能性が考えられた。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>と共に血中カルシウムの調節に関わっているPTHに対するレセプターの存在を卵殻腺粘膜で調べたところ、PTHに特異的に結合するレセプターが存在することが確認された。排卵周期中におけるPTHレセプターの親和性を検討したところ、卵殻形成中に高くなることが明らかとなったことから、PTHが卵殻形成中に卵殻腺に何らかの作用をしていると考えられ、CaBP-D28K mRNA発現にも何らかの作用を及ぼしているのかもしれない。インドメタシンによる排卵遅延は卵殻質にもCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量に何の影響も与えなかった。一方、卵殻形成の盛んな時期にプロスタグランジンを投与し排卵誘起させることによって卵殻腺内の卵を出して空にしまうと、CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量は著しく減少した。

これらの結果より、卵殻腺のCaBP-D28K mRNA発現は小腸とは異なり卵殻形成や排卵に密接した関係を持っていることが示唆された。また、VDR mRNA量の変動から1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>も卵殻腺CaBP-D28K遺伝子発現に関係している可能性が考えられた。CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNAの遺伝子発現には卵殻腺内の卵が直接影響を与えるのではなく、卵殻形成に伴うカルシウム分泌及び排卵に関係するステロイドホルモンが卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現調節に関係していると考えられた。

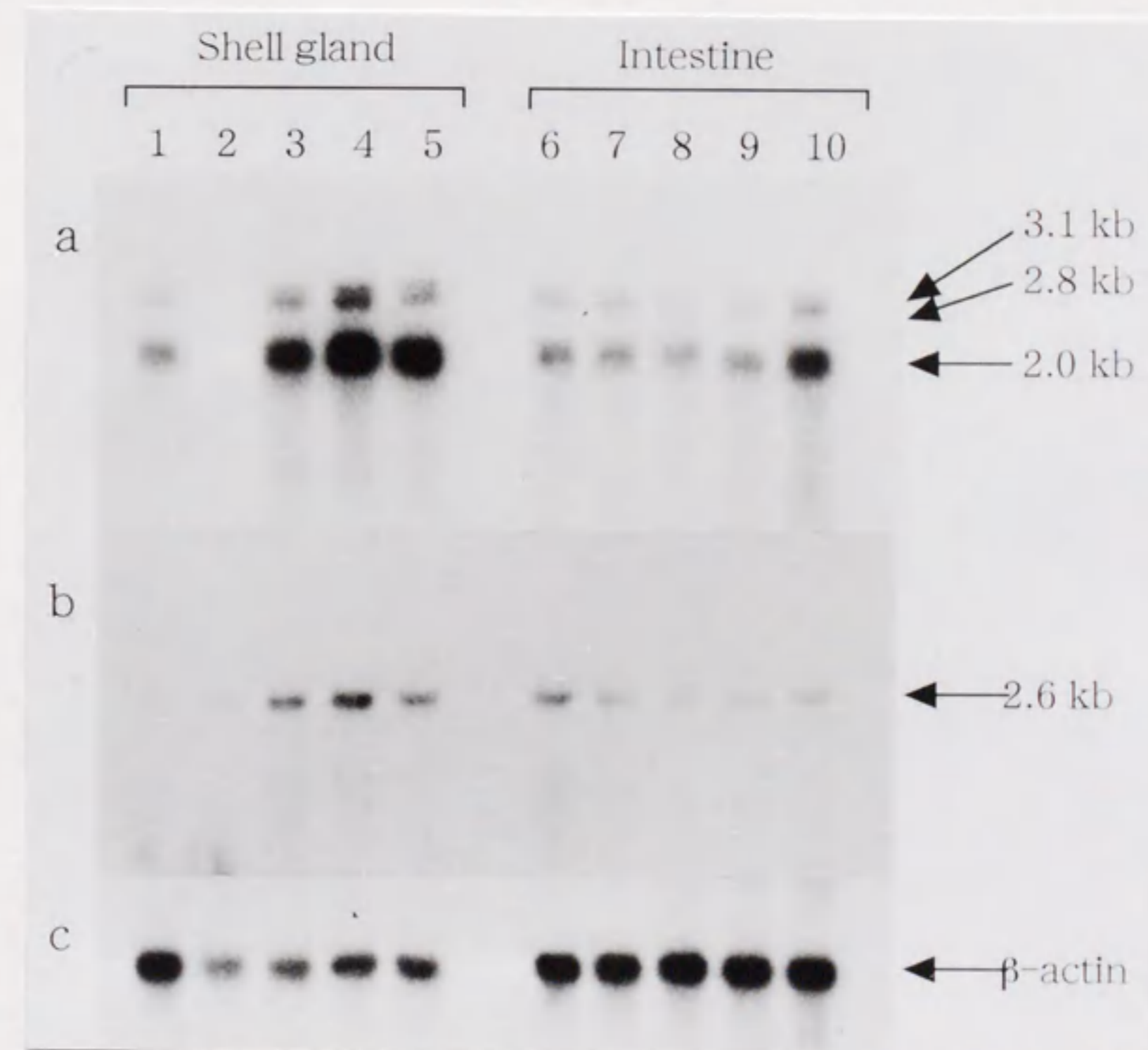


図 2-1；産卵鶏の排卵周期における小腸及び卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNAのノーザンプロットの結果。レーン1-5は卵殻腺、レーン6-10は小腸の排卵0、5、13、18、22時間後をそれぞれ示している。各mRNAのサイズは右に矢印で示した。

パネルa；CaBP-D28K mRNA

パネルb；VDR mRNA

パネルc； $\beta$ -actin mRNA

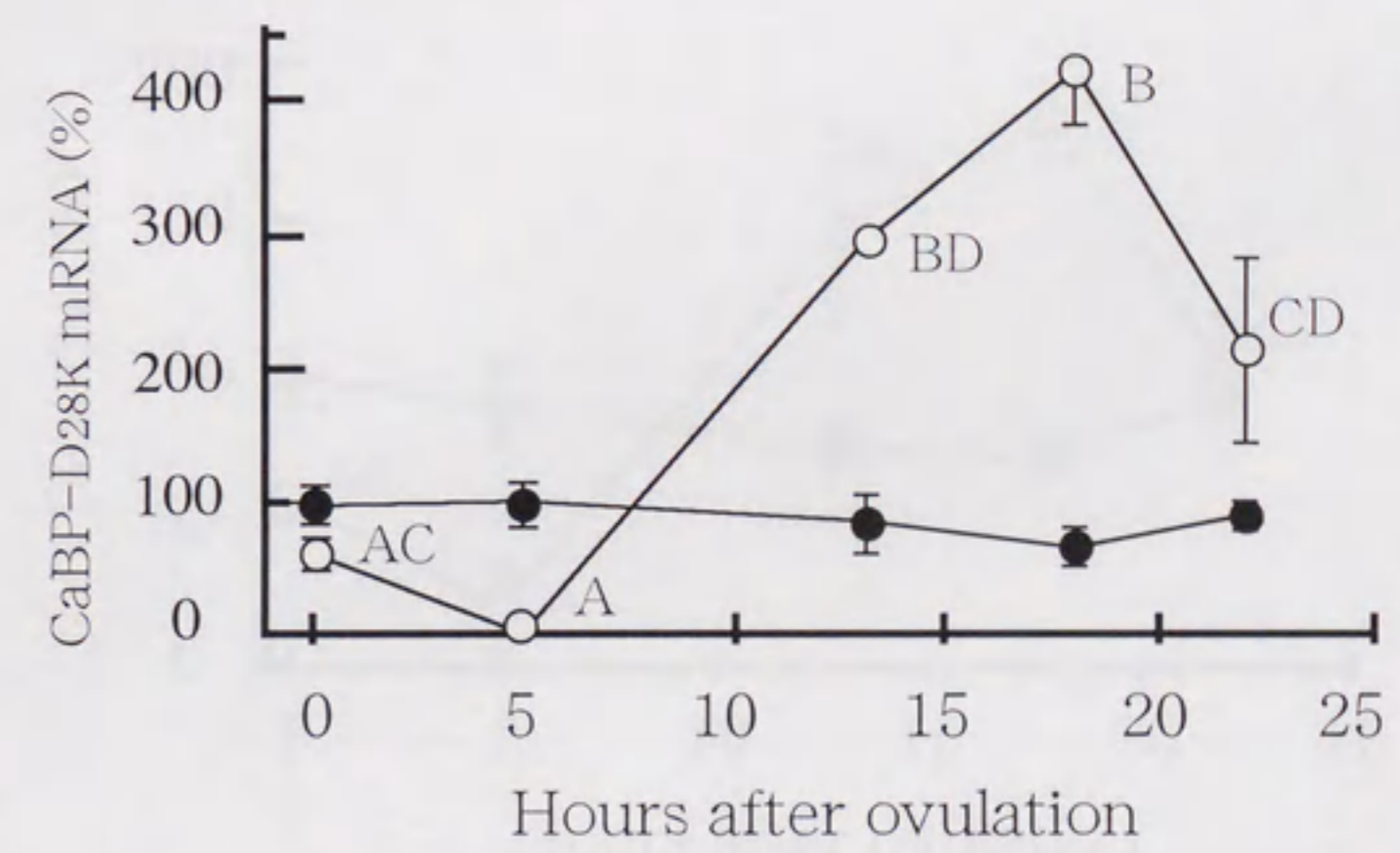


図2-2；産卵鶏の排卵周期における小腸(●)及び卵殻腺(○) CaBP-D28K mRNA量の変化。スロットプロット分析から得られたデータは予想排卵0時間の小腸CaBP-D28K mRNA量を100%とし、平均値±SEMで表わした(n=3-4)。異なる肩文字は有意差があることを示す(p<0.05)。

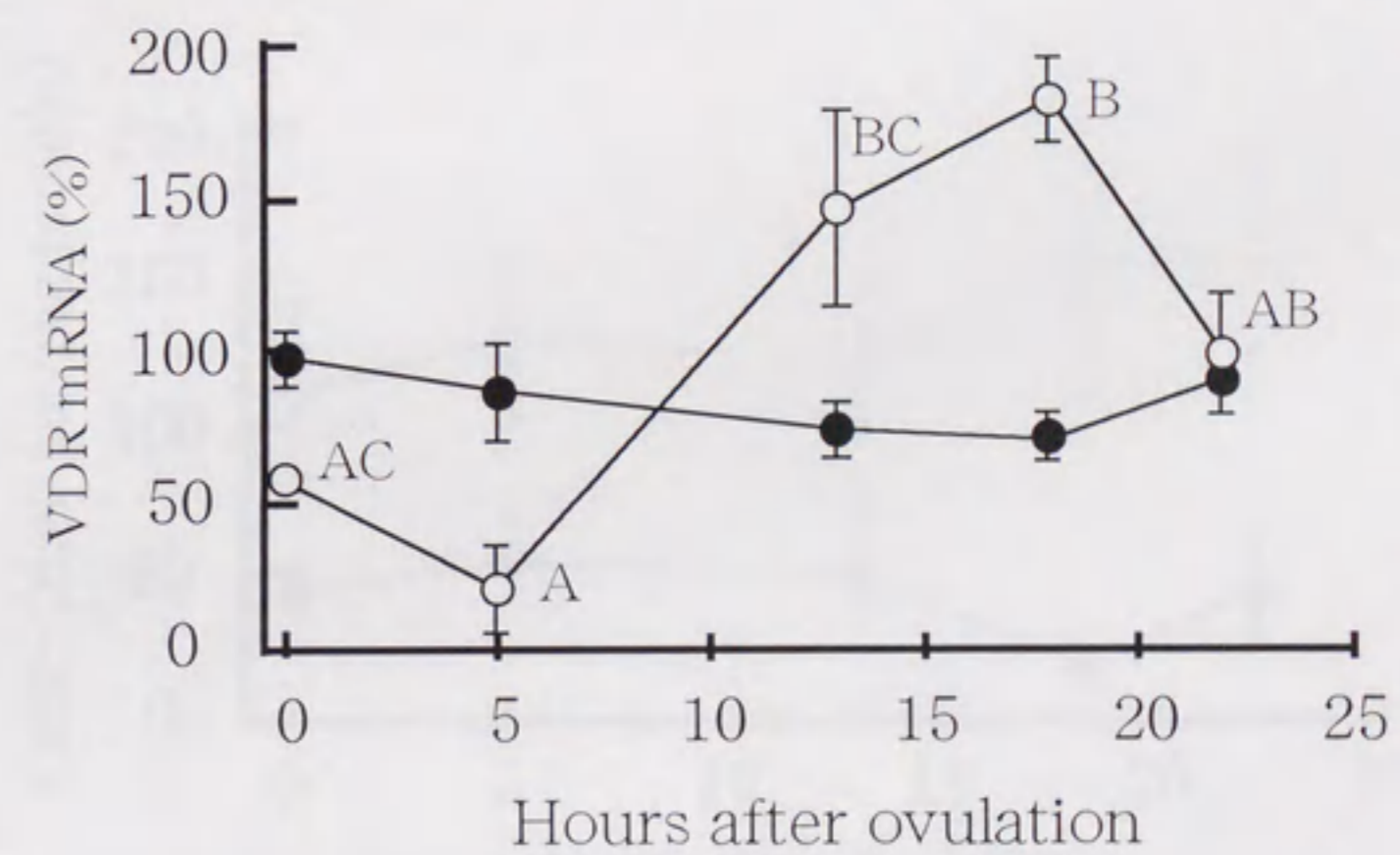
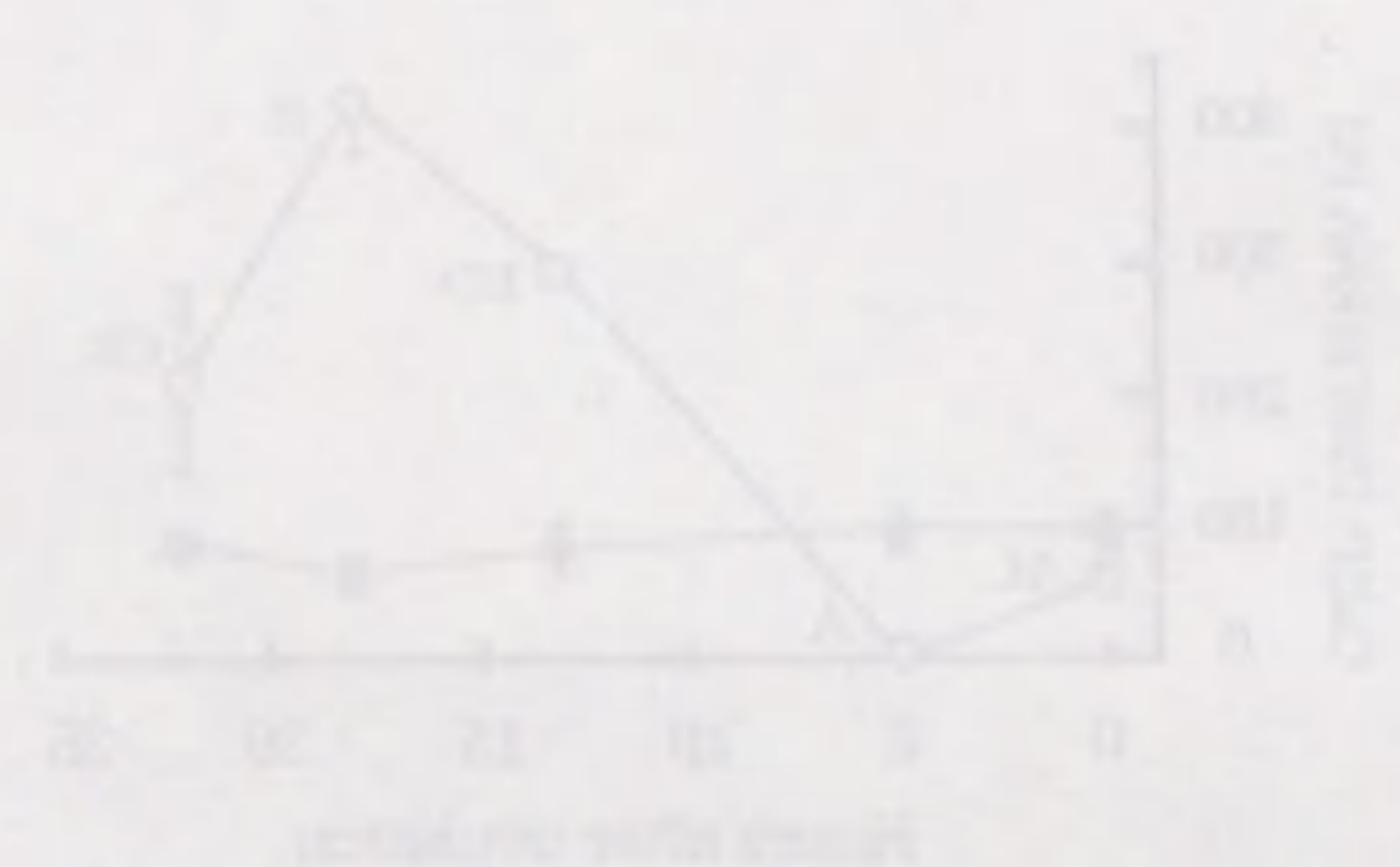


図 2-3 ; 産卵鶏の排卵周期における小腸 (●) 及び卵殻腺 (○) VDR mRNA 量の変化。スロットプロット分析から得られたデータは予想排卵0時間の小腸VDR mRNA量を100%とし、平均値±SEMで表わした (n = 3-4)。異なる肩文字は有意差があることを示す (p<0.05)。



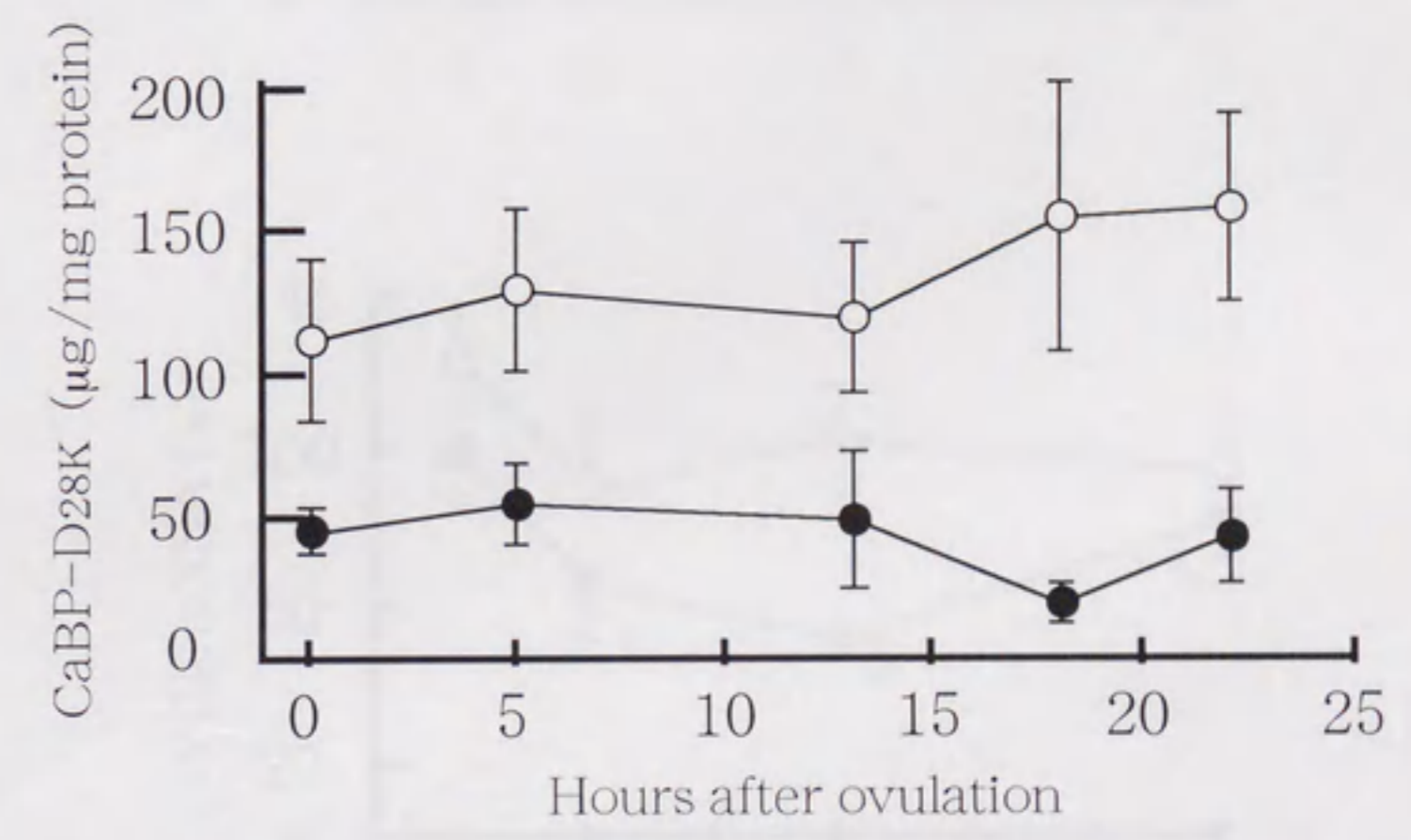


図2-4；産卵鶏の排卵周期における小腸(●)及び卵殻腺(○) CaBP-D28K量の変化。データは平均値±SEM (n=3-4) で表わした ( $p<0.05$ )。

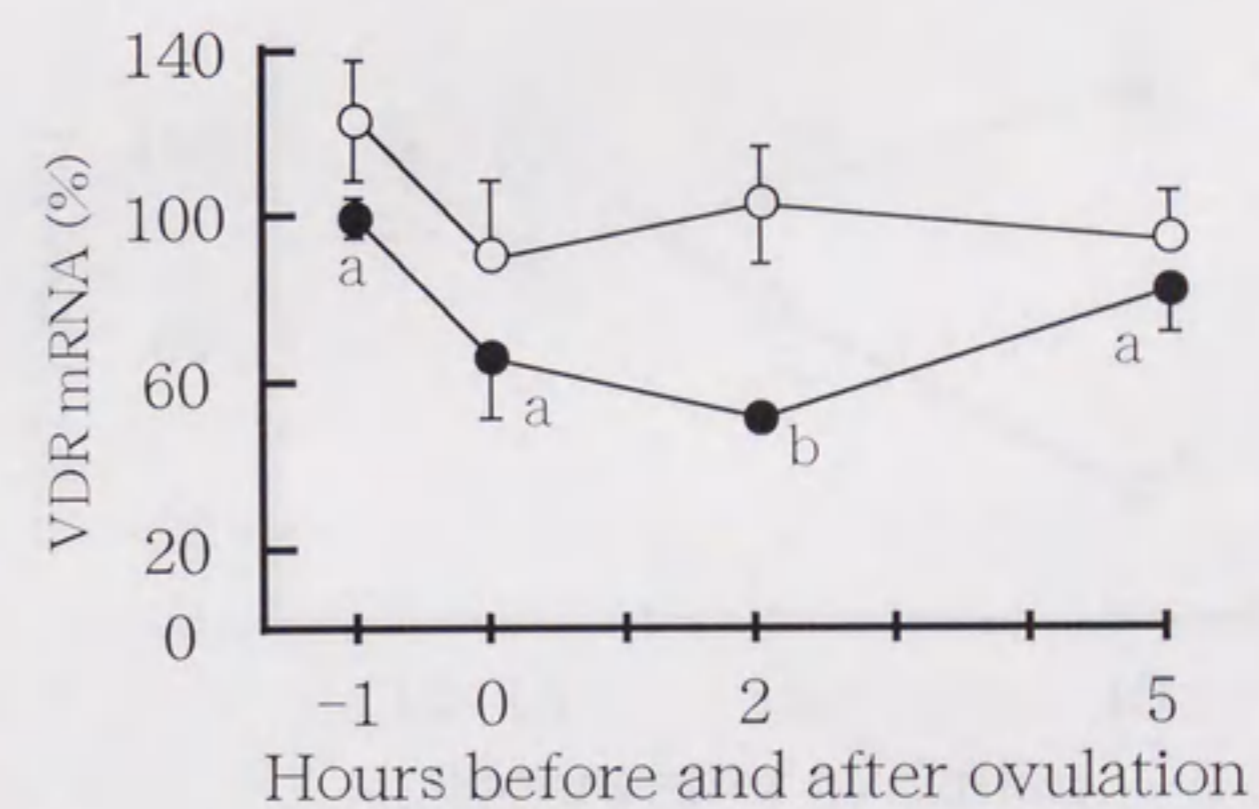
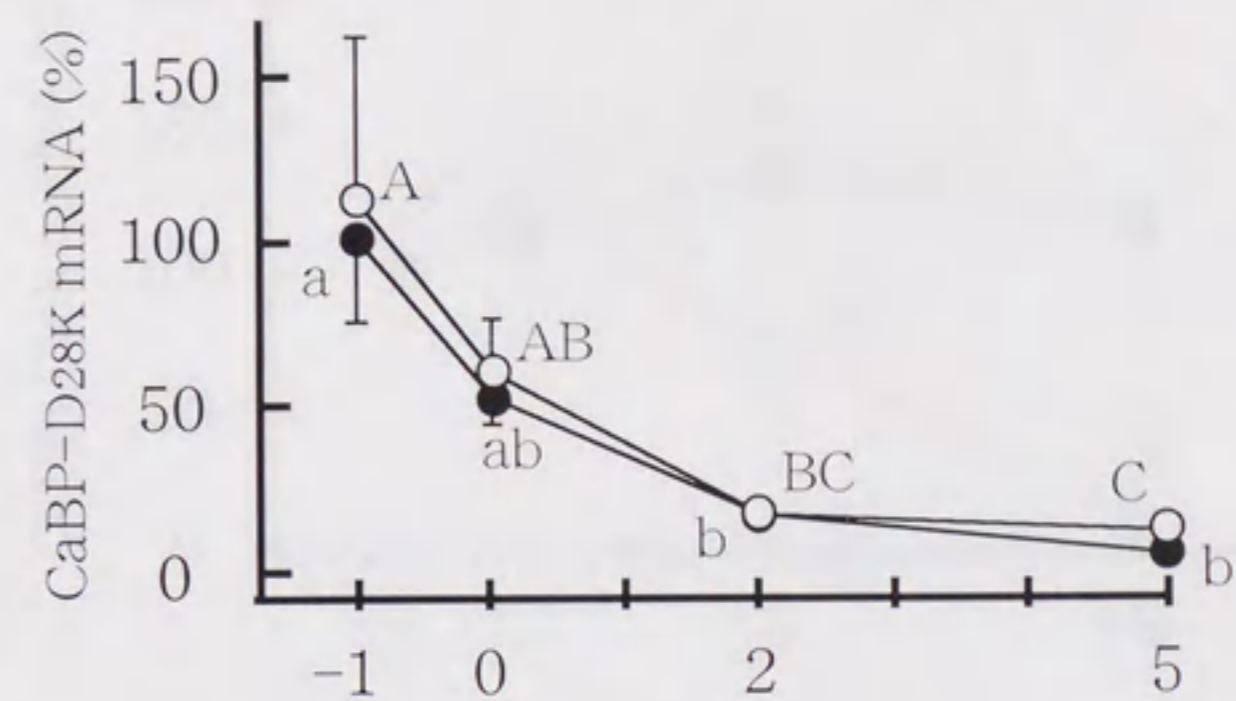
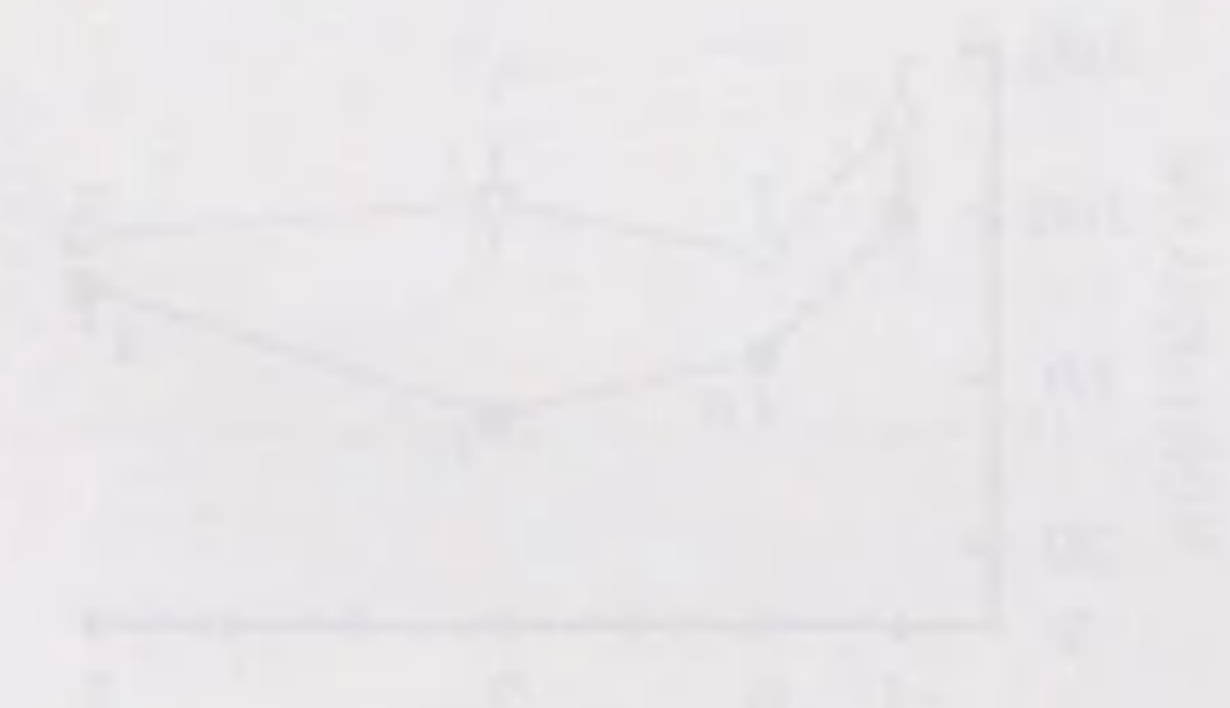


図2-5；インドメタシン投与による放卵遅延が卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量に与える影響。データはコントロール群の予想排卵1時間前(-1時間)の値を100%とし、平均値±SEM (n=3-4) で表わした。異なる肩文字は有意差があることを示す(大文字はインドメタシン投与群、小文字はコントロール群； $p < 0.05$ )。インドメタシン投与群(○)、コントロール群(●)



Faint text below the graphs, possibly a legend or axis label.

Faint text at the bottom of the left page, possibly bleed-through or a separate section.

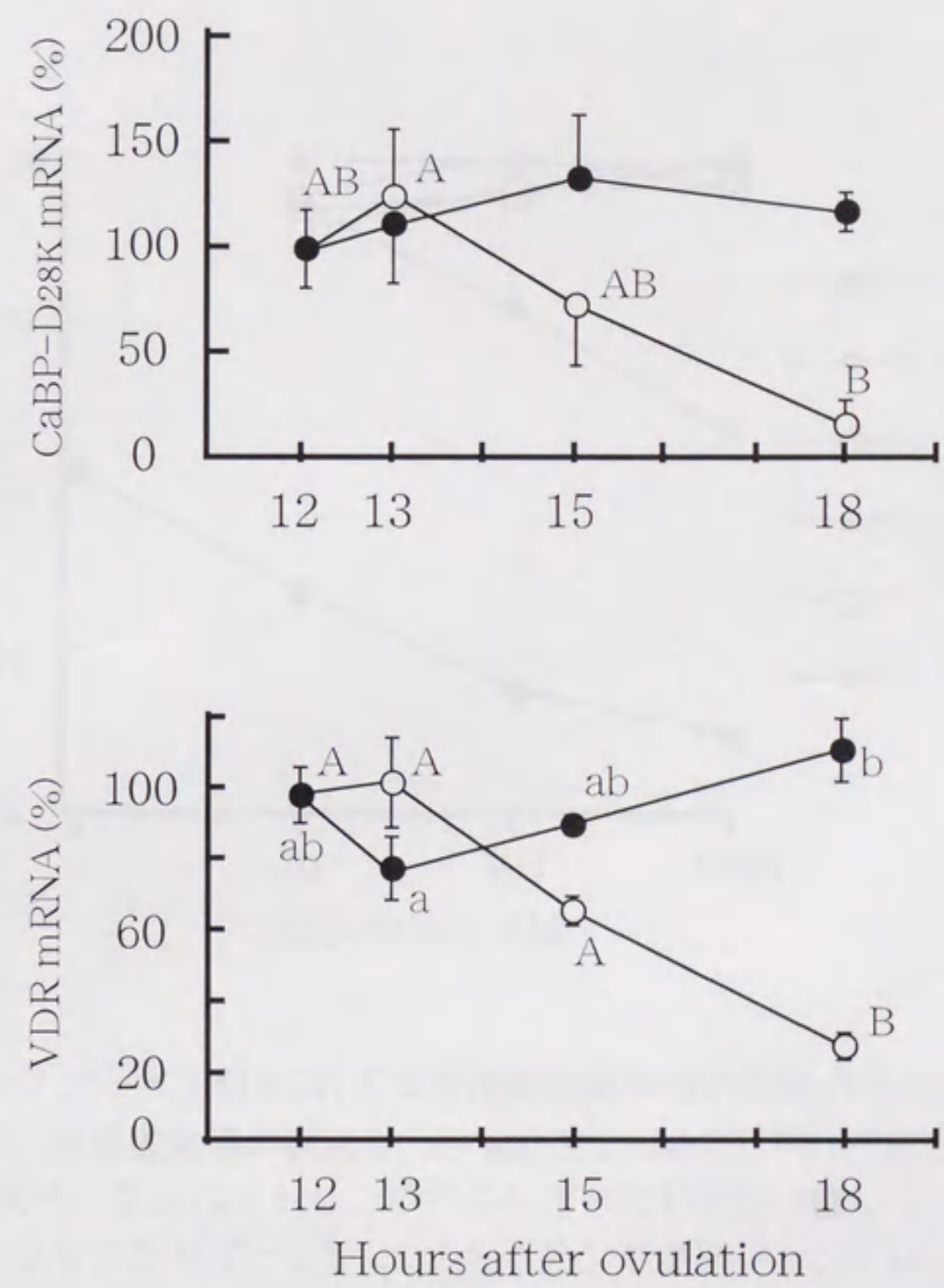


図2-6; プロスタグランジン投与による早期放卵が卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量に与える影響。データは予想排卵12時間後の値を100%とし、平均値±SEM (n = 3-4) で表わした。異なる肩文字は有意差があることを示す (大文字はプロスタグランジン投与群、小文字はコントロール群;  $p < 0.05$ )。プロスタグランジン投与群 (○)、コントロール群 (●)。

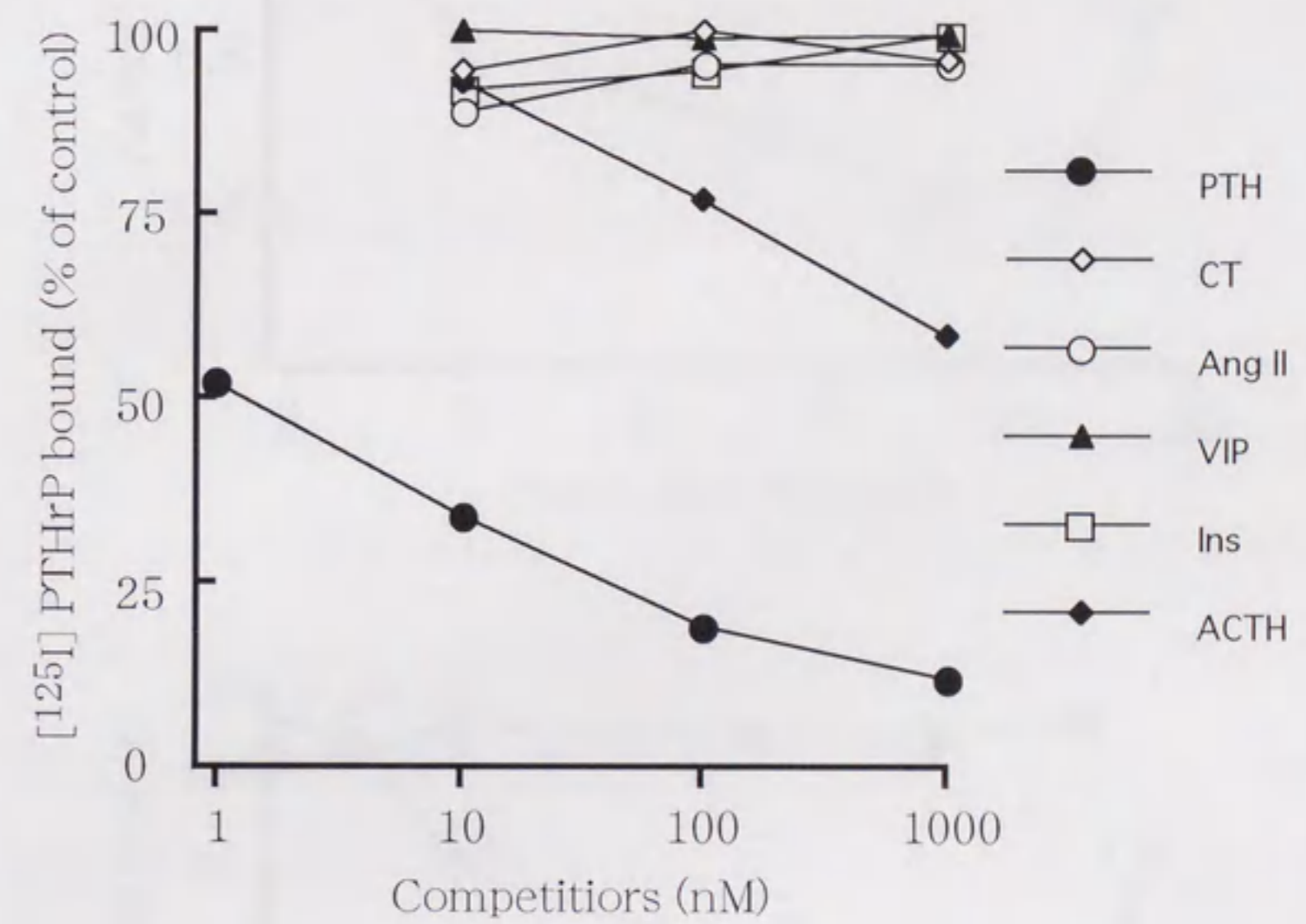
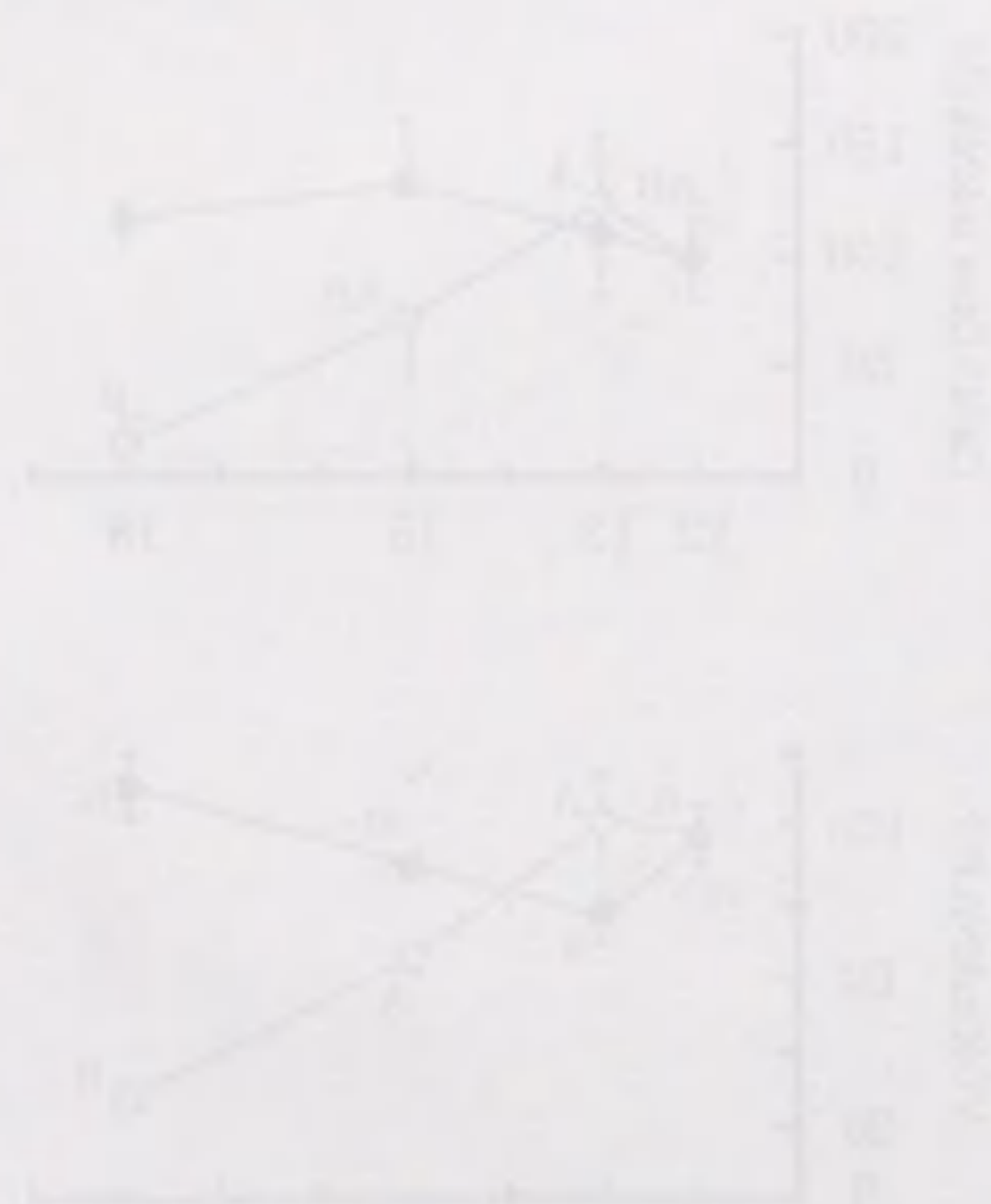


図 2-7 ;  $[^{125}\text{I}]\text{PTH}$ に対する卵殻腺粘膜の特異的結合を示したグラフ。卵殻腺粘膜の膜画分 ( $30\ \mu\text{g}$ ) を  $1\ \text{nM}$  の  $[^{125}\text{I}]\text{PTH}$  と  $4^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートし、ラベルしていない  $\text{PTH}$  (●)、ニワトリカルシトニン ( $\text{CT}$ ; ◇)、ニワトリアンギオテンシンII ( $\text{Ang II}$ ; ○)、ニワトリVIP (▲)、ヒトインシュリン ( $\text{Ins}$ ; □)、副腎皮質刺激ホルモン ( $\text{ACTH}$ ; ◆) と競合させた。コントロールの  $[^{125}\text{I}]\text{PTH}$  結合量は  $38.2\ \text{fmol/mg protein}$  であった。それぞれのポイントは2つのサンプルの平均値を示す。

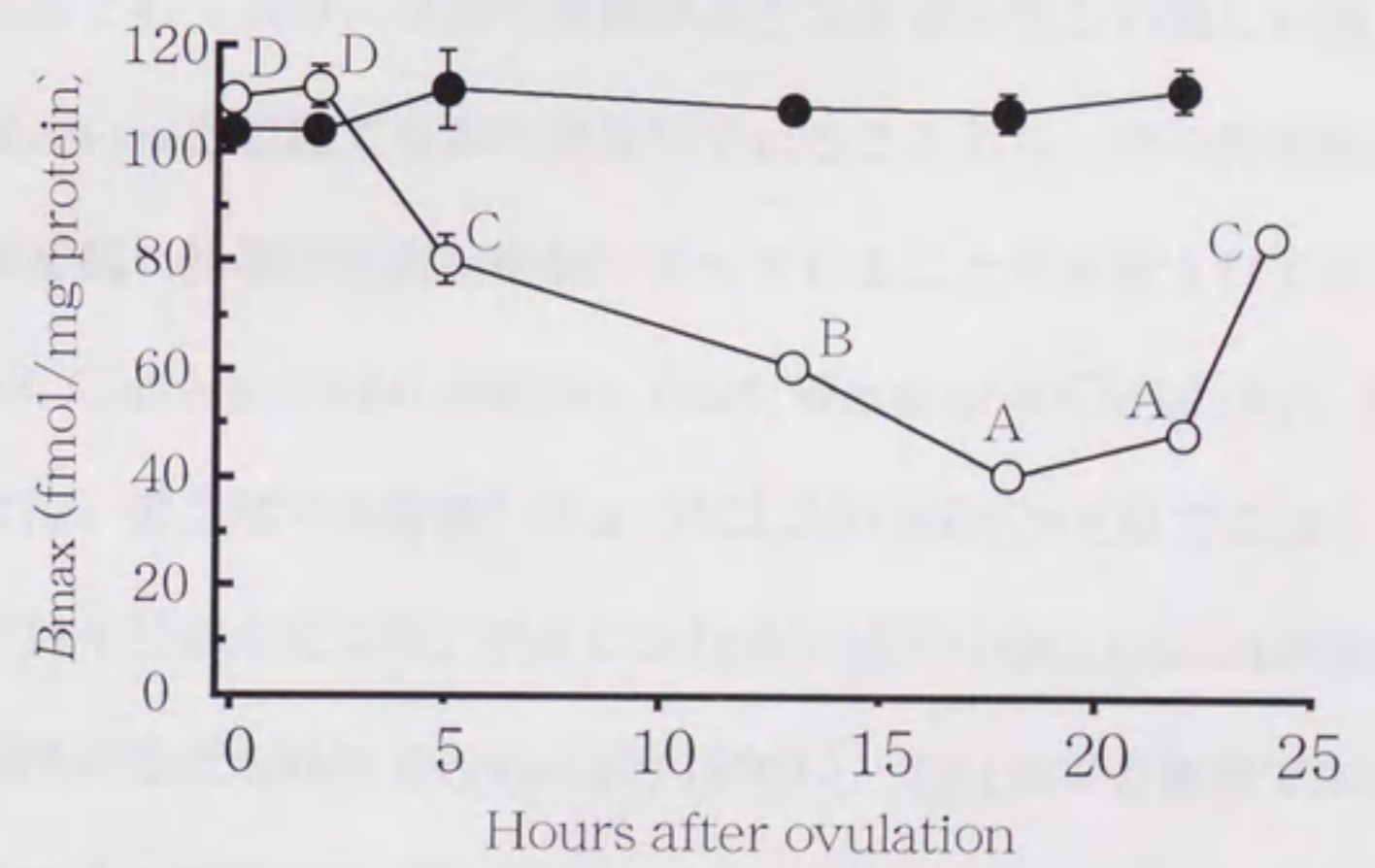
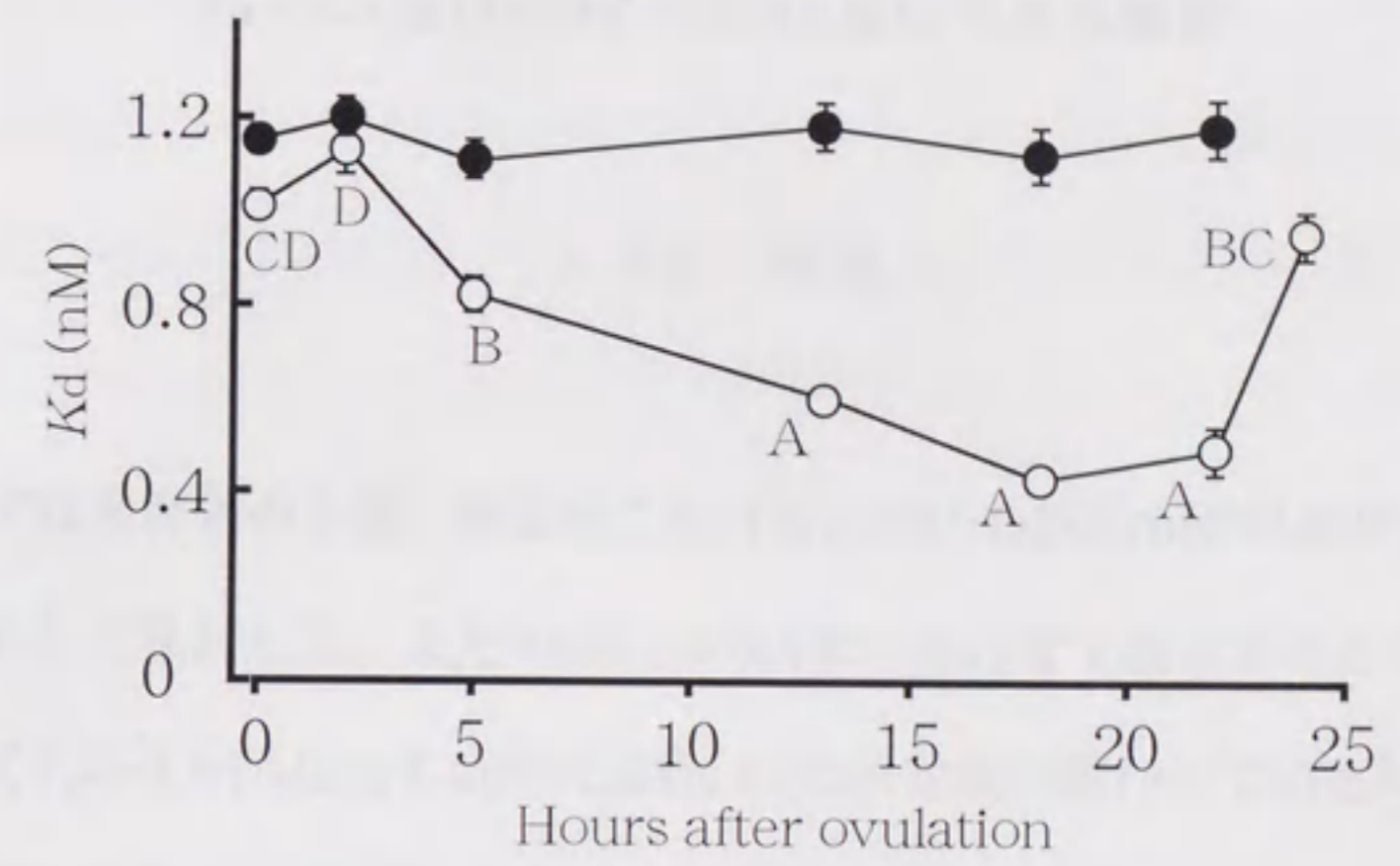


図 2-8 ; 排卵周期における卵殻腺粘膜のPTHレセプターの解離定数 $K_d$ 値と最大結合量 ( $B_{max}$ ) の変化。データは平均値 $\pm$ SEM ( $n=4$ ) で表わした。統計処理はTukey法で行った。異なる肩文字は有意差があることを示す ( $p<0.05$ )。○ ; 産卵鶏、● ; 休産鶏。

### 第3章

#### アミノグルタチミド (aminoglutethimide) が産卵鶏のCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量に与える影響

##### 3・1 序章

第2章では産卵鶏の小腸、卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNAの変動を排卵周期に注目して検討した。またVDR mRNA量もあわせて検討することで、卵殻腺において1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>がCaBP-D28K mRNA発現に関わっている可能性を示した。しかし緒言でも述べたように、CaBP-D28K mRNAは様々な組織における発現が報告されており、小腸や腎臓のようなカルシウムの激しい出入りがない脳や膵臓といった組織でも多く発現していることから、その発現様式はそれぞれの発現組織に特異的な調節機構を持っていることが示唆されてきた (Roth *et al.*, 1982; Corradino and Alaimo, 1994; Wang and Christakos, 1995)。特に卵殻腺では、第2章でも指摘したように1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>だけではなく、排卵に関わるステロイドホルモンや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>がCaBP-D28K mRNA発現を調節している可能性があげられた (Nys *et al.*, 1992b)。これまでの報告でエストロジェンが卵殻形成と卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現に非常に重要な役割を担っていることが示唆されてきた (Nys *et al.*, 1992b; Corradino and Alaimo, 1994)。たとえば、ヒヨコにエストロジェンを投与すると小腸でカルシウム吸収が増加し (Nys and de Laage, 1984b)、卵殻腺のCaBP-D28Kタンパク質とCa<sup>2+</sup>-ATPase 活性が上昇する事が報告されている (Nys *et al.*, 1989; Qin *et al.*, 1993)。産卵鶏では、卵殻形成は卵殻腺に卵が入れば何時でも起こるというものではなく、排卵が起っていることと卵が下りてきて卵管上部を刺激することが

必要であることがわかっている (Nakada *et al.*, 1976; Tanaka, 1976)。また、プロゲステロンは排卵と卵殻形成時間に影響を与える (Etches and Cheng, 1981; Johnson and van Tienhoven, 1984)。こうした報告からステロイドホルモンが卵殻形成に関係していると考えられる。しかし産卵鶏に外因性のエストロジェンを投与してもCaBP-D28K遺伝子発現や卵殻質にも影響はみられなかったことから (Bar, *et al.*, 1996)、特に卵殻形成におけるCaBP-D28K 遺伝子発現とステロイドホルモンの関わりは今だにはっきりしていない。そこで第3章では産卵鶏の小腸及び卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA発現に対するステロイドホルモンの役割を調べるために、ステロイド合成阻害剤であるアミノグルタチミド (aminoglutethimide, AGT) を用いて卵殻形成中の内因性のステロイド合成を阻害し、小腸及び卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量、卵殻質などを検討した。

### 3・2 材料と方法

#### 3・2・1 試薬

AGT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) は投与を行う直前に調整した。AGTは水と懸濁し、溶解するまで少しずつ5 N HClを加えた。溶解した後、5 N NaOHを少しずつ加えpH 3.2から3.5になるように調整した。プロゲステロン (P4) はルテオーゲン (三共臓器、東京)、エストラジオールベンゾエイト (EB) はギナンドール (三共、東京)、デキサメタゾン (Dex、和光純薬、大阪) を購入し用いた。

### 3・2・2 供試鶏及び投与

単冠白色レグホーンの8-10ヵ月齢の産卵鶏(1.5-2.0 kg)を32羽用いた。産卵鶏はそれぞれ無窓鶏舎の単ケージで飼育し、市販飼料、水は自由摂取とした。光条件は14時間明期:10時間暗期(14L:10D)とした。毎日の産卵時刻については第2章と同様にして記録した。産卵鶏のうち、比較的規則正しく4個以上の卵を連産しているものを選び実験に用いた。

産卵鶏を5つの群に分け、各群の投与は以下のように行った。

- (1) コントロール群; 酸性水(pH 3.2-3.51, 1 ml)を静注し、続けてプロピレングリコール(1 ml)を胸筋に投与した。
- (2) AGT群; AGT(130 mg/kg body weight)を静注し、続けてプロピレングリコール(1 ml)を胸筋に投与した。
- (3) AGT+P4群; AGT(130 mg/kg body weight)を静注し、続けてP4(0.4 mg/kg body weight)を胸筋に投与した。
- (4) AGT+EB群; AGT(130 mg/kg body weight)を静注し、続けてEB(1 mg/kg body weight)を胸筋に投与した。
- (5) AGT+Dex群; AGT(130 mg/kg body weight)を静注し、続けてDex(1 mg/kg body weight)を胸筋に投与した。

すべての群の投与はクラッチの2個目もしくは3個目の後の排卵5時間後に行った。投与後4時間(排卵9時間後)にすべての産卵鶏は外頸静脈を切断し放血死させた。AGTはこの投与量では少なくとも投与後4時間は血中ステロイドホルモン濃度を著しく減少させる事がわかっているため、投与4時間後にサンプリングを行った(Johnson and van Tienhoven, 1984)。産卵鶏を放血死させた後、小腸及び卵殻腺の粘膜を採取し、液体窒素で急速凍結して-80℃で保存した。血漿は血液から分離した後カルシウム濃度を測定するまで、-30℃で保存した。



### 3・2・3 total RNA抽出、ノーザンプロット分析

total RNA抽出は第2章と同様に市販のTRIzol Reagent (Gibco BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いておこなった。ノーザンプロットについても第2章と同様に行った。CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量の定量についてはBAS-2000 バイオイメージングアナライザー (Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)を用いて放射線量を測定した。メンブレンは同様に $[^{32}\text{P}]$ でラベルした約400-bpのリボゾームプロテイン S17 cDNA(ribosomal protein S17, Dr. B. Trueb, Eidgenossische Technische Hochschuleより提供)で同時にハイブリダイゼーションを行い、CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量をリボゾームプロテイン S17に対する放射活性比で標準化した。

### 3・2・4 卵殻比率、血中カルシウム濃度測定、統計処理

卵殻のカルシウム沈着量を卵殻比率を測定することで評価した。卵殻比率は卵殻乾燥重量の卵重に対する比率として求めた。血中カルシウム濃度はカルシウムC-テストワコー (和光純薬、大阪)を用いて分光光度計で測定した。

各群のすべてのデータはStatView (Abacus Concepts, Inc., USA)を用いてScheffe's Fテストで有意差検定を行った。

## 3・3 結果

図3-1と図3-2はAGT及びAGT+ステロイドホルモン (P4, EB, Dex)投与が卵殻腺および小腸のCaBP-D28K mRNA発現量に与えた影響をみるために、ノーザンプロットで得られたCaBP-D28K mRNAのバンドの放射活性を定量しグラフにしたものである。卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量はAGT群及びAGT+ステ

ロイドホルモン投与群の全群ともコントロール群よりも有意に減少した。各群の減少量はAGT群のCaBP-D28K mRNA量で56%、AGT+P4群は52%、AGT+EB群は56%、AGT+Dex群は72%であった。AGT群と各AGTとステロイドホルモン同時投与群のあいだに有意な差はみられなかった ( $p<0.05$ , 図3-1)。

小腸CaBP-D28K mRNA量も卵殻腺と同様に、AGT群は70%、AGT+EB群は64%、AGT+Dexは群74%とそれぞれコントロール群よりも有意に減少した ( $p<0.05$ , 図3-2)。AGT+P4群だけは52%減少していたが、コントロール群と有意な差がみられなかった。

卵殻腺のVDR mRNA量についても、CaBP-D28K mRNA量と同様にAGT群とAGTとステロイドホルモン同時投与群はコントロール群よりも25%から42%有意に減少した ( $p<0.05$ , 図3-1)。小腸VDR mRNA量も卵殻腺と同様にAGT群とAGTとステロイドホルモン同時投与群はコントロール群よりも45%から62%有意に減少した ( $p<0.05$ , 図3-2)。

AGT群とAGTとステロイドホルモン同時投与群による卵殻比率の変動を図3-3に示した。卵殻比率はすべての投与群でコントロール群よりも有意に減少した ( $p<0.05$ )。

AGT投与による血中カルシウム濃度の変化を図3-4に示した。各群間に有意な差はみられなかった。

#### 3・4 考察

これまでの報告からAGT (130 mg/kg body weight)を投与すると血中プロジェステロン (0.5 ng/ml)、エストロジェン (0.2 ng/ml)、コルチコステロン(10 ng/ml)濃度は著しく減少して最低でも4時間はその効果が持続し、各ステロイ

ドホルモンの投与量は血中の各ステロイドホルモン濃度を回復するのに十分であることが報告されている (Johnson and van Tienhoven, 1984; Lang *et al.*, 1984a, b)。AGTはコレステロールの側鎖切断酵素の活性を阻害することによって特異的にステロイド合成を阻害する作用を持っている (Uzgiris *et al.*, 1977)。

今回の実験で、卵殻形成中の産卵鶏にAGTを投与することにより卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量が著しく減少した。この結果はAGT投与により内因性のステロイドホルモンが減少したため、CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA転写が阻害されたと考えられる。しかし、卵殻腺のCaBP-D28K mRNA発現にステロイドホルモンが直接影響しているのか、ステロイドホルモンはVDR mRNA発現に影響しており、AGTによってVDR量が減少したことによる間接的な影響なのかはこの実験でははっきりしない。

小腸のCaBP-D28K発現は主に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって調節されていることがわかっているが、この結果からステロイドホルモンも小腸CaBP-D28K mRNA発現に関わっていることが示唆された。Navickisら (1979a) は外因性のエストロジェンをヒヨコに投与すると小腸のカルシウム結合量が増加することを示し、その理由として、エストロジェンは小腸のVDR合成を増加させるのではないかと推測している。またエストロジェンは腎臓での25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-1-ヒドロキシラーゼ活性を増加することが報告されており (Tanaka *et al.*, 1976)、ウズラを用いた実験で1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成は繁殖期に促進されることが示されている (Kenny, 1976)。またエストロジェンだけでは効果はないが、エストロジェンとプロゲステロンを同時にヒヨコに投与することによって小腸CaBP-D28K mRNA量が上昇するという報告もある (Nys *et al.*, 1992a)。今回の結果は、AGT投与によって血中エストロジェン濃度が減少して血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度が減少し、小腸CaBP-D28K mRNA量が減少したと考えられるが、EBの代替

投与により小腸CaBP-D28K mRNAおよびVDR mRNA量を回復させることはできなかった。このことからエストロゲンによる内因性の1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>合成に与える影響だけではなく、他のステロイドホルモンも小腸に直接もしくはVDRを通じて間接的に関係している可能性が考えられた。

AGT投与によって卵殻比率も著しく減少したことは、卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA産生が減少したことによりCaBP-D28K産生量が減少し、その結果カルシウム分泌量が減少したためと考えられる。これまでの報告で排卵が卵殻形成に非常に密接に関係していることから排卵に関係するステロイドホルモンの卵殻形成に対する役割が示唆されてきた (Nakada *et al.*, 1976; Tanaka, 1976)。しかし卵殻形成に対するステロイドホルモンの役割や主要な調節因子は今だに明らかにされてはいない。今回の結果からCaBP-D28K mRNA産生が減少すると卵殻質も著しく低下することから、ステロイドホルモンはCaBP-D28K mRNA産生を通じて卵殻形成に影響していると考えられる。この結果からCaBP-D28Kは卵殻形成に非常に重要であると考えられる。また産卵鶏では血中カルシウム濃度はエストロゲンによって影響を受けることがわかっているが (Bar *et al.*, 1996)、今回のAGT投与によって血中カルシウム濃度には有意な変動はみられなかった。これは卵殻へのカルシウム分泌が減少したことから、体外へのカルシウム排出量が減少したため影響がみられなかったと考えられる。

Barら (1996) は過剰のP<sub>4</sub>投与は卵殻形成時間を延長させ卵殻腺CaBP-D28K mRNA量と卵殻腺のカルシウム輸送率低下を引き起こすが、過剰のエストロゲン投与によって血中カルシウム濃度は上昇するが卵殻腺CaBP-D28K mRNA量と卵殻カルシウムに何の影響も与えないことを報告した。このことから、血中カルシウム濃度がある一定以上に高くなっても卵殻質やCaBP-D28K mRNA量には反映されないことを示した。また彼等の報告では、アンチエストロジェ

ンのタモキシフェン、アンチプロジェステロンのRU38486といったステロイドインヒビターの投与も卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に影響を与えなかったため、小腸及び卵殻腺でのCaBP-D28K mRNA発現とそれぞれのステロイドホルモンとの関わりをはっきり示せなかった。この実験でAGTを用いたことによりステロイドホルモンがCaBP-D28K mRNA発現の維持に関わっていることが明らかとなった。しかし、P4、EB、Dexの単独投与ではAGTの効果を回復できなかったことから、CaBP-D28Kの遺伝子発現は単独ではなく複数のステロイドホルモンによって直接もしくは間接的に調節されている可能性が考えられた。

### 3・5 要約

第3章では、産卵鶏の小腸及び卵殻腺における性ステロイドホルモンとCaBP-D28KとVDR mRNA発現の関係をステロイドホルモンインヒビターであるアミノグルタチミド (aminoglutethimide, AGT) を用いて検討した。AGTを産卵鶏に排卵5時間後に投与し、内因性のステロイドホルモン合成を阻害した。AGT投与4時間後の小腸及び卵殻腺のCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量を検討した。AGT投与により卵殻腺のCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量は有意に減少した。小腸でも卵殻腺と同様にAGT投与によってCaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量が有意に減少した。また、卵殻比率もAGT投与によって有意に減少したが、血中カルシウム濃度は変動しなかった。しかし、AGTと同時にプロジェステロン (P4)、エストラジオールベンゾエイト (EB)、もしくはデキサメタゾン (Dex) をそれぞれ単独で代替投与しても、CaBP-D28K mRNA及びVDR mRNA量は回復しなかった。これらの結果から産卵鶏の小腸及び卵殻腺のCaBP-D28K mRNA、VDR mRNA発現にステロイドホルモンが関係しているこ

Figure 1. Effect of P4, EB, and Dex on CaBP-D28K mRNA levels in the ovary. The figure shows a bar graph with four bars representing different treatment groups. The y-axis is labeled 'CaBP-D28K mRNA level' and the x-axis is labeled 'Treatment'. The bars show a significant decrease in mRNA levels for the P4, EB, and Dex groups compared to the control group.

Figure 2. Effect of P4, EB, and Dex on CaBP-D28K mRNA levels in the small intestine. The figure shows a bar graph with four bars representing different treatment groups. The y-axis is labeled 'CaBP-D28K mRNA level' and the x-axis is labeled 'Treatment'. The bars show a significant decrease in mRNA levels for the P4, EB, and Dex groups compared to the control group.

とが示された。また、卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量が減少すると卵殻質も著しく低下することが示された。しかし、P4、EB、Dexを単独で代替投与してもAGTの効果が回復しなかったことから、小腸および卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現には単独ではなく複数のステロイドホルモンが直接もしくは間接的に影響していると考えられた。



Figure 1. Effect of P4, EB, and Dex on CaBP-D28K mRNA levels in the ovary. Figure 2. Effect of P4, EB, and Dex on CaBP-D28K mRNA levels in the small intestine. The figures show that the levels of CaBP-D28K mRNA are significantly lower in the ovary and small intestine of P4, EB, and Dex treated rats compared to the control group.

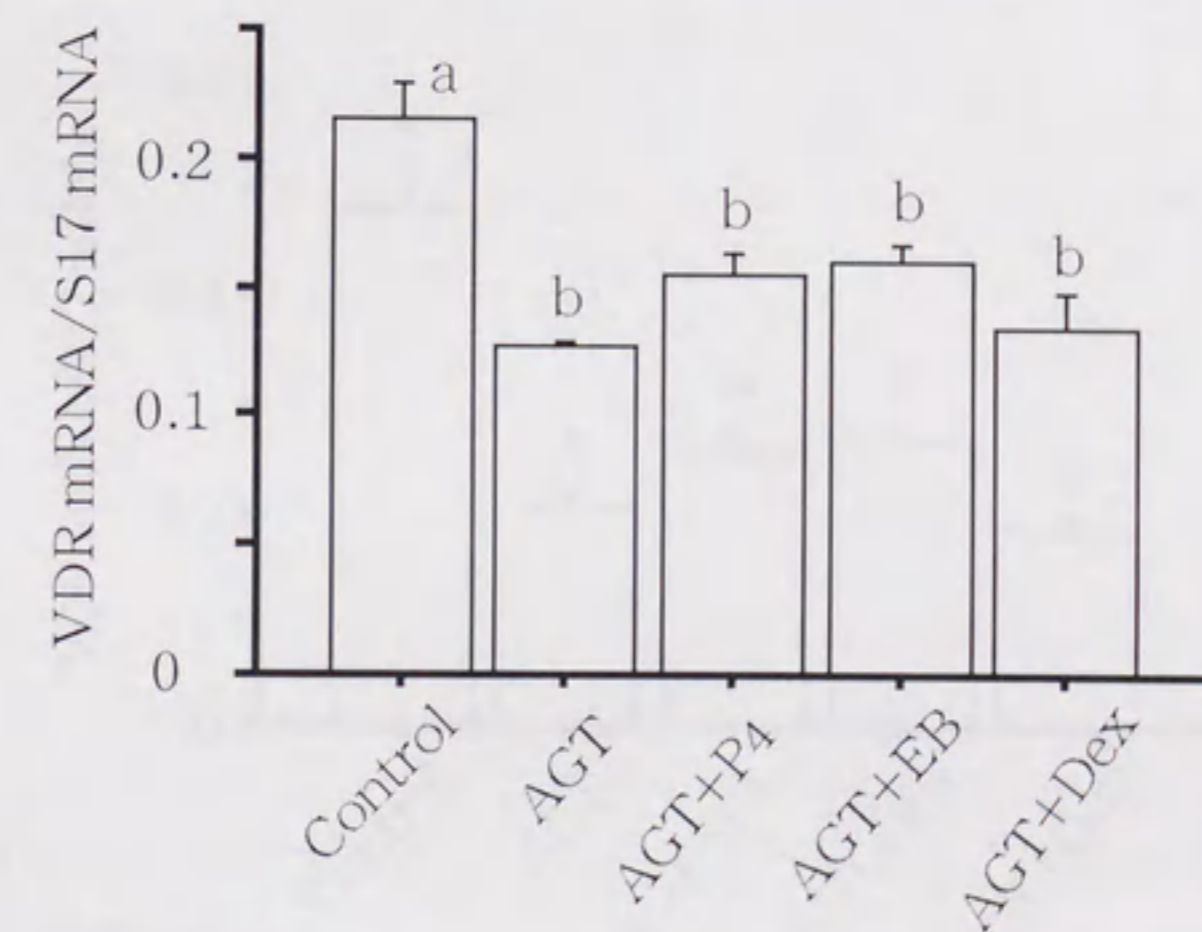
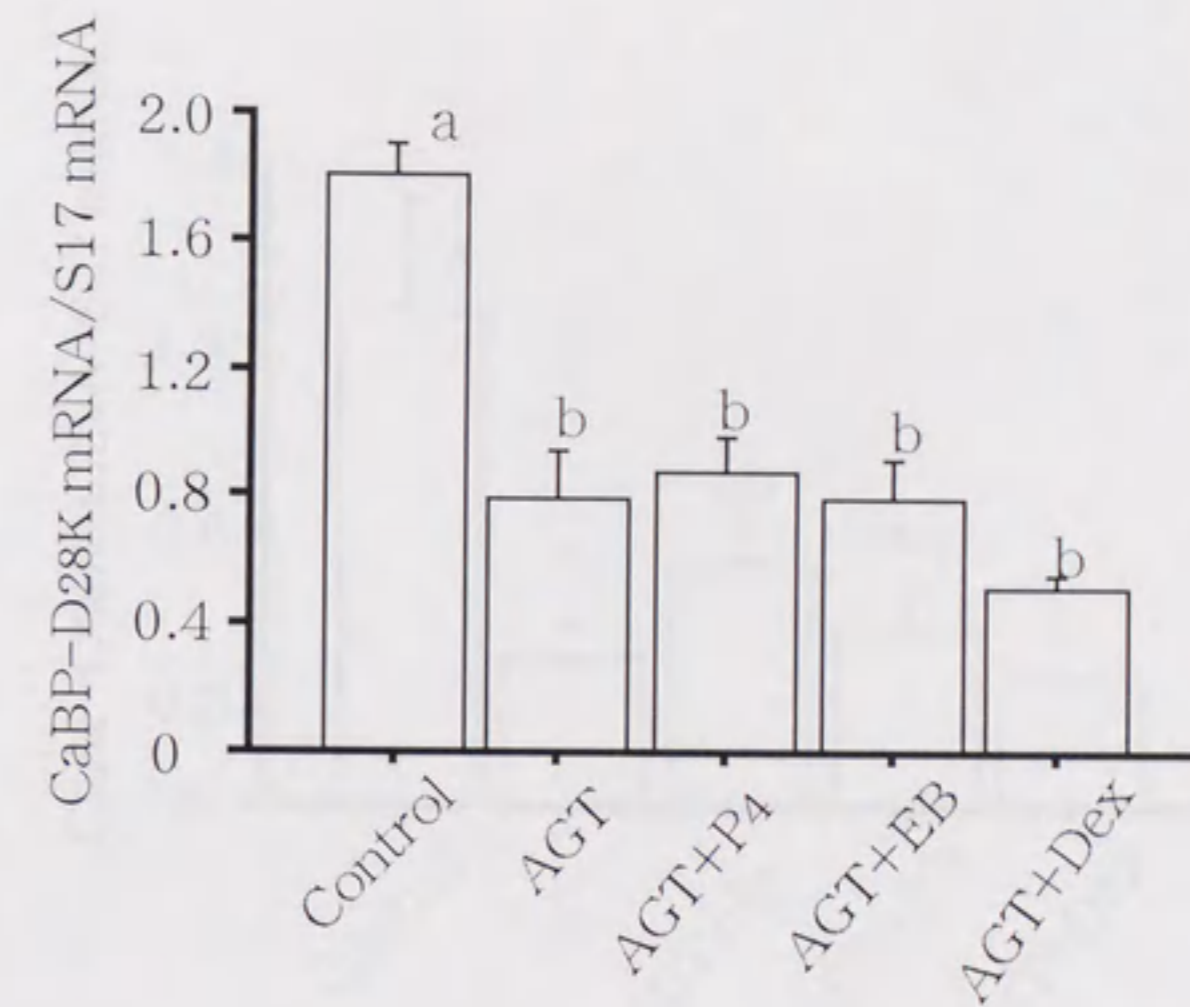


図3-1; アミノグルタチミド (AGT) もしくはAGTとエストラジオールベンゾエイト (EB)、プロジェステロン (P4)、もしくはデキサメタゾン (Dex) を投与したときの卵殻腺CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量の変化。データは平均値±SEMで表わし、異なる肩文字は有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

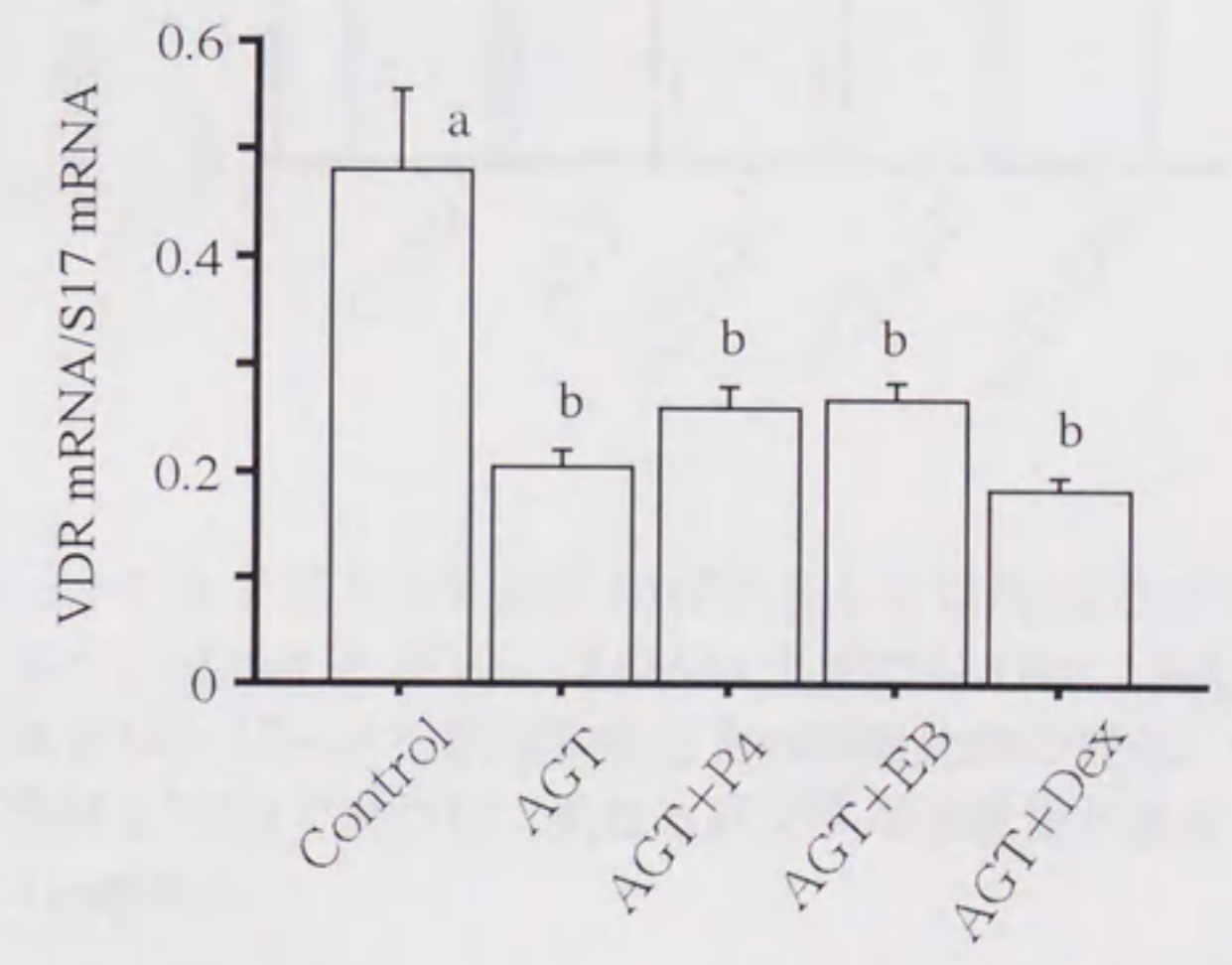
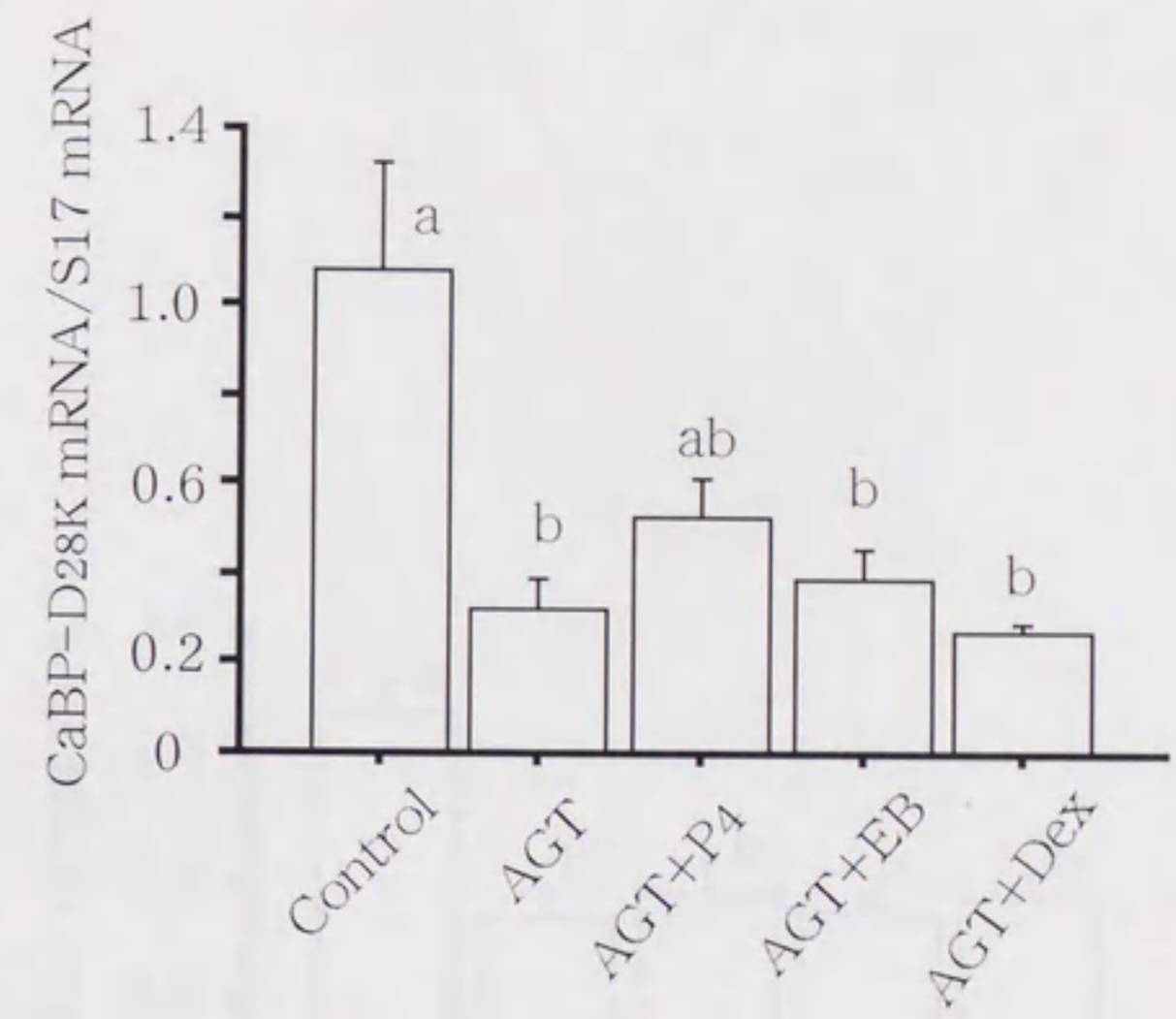
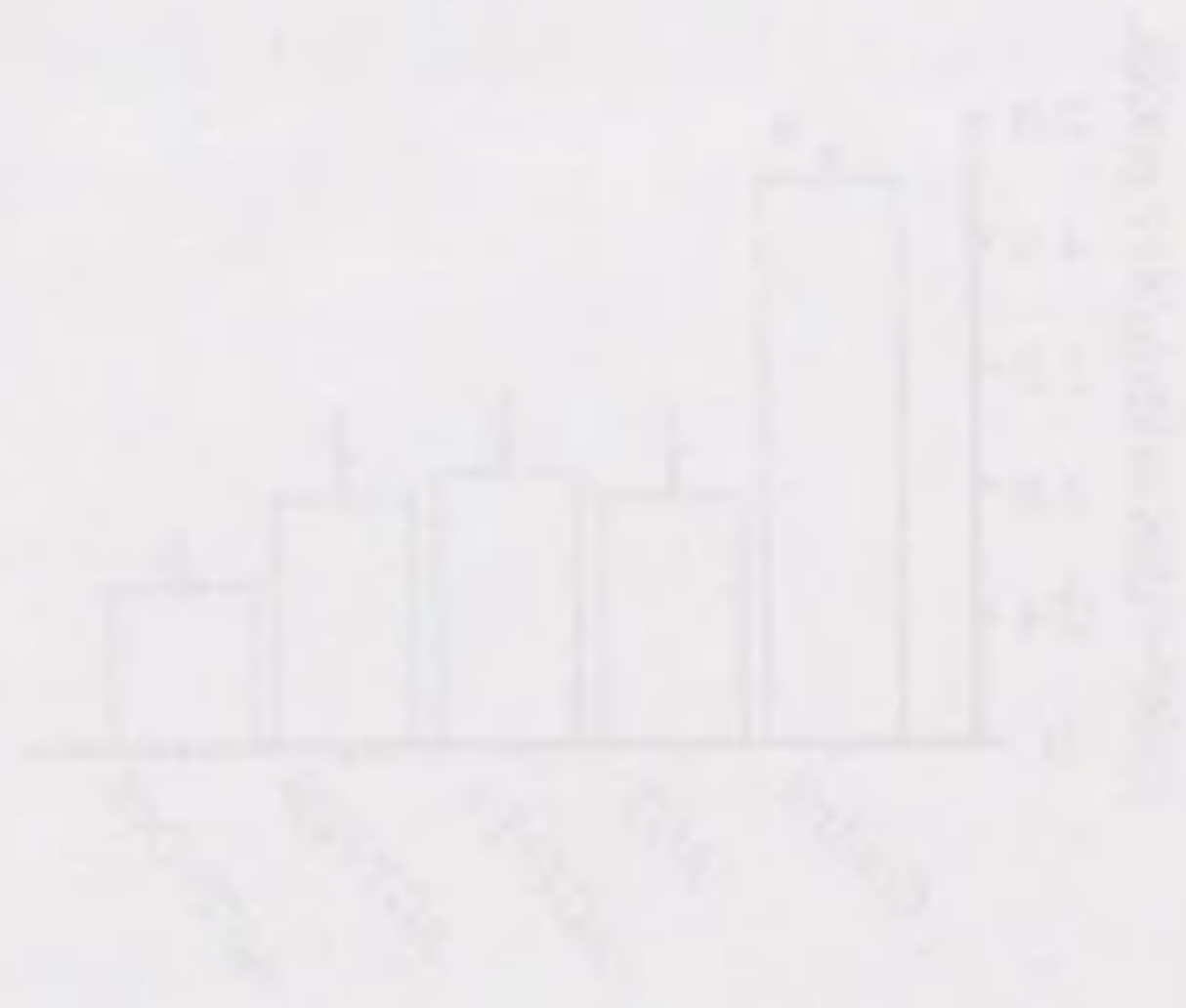


図3-2; アミノグルタチミド (AGT) もしくはAGTとエストラジオールベンゾエイト (EB)、プロジェステロン (P4)、もしくはデキサメタゾン (Dex) を投与したときの小腸CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量の変化。データは平均値±SEMで表わし、異なる肩文字は有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。



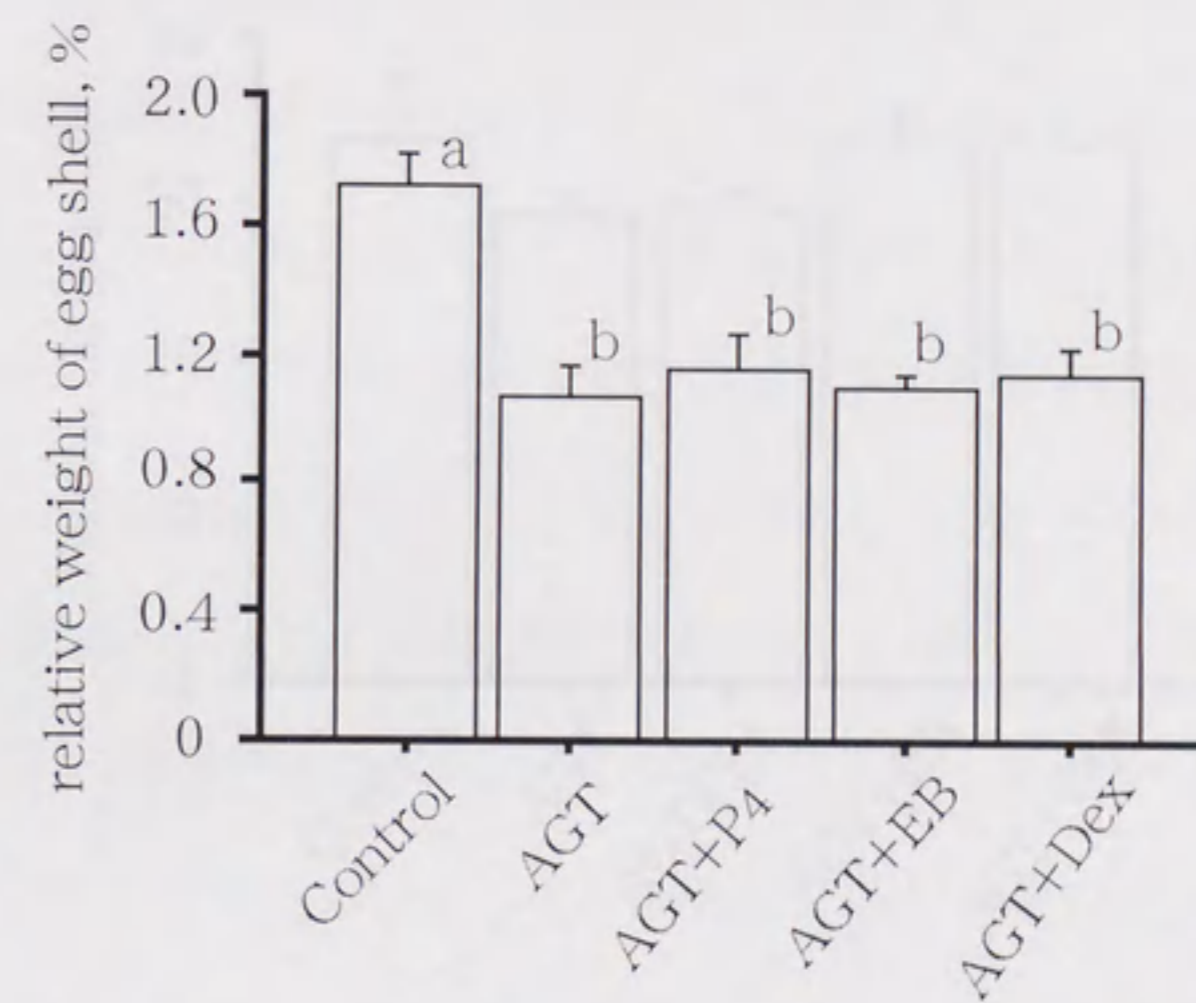
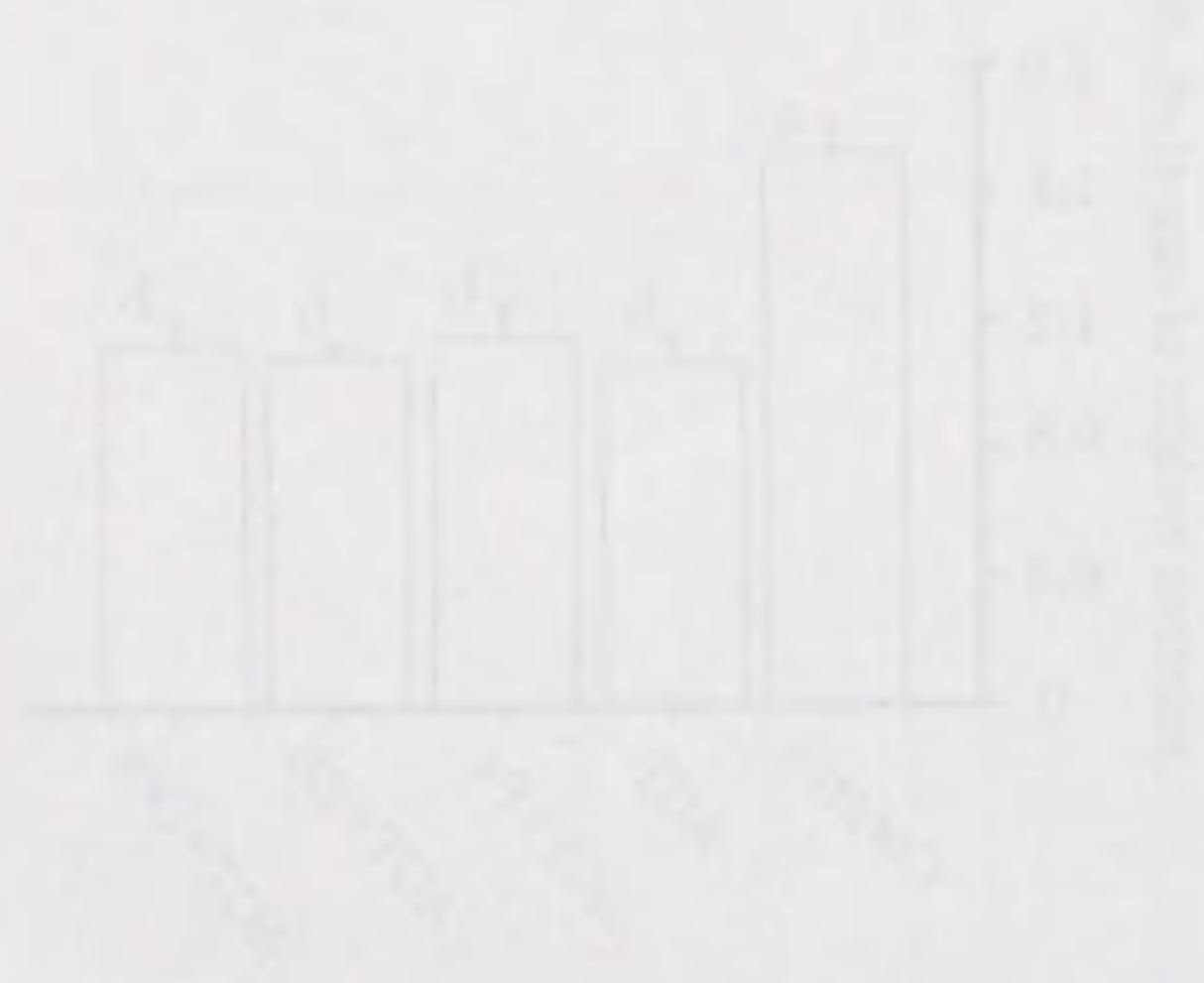


図3-3; アミノグルタチミド (AGT) もしくはAGTとエストラジオールベンゾエイト (EB)、プロジェステロン (P4)、もしくはデキサメタゾン (Dex) を投与したときの卵殻比率の変化。データは平均値±SEMで表わし、異なる肩文字は有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。



Faint, illegible text located below the bar chart on the left page.

Faint, illegible text at the top of the right page, possibly a title or header.

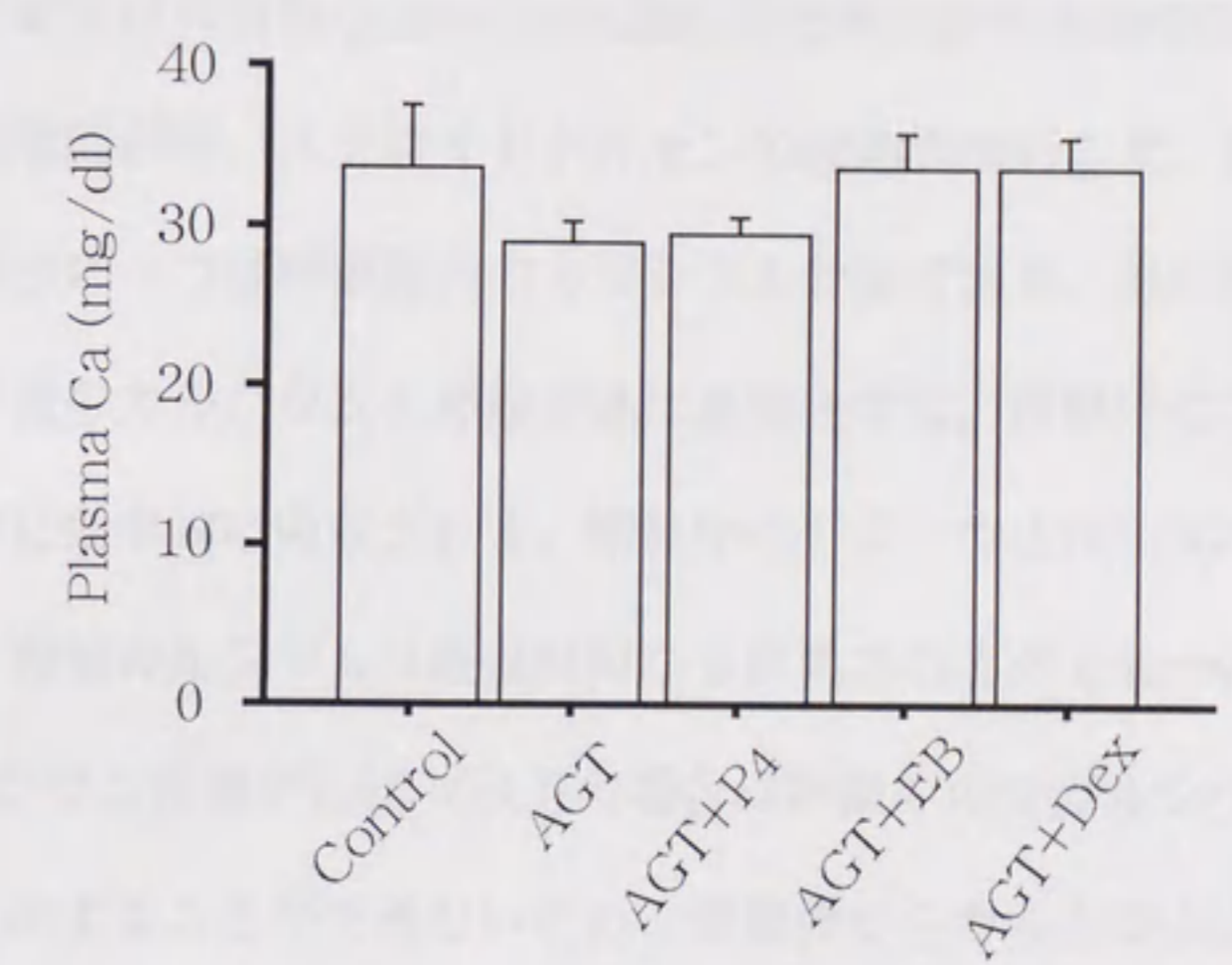


図3-4; アミノグルタチミド (AGT) もしくはAGTとエストラジオールベンゾエイト (EB)、プロジェステロン (P4)、もしくはデキサメタゾン (Dex) を投与したときの血中カルシウム濃度の変化。データは平均値±SEMで表わした。

## 第4章

### 低カルシウム飼料給餌による卵殻質の低下と小腸及び卵殻腺における CaBP-D28K mRNA量に与える影響

#### 4・1 序章

前章までの研究は卵殻腺CaBP-D28K遺伝子発現に対する調節因子として卵殻形成、卵の物理的刺激、ステロイドホルモンの役割を検討した。卵殻形成に関する重要な因子の一つは卵殻腺内のカルシウム分泌である。高い産卵率の産卵鶏は一日に多量のカルシウムを卵殻形成に必要とする。飼料中のカルシウムは小腸から血中に効率的に吸収される。飼料中のカルシウムが3.56%以上含まれている場合、卵殻カルシウムは直接飼料から供給されるが(Hurwitz and Bar, 1969)、カルシウム含量が1.95%以下の場合には卵殻中の全カルシウムをすべて飼料から直接供給することができないため、骨髓骨からカルシウムが供給されることがわかっている(Mueller *et al.*, 1969)。しかし一般的な養鶏管理においては卵殻カルシウムの供給源は一日の時間帯によっても変化しているのが実情である。というのも産卵鶏は夜間はほとんどエサを食べていないので、この間はいわば一時的に飼料からのカルシウム供給が欠乏している状態であるにもかかわらず卵殻形成は主に夜間に行われるからである(Sturkie and Mueller, 1976; Etches, 1996)。卵殻形成のカルシウム分泌を維持するために、卵殻形成の行われていないときのカルシウムは一時的に骨髓骨に蓄えられ夜間の卵殻腺からのカルシウム分泌に供給される。また卵殻形成中に血中カルシウム濃度は全カルシウム濃度、イオン化したカルシウム濃度共に減少することが示されている(Etches, 1996)。

またパラサイロイドホルモン (PTH) や $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による骨髄骨からのカルシウム動員や貯蔵調節はよく知られているが (Norman *et al.*, 1982; Etches, 1996)、カルシウム供給が欠乏したときの小腸及び卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現についての詳細な報告はほとんどない。そこで第4章では、産卵鶏に低カルシウム飼料を短期間与えることによって一時的にカルシウム欠乏にし、血中カルシウム濃度と卵殻腺内のカルシウム分泌量を減少させることによって、卵殻質と小腸及び卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA発現量との関係を見ることを目的とした。

#### 4・2 材料及び方法

##### 4・2・1 供試鶏

単冠白色レグホーンの10-13ヵ月齢の産卵鶏 (1.5-2.0 kg) を72羽用いた。産卵鶏はそれぞれ無窓鶏舎の単ケージで飼育し、光条件は14時間明期:10時間暗期 (14L:10D) とした。水は自由摂取とした。エサは表4-1に示したようなコントロール飼料 (3.5%カルシウム) か低カルシウム飼料 (0.5%カルシウム) を一日約120g与え、食べ残したエサは毎日取り除いた。産卵鶏は以下のように3群に分けた。

- (1) コントロール群 (N = 22) ; 実験期間中コントロール飼料を与えた。
- (2) 低カルシウム群 (N = 25) ; 最初の5日間はコントロール飼料を与え、次の5日間は低カルシウム飼料 (0.5%カルシウム) を与えた。
- (3) カルシウム再給餌群 (N = 25) ; 最初の5日間はコントロール飼料、次の5日間は低カルシウム飼料、さらにカルシウム再給餌として5日間コントロール飼料を与えた。

毎日産卵時刻と産卵記録はマイクロデジタルスイッチのついた時計で記録した。産卵鶏のうち比較的規則正しく4個以上の卵を連産しているものを選び実験に用いた。卵は毎日回収し、卵殻質を評価するために比重と卵殻比率と卵殻厚をそれぞれ測定した。

産卵鶏はコントロール群と低カルシウム群は実験を始めて10日目の排卵8時間後に、カルシウム再給餌群は15日目の排卵8時間後にサンプリングを行った。低カルシウム群のなかには実験期間中に産卵を止めてしまう個体もあったが、それらはCaBP-D28K mRNAを測定する実験には用いなかった。産卵鶏は放血死させた後、小腸及び卵殻腺の粘膜を採取し液体窒素で急速凍結させた後、total RNAを抽出するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。血漿は血液を遠心分離した後、カルシウム濃度を測定するまで、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 4・2・2 total RNA抽出、ノーザンブロット分析

total RNA抽出は第2章と同様にChomczynski and Sacchi (1987) の方法に準じ市販のTRIzol Reagent (Gibco BRL/Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて行った。20  $\mu\text{g}$ のtotal RNAを使用し、第3章と同様にノーザンブロット分析を行った。小腸及び卵殻腺CaBP-D28K mRNA量はリボゾームプロテインS17に対する放射活性比で標準化し定量した。

#### 4・2・3 卵殻比率、血中カルシウム濃度測定、統計処理

卵殻質の評価は比重と卵殻比率と卵殻厚を測定することで行った。血中カルシウム濃度はカルシウムE-テストワコー (和光純薬、大阪) を用いて分光光度計で測定した。

すべてのデータはStatView (Abacus Concepts, Inc., USA) を用いて

Scheffe's Fテストで有意差検定を行った。

#### 4・3 結果

##### 4・3・1 低カルシウム飼料と3.5%カルシウムの再給時が卵殻質及び血中カルシウム濃度に与える影響

低カルシウム飼料を与えはじめた次の日から産卵鶏は卵殻の薄い、壊れやすい卵を産み始めた。低カルシウム飼料を与えている間、いくつかの卵は見た目は普通であったが、中には卵殻の一部が欠けたり、完全に壊れたりする卵(以後破卵という)が出てきた。コントロール群の産卵率は実験期間中86.3%と比較的一定で卵を産み、破卵は一つもみられなかった。

図4-1は実験期間中、5日間ずつ、コントロール飼料、低カルシウム飼料、カルシウム再給飼を行った際の卵殻比率の日毎の変動をグラフにしたものである。卵殻比率は実験開始後6日目(低カルシウム飼料給餌1日目)から減少し始め、4日目にはコントロールに当たる最初の5日間より30%ほど有意に減少した( $p<0.05$ )。実験開始から7日目から10日目の卵殻比率は最初の5日間のどれと比べても有意に減少した( $p<0.05$ )。その後、コントロール飼料を再給飼してから2日目(実験開始12日目)には、卵殻比率は最初の5日間と有意な差がないほどに回復し始め、カルシウムを再給飼して4日目(実験開始後14日目)の卵殻比率は実験開始9日目と10日目の卵殻比率よりも有意に上昇した( $p<0.05$ )。他の比重、卵殻厚といった卵殻質の評価法でも卵殻比率と同様の変化を示した。5日間の低カルシウム飼料によって血中のカルシウム濃度も有意に減少させたが、コントロール飼料を再給飼することによってコントロール群と同じレベルまで有意に回復した(図4-2,  $p<0.05$ )。

#### 4・3・2 低カルシウム飼料と3.5%カルシウムの再給時が小腸及び卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に与える影響

図4-3は低カルシウム飼料を与えた時の小腸のCaBP-D28K mRNA量をグラフにしたものである。低カルシウム群の小腸CaBP-D28K mRNA量はコントロール群よりも2倍有意に増加し、カルシウム再給餌後も有意に高い値を保ち続けた( $p<0.05$ )。

図4-4は卵殻腺でのCaBP-D28K mRNA量をグラフにしたものである。低カルシウム群のCaBP-D28K mRNA量はコントロール群と有意な差はみられなかった。また、カルシウム再給餌群のCaBP-D28K mRNA量もコントロール群と変わらず有意な差はみられなかった。

#### 4・4 考察

この実験では産卵鶏に低カルシウム飼料を与えることによって卵殻質、血中カルシウム濃度が低下したときの小腸および卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA量を検討した。カルシウムを3.5%以上含む飼料を食べている産卵鶏は、卵殻形成で失われた骨髓骨のカルシウムを卵殻形成の行われていない時間に補充することができる。しかし低カルシウム飼料を与えることによって飼料から十分なカルシウムが補充されず、血中のカルシウム濃度を保つために骨髓骨だけではなく大腿骨の皮質骨からもカルシウムが溶出することがわかっている(Taylor and Moore, 1954)。血中のカルシウムはカルシウムホメオスタシスにより産卵鶏では普段は20 mg前後の高いレベルに保たれている。血中カルシウムは量的に骨のカルシウムに対して圧倒的な過飽和の状態にある。したがって、骨の生物学的機能がない限りカルシウムは物理化学的平衡に従い骨に移行

し低カルシウム血症となる。また腎臓でのカルシウム再吸収がないとカルシウムは尿中に失われ、これもまた低カルシウム血症をきたす原因となる。このように血液カルシウムを正常レベルに維持するために腸管におけるカルシウム吸収、骨からのカルシウム放出、および腎臓におけるカルシウム再吸収が常に行われていることがわかっている(尾形ら、1993)。この実験でも5日間の低カルシウム飼料給餌によって小腸からのカルシウム吸収量が減少したと考えられる。しかし上記に述べたような生理的機構により、血中カルシウムと卵殻形成を維持するために骨髓骨と皮質骨からのカルシウム溶出が促進され、カルシウム供給がなされるうちは卵殻強度が十分、不十分にかかわらず産卵を続けるが、やがて骨からのカルシウム放出も不十分になり、危急的なカルシウム欠乏症となると産卵は停止する(Etches, 1996)。図4-1に示したように低カルシウム飼料給餌中に卵殻質が低下したのは血中カルシウムが減少したためと考えられる(図4-2)。これらの結果から5日間の低カルシウム飼料給餌によって血中カルシウムと卵殻質を有意に減少させることが示され、これはこれまでの報告と同様の結果となった(Lennards and Roland, 1981; Keshavarz, 1986)。

図4-3に示すように、低カルシウム群とカルシウム再給餌群の小腸CaBP-D28K mRNA量はコントロール群よりも2倍ほど増加した。血中のカルシウム濃度が減少すると先に述べたようなカルシウムホメオスタシス機構によって、カルシウム濃度を一定に保とうとすることがよく知られている。すなわち以下に示すように一連の反応が誘起されると考えられている。はじめに低カルシウム飼料によって血中カルシウム濃度が減少すると副甲状腺からPTHが分泌される。PTHは、腎臓で25(OH)2D3を1,25(OH)2D3に変換する酵素である25-ヒドロキシ-1 $\alpha$ -ヒドロキシラーゼの産生を刺激し、血中1,25(OH)2D3の合成を増加させる。PTHと1,25(OH)2D3はともに骨からのカルシウムの溶出をも促す作用



を持ち、他にも1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は小腸でのカルシウム吸収を亢進させ、その際にCaBP-D28Kの遺伝子発現も促すことによってカルシウム吸収能を増加させる(Norman *et al.*, 1982; Corradino and Fullmer, 1991; Nys *et al.*, 1992a)。図4-2に示したように、5日間の低カルシウム飼料給餌によって血中カルシウムが減少しPTHと1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度が上昇したため、小腸でのCaBP-D28K mRNA量が上昇したと考えられる(図4-3)。カルシウム再給餌群では、血中カルシウム濃度も回復したにもかかわらず、小腸CaBP-D28K mRNA量は低カルシウム群と同じように高い値を保ち続けた。これは、先に述べたように低カルシウム飼料によって著しく骨のカルシウムが失われ、骨を再構築するために普段より多くのカルシウムが出入りしており、血中カルシウム濃度はホメオスタシスによって一定に保たれてはいるが、PTHや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度は引き続き高く維持してされているのではないかと考えられる。

小腸と比較して、低カルシウム飼料を5日間与えて卵殻質の低い卵を産んだ時の卵殻腺CaBP-D28K mRNA量はコントロール群と有意な差はみられなかった(図4-4)。このことから血中カルシウム濃度が低下してもCaBP-D28K mRNAの発現量には直接影響を与えないように思われる。本実験の結果では排卵が起こり卵殻形成が行われていることから、卵殻腺からのカルシウム分泌が全くなっている訳ではないと考えられる。というのも、確かに図4-1に示したように卵殻比率は低くなっているものの、産卵された卵の表面には卵殻が形成されており、一般的に軟卵と呼ばれる卵殻膜だけの卵ではなかったからである。第3章の結果から、CaBP-D28K mRNA量が減少すると、卵殻質は減少することから、CaBP-D28K発現量が卵殻質に影響していると考えられるが、血中カルシウムの低下や、それによる卵殻質の低下はCaBP-D28K mRNA量には直接影響していないと考えられた。今回の結果はあくまでも短期的なカルシウム欠乏によ

る血中カルシウムの低下と卵殻質が低下したときの卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に与える影響をみたものであるため、卵殻質とCaBP-D28K発現量との関係については、系統的に厚いもしくは薄い卵殻の卵を産むニワトリの系統を用いて検討するなど、さらに詳しい研究が必要であろう。最近の研究によって、非常に卵殻の厚い卵を産むことが知られているホロホロ鳥とニワトリでは、卵殻腺粘膜ヒダの構造に差があり、ホロホロ鳥のほうが管状腺を含む細胞層が白色レグホーンよりも厚いことが報告されている (Yoshimura *et al.* 1998)。卵殻腺CaBP-D28Kは管状腺細胞に存在することから、CaBP-D28K発現量がホロホロ鳥のほうが多く、このことが卵殻質の差に関係しているとも考えられる。また、小腸はCaBP-D28K mRNA量は血中カルシウム濃度が減少した事によって影響を受けたが、今回の実験では卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は血中カルシウム濃度の調節に関連したPTHや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって影響は受けなかった。しかし、第2章でも述べたようにホルモンの組織ごとにおける影響を知るためにはそれぞれのホルモンのレセプター親和性などを検討することが必要であり、今回の結果から一概にこれらのホルモンが卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現に関係していないとは言えないと思われる。

これらの結果から、低カルシウム飼料によって血中カルシウム濃度が減少すると、カルシウム吸収能を高めるために小腸CaBP-D28K mRNA量はPTHや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって増加調節を受けるが、血中カルシウム濃度の減少やそれによる卵殻質の低下は卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に直接影響を与えないことが明らかとなった。

第4章では短期間の低カルシウム飼料が、卵殻質(比重、卵殻比率、卵殻厚)と小腸及び卵殻腺カルシウム結合蛋白質(CaBP-D28K) mRNA量に与える影響を検討した。5日間、低カルシウム飼料(0.5%カルシウム)を産卵鶏に与えると、産卵鶏は卵殻質の低い壊れやすい卵を産むようになった。卵殻質の指標として卵殻比率を検討したところ、低カルシウム飼料を与えて2日目には有意に卵殻比率が減少した。他の比重、卵殻厚の指標も卵殻比率と同様な変化となった。低カルシウム飼料給餌後5日目には血中カルシウム濃度もコントロール群に比べ有意に減少した。5日間低カルシウム飼料を与えた後、5日間3.5%カルシウムを含む標準カルシウム飼料を与えたところ、卵殻質は改善され、血中カルシウム濃度もコントロール群と同じレベルにまで上昇した。低カルシウム飼料を5日間与えた後、次の排卵8時間後に小腸及び卵殻腺粘膜を採取し、ノーザンブロット法によってCaBP-D28K mRNA量を定量した。カルシウム再給餌群は低カルシウムを5日間給餌した後、5日間標準カルシウム飼料を給餌し、最終日の排卵後8時間にサンプリングを行った。小腸では低カルシウムを与えた群とカルシウム再給餌群におけるCaBP-D28K mRNA量はコントロール群に比べ約2倍有意に増加した。これは、低カルシウム飼料により血中カルシウムが減少した結果、PTHが分泌され腎臓における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の合成を刺激したためと考えられる。カルシウム再給餌群では、血中カルシウム濃度はコントロール群と同じレベルに戻っていたにもかかわらず、CaBP-D28K mRNA量が高かったのは骨の再生とカルシウム貯蔵により多くのカルシウムが必要だったため、血中PTHや1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度が引き続き高く維持されていたためと考えられる。しかし、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は5日間の低カルシウム飼料を与えたにもか

卵巣腺のCaBP-D28K mRNAの発現は、血中カルシウム低下に敏感である。本研究では、低カルシウム血症を誘発した際に、卵巣腺のCaBP-D28K mRNA発現量が有意に増加したことが確認された。この結果は、卵巣腺がカルシウム調節機構の一部として機能していることを示唆している。また、卵巣腺のCaBP-D28K mRNA発現量は、血中カルシウム濃度の低下に伴って増加する傾向を示したが、その増加はカルシウム濃度の低下に伴って観察された。この結果は、卵巣腺のCaBP-D28K mRNA発現が、血中カルシウム濃度の低下に敏感であることを示している。また、卵巣腺のCaBP-D28K mRNA発現量は、血中カルシウム濃度の低下に伴って増加する傾向を示したが、その増加はカルシウム濃度の低下に伴って観察された。この結果は、卵巣腺のCaBP-D28K mRNA発現が、血中カルシウム濃度の低下に敏感であることを示している。

かわらず有意な変動はみられなかった。この結果より卵巣腺のCaBP-D28K mRNA生産は血中カルシウム低下には影響を受けないと考えられた。

Gene	Relative expression (fold change)	P-value
Actin	1.0	
CaBP-D28K	1.5	0.05
Calmodulin	1.2	0.1
Calretinin	1.1	0.2
Carcinoma-associated protein 1	1.3	0.08
Cytokeratin 18	1.1	0.15
Epithelial cell adhesion molecule	1.2	0.09
Epithelial cell surface-associated protein	1.1	0.12
Epithelial cell surface-associated protein 2	1.2	0.08
Epithelial cell surface-associated protein 3	1.1	0.11
Epithelial cell surface-associated protein 4	1.2	0.09
Epithelial cell surface-associated protein 5	1.1	0.13
Epithelial cell surface-associated protein 6	1.2	0.08
Epithelial cell surface-associated protein 7	1.1	0.14
Epithelial cell surface-associated protein 8	1.2	0.09
Epithelial cell surface-associated protein 9	1.1	0.12
Epithelial cell surface-associated protein 10	1.2	0.08
Epithelial cell surface-associated protein 11	1.1	0.13
Epithelial cell surface-associated protein 12	1.2	0.09
Epithelial cell surface-associated protein 13	1.1	0.14
Epithelial cell surface-associated protein 14	1.2	0.08
Epithelial cell surface-associated protein 15	1.1	0.12
Epithelial cell surface-associated protein 16	1.2	0.09
Epithelial cell surface-associated protein 17	1.1	0.13
Epithelial cell surface-associated protein 18	1.2	0.08
Epithelial cell surface-associated protein 19	1.1	0.14
Epithelial cell surface-associated protein 20	1.2	0.09

表 4-1. 実験飼料の構成成分

Ingredient and composition	Low calcium diet (%)	Control diet
Corn	60.679	58.859
Wheat bran	1.5	1.455
Corn gluten feed	7.0	6.79
Soybean meal	14.9	14.453
Rapeseed meal	3.0	2.91
Corn germ meal	5.0	4.85
Corn gluten meal	2.5	2.425
Fish meal	1.0	0.97
Meat and bone meal	2.5	2.425
Animal fat	1.0	0.97
Calcium phosphate	0.40	0.388
Salt	0.25	0.243
Methionine	0.049	0.048
Lysine	0.03	0.029
Vitamin mix	0.07	0.068
Mineral mix	0.08	0.078
Lime stone	0	3
Calculated analysis		
ME, kcal/g	2929.7	2841.809
Crude Protein	18.13	17.5861
Calcium	0.54	3.5238
Total phosphate	0.61	0.5917
Sodium	0.16	0.1552

4-1 卵殻比率の経時的変化

Day	Relative weight of egg shell (%)	Feeding Program
1	9.0	Control
2	9.0	Control
3	9.0	Control
4	8.8	Control
5	8.8	Control
6	8.0	Low Ca
7	7.5	Low Ca
8	7.0	Low Ca
9	6.8	Low Ca
10	6.8	Low Ca
11	7.2	Re-supply
12	7.8	Re-supply
13	8.0	Re-supply
14	8.5	Re-supply
15	8.0	Re-supply

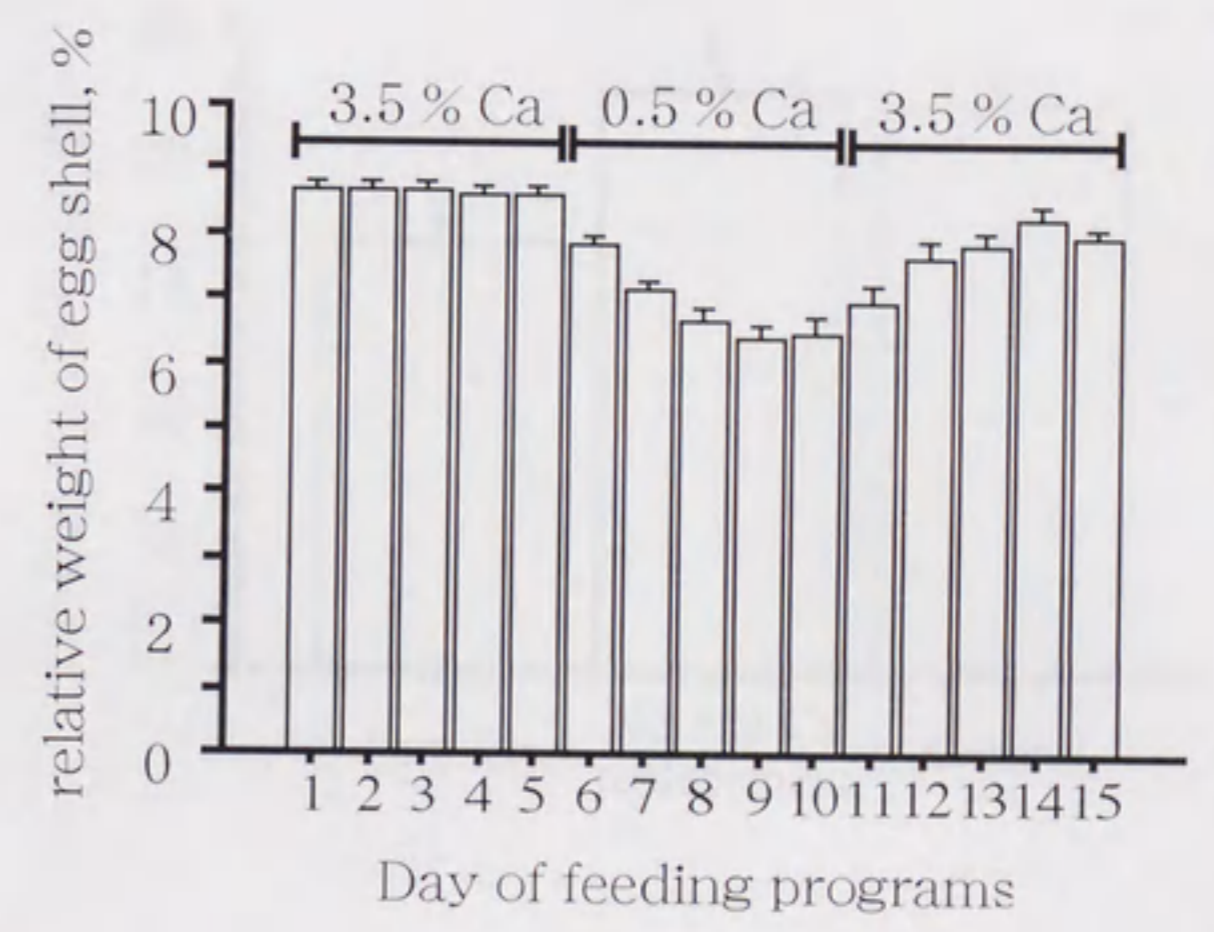


図4-1 ; コントロール飼料 (day 1-5)、低カルシウム飼料 (day 6-10)、カルシウム再給餌 (day 11-15) をしたときの卵殻比率の変化。データは平均値±SEMを示している (n=9-45)。

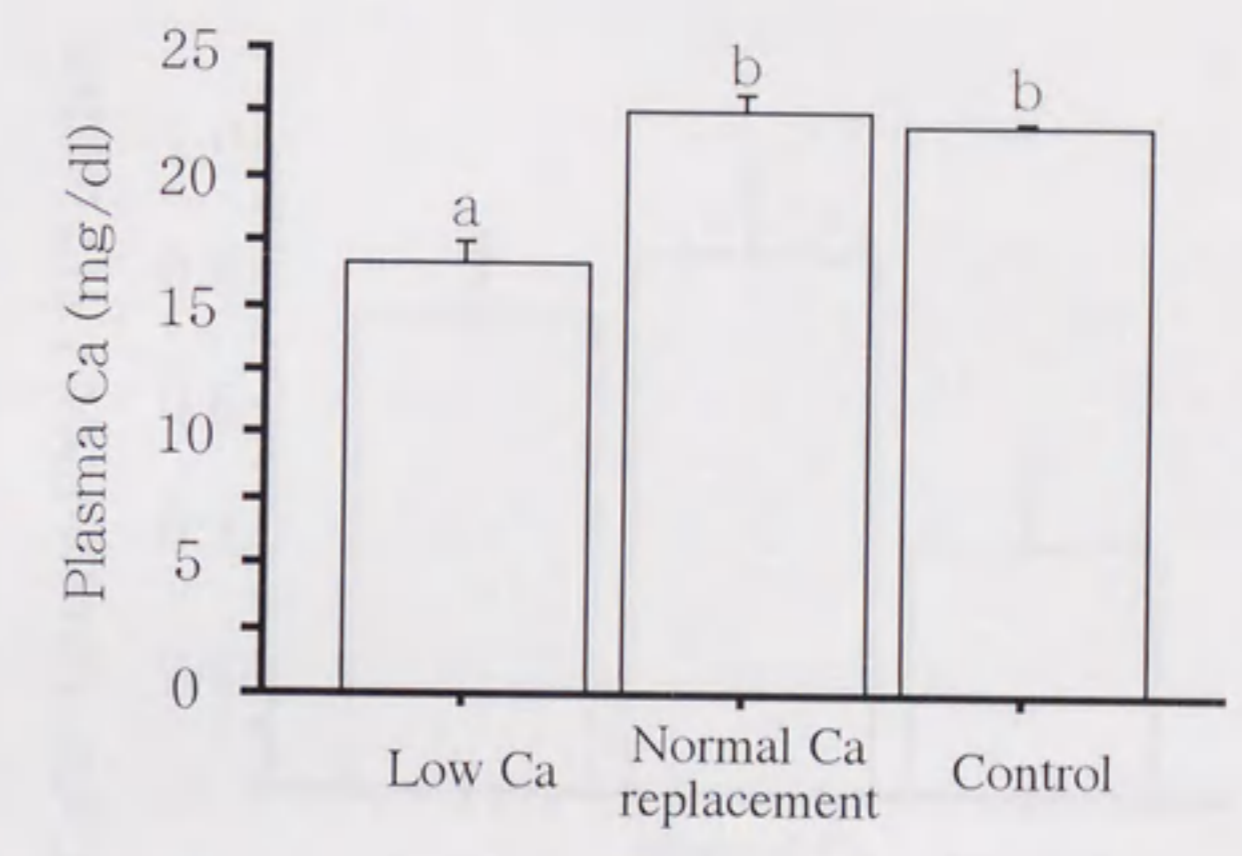


図4-2 ; 低カルシウム飼料もしくはカルシウム再給餌した時の血中カルシウム濃度の変化。データは平均値±SEMで表わした(n=8)。異なる肩文字は有意差があることを示している(p<0.05)。

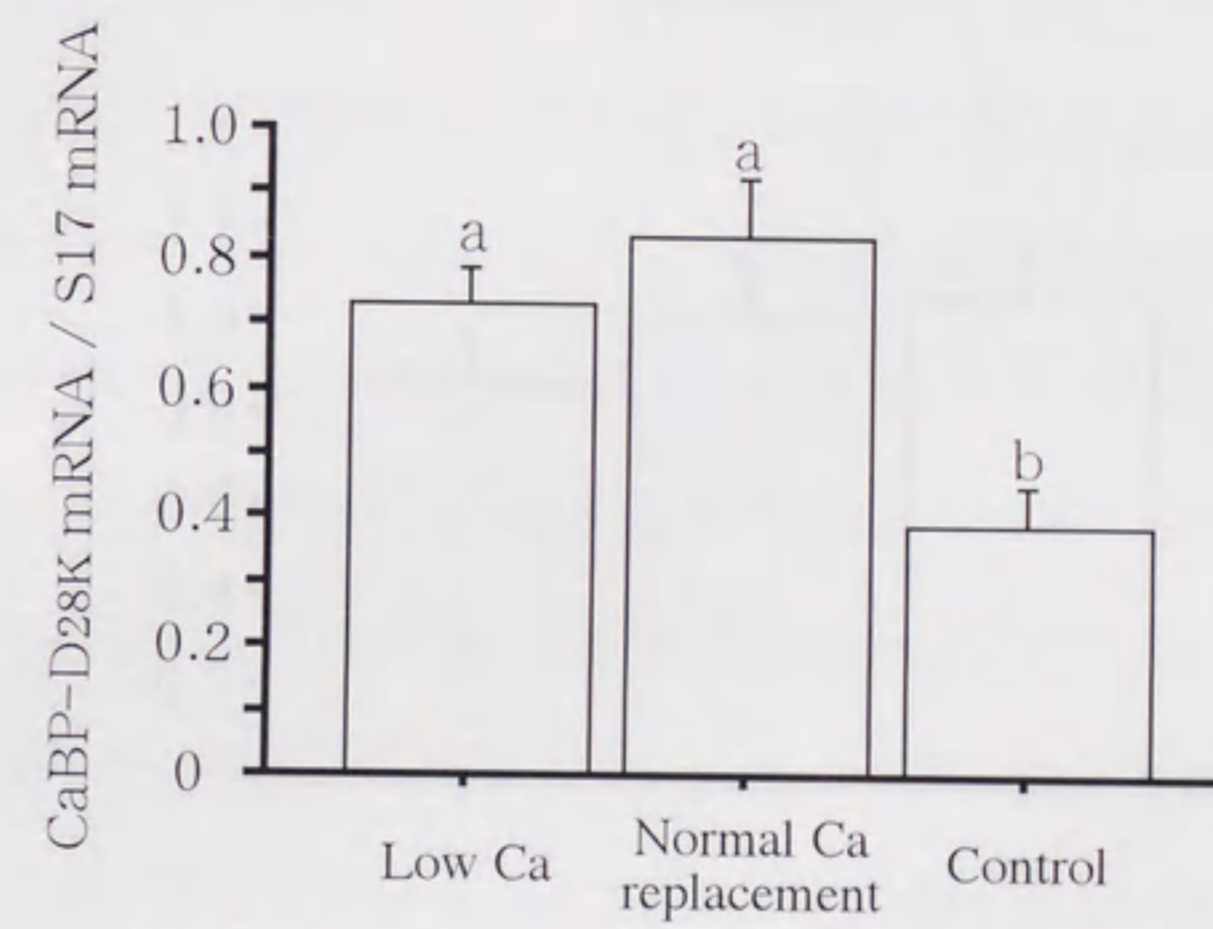


図4-3；低カルシウム飼料もしくはカルシウム再給餌した時の小腸におけるCaBP-D28K mRNA量の変化。データは平均値±SEMで表わした (n=8)。異なる肩文字は有意差があることを示している (p<0.05)。



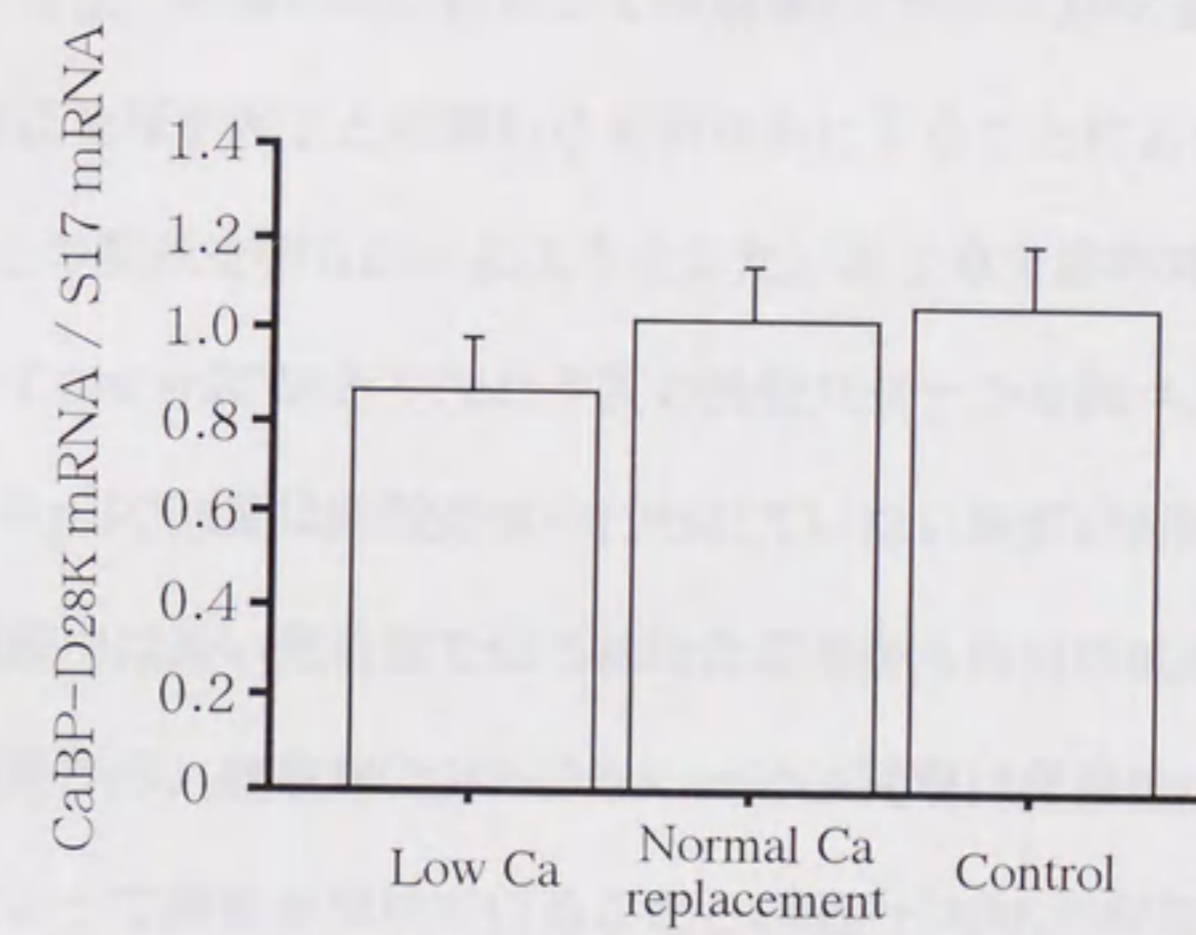


図4-4; 低カルシウム飼料もしくはカルシウム再給餌した時の卵殻腺CaBP-D28K mRNA量の変化。データは平均値±SEMで表わした (n=8)。

## 第5章

### 総合考察

本研究から得られた結果を元に、産卵鶏の卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA発現と卵殻形成を図5-1に示した。緒言でも述べたようにカルシウム分泌における卵殻腺CaBP-D28Kの生理的役割や発現機構については今だにわかっていないことから、卵殻形成に注目して卵殻腺のCaBP-D28K遺伝子発現パターンや発現調節に及ぼす因子との関わりを明らかにすることによって卵殻形成とCaBP-D28Kとの関係を明らかにしようとした。第2章で排卵周期中の小腸と卵殻腺のCaBP-D28K mRNAとタンパク質の発現パターンを調べたところ、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は卵殻形成の行われていない排卵5時間後までは非常に低く、卵殻形成中は高い発現量を保ち続けたことから卵殻形成との相関がみられた。この結果から、卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現は卵殻形成に関連した何らかの因子によって調節を受けていることとCaBP-D28Kが卵殻形成におけるカルシウム輸送に何らかの役割を果たしていると考えられる。しかし、こうした卵殻腺CaBP-D28K mRNA量の変動にもかかわらず、CaBP-D28K量は排卵周期中の変動はまったくみられなかった。最近の報告ではCaBP-D28Kは細胞質の可溶画分だけではなく、核、細胞膜といった不溶画分にも多く含まれていることがわかってきた (Hubbard and McHugh, 1995)。今回の実験で行ったCaBP-D28Kのラジオイムノアッセイでは細胞の可溶画分の濃度しか測定していないことから、卵殻形成中に細胞内でCaBP-D28Kが可溶画分から不溶画分(膜画分)に移動し、可溶画分のCaBP-D28K濃度が見かけ上変化がないように見えている可能性も考えられる。このことから、カルシウム分泌中にCaBP-D28Kは細胞膜および核内といった細胞内小器官に移行し、カルシウムの輸送や酵素活性のモ

ジュレーターなどとして働いている可能性が提唱されている。これに関して、腎臓の培養細胞を用いて、膜画分にあるプロテインキナーゼCによってCaBP-D28Kがリン酸化され、しかも1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によってリン酸化が促進されることが報告された (Gagnon *et al.*, 1994; Simboli-Campbell *et al.*, 1994; Gagnon and Welsh, 1997)。CaBP-D28Kがリン酸化されることによる生理的な役割はまだ明らかではないが、膜画分にCaBP-D28Kが移行しリン酸化されることによって、CaBP-D28Kの安定性や膜画分にある標的酵素のモジュレーターとして作用しているのではないかと考えられているが明らかではない。卵殻腺でも同様に卵殻形成に関してCaBP-D28Kが膜画分に移行しリン酸化が起こっている可能性が考えられることから、さらに卵殻形成との詳細な関係を調べることはCaBP-D28Kの生理的役割を知る上で重要な手がかりとなるであろう。

第2章の序章でも述べたように、これまで卵殻腺のCaBP-D28K発現には1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>には関係ないと報告されてきた (Bar *et al.*, 1984; Nys and de Laage, 1984a; Corradino, 1993)。しかし、今回の研究によって卵殻腺VDR mRNA量もCaBP-D28K mRNA量と同じように卵殻形成に関連して変動していることが初めて明らかになった。この結果から、VDR量が増加することによって血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>に対する親和性が高くなり、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とレセプター複合体量が増加し、CaBP-D28K遺伝子発現に関わっている可能性も考えられることから卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現にも1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が影響を与えていると考えられる。排卵周期中に血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>濃度も変動しており、特に卵殻形成時に高いことが報告されている (Abe *et al.*, 1979; Nys *et al.*, 1986a; Nys *et al.*, 1992)。これは卵殻形成によって血中から失われるカルシウムを補充するための反応と考えられるが、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によって主に発現調節されていることが明らかになっている小腸では、CaBP-D28K mRNA量及びCaBP-D28Kは排卵

周期中まったく変動を示さなかった。しかし今回の実験結果から小腸でのVDR mRNA量も排卵周期中に変動していないことから産卵鶏の小腸はすでに高いCaBP-D28K遺伝子発現をしており、1,25(OH)2D3による発現能力が飽和してしまっているのではないかと考えられる。

産卵鶏の卵殻腺における1,25(OH)2D3の直接的な影響を*in vivo*で検証することは非常に難しい。なぜなら、1,25(OH)2D3の前駆体は紫外線によっても産生されるため、欠乏症にするのに時間がかかることと、産卵鶏を1,25(OH)2D3欠乏症にすると低カルシウム血症を起こして実験をはじめの前に休産してしまい、生殖機能が萎縮してしまうからである。しかし最近の研究では、ホルモンの作用を考えるとときに標的細胞のレセプターのホルモン結合親和性を調べるのが非常に重要であることが示されている(岐阜大学、川島教授、高橋博士との私信)。つまり、血中のホルモンやレセプター濃度が高くてもレセプターのホルモン結合親和性が低ければ、リガンド-レセプター複合体が少ないため組織における生理作用も低いということである。このことから産卵鶏の排卵周期中における1,25(OH)2D3に対する小腸と卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現機構の違いは、排卵周期中のVDRの結合親和性を調べることによって今後明らかになっていくであろう。また、25(OH)2D3と共に血中カルシウム濃度を調節する働きのあるPTHに特異的に結合するレセプターが卵殻腺粘膜に存在することが初めて明らかとなった。さらにPTHレセプターの親和性が、卵殻形成時に高くなっていることも今回初めて明らかにされた。PTHの卵殻腺粘膜及びCaBP-D28K mRNA発現に対する直接的な関係については明らかではないが、共に卵殻形成に対して相関が見られたことは非常に興味深く、PTHが卵殻形成時に卵殻腺粘膜に作用していることは確かであると思われる。

卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現には1,25(OH)2D3以外にも、卵殻形成が非常

に密接に関わっていることもこの研究によって明らかにされたことは先にも述べた。卵殻腺内の卵による物理的な刺激は卵殻形成が始まるための重要な要因の一つであり、卵殻形成の盛んな時期のCaBP-D28K mRNA発現を保つために必要であるが、卵の物理的な刺激だけではCaBP-D28K mRNA発現を誘起させることはできず直接は関係していないことが第2章で示された。この結果からCaBP-D28K mRNAの発現開始および終了する機構と卵殻腺内へのカルシウム分泌には高い相関があると思われる。

第3章では、ステロイドインヒビターであるAGTによってCaBP-D28K mRNA発現が阻害されることが示された。この結果は、ステロイドホルモンのCaBP-D28K mRNA発現とカルシウム分泌調節へ直接もしくは間接的な関わりを示している。今回の実験でも、どのステロイドホルモンがカルシウム分泌とCaBP-D28K mRNA量に影響しているのかを示すことはできなかったが、これまでも報告でもアンチエストロジェンのタモキシフェンや、アンチプロゲステロンのRU38486によっても、CaBP-D28K mRNA量には変化がみられなかったことから (Bar *et al.*, 1996)、単独のステロイドホルモンではなく複数のステロイドホルモンがCaBP-D28K mRNA発現に直接及び間接的に影響していると考えられる。またプロゲステロンは過剰に投与することによって、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量を減少させることと、排卵周期中、血中プロゲステロン濃度は放卵の2時間ほど前に増加することから、プロゲステロンは卵殻CaBP-D28K mRNA発現のサブレッサーである可能性が提唱されている (Bar *et al.*, 1996)。またAGT投与によって卵殻腺のCaBP-D28K mRNA量が減少と卵殻形成も著しく減少するという相関が見られた。

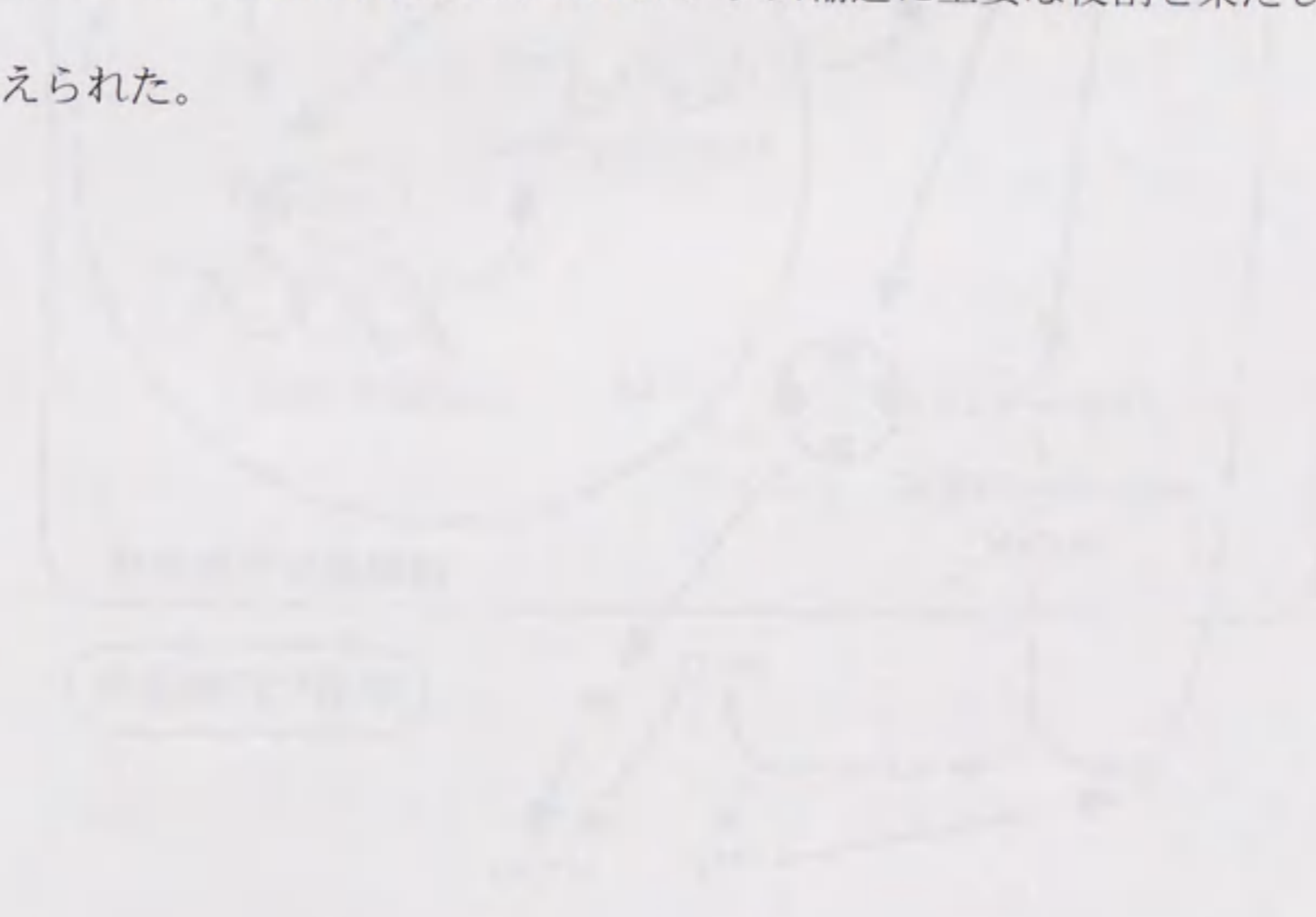
これまでの結果から、卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現には1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とステロイドホルモン、卵殻形成が関係していることを示してきたが、低カルシウ

ム飼料を用いて、血中カルシウム濃度や、卵殻質とCaBP-D28K mRNA発現量との関係を示したのが第4章の結果である。短期的に低カルシウム飼料を産卵鶏に与えることによって、産卵鶏は骨髓骨、皮質骨からカルシウムを動員し、血中カルシウム濃度と卵殻形成を賄おうとする。5日間の低カルシウム飼料によって、骨からのカルシウム動員も少なくなると、血中カルシウム濃度が減少し、卵殻沈着量が減少した(図4-1, 4-2)。その時の小腸CaBP-D28K mRNA量は、コントロール群よりも約2倍増加した。これは低カルシウム飼料により血中カルシウム濃度が減少したことによって、血中PTHと1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度が増加し、小腸でもカルシウム吸収能を高めるためにCaBP-D28K mRNA発現が増加したと考えられる。一方卵殻腺ではCaBP-D28K mRNA量は低カルシウム飼料によって血中カルシウム濃度が減少しても有意に変動しなかった(図4-4)。このことは血中カルシウム濃度の減少やそれによる卵殻質の低下はCaBP-D28K mRNA発現量に直接影響しないと考えられる。これは卵殻腺CaBP-D28K mRNA発現に対する1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の影響の低さを示しているように見えるが、今回の実験では卵殻腺における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>への親和性に変化がないと考えれば特に矛盾はないと考えられる。いずれにせよ先にも述べたように、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>との関係を明らかにするためにはレセプターの結合親和性を調べる必要があるであろう。

第2章と第3章の実験からはCaBP-D28K mRNA発現とカルシウム分泌はどちらが先に起こり、終了するのはわからなかったが、第4章の実験結果から、卵殻質が低下してもCaBP-D28K mRNA量には変化が見られなかったことから、CaBP-D28K mRNA発現の増加及び減少することがカルシウム分泌に大きく影響していると考えられる。実際にはCaBP-D28K mRNAが直接カルシウム輸送にかかわっているのではないので、CaBP-D28Kがカルシウム分泌を開始

促進しているのであろう。このことからCaBP-D28Kの生理的な役割を知ること  
は卵殻形成の機構や卵殻質の向上に貢献するであろう。

これらの結果から、産卵鶏の小腸及び卵殻腺のCaBP-D28K mRNA発現調節  
は、それぞれ異なる調節機構を持つことが明らかとなった。特に卵殻腺では従  
来述べられてきた事とは異なり、活性型ビタミンD3である1,25(OH)2D3も  
CaBP-D28K mRNA発現に十分関与していると考えられた。また卵殻腺CaBP-  
D28K mRNAの発現調節には1,25(OH)2D3だけではなく、卵殻形成に関連した  
いくつかの調節因子、つまり、排卵に関係した複数のステロイドホルモンが発  
現調節に重要な役割を果たしていると考えられた。CaBP-D28K mRNA発現量  
が減少することによって、卵殻へのカルシウム分泌も著しく減少することか  
ら、CaBP-D28Kは卵殻形成におけるカルシウム輸送に重要な役割を果たしてい  
ると考えられた。



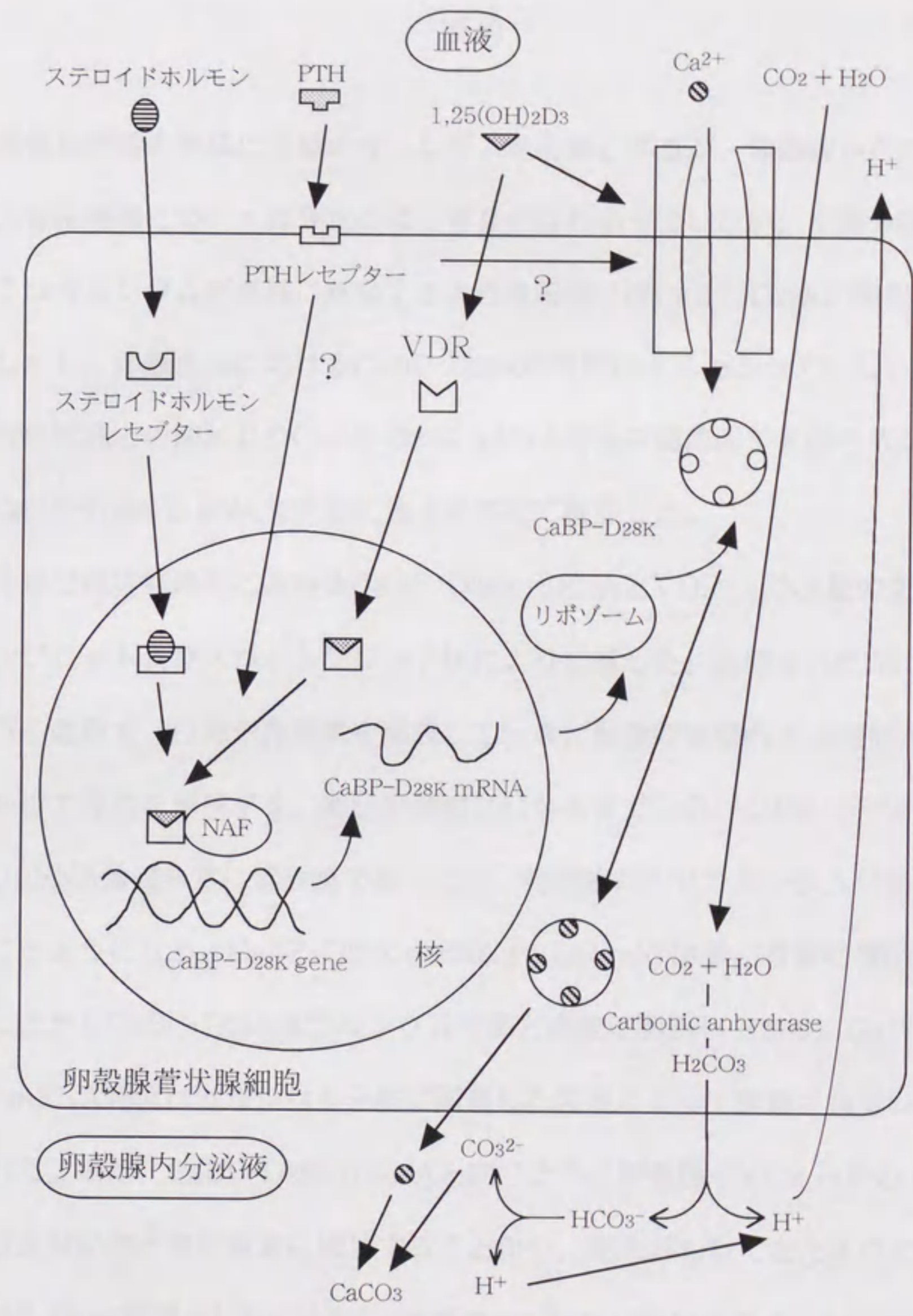


図 5-1 ; 卵殻腺におけるCaBP-D28K mRNA発現と卵殻形成の  
 模式図  
 NAF ; nuclear accessory factor



## 第6章

### 要約

産卵鶏は卵殻の形成に多量のカルシウムを必要とするが、卵殻腺からのカルシウム分泌機構については今だにはっきりとはわかっていない。小腸や卵殻腺のようなカルシウムが多量に移動するような組織にはCaBP-D28Kが発現している。しかし、卵殻形成におけるCaBP-D28Kの役割はよくわかっていない。そこで、卵殻形成との関わりやCaBP-D28K mRNA発現の調節因子を調べるために、CaBP-D28K mRNA発現量に焦点を当てて検討した。

第2章では排卵周期におけるCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量の変動をノーザンブロット及びスロットブロット法により定量した。排卵された卵は卵管内を下る過程で、白身や卵殻膜を形成していき、最後卵殻腺内で18時間から20時間かけて卵殻を形成する。卵が卵殻腺にはいるまでCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量は非常に低い値であったが、卵殻腺に入りカルシウム分泌が盛んに起こるとCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量が有意に増加した。このことからCaBP-D28Kはカルシウム分泌と密接に関連しており、CaBP-D28K mRNA発現はカルシウム分泌に関連した因子によって調節されていると考えられる。また、CaBP-D28K mRNAと同じように卵殻腺のVDR mRNA量もカルシウム分泌のときに有意に増加することから、従来言われてきたように卵殻腺CaBP-D28K発現に1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>は関わっていない訳ではなく、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>も調節因子の一つであると考えられた。一方、小腸のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量は排卵周期中で有意な変動はまったくみられなかった。しかし、こうした卵殻腺CaBP-D28K mRNA量の変動にもかかわらず、ラジオイムノアッセイによって定量したCaBP-D28K量は有意な変動がみられなかった。この

ことは、最近の報告によってCaBP-D28Kが細胞内可溶分画だけではなく、膜画分に移行している可能性があることが報告されたことから、卵殻形成時にCaBP-D28Kが膜画分に移行しているため、可溶画分のCaBP-D28K量は変動していないように見えている可能性がある。

卵殻形成には内部の卵の存在が必要不可欠である。卵殻腺内部の卵による物理的刺激がCaBP-D28K mRNA発現に与える影響を検討するためにインドメタシンによる放卵遅延と、プロスタグランジンによる早期放卵がCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量に与える影響を調べた。インドメタシンによる放卵遅延は、卵殻質にもCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量にも何の影響も与えなかった。一方、プロスタグランジンによる早期放卵誘起によって卵殻腺内の卵を出して空にしてしまうと、CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量は著しく減少した。このことから、CaBP-D28K mRNAとVDR mRNAの遺伝子発現維持には卵の存在が必要であるが、卵殻腺内の卵はCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA発現に直接影響を与えるのではなく、卵殻形成やCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA発現を終了させる機構が別にあることが示された。

血中カルシウム濃度の調節ホルモンであるPTHの卵殻腺への影響を調べるために、卵殻腺粘膜の膜画分を用い、PTHに特異的に結合するレセプターの存在を検証した。また排卵周期中におけるPTHレセプターの結合親和性の変化を測定した。卵殻腺にはPTHに特異的なレセプターが1種類存在し、卵殻腺におけるPTHレセプターの親和性が卵殻形成中に高くなることが今回初めて明らかとなったことから、PTHが卵殻形成中に卵殻腺に何らかの作用をしていると考えられ、PTHも卵殻腺CaBP-D28K発現に何らかの作用を及ぼしているのかもしれない。

第3章では、性ステロイドホルモンと卵殻腺および小腸CaBP-D28KとVDR

mRNA発現の関係をステロイドホルモンインヒビターであるアミノグルタチミド (aminoglutethimide, AGT) を用いて検討した。AGT投与により卵殻腺および小腸のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量は有意に減少した。またAGT投与によって卵殻のカルシウム分泌も有意に減少した。これらのAGTの効果は内因性のステロイドホルモンが減少したためと考えられる。しかし、AGTと同時にプロジェステロン (P4)、エストラジオールベンゾエイト (EB)、デキサメタゾン (Dex)をそれぞれ単独で代替投与しても、CaBP-D28K mRNAとVDR mRNA量は回復しなかった。これらの結果から産卵鶏の小腸と卵殻腺のCaBP-D28K mRNAとVDR mRNA発現と卵殻腺カルシウム分泌に単独ではなく複数のステロイドホルモンがCaBP-D28K mRNA発現に関係していることが示された。

第4章では、カルシウム分泌量が卵殻腺CaBP-D28K mRNA量に与える影響を調べるために、産卵鶏に短期間低カルシウム飼料を与えてその影響を検討した。5日間、低カルシウム飼料 (0.5%カルシウム) によって血中カルシウム濃度も有意に減少し、産卵鶏は卵殻質の低い、壊れやすい卵を産むようになった。5日間低カルシウム飼料を与えた後、5日間、3.5%カルシウムを含む標準カルシウム飼料を与えたところ、卵殻質は改善され、血中カルシウム濃度も上昇した。小腸では低カルシウムを与えた群及びカルシウム再給餌群のCaBP-D28K mRNA量はコントロール群に比べて有意に増加した。これは、低カルシウム飼料により血中カルシウムが減少した結果、PTHが分泌され、腎臓における1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の合成を刺激したためと考えられる。しかし、卵殻腺CaBP-D28K mRNA量は5日間の低カルシウム飼料によって有意に変動しなかった。この結果より短期間の低カルシウム飼料は血中カルシウム濃度を減少させ、卵殻質に直接すぐ影響を及ぼすことが示された。また、血中カルシウム濃度が減少することによって、血中パラサイロイドホルモン、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度が増加し、小

腸におけるCaBP-D28K mRNA量を増加させたと考えられた。しかし、血中カルシウム濃度の低下やそれによる卵殻質の低下は卵殻腺CaBP-D28K mRNA量には有意な影響を与えなかった。このことからCaBP-D28K mRNA発現の増加及び減少することがカルシウム分泌に大きく影響していると考えられる。実際にはCaBP-D28K mRNAが直接カルシウム輸送にかかわっているのではないので、CaBP-D28Kがカルシウム分泌を開始促進しているのであろう。

これらの結果から、産卵鶏の小腸及び卵殻腺のCaBP-D28K mRNA発現調節は、それぞれ異なる調節機構を持つことが明らかとなった。特に卵殻腺では従来述べられてきた事とは異なり、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>がCaBP-D28K mRNA発現に関与していると考えられた。しかし卵殻腺CaBP-D28K mRNAの発現調節には1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>だけではなく、卵殻形成に関連したいくつかの調節因子、つまり、排卵周期中の複数のステロイドホルモンがCaBP-D28K mRNA発現調節に重要な役割を果たしていると考えられた。また、CaBP-D28K mRNA発現量が減少すると、卵殻へのカルシウム分泌が著しく減少することから、CaBP-D28Kは卵殻形成におけるカルシウム輸送に重要な役割を果たしていると考えられた。

## 謝辞

本研究の遂行および論文の作成にあたり、長年にわたり懇切丁寧な御指導をいただきました名古屋大学農学部島田清司教授に心から感謝いたします。また、適切な御助言をいただきました佐藤孝二博士(名古屋大学名誉教授)、海老原史樹文教授、齋藤昇教官、吉村崇教官(名古屋大学農学部)に厚くお礼を述べさせていただきます。

本研究に使用いたしましたニワトリCaBP-D28K cDNA、VDR cDNA、 $\beta$ -actin cDNA、リボゾームプロテインS17 cDNAを提供していただきましたDr. B. S. Komm(アリゾナ大学)、Dr. D. P. McDonnel(Ligand Pharmaceuticals Inc.)、妹尾久雄教授(名古屋大学環境医学研究所)、ならびにDr. B. Trueb(Eidgenossische Technische Hochschule)に深く感謝いたします。PTHレセプターアッセイの実験において多大なる御指導と御助言をいただきました川島光夫教授、高橋哲也博士(岐阜大学農学部)に深く感謝いたします。CaBP-D28Kの標準品とCaBP-D28Kの抗体を提供くださいました東門美代博士(神戸大学医学部)に深く感謝いたします。有益な御助言と英文の校正に多大なご協力をいただきましたDr. C. P.W. Tsang(Agriculture Canada)、Dr. T. I. Koike(University of Arkansas for Medical Sciences)に心から感謝いたします。実験に用いましたニワトリを快く提供いただきました野田賢治氏、宮川博充氏(愛知県農業総合試験場)、奥村純市教授、喜多一美教官(名古屋大学農学部)に厚くお礼を申し上げます。実験に用いました炭酸カルシウム結晶、低カルシウム飼料を調整、提供くださいました細谷実氏(株式会社ホソヤ)、川村氏(中部科学飼料)に厚くお礼を申し上げます。ノーザンブロット等アイソトープ実験に便宜を賜りました名古屋大学アイソトープセンターの職員の方々に厚くお礼を申し

（Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.)

上げます。

事務処理など、書類の作成等にご助言、便宜を賜りました加藤律子様（名古屋大学事務補佐員）、また研究の遂行にあたり、実験の補助およびニワトリの飼育管理等多くのご協力を賜りました名古屋大学農学部動物機能制御学講座の卒業生、並びに在籍中の皆様に深く感謝いたします。

最後に亡き両親に代わり、いつも暖かく見守り続け支えてくれた兄達、そして励ましてくれた友人達に深く感謝いたします。

（Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.)

参考文献

- Abe, A., Tanabe, R., Suda, T., and Yoshiki, S. (1979) Circadian rhythm of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production in egg laying hens. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88: 500-507
- Bar, A., Rosenberg, J., and Hurwitz, S. (1984) The lack of relationships between vitamin D<sub>3</sub> metabolites and calcium-binding protein in the eggshell gland of laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78B: 75-79
- Bar, A., Striem, S., Mayel-Afshar, S., and Lawson, D. E. N. (1990) Differential regulation of calbindin-D<sub>28K</sub> mRNA in the intestine and eggshell gland of the laying hen. *Journal of Molecular Endocrinology* 4: 93-99
- Bar, A., Striem, S., Vax, E., Talpaz, H., and Hurwitz, S. (1992) Regulation of calbindin mRNA and calbindin turnover in intestine and shell gland of the chicken. *American Journal of Physiology* 262: R800-R805
- Bar, A., Vax, E., Hunziker, W., Halevy, O., and Striem, S. (1996) The role of gonadal hormones in gene expression of calbindin (Mr 28,000) in the laying hen. *General and Comparative Endocrinology* 103: 115-122
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159
- Christakos, S., Gabrielides, C., and Rhoten, W. B. (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocrine Reviews* 10: 3-26
- Christakos, S., and Norman, A. W. (1978) Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium binding protein in bone tissue. *Science* 202: 70-71

- Corradino, R. A. (1993) Calbindin D28K regulation in precociously matured chick egg shell gland in vitro. *General and Comparative Endocrinology* 91: 158-166
- Corradino, R. A., and Alaimo, J. (1994) In vitro regulation of calbindinD28K mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and estradiol in precociously-matured egg shell gland from vitamin D3-depleted chicks. *Hormone & Metabolic Research* 27: 39-40
- Corradino, R. A., and Fullmer, C. S. (1991) Positive cotranscriptional regulation of intestinal calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and glucocorticoids. *Endocrinology* 128: 944-950
- Corradino, R. A., Smith, C. A., Krook, L. P., and Fullmer, C. S. (1993) Tissue-specific regulation of shell gland calbindin D28K biosynthesis by estradiol in precociously matured, vitamin D-depleted chicks. *Endocrinology* 132: 193-198
- Corradino, R. A., Wasserman, R. H., Pubols, M. H., and Chang, S. I. (1968) Vitamin D3 induction of a calcium-binding protein in the uterus of the laying hen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 378-380
- Costa, E. M., Hirst, M. A., and Feldman, D. (1985) Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells. *Endocrinology* 117: 2203-2210
- Coty, W. A. (1980) A specific, high affinity binding protein for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D in the chick oviduct shell gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93: 285-292
- Eastin, W. C., Jr., and Spaziani, E. (1978) On the control of calcium secretion in the avian shell gland (uterus). *Biology of Reproduction* 19: 493-504
- Etches, R. J. (1996) "Reproduction in poultry" CAB INTERNATIONAL, Oxon



- Etches, R. J., and Cheng, K. W. (1981) Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* 91: 11-22
- Feher, J. J., Fullmer, C. S., and Wasserman, R. H. (1992) Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *American Journal of Physiology* 262: C517-C526
- Fullmer, C. S., and Wasserman, R. H. (1987) Chicken intestinal 28-kilodalton calbindin-D: complete amino acid sequence and structural considerations. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA* 84: 4772-4776
- Gagnon, A., Simboli-Campbell, M., and Welsh, J. (1994) Induction of calbindin D-28K in Madin-Darby bovine kidney cells by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Kidney International* 45: 95-102
- Gagnon, A., and Welsh, J. (1997) Modulation and phosphorylation of calbindin-D28K correlates with protein kinase C activation. *Biochemistry and Cell Biology* 75: 33-40
- Hall, A. K., Bishop, J. E., and Norman, A. W. (1987) Inhibitory and stimulatory effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on chick intestinal calbindin-D28K and its mRNA. *Molecular and Cellular Endocrinology* 51: 25-31
- Hubbard, M. J., and McHugh, N. J. (1995) Calbindin28kDa and calbindin30kDa (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain. *FEBS Letters* 374: 333-337
- Hunziker, W. (1986) The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA* 83: 7578-7582
- Hunziker, W., and Schrickel, S. (1988) Rat brain calbindin D28: Six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Molecular Endocrinology* 2: 465-473

Hunziker, W., Siebert, P. D., King, M. W., Stucki, P., Dugaiczky, A., and Norman, A. W. (1983) Molecular cloning of a vitamin D-dependent calcium-binding protein mRNA sequence from chick intestine. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA* 80: 4228-4232

Hurwitz, S., and Bar, A. (1969) Intestinal calcium absorption in the laying fowl and its importance in calcium homeostasis. *American Journal of Clinical Nutrition* 22: 391-395

Johnson, A. L., and van Tienhoven, A. (1984) Effects of aminoglutethimide on luteinizing hormone and steroid secretion, and ovulation in the hen, *Gallus Domesticus*. *Endocrinology* 114: 2276-2283

Kenny, A. D. (1976) Vitamin D metabolism: physiological regulation in egg-laying Japanese quail. *American Journal of Physiology* 230: 1609-1615

Keshavarz, K. (1986) The effect of variation of calcium intake on production performance and shell quality. *Poultry Science* 65: 2120-2125

King, M. W., and Norman, A. W. (1986) Analysis of the mRNA coding for the chick vitamin D-induced calbindin and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 248: 612-619.

Kretsinger, R. H. (1976) Calcium-binding proteins. *Annual Reviews of Biochemistry* 45: 239-266

Lang, G. F., Etches, R. J., and Walton, J. S. (1984a) Effects of luteinizing hormone, progesterone, testosterone, estradiol and corticosterone on ovulation and luteinizing hormone release in hens treated with aminoglutethimide. *Biology of Reproduction* 30: 278-288

Lang, G. F., Walton, J. S., and Etches, R. J. (1984b) The effect of aminoglutethimide on steroid secretion, ovulation, and luteinizing hormone release in the hen. *Poultry Science* 63: 1861-1871

- Lennards, R. M., and Roland, D. A., Sr. (1981) The influence of time of dietary calcium intake on shell quality. *Poultry Science* 60: 2106-2113
- Lowe, K. E., Maiyar, A. C., and Norman, A. W. (1992) Vitamin D-mediated gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2: 65-109
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Rendall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275
- Mangelsdorf, D. J., Komm, B. S., McDonnell, D. P., Pike, J. W., and Haussler, M. R. (1987) Immunoselection of cDNAs to avian intestinal calcium binding protein 28K and a novel calmodulin-like protein: assessment of mRNA regulation by the vitamin D hormone. *Biochemistry* 26: 8332-8338
- McDonnell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J. W., Haussler, M. R., and O'Malley, B. W. (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* 235: 1214-1217
- Minghetti, P. P., Cancela, L., Fujisawa, Y., Theofan, G., and Norman, A. W. (1988) Molecular structure of the chicken vitamin D-induced calbindin-D28K gene reveals eleven exons, six Ca<sup>2+</sup>-binding domains, and numerous promoter regulatory elements. *Molecular Endocrinology* 2: 355-367
- Minghetti, P. P., Gibbs, P. E. M., and Norman, A. W. (1989) Computer analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-receptor regulated promoters: identification of a candidate D<sub>3</sub>-response element. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 162: 869-875
- Mueller, W. J., Brubaker, R. L., and Caplan, M. D. (1969) Egg shell formation and bone resorption in laying hens. *Federation Proceedings* 28: 1851-1856
- Murer, H., and Hildmann, B. (1981) Transcellular transport of calcium and inorganic phosphate in the small intestinal epithelium. *American Journal of Physiology* 240: G409-416

- Nakada, T., Koja, Z., and Tokashiki, S. (1976) Influence of ovulation and gonadal hormones on shell formation in the domestic fowl. *Japanese Poultry Science* 13: 169-174
- Navickis, R. J., Dial, O. K., Katzenellenbogen, B. S., and Nalbandov, A. V. (1979a) Effects of gonadal hormones on calcium-binding protein in chick duodenum. *American Journal of Physiology* 237: E409-E417
- Navickis, R. J., Katzenellenbogen, B. S., and Nalbandov, A. V. (1979b) Effects of sex steroid hormones and vitamin D3 on calcium-binding proteins in the chick shell gland. *Biology of Reproduction* 21: 1153-1162
- Norman, A. W., Roth, J., and Orci, L. (1982) The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocrine Reviews* 3: 331-366
- Nys, Y. (1987) Progesterone and testosterone elicit increases in the duration of shell formation in domestic hens. *British Poultry Science* 28: 57-68
- Nys, Y., Baker, K., Bouillon, R., van Baelen, H., and Lawson, D. E. M. (1992a) Regulation of calbindin D 28K and its mRNA in the intestine of the domestic hen. *General and Comparative Endocrinology* 86: 460-468
- Nys, Y., Baker, K., and Lawson, D. E. M. (1992b) Estrogen and calcium flux dependent factor modulate the calbindin gene expression in the uterus of laying hens. *General and Comparative Endocrinology* 87: 87-94
- Nys, Y., and de Laage, X. (1984a) Effects of suppression of eggshell calcification and of 1,25(OH)2D3 on Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ATPase, alkaline phosphatase, carbonic anhydrase and CaBP levels-I. The laying hen uterus. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78A: 833-838

Nys, Y., and de Laage, X. (1984b) Effects of suppression of eggshell calcification and of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-ATPase, alkaline phosphatase, carbonic anhydrase and CaBP levels-II. The laying hen intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology* 78A: 839-844

Nys, Y., Mayel-Afshar, S., Bouillon, R., Baelen, H. V., and Lawson, D. E. M. (1989) Increases in calbindin D 28K mRNA in the uterus of the domestic fowl induced by sexual maturity and shell formation. *General and Comparative Endocrinology* 76: 322-329

Nys, Y., N'Guyen, T. M., Williams, J., and Etches, R. J. (1986a) Blood levels of ionized calcium, inorganic phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol and gonadal hormones in hens laying hard-shelled or shell-less eggs. *Journal of Endocrinology* 111: 151-157

Nys, Y., Parkes, C. O., and Thomasset, M. (1986b) Effects of suppression and resumption of shell formation and parathyroid hormone on uterine calcium-binding protein, carbonic anhydrase activity, and intestinal calcium absorption in hens. *General and Comparative Endocrinology* 64: 293-299

Nys, Y., van Baelen, H., and Bouillon, R. (1992) Plasma 1,25-dihydroxycholecalciferol and its free index are potentiated by ovulation dependent factors and shell formation induced hypocalcemia in the laying hens. *Journal of Domestic Animal Endocrinology* 3: 37-47

尾形悦郎、須田立雄、小椋陽介編 (1993) [ビタミンDのすべて] 講談社、東京

Qin, X., Klandorf, H., Porter, D. W., Holt, S. B., and Martin, W. G. (1993) Estrogen enhancement of Ca-, Mg-, and Ca-Mg-stimulated adenosine triphosphatase activity in the chick shell gland. *General and Comparative Endocrinology* 89: 4-10

Roland, D. A., Sr. (1988) Egg shell problems: Estimate of incidence and economic impact. *Poultry Science* 67: 1801-1803

- Rosenberg, J., Hurwitz, S., and Bar, A. (1986) Regulation of kidney calcium-binding protein in the bird (*Gallus Domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A: 277-281
- Roth, J., Bonner-Weir, S., Norman, A. W., and Orci, L. (1982) Immunocytochemistry of vitamin D-dependent calcium binding protein in chick pancreas: exclusive localization in B-cells. *Endocrinology* 110: 2216-2218
- Salacinski, P. R. P., Mclean, C., Sykes, J. E. C., Clement-Jones, V. V., and Lowry, P. J. (1981) Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril (iodogen). *Analytical Biochemistry* 117: 136-146
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory Press, New York
- Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals New York Academy of Sciences* 51: 660-671
- Shimada, K., and Asai, I. (1978) Uterine contraction during the ovulatory cycle of the hen. *Biology of Reproduction* 19: 1057-1062
- Shimada, K., and Asai, I. (1979) Effects of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and indomethacin on uterine contraction in hens. *Biology of Reproduction* 21: 523-527
- Simboli-Campbell, M., Gagnon, A. M., Franks, D. J., and Welsh, J. E. (1994) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> translocates protein kinase C  $\beta$  to nucleus and enhances plasma membrane association of protein kinase C  $\alpha$  in renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 3257-3264
- Sonnenberg, J., Pansini, A. R., and Christakos, S. (1984) Vitamin D-dependent rat renal calcium-binding protein: development of a radioimmunoassay, tissue distribution, and immunologic identification. *Endocrinology* 115: 640-648

Spencer, R., Charman, M., Wilson, P., and Lawson, E. (1976) Vitamin d-stimulated intestinal calcium absorption may not involve calcium-binding protein directly. *Nature* 263: 161-163

Stein, W. D. (1992) Facilitated diffusion of calcium across the rat intestinal epithelial cell. *Journal of Nutrition* 122: 651-656

Striem, S., and Bar, A. (1991) Modulation of quail intestinal and egg shell gland calbindin (Mr 28,000) gene expression by vitamin D<sub>3</sub>, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and egg laying. *Molecular and Cellular Endocrinology* 75: 169-177

Sturkie, P. D., and Mueller, W. J. (1976) Reproduction in the female and egg production. In: Sturkie, P. D. (Editor) *Avian Physiology* 3rd Edition. Springer-Verlag, New York, p. 303-330

Tanaka, K. (1976) A physiological study of egg shell formation in the domestic fowl with special reference to the initiation of secreting egg shell material. *Japanese Journal Zootechnical Science* 47: 385-392

Tanaka, Y., Castillo, L., and Deluca, H. F. (1976) Control of renal vitamin D hydroxylases in birds by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the USA* 73: 2701-2705

Taylor, A. N., and Brindak, M. E. (1974) Chick brain calcium-binding protein: comparison with intestinal vitamin D-induced calcium binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 161: 100-108

Taylor, A. N., and Wasserman, R. H. (1967) Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium-binding protein: partial purification, electrophoretic visualization, and tissue distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 119: 536-540

Taylor, T. G., and Moore, J. H. (1954) Skeletal depletion in hens laying on a low-calcium diet. *British Journal of Nutrition* 8: 112-124

- Theofan, G., Nguyen, A. P., and Norman, A. W. (1986) Regulation of calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is correlated to receptor occupancy. *The Journal of Biological Chemistry* 261: 16943-16947
- Thiede, M. A., Harm, S. C., McKee, R. L., Grasser, W. A., Duong, L. T., and Leach, R. M., Jr. (1991) Expression of the parathyroid hormone-related protein gene in the avian oviduct: potential role as a local modulator of vascular smooth muscle tension and shell gland motility during the egg-laying cycle. *Endocrinology* 129: 1958-1966
- Thorens, B., Roth, J., Norman, A. W., Perrelet, A., and Orci, L. (1982) Immunocytochemical localization of the vitamin D-dependent calcium binding protein in chick duodenum. *The Journal of Cell Biology* 94: 115-122
- Tohmon, M., Fukase, M., Kishihara, M., Kadowaki, S., and Fujita, T. (1988) Effect of glucocorticoid administration on intestinal, renal, and cerebellar calbindin-D28K in chicks. *Journal of Bone and Mineral Research* 3: 325-331
- Tsai, H. C., and Norman, A. W. (1973) Studies on calciferol metabolism. 8. Evidence for a cytoplasmic receptor for 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in the intestinal mucosa. *The Journal of Biological Chemistry* 248: 5967-5975
- Uzgiris, V. I., Graves, P. E., and Salhanick, H. A. (1977) Ligand modification of corpus luteum mitochondrial cytochrome P-450 spectra and cholesterol monooxygenation: an assay of enzyme-specific inhibitors. *Biochemistry* 16: 593-600
- van de Velde, J.-P., Loveridge, N., and Vermeiden, J. P. (1984) Parathyroid hormone responses to calcium stress during eggshell calcification. *Endocrinology* 115: 1901-1904
- Wang, Y.-Z., and Christakos, S. (1995) Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. *Molecular Endocrinology* 9: 1510-1521



Wasserman, R. H., Corradino, R. A., and Taylor, A. N. (1968) Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties. *The Journal of Biological Chemistry* 243: 3978-3986

Wasserman, R. H., and Fullmer, C. S. (1983) Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Annual Reviews of Physiology* 45: 375-390

Wasserman, R. H., and Taylor, A. N. (1966) Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152: 791-793

Wilson, P. W., Harding, M., and Lawson, D. E. M. (1985) Putative amino acid sequence of chick calcium-binding protein deduced from a complementary DNA sequence. *Nucleic Acids Research* 13: 8867-8881

Wilson, P. W., Rogers, J., Harding, M., Pohl, V., Pattyn, G., and Lawson, D. E. M. (1988) Structure of chick chromosomal genes for calbindin and calretinin. *Journal Molecular Biology* 200: 615-625

Yasuoka, T., Kawashima, M., Takahashi, T., Iwata, A., Oka, N., and Tanaka, K. (1996) Changes in parathyroid hormone receptor binding affinity during egg laying: Implications for calcium homeostasis in chicken. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 1913-1920

Yoshimura, Y. (1998) Histological characterization of the oviducal structures in Guinea fowl (*Numida meleagris*). *Japanese Poultry Science*. 35: 149-156

## 報文目録

- 1) Teruko Ieda, Noboru Saito, Tamao Ono and Kiyoshi Shimada  
Effects of presence of an egg and calcium deposition in the shell gland on levels of messenger ribonucleic acid of CaBP-D28K and of vitamin D3 receptor in the shell gland of the laying hen  
*General and Comparative Endocrinology* 99 (1995); 145-151
- 2) Teruko Ieda, Noboru Saito and Kiyoshi Shimada  
Effects of aminoglutethimide on levels of messenger ribonucleic acid of CaBP-D28K and of vitamin D3 receptor in the shell gland of laying hen  
*Japanese Poultry Science* 35 (1998); 346-355
- 3) Teruko Ieda, Noboru Saito and Kiyoshi Shimada  
Effect of low calcium diet on messenger ribonucleic acid levels of calbindin-D28K of intestine and shell gland in laying hens in relation to egg shell quality  
*Japanese Poultry Science* (submitted)
- 4) Teruko Ieda, Tetsuya Takahashi, Noboru Saito, Mitsuo Kawashima and Kiyoshi Shimada  
Changes in parathyroid hormone receptor binding affinity in shell gland of laying hens during oviposition cycle  
(in preparation)