



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ニワトリ胚の発生過程における卵黄嚢膜の糖代謝機能の変動

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 柴田, 光浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000252

ニワトリ胚の発生過程における卵黄囊膜の
糖代謝機能の変動

2023年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物生産科学

(岐阜大学)

柴田 光浩

ニワトリ胚の発生過程における卵黄囊膜の
糖代謝機能の変動

柴田 光浩

目次	
略語表	1
序論	3
第1部 胚発生における卵黄囊の必要不可欠な機能	4
(1) 胚体外膜について	
(2) 卵黄囊膜の発生と構造	
(3) 卵黄囊における栄養素輸送機能	
(4) 造血機能	
(5) 代謝臓器としての卵黄囊	
(6) まとめ	
第2部 ニワトリ胚の発生過程における卵黄囊膜における糖代謝機能の変動	23
第1節 序論	23
第2節 糖新生酵素の mRNA 発現の変動	25
(1) 実験材料および方法	
(2) 結果	
第3節 糖新生酵素の酵素活性	30
(1) 実験材料および方法	
(2) 結果	
第4節 その他代謝産物等の測定	35
(1) 実験材料および方法	
(2) 結果	
第5節 考察	41

第 6 節 結論	47
総合結論	48
謝辞	49
引用文献	50

略語表

ATP:	adenosine 5'-triphosphate
CoA:	coenzyme A
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
FBPase:	fructose-1,6-bisphosphatase
G6Pase:	glucose 6-phosphatase
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLUT:	glucose transporter
IGF:	insulin-like growth factor
LDL:	low density lipoprotein
NADH:	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADP:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEFA:	non-esterified fatty acid
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PEP:	phosphoenolpyruvic acid
PEPCK:	phosphoenolpyruvate carboxykinase
RBP:	retinol-binding protein
RNA:	ribonucleic acid
RT-PCR:	revers transcription PCR
SGLT:	sodium glucose transporter

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

TTR: transthyretin

VLDL: very low-density lipoprotein

cDNA: complementary DNA

dGDP: deoxyguanosine diphosphate

mRNA: messenger RNA

rRNA: ribosomal RNA

qPCR: quantitative PCR

序論

羊膜動物は胚の発生段階で胚体外膜を形成している。胚体外膜には、羊膜、漿膜、尿膜、卵黄嚢があるが、そのうち卵黄嚢は卵黄を包む巨大な袋として、鳥類や爬虫類では胚発生の期間中を通して存在している。卵黄を包み込んでいることから、卵黄嚢の主な役割は卵黄に蓄えられた栄養成分を胚に供給することで胚発生を支えることであることが、古くからよく知られてきた。また、卵黄嚢の役割は栄養素の供給だけに限定されず、造血機能、代謝、タンパク質合成など、多岐にわたる。これらの機能は、それらの役割を果たす胚内の器官が成熟するまでの間、それらの器官の代わりに胚発生の初期段階を支える重要な機能であるといえる。また、母体からの栄養供給を胎盤が行う哺乳類においても、卵黄嚢は発生初期から存在し、鳥類と同様に造血や栄養代謝、タンパク質の合成など、様々な機能が報告されている。哺乳類では胎盤が完成する頃には卵黄嚢は退縮するため、その意義は低く見積もられてきたが、ヒトでは卵黄嚢の異常と流産や胎児の異常に相関関係があることが報告されているなど、やはり哺乳類においても卵黄嚢は胚発生に不可欠であるといえる。本研究はその卵黄嚢に着目した。なお、本論文は2部構成となっている。

第1部では、鳥類と哺乳類を中心に、卵黄嚢の構造、発生、機能を比較しまとめた。それぞれの共通点や違いについて総括することで、卵黄嚢という器官をあらためて俯瞰することが目的である。

第2部では、卵黄嚢の多岐にわたる機能のうち、代謝機能に着目した。卵黄嚢は卵黄に蓄えられた栄養成分を胚に供給することだけでなく、胚が利用可能な形に変換する代謝臓器としての役割が示唆されている。本研究では、代謝機能のうち糖代謝に着目し、

- (1) 糖新生酵素の遺伝子発現量の測定
- (2) 糖新生酵素の酵素活性の測定
- (3) その他代謝産物（グルコース、グリコーゲン、乳酸、遊離脂肪酸およびトリグリセリド）の測定

を行った。これらのデータを統合することで、卵黄嚢の代謝臓器としての役割をより明らかにすることを目的とした。

第1部 胚発生における卵黄嚢の不可欠な機能

1. 胚体外膜について

鳥類や爬虫類、哺乳類など、陸上生活をする動物は約3億7000万年前に両生類との共通の祖先から進化した (Blair and Hedges, 2005)。これらの動物は胚体外膜を発達させ、魚類や両生類よりも産卵数が少なく、乾燥した環境にも耐え、貴重な胚の発育に時間がかかるようになった (Stern and Downs, 2012)。爬虫類、鳥類、哺乳類はすべて、羊膜、漿膜、卵黄嚢、尿膜という4つの胚体外膜を持っており、羊膜から分泌される羊水の中で育つため、羊膜動物と呼ばれる。胚体外膜は、発生中の胚に水環境、酸素供給、栄養へのアクセス、老廃物の貯蔵を提供する。図1は鳥類の胚外膜を示しており、漿膜と尿膜が融合して漿尿膜を形成している。卵黄嚢は卵黄を包む袋で、鳥類や爬虫類では、胚発生の時期を通して大きな胚外膜であり、胚発生の全段階を支えている (Speake *et al.*, 1998)。

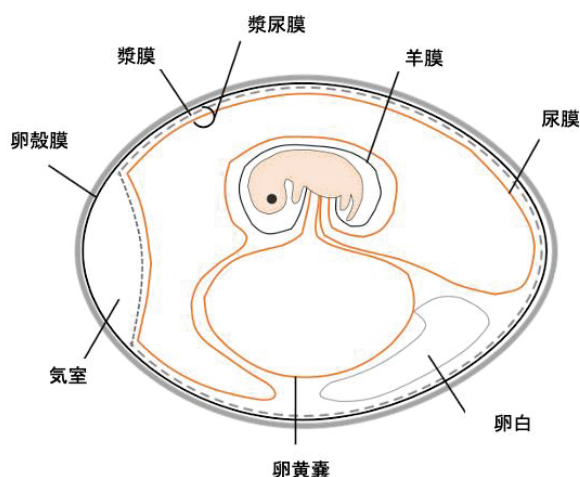


図1. 孵卵10日目頃のニワトリ胚と胚外膜の模式図。尿膜と漿膜が融合して漿尿膜を形成する。卵白は最終的に卵黄に吸収される。気室は胚が呼吸するにつれて容積が増加する。

卵黄嚢の主な機能は、卵黄に蓄えられた栄養素を胚に供給することである。卵黄嚢は、鳥類や爬虫類など、胚が母体から独立している動物の胚発生において不可欠な器官である。魚類や両生類では、卵は水中に産み落とされるため、羊膜や硬い卵殻は必要ない。老廃物は卵膜を介して水中に拡散するため、尿膜も不要である。しかし、これらの動物にとっても、卵

黄は胚発生のための唯一の栄養源であるため、卵黄嚢は進化上最古の胚外膜と呼ばれている (Ross and Boroviak, 2020)。

一方、母親と胎児が胎盤を通じて直接つながっている哺乳類では、卵黄嚢の重要性は過小評価されてきた。ヒトの二次卵黄嚢 (霊長類では事実上の卵黄嚢) は、妊娠 4 週目の終わりから存在し、9 週目頃には縮小の兆候が見られ、15 週目頃には見えなくなる (Jones and Jauniaux, 1995; Papaioannou *et al.*, 2010)。反芻動物においても、卵黄嚢は早期に変性し、胎盤の発達とともに縮小することが報告されている (Galdos-Riveros *et al.*, 2015)。

しかし、卵黄嚢の発達と胚発生の成功との関係も報告されている。ヒトでは、卵黄嚢が小さい (またはない) ことと流産には相関関係が認められており (Exalto, 1995)、卵黄嚢の直径が 6 mm を超えるか、 $6 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ の範囲外であることが、糖尿病、流産、染色体異常と関連している (Lindsay *et al.*, 1992; Stampone *et al.*, 1996; Ivanisevic *et al.*, 2006; Berdahl *et al.*, 2010)。ヒトの自然流産の約 70 % に、第二次卵黄嚢の形態異常があることが報告されており (Nogales *et al.*, 1993)、卵黄嚢の大きさは母体の健康状態も反映している可能性が示唆されている (Karlsen *et al.*, 2019)。

言い換えれば、卵黄嚢は単に胎盤が完成するまでの一時的な器官ではなく、哺乳類においても正常な胚発生に不可欠な器官である。卵黄嚢の役割の解明は、ブロイラーやレイヤーのような家禽類のみならず、反芻動物や非反芻動物のような家畜類においても、育種や生産性の向上、動物の生理状態に応じた飼育条件の設定に重要な基礎知識を提供するものである。

2 卵黄嚢膜の発生と構造

胚体外膜は、発生中の胚に水環境、酸素供給、栄養へのアクセス、老廃物の貯蔵を提供する。胚による栄養へのアクセスに関して、哺乳類には卵黄がほとんどなく、母体の栄養のほとんどは胎盤 (絨毛膜胎盤) を通過して胚に到達する。ヒトのような霊長類では、卵黄嚢は絨毛に接しておらず、非常に小さく一過性のものである。一方、鳥類は卵黄嚢が発達し、巨大な卵黄を包んでいる。他の羊膜類は、この両極端の中間に位置する (Sheng and Foley, 2012)。ここでは、まず鳥類と爬虫類の卵黄嚢について、次に哺乳類の卵黄嚢について説明する。図 2 に鳥類と哺乳類の卵黄嚢と胎盤のそれぞれの模式図を示した。

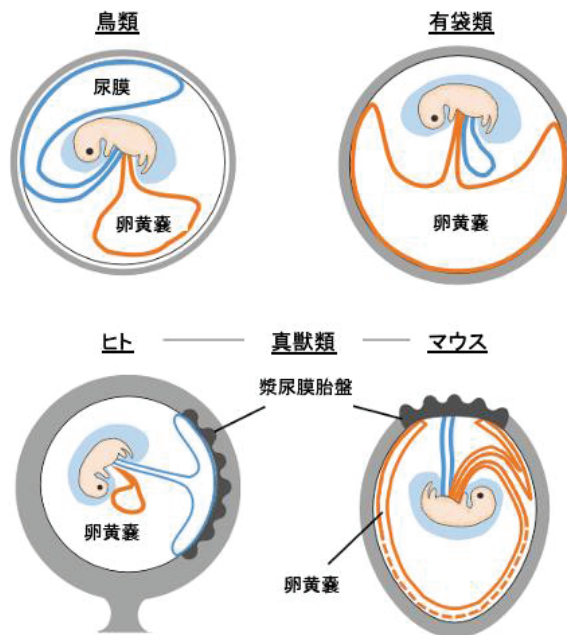


図 2. 鳥類と哺乳類の胎盤の模式図。哺乳類、有袋類、真獣類（ヒトとマウス）の例を示す。マウス胚の卵黄囊の点線は、分解される可能性のある体腔卵黄囊膜（parietal yolk sac membrane）を示している。この分解は、反転卵黄囊胎盤（inverted yolk sac placenta）と呼ばれる構造につながる可能性がある。

2-1. 鳥類と爬虫類の卵黄囊

卵黄囊の発生と構造については、1800年代にはすでに、特にニワトリのような家禽類の胚を用いて研究されていた。鳥類の卵黄囊の発生に関する優れた書籍がある（例えば Rommanoff, 1960a; Etches, 1996 を参照）。以下では、鳥類（総説や優れた原著論文は Yoshizaki *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2013; Starck, 2021 を参照）と爬虫類について概説する。

鳥類の卵黄囊は、最終的に卵黄全体を包む大きな胚外膜である。胚盤胞とはごく初期の胚のことで、ニワトリの場合、放卵（または産卵; 排卵後約 24 時間）の時期に相当する。胚盤胞は卵黄の表面に浮いた状態で存在する。発生後 80 時間までに、胚は卵黄に沿って発生し、胚の中腸と卵黄囊をつなぐ構造である卵黄茎が形成される。卵黄囊は最初、外胚葉細胞

と内胚葉細胞で構成され、内胚葉細胞は卵黄に面している。卵黄嚢には、血管のない vitellina 領域と、血管の発達した vasculosa 領域があり、後者では外胚葉と内胚葉の間に中胚葉領域がある。言い換えれば、完全な卵黄嚢は3つの胚葉細胞層からなる。卵黄嚢は発生初期には卵黄全体を覆っていない。ニワトリの卵黄嚢は発生に伴い、孵化3日目(E3)に卵黄赤道を越え、E5でほぼ卵黄を覆う。次に血管膜はE5-E7で赤道を越え、E14-E15で卵黄をほぼ覆うようになる。孵卵の最初の1週間は、吸収された卵黄が主に卵黄嚢の発生に使われる。私たちの研究グループの測定によると(Too *et al.*, 2017)、卵黄嚢膜の重量(卵黄を除いた湿重量)はE4で0.67g、徐々に増加し、特にE11以降(1.79g)、E17(4.67g)でピークに達した。その後、卵黄嚢膜は退縮し、孵化3日目には0.68gに達し、E4とほぼ同じ重量となった。Yadgary *et al.* (2013)は、この重量の変化は卵黄嚢の吸収部分の面積の増加と関連していると述べている。

完成した卵黄嚢では、卵黄と接する面が折りたたまれ(図3)、絨毛が発達している。この構造は、小腸の折りたたまれたひだ構造と同様に、表面積を増やすことで卵黄からの栄養吸収を助けると考えられている。このよく発達したひだ構造の吸収面積は、ニワトリではE5からE17にかけて10倍以上に増加する(Yadgary *et al.*, 2013)。ひだの高さは最終的に3~7mmに達する。さらに、卵黄嚢膜上皮細胞(すなわち内胚葉細胞)には、(同じく吸収性上皮である小腸上皮と比較して)ランダムに配列し、比較的まばらな微絨毛がある。微絨毛は、エンドサイトーシス以外の卵黄取り込み経路として、卵黄吸収効率の向上に寄与している可能性がある。さらに、卵黄嚢の内容物(=卵黄)は、上皮細胞間のタイトジャンクションのような構造により、上皮細胞の細胞質を通過しなければ胚側に移動できない。つまり、卵黄の取り込みは、発生中の生理的な要求に応じて制御できる(Speake *et al.*, 1998; Mobbs and McMillan, 1981)。

卵黄嚢は卵黄莖によって腸管とつながっているが、孵卵期間中、少なくとも孵卵期間の終了直前までは、卵黄嚢の内容物(=卵黄)が直接腸管に取り込まれることはないと考えられている(Romanoff, 1960a)。前述したように、卵黄嚢はE17をピークに徐々に縮小していく(Too *et al.*, 2017)。孵化の頃には、卵黄嚢はヒナの腹腔内に収まっている。残った卵黄は腸管に吸収され、孵化後5-7日で消失する(Romanoff, 1960a)が、その吸収機構は完全には解明されていない。

爬虫類でも卵黄囊膜が卵黄吸収に機能していることが報告されているが、卵黄囊内面の形状は鳥類とは大きく異なっている (Blackburn, 2020)。ヘビ、トカゲ、カメ、ワニでは、卵黄囊膜の内胚葉細胞が卵黄囊腔に侵入・増殖し、卵黄を貪食する。やがて卵黄囊は卵黄を貪食した内胚葉細胞で満たされる。さらに血管が侵入し、内胚葉細胞が血管の周りに再配列し、卵黄囊腔内に内胚葉で被覆された血管からなる細長い「スパゲッティ状 (または糸状) のひも」を形成する。これらの構造により、卵黄が卵黄囊に効率よく吸収され、血管を通して爬虫類の胚に栄養が供給される。系統発生的に、Blackburn (2020) はこれらの爬虫類の卵黄囊を竜脚類 (哺乳類以外の羊膜類の仲間) の祖先の形とみなしており、鳥類型の卵黄囊が非鳥類恐竜から鳥類に分岐する前か後に生じたのかは不明であるとしている。Yoshizaki *et al.* (2004) は、卵黄タンパク質が卵黄囊膜の上皮細胞に吸収される前に、共存する酵素カテプシン D によってある程度分解されることを発見した。この発見に基づき、Blackburn (2020) は、卵黄の上皮外消化が鳥類の祖先で起こり、爬虫類で見られるような「卵黄の中に伸びる内胚葉細胞が卵黄を貪食し、細胞内で消化する」方法は、進化の過程で最終的に廃止されたと示唆した。これらの発見は、脊椎動物の祖先が陸上に進出した当時、胚の発育に必要な栄養素をすべて含んでいた卵黄から、胚が栄養素を吸収する方法が進化の過程でどのように変化していったかを知る手がかりとなる。しかし、後述するように、鳥類の卵黄の内容物の大部分は、リポタンパク質という形をしたタンパク質と脂質の複合体である。これらの成分が卵黄囊腔内 (上皮細胞の外側) でどのように消化され、上皮細胞に吸収され、細胞内で処理されるのか、より正確に調べる必要がある。

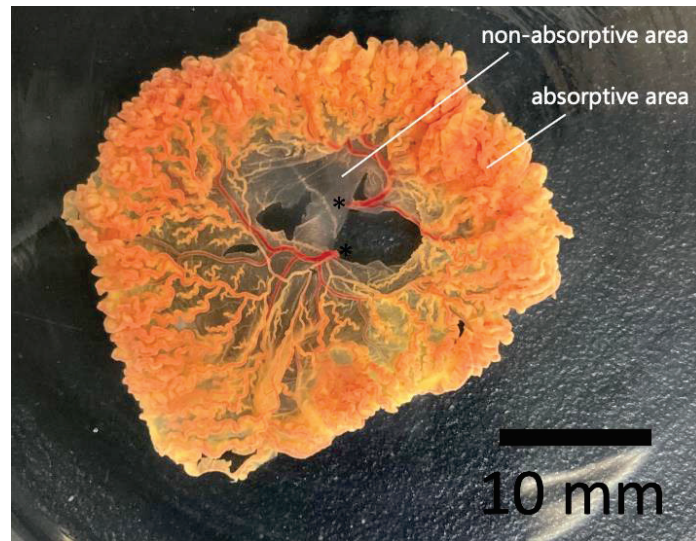


図 3. (18 日の孵卵期間のうちの) 孵卵 10 日目のニホンウズラ胚の卵黄囊膜。卵黄茎を切断し、卵黄囊の卵黄側（内胚葉上皮）を上にして、卵黄を洗い流した状態。vitelline vessels (*印) は胚の側面で切断されている。この写真では、卵黄囊膜が吸収性の領域 (absorptive area) と非吸収性の領域 (non-absorptive area) から構成されていることを示す (Yadgary *et al.*, 2013)。卵黄に接する面はよく発達したひだ構造になっている。

2-2. 哺乳類の卵黄囊

哺乳類の卵黄囊の発生と構造については、優れた原著論文や総説がある (Ross and Boroviak, 2020; Jollie, 1990; Freyer *et al.*, 2003; Carter and Enders, 2004; Freyer and Renfree, 2009; Cindrova-Davies *et al.*, 2017; Ornoy and Miller, 2023)。これらの論文に基づき、重要な点を以下に要約する。

哺乳類の卵黄囊は、胚盤胞期に発生した受精卵から生じる構造体である。卵黄囊は 2 層構造で、外胚葉（栄養芽細胞）と胚外内胚葉から生じる。さらに、卵黄囊の一部または全領域では、外胚葉と内胚葉の間に胚外中胚葉（vitelline vessel につながる血管を持つ）が伸びており、3 層構造になっている。多くの哺乳動物では、卵黄囊は絨毛と接触し、choriovitelline 胎盤を形成する。この胎盤は一過性のもので、やがて尿膜と絨毛膜が接触することにより、chorioallantoic 胎盤へと移行する。しかし、種によって大きな違いがある。

ほとんどの有袋類は choriovitelline 胎盤のみを形成する。有袋類の祖先の幹となる種は、おそらく choriovitelline 胎盤と chorioallantoic 胎盤の両方を持っていた。しかし、有袋類の胎盤の進化の過程で後者の重要性は低下し、choriovitelline 胎盤が優勢になったと考えられている。一部のげっ歯類やウサギ類では、choriovitelline 胎盤は出産まで存続するものもいる。これらの動物では、卵黄嚢が choriovitelline 胎盤と並行して、妊娠中に母親の子宮から栄養を吸収し、消化し、胎児に運ぶ。もう一つの重要な機能は、胎児への免疫グロブリンの運搬である。これらの動物で choriovitelline 胎盤が形成される際、卵黄嚢の一部または全部が反転し、卵黄嚢内胚葉が母体（子宮）側を向いた吸収上皮が形成される（反転卵黄嚢胎盤: inverted yolk sac placenta と呼ばれる）。有袋類の卵黄嚢胎盤との形態学的な大きな違いは、頭頂卵黄嚢（母体側にある卵黄嚢）の変性を伴う卵黄嚢の反転である。一方、有袋類では卵黄嚢は反転しない。

ヒトやその他の霊長類では、卵黄嚢は絨毛に物理的に付着していないため、卵黄嚢は胎外腔の中で自由な構造として存在する。これらの種では、chorioallantoic 胎盤のみが形成される。ヒトの卵黄嚢は妊娠 10 週前後で退縮し始めるため、哺乳類の卵黄嚢は 50 年ほど前までは胎生期の臓器とみなされ、ほとんど注目されていなかった。PubMed で "human (or mouse, rat) yolk sac" を検索すると、1970 年以前の論文はほとんど見つからない。

3. 卵黄嚢における栄養素の輸送機能

卵黄嚢の最も重要な機能のひとつは、卵黄に蓄積された栄養素を胚に供給することである。卵黄嚢は、卵黄に蓄積された栄養素を運搬する機構として、胚が母体から独立し、卵黄に蓄積された物質が胚発生の唯一の栄養源でありエネルギー源である爬虫類や鳥類にとって特に重要である。胎盤を介して母体から栄養を得る哺乳類では、卵黄嚢は胎盤が完成するまでの間（例えばヒトでは妊娠 15 週目頃）、栄養供給において一時的ではあるが重要な役割を果たしている。

3-1. 鳥類における母体栄養素の輸送

卵黄囊膜の上皮細胞は、片側（先端側）が卵黄に接し、もう片側（基底側）が基底膜を挟んで血管に面している。この二極性により、卵黄囊膜は相互に関連する2つの機能、すなわち栄養を取り込み、循環系に放出する機能を持つ（Sheng and Foley, 2012）。鳥類の卵黄囊膜は、多種多様な栄養トランスポーターや関連分子を発現している。しかし、それらの発現のタイミングは様々である。例えば、アミノペプチダーゼN（APN）、ペプチドトランスポーター1（PepT1）、カチオン性アミノ酸トランスポーター1（CAT1）、グルコーストランスポーター5（GLUT5）は胚発生の初期に発現量が高く、孵化に向けて減少する傾向がある（Yadgary *et al.*, 2011）。ナトリウム／グルコース共輸送体1（SGLT1）および興奮性アミノ酸トランスポーター3（EAAT3）の発現レベルは孵化に向けて増加することが報告されている（Speier *et al.*, 2012）。

卵黄成分の中でも脂質は最もエネルギーの高い物質であるため、胚への脂質の効率的な供給は正常な胚発生に不可欠である。エンドサイトーシス受容体、脂肪酸トランスポーター、リパーゼ、アポリポタンパク質など、卵黄囊膜を介した脂質の移動プロセスを担う様々なタンパク質が、ニワトリ卵黄囊上皮細胞の生化学的解析やトランスクリプトーム解析によって検出されている（Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2014）。リパーゼの酵素活性（1,2-ジアシルグリセロールの加水分解で評価）も見つかっている（Yadgary *et al.*, 2013）。これらの知見は、鳥類の卵黄囊の上皮細胞において、脂質がレセプターを介したエンドサイトーシスによって卵黄から取り込まれ、上皮細胞で加水分解された後、再エステル化されてリポタンパク質粒子が構築され、血流を通じて胚に供給されるという証拠を示している（Speake *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2014; Schneider, 2016）。

鳥類では、母体で産生される性ステロイド、副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモンなどの脂溶性ホルモンが、母鶏の卵胞形成中に母体血液から卵黄に移行することが知られている。これらのホルモンは正常な胚発生を促進し、胚の内分泌器官が完全に機能するまでの間、胚やヒナの発育に影響を与える（Groothuis and von Engelhardt, 2005; Darras, 2019）。

私たちの研究グループは、産卵鶏の卵黄囊における甲状腺ホルモンの代謝について研究した（Too *et al.*, 2017）。甲状腺ホルモン（トリヨードサイロニンやサイロキシンなど）は鳥

類の正常な胚発生に不可欠である。甲状腺ホルモンは、母鶏が卵胞を形成するときに母体の血液から卵黄に蓄積される。卵黄中の甲状腺ホルモンは卵黄囊膜を通して胚に供給される可能性が高く、胚の甲状腺が完全に機能するまでは重要な役割を果たすと考えられる。私たちは、発生中のニワトリ胚の卵黄囊膜に、甲状腺ホルモンを活性化する脱ヨード酵素 D2、不活性化する脱ヨード酵素 D3、ヨウ素のリサイクルに関与する脱ヨード酵素 D1 の、3つの酵素遺伝子の発現を発見した。また、発生中のニワトリ胚の卵黄囊膜において、甲状腺ホルモンを含む低分子輸送体である有機アニオントランスポーター1 C1 (OATP1C1)、モノカルボン酸トランスポーター8 (MCT8)、MCT10、甲状腺ホルモンのキャリアータンパク質であるトランスサイレチン (TTR) およびアルブミンの遺伝子発現を確認した。これらの知見に基づいて、私たちは卵黄囊における甲状腺ホルモン代謝のモデルを仮定した(図4)。甲状腺ホルモンは、受容体を介したエンドサイトーシスによって卵黄から卵黄囊膜の上皮細胞に取り込まれ、発生中の胚の要求に応じて上皮細胞で活性化または不活性化され、膜輸送体を通して単独で、あるいはエキソサイトーシスによってタンパク質 (TTR またはアルブミン) と結合した形で血流に放出される。私たちは、それらが血液中に放出され、胚に送られると推測している。

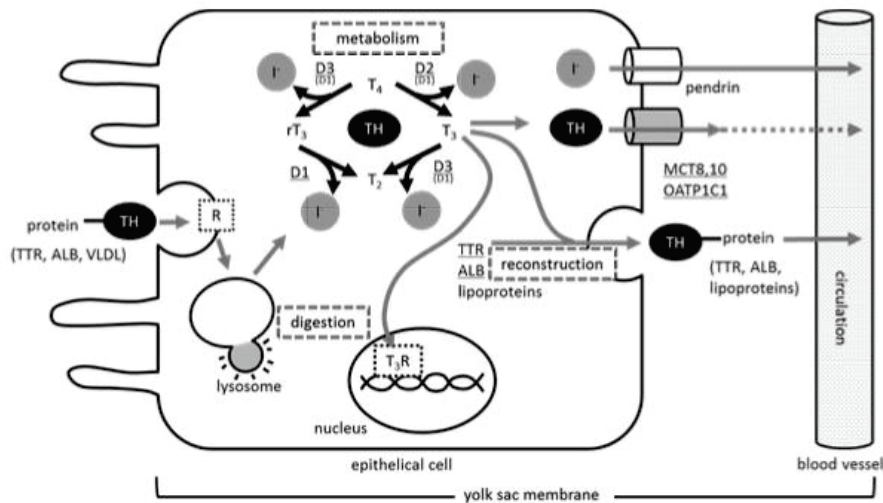


図4. ニワトリ卵黄囊上皮細胞における甲状腺ホルモン (TH) の取り込み、代謝、分泌の仮定経路。1) タンパク質と結合した TH が卵黄からエンドサイトーシスされる。2) タンパク質のリソソーム消化により、遊離 THs が細胞内で遊離される。3) TH は、発生段階特異的に3つの脱ヨード酵素 (D1、D2、D3) によって触媒される。4)触媒された THs は、新たに合成された TH 結合タンパク質と結合し、細胞外に放出され、循環する。5) 遊離 THs とヨウ化物 (I) は、それぞれの特異的トランスポーターを通過して細胞外に放出される。卵黄囊膜上皮細胞における発現が報告されているタンパク質名には下線が引かれている (Too *et al.*, 2017)。TTR: トランスサイレチン, ALB: アルブミン, VLDL: 超低比重リポタンパク質, R: エンドサイトーシス受容体複合体 (cubilin-megalín-amnionless: Schneider, 2016), T₄: サイロキシシン, T₃: トリヨードサイロニン, rT₃: リバース T3 (不活性), T₂: ジヨードサイロニン (不活性), T₃R: 核内 T₃ 受容体。

3-2. 哺乳類における母体栄養素の輸送

前述のように、鳥類の卵黄囊膜では、栄養分の取り込みは内胚葉上皮細胞によって行われることが知られている。ヒトの卵黄囊膜でも、微細構造レベルで上皮細胞に発達した微絨毛とエンドサイトーシス小胞が確認されている (Hesseldahl and Larsen, 1969; Pereda *et al.*, 1994)。つまり、哺乳類においても、卵黄囊内の栄養素は卵黄囊内皮上皮細胞を介して吸収され、血液に取り込まれ、胚に供給されると考えられる。

胎盤が発達すると、母体から供給された栄養素（アミノ酸、炭水化物、脂質など）は、母体循環から胎盤を介して胎児循環に移行する。しかし、妊娠初期には胎盤の絨毛部分の血管は貧弱な毛細血管しかない。一方、卵黄嚢の血管系はよく発達しており（Jones, 1997）、卵黄嚢を介した胎児循環の可能性が示唆されている（Burton *et al.*, 2001）。

哺乳類の中には前述のように卵黄嚢の上皮細胞の「向き」が異なる種があり、その結果、栄養供給の手順が異なっている（Cindrova-Davies *et al.*, 2017）。ヒトを含む真獣類の卵黄嚢は、絨毛膜に接着していない。したがって、子宮内膜からの栄養分は、絨毛間腔に放出された後、絨毛膜絨毛の合胞体性栄養膜によって貪食され、細胞内のリソソームによって消化される。得られた産物（アミノ酸など）はトランスポーターを介して体腔液中に移行する。その後、卵黄嚢内胚葉細胞がそれらを取り込み、胎児循環に入る。あるいは、栄養素は卵黄嚢腔内に拡散し、卵黄嚢上皮細胞に取り込まれる。また、タンパク質の一部は卵黄中に放出され、内胚葉細胞によって吸収される。一方、ヒトや他の哺乳類と異なり、げっ歯類の卵黄嚢膜は絨毛膜に付着している。したがって、子宮内膜からの栄養分泌物は、胎児の循環に入る前に、卵黄嚢上皮細胞によって貪食され、リソソームによって細胞内で消化される（Cindrova-Davies *et al.*, 2017 参照）。ラット胚を用いた実験では、タンパク質が卵黄嚢細胞に吸収され、リソソームによってアミノ酸に分解され、胚に輸送されることが確認されている（Lloyd *et al.*, 1998）。いずれの場合も、栄養吸収は卵黄嚢膜の内胚葉、上皮細胞層で起こる（Burton *et al.*, 2001; Pereda and Motta, 1999）。

ヒトの卵黄嚢では、アポリポタンパク質や ATP 結合カセット（ABC）トランスポーター遺伝子の転写物を含む、コレステロールや他の脂質の輸送に関与する転写物が見ついている（Cindrova-Davies *et al.*, 2017）。ラットの卵黄嚢でコレステロールが合成されることは古くから知られている（Plonne *et al.*, 1992）。マウスでは、アポリポタンパク質 B（apoB）遺伝子の発現は、卵黄嚢が形成された直後（胚発生の 6 日目から 7 日目の間）に始まる（Farese *et al.*, 1996）。したがって、卵黄嚢は母体由来の脂質と卵黄嚢内で合成された脂質をリポタンパク質パッケージの形で胚に供給していると考えられる。さらに、ヒトや他の哺乳類の卵黄嚢には、solute carrier (SLC) トランスポータースーパーファミリーに属する様々なトランスポーターが発現しており、アミノ酸、炭水化物、ビタミン A、B12、E、葉酸、レチノイン酸などのビタミンの輸送や（Cindrova-Davies *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 1994;

Moestrup *et al.*, 1996; Jauniaux *et al.*, 2007; Kozyraki and Gofflot, 2007)、カルシウムなどのイオンの輸送に関与している (Lloyd *et al.*, 1996)。また母体由来の免疫グロブリンも卵黄嚢膜を通して胚に供給される (Merad and Wild, 1992)。

4. 造血機能

胚発生期において卵黄嚢が造血器官であることは古くから知られている。ニワトリ胚は、胚発生期の造血を含む胚発生研究にしばしば用いられてきた。これはとりわけ、産卵後の卵を冷蔵することで、その後の胚発生に影響を与えることなく、少なくとも 1 週間は発生プロセスを停止させることができること、インキュベーターに同時に入れることで、すべての卵の発生を同期させることができること、殻を部分的に破ることで発生を容易に観察できることなどが理由である (De Groef *et al.*, 2008)。造血は鳥類や哺乳類の胚発生段階を通じて「波」を描いて起こり、最初のもは「原始的」造血と呼ばれ、その後のものは「確定的」造血と呼ばれる。これらの造血部位は発生過程で移行する (McGrath and Palis, 2005)。これらの部位の造血幹細胞はすべて卵黄嚢に由来するわけではない (Mikkola and Orkin, 2006)。ニワトリとウズラのキメラを使った研究から、幹細胞は側板中胚葉に由来するニワトリの aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域から発生することが示唆されている (Elsaid *et al.*, 2020)。さらに、卵黄嚢が造血に関与する期間は、卵黄嚢が発生を通じて持続する鳥類と、胎盤が形成される頃には卵黄嚢が退縮する哺乳類、特にヒトとでは異なるようである (Guedes *et al.*, 2014)。鳥類と哺乳類の胚の造血部位の模式図を図 5 に示す。

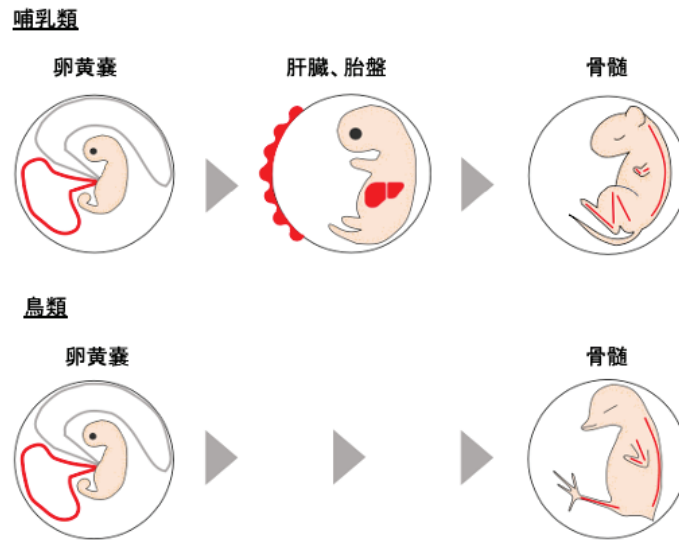


図 5. 哺乳類と鳥類の胚における造血部位（赤色で示す）。卵黄嚢が胚発生を通して持続する鳥類と、胎盤が形成されるまでに卵黄嚢が退縮するほとんどの哺乳類では、造血に関連するさまざまな器官の役割が異なっている可能性がある。哺乳類とは異なり、鳥類では胚肝臓の造血器官としての機能は限定されている。

4-1. 鳥類における卵黄嚢の造血機能

鳥類の胚では、卵黄嚢は骨髓が造血機能を持つまでの間、未熟な胚を支える不可欠な造血組織である（図 5）。ニワトリでは、胚発生の 1 日目（E1）に卵黄嚢で原始的な赤血球造血が観察されている（Nagai *et al.*, 2018）。卵黄嚢は E6 以降、主要な造血部位となり、卵黄嚢の造血機能は E17 以降低下するまで続く。骨髓では、赤血球形成と顆粒球形成が E12-E13 あたりから観察されるが、卵黄嚢での造血も続く（Guedes *et al.*, 2014）。造血細胞は孵卵中期以降、肝臓、脾臓、ファブリキウス嚢、胸腺にも見られる。しかし哺乳類とは異なり、胚肝臓の造血器官としての機能は限られている。

4-2. 哺乳類における卵黄嚢の造血機能

哺乳動物胚における卵黄嚢の造血機能については、その多くがマウスを用いて研究が行われてきた。マウス胚では、胚発生の 7.5 日目（E7.5）から卵黄嚢の中胚葉層で赤血球形成が

観察される。この時期の赤血球のヘモグロビン変異型は、胚発生後期の赤血球とは異なり、酸素に対する親和性が高い。マウス胚では、卵黄囊の造血機能に続いて、E9 で胎盤、E12 で肝臓、E17.5 以降で骨髄が形成される (Alvarez-Silva *et al.*, 2003; Yamane, 2018) マウス胚の卵黄囊では、赤血球と同様に血小板の産生を担う巨核球が E7.25 と E9.5 に見られる。一方、末梢血中の血小板は E10.5 で確認される (Tober *et al.*, 2007)。マクロファージは、E9 とマウス胚の卵黄囊で観察された (Takahashi *et al.*, 1989)。中胚葉からの造血幹細胞形成を制御するシグナルや転写因子としては、BMP4、Flk-1、c-kit、Scl、Lmo2、Gata2、Runx1、CBF β 、Mll、c-Myb、Stat5a、Notch、Hedgehog などが知られており、これらは幹細胞の生成に異なるタイミングで作用する (Jaffredo *et al.*, 2005)。

ヒトの卵黄囊の発生過程はマウスのそれとは異なり、一次卵黄囊が最初に発生し、退化して二次卵黄囊を形成する。一次卵黄囊は一過性であり、その役割は不明なままである (Ross and Boroviak, 2020)。造血は妊娠 3 週頃に二次卵黄囊で機能し始めると報告されている。造血は 8 週目以降に減少し、ヒトの卵黄囊は 10 週目頃に退縮し始める。その後、6~22 週目には肝臓が造血の主要部位として機能し、その後は骨髄が生涯にわたる血球産生の場となる (Palis and Yoder, 2001; Tavian and Peault, 2005)。

卵黄囊における造血機能は、鳥類や哺乳類以外でも報告されている。卵黄囊はヨーロッパイシガメにおける最初の造血部位であることが知られている (Vasse and Beaupain, 1981)。また魚類 (ゼブラフィッシュとニジマス) でも卵黄囊による造血が観察されている (Al-Adhami and Kunz, 1977; Iuchi and Yamamoto, 1983)。

すなわち、骨髄などの造血器官が未熟な発生初期には、代わりに卵黄囊で造血が行われており、この卵黄囊の造血機能は羊膜類だけでなく魚類にも保存されている可能性がある。

5. 代謝組織としての卵黄囊

鳥類の卵黄囊膜は、内胚葉、外胚葉、中胚葉に由来する 3 つの異なる細胞層から構成されていることから、Wong and Uni (2021) は、これを単なる膜ではなく、鳥類の発生過程において不可欠な多機能器官と呼んでいる。鳥類の卵黄囊膜には様々な代謝酵素が存在するが (Wong and Uni, 2021; Nakazawa *et al.*, 2011)、鳥類では孵卵後期になると卵黄囊内の糖

質含量が急激に増加するため (Wong and Uni, 2021)、糖質代謝に注目した。ヒトやげっ歯類などの哺乳類では、代謝器官としての卵黄嚢は、グルコースや脂質などの栄養輸送機能を除いてあまり注目されてこなかったため、ここでは鳥類の卵黄嚢に焦点を絞る。

炭水化物は動物の生存と成長に必要であり、胚発生期においても不可欠である。哺乳類では、炭水化物は(胎盤を介して)継続的に胎児に供給される。一方、鳥類や爬虫類の卵の中の胚は母体から独立しているため、胚発生は卵の中に蓄えられている栄養素だけで行わなければならない。

卵白は重量の90%近くが水分で、タンパク質が約10%、炭水化物は1%以下である。卵黄の重量は、水分が約44%、脂質が約36%、タンパク質が約17%、ミネラルが2%、炭水化物が1%未満である (Romanoff and Romanoff, 1963; Shenstone, 1968)。言い換えれば、卵の総炭水化物含量は1%未満である。

鳥類の成鳥(哺乳類の成体でも同様)では、糖質の代謝は肝臓と腎臓で行われることがよく知られており、肝臓は血糖値の維持に大きな役割を果たしている。血糖値の維持、解糖と糖新生、グリコーゲンの分解と合成、脂質代謝、抗酸化機能など、鳥類の肝臓のさまざまな代謝機能は、ニワトリ胚を用いて長い間研究されてきた (Ballard and Oliver, 1963; Thommes and Just, 1964; Nelson *et al.*, 1966; Freeman, 1969; Shand *et al.*, 1994; Cogburn *et al.*, 2018; Pulikanti *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021)。

鳥類はよく知られた高血糖動物であり、血糖値はハトで約300mg/dl、アヒルで200mg/dl、セキセイインコで330mg/dl、ハチドリでは給餌後に740mg/dlまで上昇する (Harr, 2002; Hargrove, 2005)。ニワトリの血糖値はヒトの約2倍である (Bell and Sturkie, 1965; Beauchat and Chong, 1998)。ニワトリ胚においても高い血糖値が報告されており、9日目 (E9) の血糖値はヒトのレベルを上回り、21日間の卵孵化のE18では成鶏と同等である (Roy *et al.*, 2013)。

卵に貯蔵される炭水化物の割合が低いにもかかわらず、鳥類の胚が高い血糖値を維持しているという事実は、胚の段階で糖新生が起こっていることを示唆している。糖新生とは、糖質以外の物質からグルコースを合成する生化学的経路であり、基質はそれぞれ脂肪分解とタンパク質分解から生じるグリセロールとアミノ酸である (Hazelwood and Lorenz, 1959;

Klasing, 1998)。糖新生は、グルコースを分解してピルビン酸を生成する解糖系の逆経路である。糖新生の経路では、それぞれ 4 つの異なる酵素によって触媒される不可逆的な反応を伴い、これらの酵素は、グルコース-6-ホスファターゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの細胞質アイソザイムとミトコンドリアアイソザイム、ピルビン酸カルボキシラーゼである。哺乳類でも鳥類でも、成体では肝臓と腎臓で糖新生が行われることはよく知られている。大きな臓器である肝臓は、血糖値の維持に重要な役割を果たしている。しかしながら、肝臓だけでは鳥類の胚における糖代謝システム全体を説明することはできない。

Yadgary and Uni (2012) は E11 以降のニワトリ胚を研究し、糖新生酵素（グルコース-6-ホスファターゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ）の mRNA が E13 までに肝臓で発現されることを発見した。また Roy *et al.* (2013) は解糖系酵素の mRNA が E11 までに発現されることを報告した。これらの酵素遺伝子の発現は、その後の孵卵期間を通じて変化した。しかし、これらの時期以前には、肝臓は主要な代謝器官となるには十分な大きさ（E11 の 70 mg に対して、E4 では 0.3 mg、E7 では 5 mg; Romanoff, 1960b）ではない。しかし、孵化開始時から炭水化物含量が低い（前述のように 1%未満）ニワトリ卵では、胚の血糖値を維持・上昇させ、胚発生のためのエネルギーを供給するために、肝臓が機能し始めるよりもずっと早く、糖新生が活性化されなければならない。言い換えれば、肝臓が完全に発達する前に、肝臓以外の代謝器官が糖新生に関与していなければならない。

そこで、卵黄嚢が糖新生に関与している可能性がある (Too *et al.*, 2017; Shibata *et al.*, 2023)。卵黄嚢膜は、ニワトリ卵の孵化期間を通じて、胚内外の器官の中で最も大きい。例えば E17 では、卵黄嚢膜の湿重量 (4.67 g; Too *et al.*, 2017) は胚肝臓 (0.479 g; Romanoff, 1960) の 10 倍近くある。Yadgary and Uni (2012) は、糖新生酵素（グルコース-6-ホスファターゼ、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ）の mRNA が E11 の卵黄嚢膜に発現していることを報告した。また、E1-E4 のニワトリ卵黄嚢膜のマイクロアレイ解析 (Nakazawa *et al.*, 2011) では、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの発現が認められた。これらの知見から、卵黄嚢での糖新生が、肝臓や腎臓がまだ未熟な培養中の胚の血糖値を高く維持するの

に役立っているのではないかと考えられる。

鳥類の卵黄嚢の代謝機能のうち、卵中の脂質の量を考えると、脂質代謝は不可欠である。脂質は卵殻を含む鶏卵の重量の約 10% を占める (Romanoff and Romanoff, 1963)。栄養学的には、脂質 (9 kcal) は重量 (g) あたりのカロリーが炭水化物やタンパク質 (4 kcal) の 2.2 倍以上あり、脂質が体内で水和されないことを考慮すると 6.7 倍となる。

鶏卵卵黄の脂質含量 (w/w) は、トリグリセリド約 62%、リン脂質 33%、コレステロール 5% 未満である。卵黄脂質を構成する主な脂肪酸はオレイン酸 (約 60%)、パルミチン酸 (約 20%)、リノール酸 (約 7%) である。しかし、これらは母鶏の飼料によって著しく異なる (Romanoff and Romanoff, 1963)。

また、すでに述べたように、鳥類の卵黄嚢の上皮細胞では、脂質が受容体を介したエンドサイトーシスによって卵黄から取り込まれ、加水分解された後、再エステル化されてリポタンパク質粒子が構築され、血流を通じて胚に供給される (Speake *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2013; Yadgary *et al.*, 2014; Schneider, 2016)。

組織学的観察により、卵黄嚢膜の上皮細胞の先端表面に多数の絨毛が認められ、卵黄成分が細胞内に取り込まれていることが示された。細胞内では、電子密度が不均一な卵黄顆粒が観察され、リソソームが取り込まれたファゴソームと融合していることが示唆された。細胞内には脂質滴も観察され、その数は E15 から孵化間近にかけて徐々に減少した。さらに、脂質球が上皮細胞の基底側表面からエキソサイトーシスによって放出されているのが観察された (Wakayama and Kusuhara, 1991)。

ニワトリ卵の孵卵期間の最後の週には、1 日あたり 0.5g の脂質が卵黄嚢から胚に輸送される (Noble and Cocchi, 1990)。これらの脂質が通過する卵黄嚢膜の上皮細胞は、脂肪酸デサチュラーゼ、モノアシルグリセロールおよびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、グリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼの活性が高い。したがって、卵黄嚢膜の上皮細胞に取り込まれた卵黄脂質は、卵黄脂質の加水分解/再エステル化や不飽和脂肪酸の合成などのリモデリングを受けるはずである (Speake *et al.*, 1998; Nakazawa *et al.*, 2011)。

細胞内アシル-CoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) は卵黄嚢膜の上皮

細胞に取り込まれたコレステロールを速やかにエステル化し、主生成物はオレイン酸コレステロールであると報告されている (Speake *et al.*, 1998; Shand *et al.*, 1993)。母鶏の卵胞内の卵黄に蓄積された VLDL (VLDLy) の球径 (約 30 nm) は、一般的な VLDL の直径 (約 70 nm) よりも小さい (Salvante *et al.*, 2007)。そのため、表面積が比較的大きく、それに応じて大量のコレステロールが非エステル化極性分子として表面に存在する。このため、コレステロールが胚血中リポタンパク質の主成分である新しいリポタンパク質 (LDL と HDL: Kanai *et al.*, 1996) に再構成される際に、コレステロールのエステル化が必要となる。卵黄囊膜の上皮細胞における豊富な ACAT 活性は、この要求に対応している。

まとめると、鳥類の卵黄囊膜は、単に卵黄脂質を胚に輸送させるのではなく、むしろ脂質を再形成して、胚に供給させるための新しい脂質を作り出している。

6. まとめ

これまで述べてきたさまざまな機能に加え、卵黄囊は血漿タンパク質合成の場でもある。ニワトリ胚のトランスクリプトーム解析から、多くのタンパク質が卵黄囊で合成されることが明らかになった。トランスサイレチン (TTR)、アルブミン、 α -フェトタンパク質などの血漿タンパク質の遺伝子が、様々な代謝酵素、細胞膜トランスポーター、成長因子レセプターに加えて発現している (Yadgary *et al.*, 2014; Nakazawa *et al.*, 2011)。

哺乳類では、ラット胚における TTR、レチノール結合タンパク質、トランスフェリン、 α -フェトプロテインの mRNA 発現は、20 日目頃までの 22 日間の妊娠期間を通じて、肝臓よりも卵黄囊の方が高かった。これらのタンパク質は、主に母親よりも胎児の方向に分泌された (Thomas *et al.*, 1990)。インスリンの父親による発現 (ゲノムインプリンティング) は、ヒト (Moore *et al.*, 2001) とマウス (Deltour *et al.*, 1995) の卵黄囊でも報告されている。したがって、インスリンは胎内での胎児の成長に影響を与えるはずである。

胚を収容するための羊膜、老廃物を捨てるための袋としての尿膜、栄養分を貯蔵するための卵黄囊、そして全体を覆い、外界との物質交換に働く漿膜という。胚外膜の枠組みが、動物が進化の過程で陸上に進出するための基本構造として不可欠であるといえる。第 1 部では特に卵黄囊に焦点を当てた。これまで述べてきたように、卵黄囊は胚の発生に不可欠な栄

養素を吸収、代謝、分配し、初期の造血に寄与し、胚の成長に必要なタンパク質や成長因子を産生する胚外臓器として、発生に不可欠な役割を果たしている。これらの多様な機能を担う遺伝子や転写因子の、卵黄囊上皮細胞における制御の違いを明らかにすることは、興味深いテーマであり、現在私たちの研究室で進行中である。

第2部 ニワトリ胚の発生過程における卵黄囊膜における糖代謝機能の変動

第1節 序論

孵化場では、適切な温度、湿度、換気（そして卵の回転）を与えるだけで胚発生が進む。ニワトリ卵では、他の鳥類の卵と同様、胚の発育に必要な栄養素のほとんどすべてが卵黄と卵白に含まれている。呼吸ガス（酸素と二酸化炭素）と水蒸気は卵殻を通して出入りする。しかし、胎盤を通して母親とつながっている哺乳類の胎児とは異なり、発生中のニワトリ胚に外部から栄養素が供給されることはない。

卵内の栄養素の代謝によって生成される ATP は、形態形成のためのエネルギーとして使われる。推定によれば、湿重量 60 g の鶏卵には 88 kcal のエネルギーが含まれており、45 g のヒヨコが孵化すると 64 kcal のエネルギーに相当する (Etches, 1996)。残りのエネルギーは、熱として放出されたものも含め、形態形成に使われたはずである。その上、卵内には殻を割るのに必要なエネルギーも蓄える必要がある。孵化時に殻を割るためには、大量のエネルギー（鳥の種類や殻の厚さにもよるが、発生過程全体の 10%にも達する）が必要である (Vleck and Bucher, 1998)。

高血糖は他の動物群には見られない鳥類全体の大きな特徴である。ニワトリの血糖値は鳥類の中では特別高いわけではないが、健康なヒトの約 2 倍である (Martinez del Rio and Gutiérrez-Guerrero, 2020)。孵卵中のニワトリ胚の血糖値は、多くの報告で徐々に上昇し (Yarnell *et al.*, 1966; Evans and Scholz, 1973; Lu *et al.*, 2007)、Roy *et al.* (2013)の報告では、孵卵期間の 3 分の 1 を過ぎると 100 mg/dL を超え、孵化時には 200 mg/dL に達する。これらの事実は、胚の高血糖を促進するために使用されるグルコースをまかなうために、卵にも栄養素の貯蔵が必要であることを示している。

ニワトリをはじめとする鳥類の胚では、限られた卵の内容物（卵黄と卵白の栄養素）を代謝して、前述したさまざまな用途に適切に配分し、胚が利用できるようにしなければならないことに注意すべきである。

Romanoff and Romanoff (1963) は鶏卵の卵黄と卵白の構成成分について次のように述べている：卵黄は水分 49%、タンパク質 17%、脂質 33%、炭水化物 1%を含む。卵黄は水分 49%、タンパク質 17%、脂質 33%、炭水化物 1%を含み、卵白は水分 88%、タンパク質

11%、炭水化物 1%を含む。これらの値は卵によって異なり (Romanoff and Romanoff, 1963)、産卵する年齢 (Fletcher *et al.*, 1981; Rossi and Pompei, 1995) や品種によっても異なる。

本研究では、孵卵中のニワトリ卵の卵黄嚢に焦点を当てた。卵黄嚢は袋状の構造で、孵卵 2 日目頃から卵黄の上に拡がり、9 日目頃には卵黄を覆う (Romanoff, 1960a)。卵黄 (または卵黄嚢内容物) を包む卵黄嚢膜 (または卵黄嚢組織) は、孵卵期間を通じて胚および胚外器官の中で最も大きい。例えば孵卵 17 日目では、卵黄嚢膜の湿重量 (4.67 g; Too *et al.*, 2017) は胚の肝臓 (0.479 g; Romanoff, 1960b) の 10 倍近い。卵黄嚢膜には (肝臓や小腸のような) 内胚葉由来の上皮細胞層があり、卵黄を取り込んで適切な形に変換または代謝する (Bauer *et al.*, 2013)。代謝産物は卵黄嚢膜の血管系を通じて胚に送られる。卵白はほとんどの場合、卵黄嚢膜を経由して胚に運ばれる (Yoshizaki *et al.*, 2002)

卵黄嚢膜には様々な代謝酵素が存在する (Nakazawa *et al.*, 2011; Wong and Uni, 2021)。糖質代謝に関しては、卵黄嚢膜はグリコーゲンを蓄積し、グリコーゲンの合成と分解を担う酵素を発現している (Willier, 1968; Yadgary and Uni, 2012)。糖新生酵素も卵黄嚢膜に存在し (Nakazawa *et al.*, 2011; Yadgary and Uni, 2012)、糖新生によって卵における低い炭水化物含量 (すでに記述したように約 1%) を補完している可能性が考えられる。

内胚葉由来の卵黄嚢膜上皮細胞層の機能と制御を明らかにすることは、発生過程で腸上皮と胚の肝臓が完全に機能するようになる前に、ニワトリ胚発生を進めるメカニズムを理解するために不可欠である。

本研究では、卵黄嚢膜の糖質代謝に注目し、この胚外器官が胚発生中の需要に応じて、卵黄から移行した栄養素からどのようにグルコースを産生するのかを明らかにする。これは、孵卵 3 日目から孵卵後 3 日目までの毎日、産卵鶏の発生過程における 5 つの糖新生主要酵素および関連代謝産物の発現と活性を一括して定量化した初めての報告である。

第2節 糖新生酵素の mRNA 発現

(1-1) 実験動物とサンプル採取

レイヤー系統(Hy-Line)の受精卵を日本レイヤー(岐阜県)から購入した。受精卵を 37.8°C、相対湿度 70%の条件下でインキュベートした。孵卵の開始日を Embryonic day 0 (E0) とし、すべての胚は E21 の時点で卵殻の外側にくちばしを出していた。卵黄嚢膜は E3 胚から 3 日齢のヒナ (C3) まで毎日採取した (n=7-9)。卵黄嚢膜は滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で数回交換しながらよく洗い、ろ紙にのせて余分な PBS を吸収させた後、電子天秤で秤量し、直ちに液体窒素で凍結し、-80°Cで保存した。血液は E8-E16 に胚外血管から、E17-E20 に胚心臓から、E21-C3 に素早く断頭して採取した (n=7-9)。採取した血液から血漿を精製し、-60°Cで保存した。すべての動物操作は岐阜大学動物実験福祉委員会の承認を得た。

(1-2) mRNA 発現の測定

TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用して、凍結卵黄嚢膜から total RNA を抽出した。RNase-free DNase 1 (gDNA Remover, TOYOBO, 大阪府)を使用して、製造元の指示に従ってゲノム DNA を除去した。次に、ReverTra Ace (TOYOBO) とランダムプライマー (TOYOBO) を使用して、total RNA(1 μ g)を逆転写して一本鎖 cDNA(first-strand DNA)にした。

mRNA 発現量は、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master (Agilent) 用の二段階標準サイクリングプログラムを備えた Mx3000P Real-Time PCR システム(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で実行されるリアルタイム RT-PCR によって定量した。一回の反応に使用した試薬の容量は、10 μ l の QPCR Master Mix、0.8 μ l の各 10 μ M フォワードおよびリバースプライマー、7.4 μ l の滅菌水、および 1 μ l のテンプレート cDNA であった。実行プログラムは、95°Cで 3 分間の初期変性と、それに続く 95°Cでの 5 秒間の変性および 60°Cでの 20 秒間のアニーリングと伸長反応の 40 サイクルで構成されていた。増幅プログラムに続いて、非特異性を検出するための解離曲線分析を行った。各実験サンプルおよびスタンダードサンプルは 2 回ずつ定量を行った。Mx3000P システムにインストー

ルされたソフトウェアを使用し、プールされた cDNA の連続希釈をスタンダードとして使用して、標準曲線法に従って相対発現値を計算した。逆転写と PCR 増幅の特異性を確認するために、反応にサンプルコントロールは含まれていない。

なお、発現量の補正のために、18s-rRNA と GAPDH をハウスキーピング遺伝子として使用した（リアルタイム RT-PCR によって孵卵期間中の卵黄嚢膜において有意な変化を示さず、最適であることを確認した）。mRNA 発現量は、これらの 2 種のハウスキーピング遺伝子の平均値で補正した値で統計処理を行った（n=7-9）。

リアルタイム RT-PCR に使用されるプライマーを表 1 に示す。G6Pase、FBPase、PEPCK-C、PC、18s-rRNA および GAPDH は、以前に *Gallus gallus* で報告された配列である。また、PEPCK-M のプライマーは、オンラインプライマー設計ソフトウェア Primer3 を使用して、GenBank データベースの *Gallus gallus* のゲノム配列から設計した。

表 1. リアルタイム RT-PCR に使用したプライマー

Gene Name	Accession No.	Primer sequence (5' → 3')	Amplicon length (bp)	Reference
<i>G6Pase</i>	XM_42201.2	F: CATGTA CTT CACTTACTTTTCCTCC R: TATTGTATCAGCGTGGCGTA	137	Roy <i>et al.</i> , 2013
<i>FBPase</i>	AJ276212	F: TTCCATTGGGACCATATTTGG R: ACCCGCTGCCACAAGATTAC	100	Yadgary and Uni, 2012
<i>PEPCK-C</i>	M14229.1	F: TGCTGGTGTGCCTCTTGAT R: CACACGGGAATTCTCTCCAT	295	Roy <i>et al.</i> , 2103
<i>PEPCK-M</i>	NM_205470.1	F: ACACCATCTTCACCAACGTG R: GTCCATAATGGGGCACTGAT	191	Present study
<i>PC</i>	AF509529.1	F: TGGGGCATAAATTC AAGGAG R: GAATTCGACCACGGAGAGAG	194	Roy <i>et al.</i> , 2013
<i>18s rRNA</i>	AF173612.1	F: TCAACTTTTCGATGGTACTGTCTGTG R: CTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT	106	Roy <i>et al.</i> , 2013
<i>GAPDH</i>	NM_204305	F: GAAGCTTACTGGAATGGCTTTCC R: GATATCATCATACTTGGCTGGTTTCTC	97	Van Herck <i>et al.</i> , 2012

(2) 結果

図 6 に糖新生における主要酵素 (G6Pase、FBPase、PEPCK-C、PEPCK-M、PC) の mRNA 発現量の変動を示す。

G6Pase は E3 から C2 までの mRNA 発現量の変化を定量した。mRNA 発現量は E3 から E20 まで同程度で有意差はなかった。mRNA 発現量はその後、E21 から孵化まで有意に増加し、孵化後の C2 で最大となった。

FBPase の mRNA 発現は E3 から E6 まで有意に増加し、孵卵期間を通じて E6 で発現量が最大となった。その後、孵化に向けて徐々に減少する傾向にあり、C3 で発現量が最も低くなった。

PEPCK-C と PEPCK-M は E3 から C3 の期間で定量を行った。PEPCK-C の mRNA 発現量は E3 から E7 まで増加し、E7 で最大に達した。その後 E8 で有意に減少し、E14 まで同程度の発現レベルにとどまった。E15 以降は再び増加し、E17 でピークに達した後、C3 まで減少し続けた。PEPCK-M の mRNA 発現量は E3 から E11 の間で増減を繰り返したが、その後は増加傾向にあった。PEPCK-M の mRNA 発現量は E16 で最大になった後、E21 まで減少する傾向があり、孵化後は低レベルで推移した。

PC の mRNA 発現は E3 から E5 まで増加し、E5 で最大となった。E5 後は E9 まで減少を続け、その後は C3 まで低発現レベルを維持した。

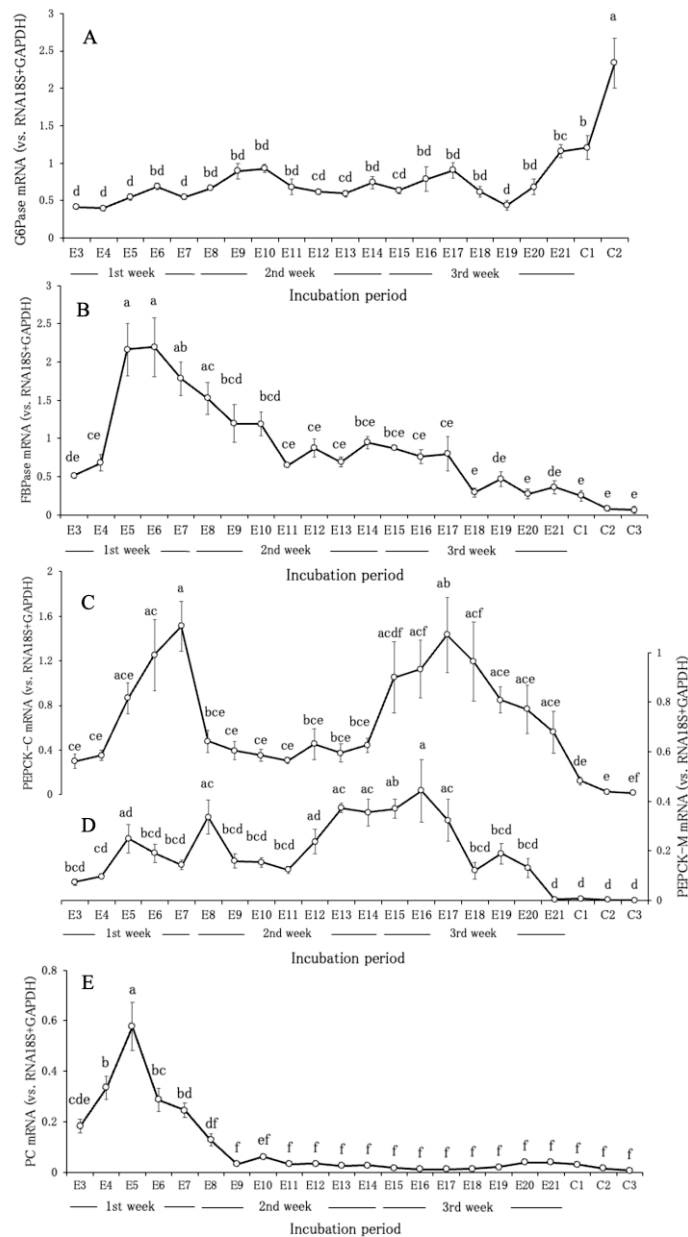


図6. ニワトリ胚および初生雛の卵黄囊膜における糖新生主要酵素の mRNA 発現量の変動 (A) G6Pase (グルコース-6-ホスファターゼ) (B) FBPase (フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ) (C) PEPCK-C (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの細胞質アイソザイム) (D) PEPCK-M (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのミトコンドリアアイソザイム) (E) PC (ピルビン酸カルボキシラーゼ) これらの酵素の相対 mRNA 量は平均値±標準誤差で表した。異なる文字は Turkey の多重比較検定による同一酵素内での有意差を示す (P<0.05)。

第3節 糖新生酵素の酵素活性

(1) 実験材料および方法

(1-1) 酵素液の調製

酵素溶液は、Utter and Keech (1963)の方法を修正して調製した。0.5 gの組織を正確に量り、2.5 mlの0.25 M Sucrose/1 mM EDTA-2Na溶液に入れ、氷冷しながらガラス製ホモジナイザーを使用してホモジナイズした後、4°C、600 × *g*で15分間遠心分離し、細胞核および細胞膜画分を沈殿させた。上澄みを分注し、さらに4°C、8,000 × *g*で15分間遠心分離し、ミトコンドリア画分を沈殿させ、上澄みの一部をG6Pase活性測定用に使用した。

上澄みをさらに4°C、105,000 × *g*で60分遠心分離し、可溶性画分とマイクロソーム画分に分画した後、この上澄みを用いてFBPase活性、PEPCK-C活性の測定に用いた。

ミトコンドリア画分（上澄みを完全除去）を0.25 M Sucrose/1 mM EDTA-2Na溶液2 mlで再懸濁し、4°C、8,000 × *g*で10分間遠心分離し、もう一度ミトコンドリア画分の沈殿を得た後、上澄みを除去してから沈殿に2 mlの0.25 M Sucrose/1 mM EDTA-2Na溶液を加えて再懸濁したものをミトコンドリア画分の酵素液とし、PC活性およびPEPCK-M活性の測定に用いた。なお、ミトコンドリア画分の酵素液は酵素活性を測定する前に、-30°Cで完全に凍結させた後解凍する操作を3回繰り返す、続いて超音波細胞破碎機を用いて30秒間超音波処理を行った。

酵素溶液中のタンパク質はブラッドフォード法 (Bradford, 1976) を改良した方法で測定し、単位タンパク質あたりの酵素活性を算出した。

(1-2) G6Pase 活性

Baginsky *et al.* (1974)の方法に基づいて測定した。酵素液10 μlを37°Cで10分間保温した後、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) : 0.25 M スクロース/1 mM EDTA : 0.1 M グルコース-6-リン酸緩衝液=5:1:2の割合で混合して作製した反応試薬液40 μlを加え37°Cで15分間反応させた。15分後、氷冷しておいた2%アスコルビン酸/10%トリクロロ酢酸溶液100 μlを混和して反応を停止させ、4°C、1,000 × *g*で10分間遠心分離を行

い、上澄みからリン酸を測定した。なお、リン酸測定にはホスファ C テストワコーキット（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）を使用した。

(1-3) FBPase 活性

Opie and Newsholem (1967) および Lutzko and Gibbs (1974) の手法を一部修正して行った。6 mM MgSO₄ · 7H₂O、1 mM EDTA-4Na および 20 mM メルカプトエタノールを含む 50 mM Tris-Buffer (pH7.5) 1.10 ml、0.2 mM NADP 0.08 ml、3.5 U/ml phosphoglucose isomerase 0.08 ml、0.7 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.08 ml および酵素液 0.03 ml を順次プラスチック製セル（光路長 1 cm）内に入れ混和し、25°C で 2 分間インキュベートした。0.1 mM fructose-1,6-bisphosphatase 0.03 ml を加え混和し、反応を開始し、空気を対照として 25°C で反応中の波長 340 nm における吸光度の変化を測定した。

(1-4) PEPCK-C および PEPCK-M 活性

PEPCK 活性は Meyuhas *et al.* (1971) の方法を一部修正して行った。50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4)、1 mM MnCl₂、20 mM NaHCO₃、1 mM PEP、2U malate dehydrogenase、0.25 mM NADH を混合して反応液とした。反応液に酵素溶液 80 μl を加え、30°C で 3 分間インキュベートした後、0.15 mM dGDP を加えて反応を開始させ、波長 340 nm の吸光度の変化を 1 分間隔で 5 分間測定した。

(1-5) PC 活性

Utter and Keerch (1963) の方法を一部修正して行った。3 mM K⁺pyruvate、16 mM KHCO₃ および 5 mM MgCl₂ を含む 0.1 M Tris-buffer (pH 7.8) 1.22 ml、1 mM ATP 0.04 ml、0.05 mM acetyl-CoA 0.04 ml、0.17 mM NADH 0.04 ml および 21.9 U/ml malate dehydrogenase 0.020 ml を順次プラスチックセル（光路長 1cm）内に入れ混和し、30°C で 2 分間インキュベートした（反応液）。反応液に酵素液 20 μl を加え混和し、反応を開始し、空気を対照として 30°C で反応中の波長 340 nm における吸光度の変化を測定した。

(1-6) 酵素活性の算出

酵素活性は以下の式で計算し、最終的に組織中の単位タンパク質 (mg) あたりの活性に換算した。

FBPase、PC および PEPCK 活性：

$$\text{酵素活性 (nmol/min/mg protein)} = V / (\varepsilon \times d \times v) \times (\Delta E / \Delta t) \times 1000 \times 1/P$$

V：反応の最終体積、v：酵素溶液の体積、 ε ：モル吸光係数 (NADH の場合 6.22×10^3)、
d：経路長 (1 cm)、 $\Delta E / \Delta t$ ：1 分間の吸光度の変化率、P：酵素溶液のタンパク質濃度 (mg/mL)

G6Pase 活性：

$$\text{酵素活性 (nmol phosphate/min/mg protein)} = \text{リン酸濃度 (nmol/mL)} \times 1/t \times 1/P$$

t：酵素反応時間 (15 分)、P：酵素溶液のタンパク質濃度 (mg/mL)

(2) 結果

図 7 に酵素活性の変動を示す。

G6Pase 活性は E3 から C3 まで測定した。G6Pase 活性は E3 から E9 まで増加する傾向があり、E9 でピークに達した。E9 以降、G6Pase 活性は低下する傾向にあり、E18 まで同程度の変化を示した。E18 以降は再び増加し、C3 で最大値を示した。

FBPase 活性は E6 から C3 まで測定された。E6 で最も高く最大値を示したが、E7 で減少し、その後 E17 まで徐々に増加する傾向を示した。E17 でピークに達した後、有意に減少し、その後は C3 まで低いレベルで推移した。

PEPCK-C と PEPCK-M の活性は E3 から C3 まで測定した。PEPCK-C の活性は E3 から E5 にかけて有意に上昇し、E5 で最大となった。E5 から E7 にかけて減少し、E7 から E10 にかけて緩やかに増加した後、再び減少し、E14 から E18 にかけて低い活性レベルを維持した。E18 から孵化まではわずかに増加する傾向があり、その後は同程度の活性を維持した。PEPCK-M の活性は E17 に最大に達したが、それ以前の孵卵期間中は低いままであっ

た。E17以降はわずかに減少し、同様の活性レベルを維持した。孵卵期間を通じて、PEPCK-Mの酵素活性はPEPCK-Cよりも低かった。

PC活性はE3からC3まで測定した。PC活性はE3からE5まで有意に上昇し、E5で最大となった。E5からE6にかけて有意に低下した後、C2まで活性レベルは低いままであった。C2からC3にかけて再び上昇した。

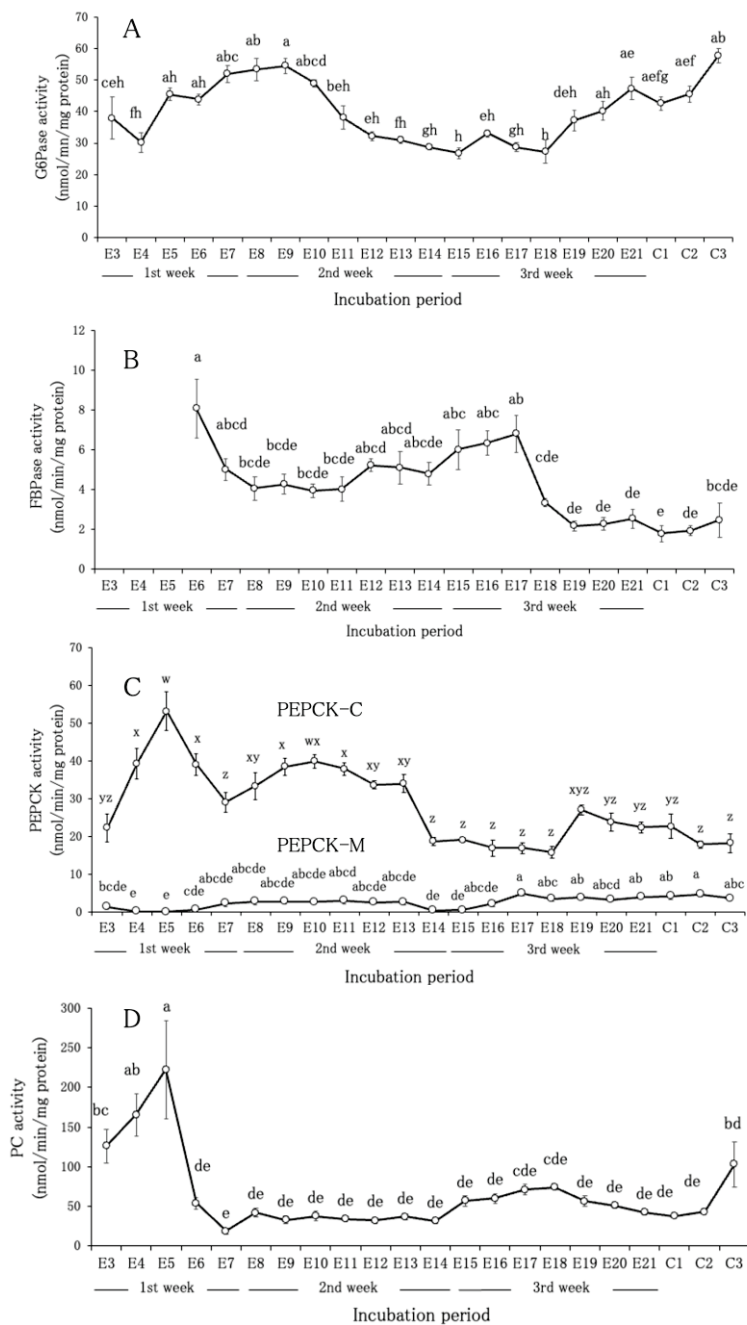


図 7. ニワトリ胚および初生雛の卵黄囊膜における糖新生主要酵素の酵素活性の変動 (A) G6Pase (グルコース-6-ホスファターゼ) (B) FBPase (フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ) (C) PEPCK-C (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの細胞質アイソザイム) PEPCK-M (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのミトコンドリアアイソザイム) (D) PC (ピルビン酸カルボキシラーゼ) これらの酵素活性は平均値±標準誤差で表した。異なる文字は、Turkey の多重比較検定による同一酵素内での有意差を示す(P<0.05)。

第4節 その他代謝産物等の測定

(1) 実験材料および方法

(1-1) 血糖値の測定

血漿グルコース濃度は、グルコース CII テストキット（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪府）を使用して、製造業者の推奨する方法にてグルコースオキシダーゼ法により測定した（n=7-9）。

(1-2) 卵黄囊膜含有グルコース量の測定

卵黄囊膜サンプル 100 mg と 0.5 M クエン酸緩衝溶液 500 μ l を混合し氷上でマイクロホモジナイザーを用いてホモジナイズし、微量遠心管に移した。100°Cで 5 分間加温した後、4°C、13,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、上澄み液を採取した。グルコース CII テストキットを使用して、505 nm の吸光度を測定し、卵黄囊膜中のグルコース量を測定した（n=7-9）

(1-3) 卵黄囊膜含有グリコーゲン量の測定

グリコーゲンの測定は Murat *et al.* (1974) の方法を参考にした。グルコース測定に用いたサンプルおよびグリコーゲン標準液 40 μ l をアミログリコシダーゼ酵素液 100 μ l と混和し、20°Cで 3 時間インキュベートし反応させた後、100°Cで 5 分間加温し反応を停止させた。再度グルコース量の定量を行い、アミログリコシダーゼ酵素の反応前後のグルコース量の差をグリコーゲンに変換されたグルコース量とし、グリコーゲン標準液の結果から卵黄囊膜中のグリコーゲン量を求めた（n=7-9）。

(1-4) 卵黄囊膜含有乳酸濃度の測定

ガラス製ホモジナイザーに 2.5 ml の 1N 過塩素酸と 500 mg の卵黄囊膜サンプルを加え、完全にすりつぶした後、3,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した。0.02 ml のメチルオレンジ指標（50 mg のメチルオレンジを蒸留水 100 ml に加えて調製）と 0.1 ml の 5 M 炭酸カリウム

溶液を加えて攪拌した。さらに 5 M 炭酸カリウム溶液を溶液の色が変わるまで加えた後、10 分間氷上で静置し、上澄み液を集めた。抽出物 0.2 ml を測定サンプルとし、デタミナー LA（ミナリスメディカル株式会社、東京都）を使用して製造業者の推奨する方法にて定量を行った（n=7-9）。

(1-5) 卵黄囊膜の含有脂肪酸およびトリグリセリド量の測定

卵黄囊膜からの総脂質の抽出は、Folch *et al.* (1957)の方法を一部修正して行った。卵黄囊膜サンプルを約 100 mg 量りとり、その 10 倍量の蒸留水を加えて、濃度を 0.1 mg/ μ l とした。破碎装置を利用して組織溶液をビーズ破碎（4,000 rpm、1 分間）した後、破碎液 440 μ l を新しいチューブに移し、メタノール・クロロホルム溶液（1:2）を 1,100 μ l を加え、よく混和した。15,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、下層の有機層から 400 μ l を分注した。80°C で 15 分間、加温して乾燥させた後、メタノール 100 μ l を加えて超音波で分散させ、使用時まで -20°C で保存した。なお、使用時には再度超音波ホモジナイザーで溶液を分散させてから定量に使用した。

卵黄囊膜中の遊離脂肪酸濃度の測定は、ラボアッセイ TM NEFA（ACS・ACOD 法）（富士フィルムワコーシバヤギ株式会社、群馬県）を使用して、製造業者の推奨する方法にて定量を行った（n=7-9）。

卵黄囊膜中のトリグリセリド濃度の測定は、ラボアッセイ TM Triglyceride（GPO・DAOS 法）（富士フィルムワコーシバヤギ株式会社、群馬県）を使用して、製造業者の推奨する方法にて定量を行った（n=7-9）。

(2) 結果

図 8 は、ニワトリ胚の血糖値、卵黄囊膜重量、卵黄囊膜のグルコース含量およびグリコーゲン含量を示す。ニワトリ胚および初生雛の血糖値は E8 で 55.2 mg/dl であったが、徐々に上昇し、E15 で 100 mg/dl を超えた（その後低下したが、再び上昇傾向にあった）。孵化直前の E21 では 203.6 mg/dl が最大値で、孵化後もほとんど変わらなかった。卵黄囊重量

(卵黄を除いた湿重量) はサンプリング開始時の E4 で 0.41 g であったが、発生が進むにつれて増加し、E15 で最大 3.26 g に達した。E17 以降、孵化に向けて卵黄囊膜は収縮し、サンプリング最終日の C3 で最小値 (0.41 g) を示した。卵黄囊膜は C3 でほぼ完全に腸管に吸収された。卵黄囊膜に含まれるグルコース量は E4 で 0.39 mg であったが、孵卵中徐々に増加する傾向にあり、E17 で最大 (11.25 mg) に達した。E17 以降、卵黄囊の湿重量が減少するにつれてグルコース量は減少し、C3 で 0.47 mg に達した。卵黄囊膜に含まれるグリコーゲン量は E4 で 0.46 mg であったが、その後はグルコース量と同様に増加する傾向にあった。最大値は E17 で 102.51 mg (E4 の約 220 倍)、E17 以降は減少し、C3 では 4.39 mg となった。

図 9 は卵黄囊膜中の乳酸濃度の変動を示す。定量初日の E3 で乳酸濃度は 0.53 mg/dl であったが、E5 に向かって上昇し、最大値は 3.10 mg/dl に達した。E5 以降は E12 (E12 で 0.07 mg/dl) まで減少傾向にあり、E13 以降再び増加した。この増加は孵化直前まで徐々に続き、E21 の乳酸濃度は 1.27 mg/dl であった。そして孵化後、乳酸濃度は減少する傾向にあった。

図 10 は卵黄囊膜中の NEFA とトリグリセリド含量の変動を示す。それぞれの含量は E3 から C2 までの期間で測定を行った。NEFA 含量は E3 で 1.34×10^{-4} mEq であり、E14 まで増加し続けた。最大値は E14 で 1.59×10^{-2} mEq であり、E15 以降は減少傾向にあった。トリグリセリド含量は定量初日の E3 で 0.44 mg であり、E16 まで増加し続けた。最大値は E16 の 27.42 mg で、E16 以降は減少傾向にあった。

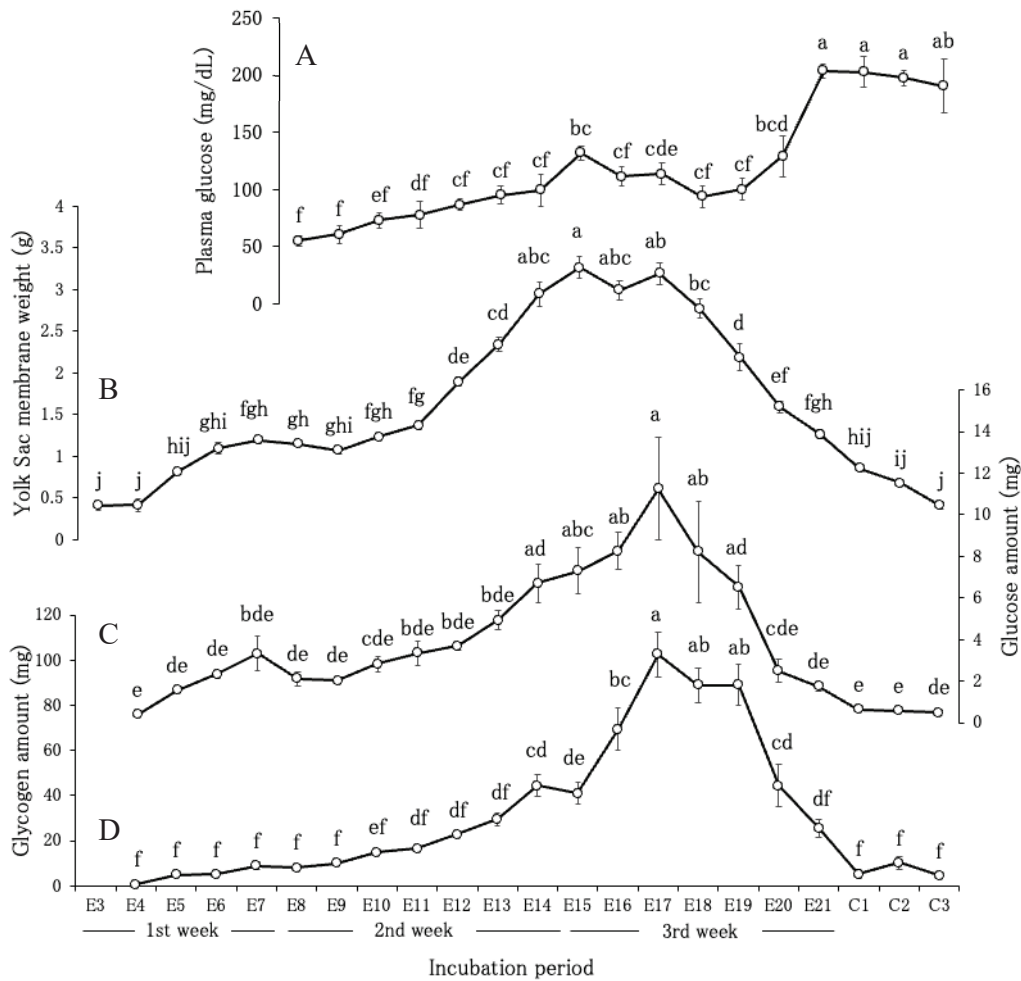


図 8. (A) ニワトリ胚および初生雛の血漿グルコース濃度の変動 (平均±標準誤差、n=7-9) (B) 卵黄囊膜湿重量の変動 (平均±標準誤差、n=7-9) (C) 卵黄囊膜中のグルコース量含有量の変動 (平均±標準誤差、n=7-9) (D) 卵黄囊膜中のグリコーゲン量含有量の変動 (平均±標準誤差、n=7-9)。共通の文字のない平均値は、同じ測定カテゴリ内で有意に異なる ($P < 0.05$)。E および C はそれぞれ胚の孵卵日および孵化後を示す。

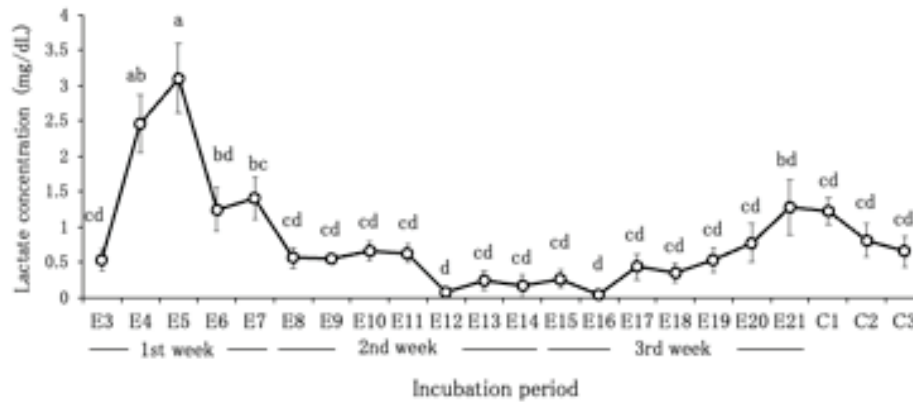


図9. ニワトリ胚および初生雛の発生過程における卵黄囊膜中の乳酸濃度の変動（平均±標準誤差、n=7-9）。共通の文字のない平均値は、同じ測定カテゴリー内で有意に異なる（ $P < 0.05$ ）。EおよびCはそれぞれ胚の孵卵日およびニワトリの孵化翌日を示す。

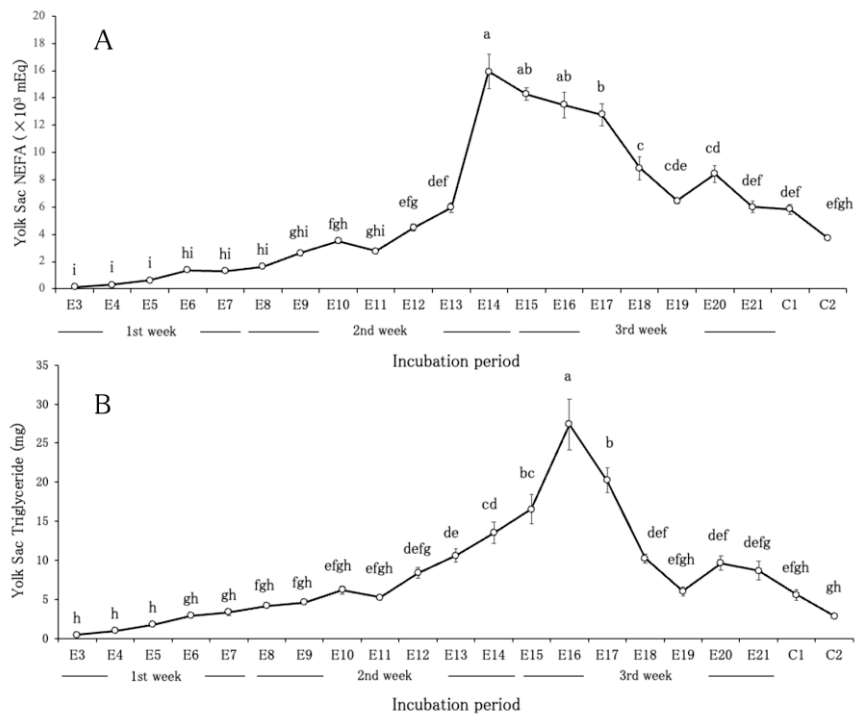


図 10. (A) ニワトリ胚および初生雛の発生過程における卵黄囊膜中の遊離脂肪酸含量（平均±標準誤差、n=7-9）(B) ニワトリ胚および初生雛の発生過程における卵黄囊膜中のトリグリセリド含量（平均±標準誤差、n=7-9）。共通の文字のない平均値は同じ測定カテゴリー内で有意に異なる（ $P < 0.05$ ）。E および C はそれぞれ胚の孵卵日およびニワトリの孵化翌日を示す。

第5節 考察

本研究では、生化学的データから、孵卵中の胚への酸素供給量が非常に変化しやすいことが示唆された。ヒトの運動時の骨格筋でよく知られているように、細胞への酸素供給が不足すると、ミトコンドリアでのエネルギー産生（クエン酸回路およびそれに続く酸化的リン酸化）が不十分となり、乳酸が組織に蓄積する。卵黄囊膜の乳酸濃度の変化（図9）は、特に孵卵の最初の週に、組織の酸素不足が起こることを示唆している。また、有意差はないが、第3週後半に乳酸濃度が上昇する傾向がある。

孵卵1週目～2週目半ば

孵卵中、漿尿膜はE5頃から発生する。E9頃までに内卵殻膜の75%に達し、E12頃までに内卵殻膜と接触して卵全体に広がる（Romanoff, 1960; Tazawa, 1980; Vleck and Bucher, 1998）。漿尿膜では毛細血管が発達し、気泡や卵殻の孔を通して胚と周囲の大気との間で効率的なガス交換ができるようになる。さらに、赤血球とヘモグロビンによる酸素輸送の増加も起こる（Tazawa, 1980）。なお、漿尿膜の毛細血管が完全に発達するまでは、供給される酸素量が胚の要求量を下回ることを直接証明した研究はない。しかし一般的には（Vleck and Bucher, 1998; Moran, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008）、漿尿膜の毛細血管がまだ発達していない孵卵のごく初期段階において、卵黄囊膜の乳酸濃度が特に最初の1週間で高いという私たちの結果（図9）は、孵卵初期に想定される酸素欠乏を裏付けている。

哺乳類や鳥類では、コリ回路が働いている（例えばヒト:Hoffer, 1990; ニワトリ:Watford, 1985）。この回路では、例えば筋肉の嫌気性収縮によって筋肉内で産生された乳酸は、血液を介して肝臓に取り込まれ、糖新生によってグルコースに変換される。グルコースは肝臓から血液中に分泌され、筋肉に取り込まれ、再び乳酸を産生するために使用される。

コリ回路では、乳酸デヒドロゲナーゼによって乳酸からピルビン酸が産生された後、糖新生の3つの一方向性主要酵素（代謝経路の調節ステップに関与する酵素）が働いてグルコース（正確にはグルコース6リン酸）が産生される（Rui, 2014; Hatting *et al.*, 2018）。すなわち、ピルビン酸カルボキシラーゼ（PC）はピルビン酸からオキサロ酢酸への反応を触媒し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）はオキサロ酢酸をホスホエ

ノールピルビン酸に変換する。いくつかの双方向の酵素反応の後、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) が一方向にフルクトース 1,6-ビスリン酸をフルクトース 6-リン酸に変換する。フルクトース 6-リン酸とグルコース 6-リン酸は異性体であり、相互に変換される。

卵黄嚢では、主要酵素 (PC、PEPCK-C、FBPase) の遺伝子発現レベルと活性の両方が、孵卵の最初の週に高い (図 6 および 7)。これらの結果は、卵黄嚢膜 (あるいは血管でつながった胚臓器) で増加した乳酸が、卵黄嚢膜での糖新生に利用される可能性を示唆している。卵黄嚢膜で増加した乳酸が、この組織での糖新生に直接利用されるとすれば、それは「臓器内コリ回路」と呼ぶことができるだろう。

PEPCK アイソザイム

哺乳類と同様、鳥類でも異なる細胞内局在を持つ 2 種類の PEPCK アイソザイムが知られている。ミトコンドリア型 (PEPCK-M) と細胞質型 (PEPCK-C) である (Hod *et al.*, 1986)。げっ歯類を除くほとんどの哺乳類では、両方のタイプの PEPCK が肝臓と腎臓に存在する。一方、成鶏では、肝臓には PEPCK-M のみが存在し、腎臓には両方の型が存在する (Shen and Mistry, 1979a, 1979b; Watford *et al.*, 1981)。一時的な PEPCK-C 遺伝子の発現はニワトリ胚の肝臓でも見られる (Savon *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2013)。

Yadgary and Uni (2012) は、E11 から E21 までの卵黄嚢膜における PEPCK-C の遺伝子発現を報告した。今回の報告は、遺伝子発現と酵素活性の結果から、卵黄嚢膜に両方のアイソザイムが存在することを初めて示したものである。この組織における 2 つのアイソザイムの役割の違いに関する今後の研究が重要であろう。しかしながら、PEPCK-C の酵素活性は PEPCK-M のそれよりもはるかに高い (E4 で 320 倍、E17 で 3.5 倍、実験期間の平均で 31 倍、図 7) ことから、PEPCK-C は卵黄嚢膜での糖新生に量的に多く寄与するアイソザイムであると予想される。

糖新生の炭素源が乳酸である場合、細胞はミトコンドリアと細胞質間の反応に伴う還元当量 (NADH) の移動を必要としない PEPCK-M を使う方が効果的である (Watford *et al.*, 1981; Hod *et al.*, 1986)。しかし、このアイソザイムが細胞内で利用可能であれば、細胞は

乳酸からの糖新生に PEPCK-C を利用することもできる（アスパラギン酸トランスアミナーゼまたはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ反応を介して）（Watford, 1985）。

哺乳類では、PEPCK-M は PEPCK-C とは異なり、循環ホルモンのような因子によって制御されず（Hanson and Reshef, 1997）に発現していることが示唆されている。PEPCK-M 活性レベルは必ずしも遺伝子発現の変化と並行していない（Stark and Kibbey, 2014）。本研究で調べた酵素のうち、PEPCK-M の mRNA と酵素活性が特に一致しないこと（図 6 と図 7 の比較）は、哺乳類における性質と一致している。孵卵中の卵黄囊膜の乳酸濃度と PEPCK-C 活性の変化の特徴が似ていること（図 9 と図 7）は、増加した乳酸からの糖新生が PEPCK-M による定常的なものだけでなく、PEPCK-C の誘導によっても行われていることを示唆しているのかもしれない。卵黄囊膜における乳酸の増加と PEPCK-C の誘導を結びつけるメカニズムの解明は、有望な課題である。例えば、哺乳類の腎臓細胞株 LLC-PK1 では、細胞内 pH に応答した PEPCK-C 遺伝子発現の転写制御が知られている（Curthoys and Gstraunthaler, 2001）。

孵卵 2 週目半ば～3 週目半ば

卵黄囊膜の乳酸濃度（図 9）は、E4 と E5（第 1 週にピーク）以外の日では有意差はないものの、低い傾向にある。これらのデータは、乳酸をあまり産生しない好気性代謝が第 2 週半ばから第 3 週半ばにかけて起こることを示唆している。PC の遺伝子発現と酵素活性（図 6 と 7）はともに、第 1 週目のいくつかの日に比べて有意に低く、これは乳酸からの糖新生があまり活発でないことを示唆している。

Bauer *et al.* (2013) は、卵黄囊膜の内胚葉上皮細胞培養、qPCR、免疫組織化学、in situ ハイブリダイゼーションから、卵黄脂質がエンドサイトーシスによって卵黄膜の上皮細胞に取り込まれ、リソソーム酵素によって処理され、トリグリセリドを含む新しいリポタンパク質（LDL と VLDL）に詰め込まれ、血管系に分泌されることを発見した。卵黄囊膜のトリグリセリド含量は著しく増加し、E14-E17 では有意に高い（図 10）。これらの結果は、卵黄囊膜のトランスクリプトームを解析し、脂質代謝と輸送を担う遺伝子を発見した Yadgary *et al.* (2014) の報告と一致している。

Sato *et al.* (2006) は、レイヤーとブロイラーの E14 および E18 胚の呼吸割合（酸素消費量に対する二酸化炭素排出量の比）は約 0.7 であったと報告している。この結果は、この時期の胚のエネルギー源は主に脂質であることを示している。卵黄から卵黄嚢膜や血管を通過して胚に送られるトリグリセリドを含む脂質が、エネルギー源としての役割を担っていると考えられる。

また、卵黄嚢膜中の遊離脂肪酸含量は、第 2 週半ばから第 3 週半ばにかけて著しく増加する（図 10）。E11 から E21 の卵黄嚢膜ではトリグリセリドリパーゼ活性が確認されている（Yadgary *et al.*, 2013）。卵黄嚢膜内では、増加したトリグリセリドがリパーゼによって加水分解され、遊離脂肪酸が増加する可能性がある。得られた遊離脂肪酸は、エネルギー源として胚に輸送される（あるいは新しいトリグリセリドに再構成される）。

リパーゼがトリグリセリドを加水分解して遊離脂肪酸を生成すると、グリセロールが生成される。グリセロールはピルビン酸に代謝されエネルギー源として利用されるが、ピルビン酸を経由するか直接的に糖新生の源となることもある。Wang *et al.* (2020) は、¹³C 標識による *in vivo* トレーサー実験で、6-18 時間絶食させた成体マウスは、（グリセロールが直接グルコースに変換されるか、ピルビン酸に変換されるかにかかわらず）実質的な糖新生源として乳酸ではなくグリセロールを使用することを見いだした。

グリセロールからの糖新生にはFBPaseによる触媒作用が必要である。本研究では、FBPaseの遺伝子発現は第 3 週半ばまで徐々に減少する傾向にあるが、酵素活性は高いままであった（図 6 および 7）。この結果は、グリセロールからの糖新生が可能であることを示唆している。この時期には、増加したトリグリセリドの分解に由来するグリセロールが卵黄嚢膜での糖新生の主要な供給源になっていると推測される。

孵卵 3 週目後半

第 3 週後半（E18 以降）、卵黄嚢膜の乳酸濃度は有意ではないが増加する傾向にある。また血漿中の乳酸濃度も第 3 週目に測定した：E15-E17 までは一定で、E18 から増加し始め、E19 で有意に増加しピークに達し、E20 と E21 で有意に減少した（ $P < 0.05$, $n = 7-9$ ）。観察された乳酸濃度の増加は、胚の嫌气的環境の増加を反映しているのかもしれない。孵卵末期

には、卵殻外の酸素供給は胚の代謝速度を満たすには不十分であると考えられている (Vleck and Bucher, 1998)。Tazawa *et al.* (1983) は、ニワトリ胚の血中酸素圧が、孵卵末期に向けて発生が進むにつれて低下することを指摘している。

一方、3 週目後半の酵素活性は、G6Pase 活性の上昇を除いて有意な変化はない。遺伝子発現も、G6Pase が有意に増加する以外は、変化しないか低い傾向にある。したがって、卵黄囊膜の糖新生活性は低いと考えられる。

この時期 (E18 以降) には、卵黄囊膜の重量、グルコース量、グリコーゲン量も徐々に有意に減少する (図 8)。卵黄囊膜に貯蔵されたグリコーゲンがグルコースに変換され、胚に供給されることにより、これらの量が減少し、卵黄囊膜の重量が減少すると考えられる。胚に送られたグルコースは、De Oliveira *et al.* (2008) が提唱しているように、孵化時の胚の運動と外部呼吸のエネルギー源になると予想される。

グルコースの貯蔵と分泌

卵黄囊膜での糖新生によって産生されたグルコース 6-リン酸は、(コリ回路のように) 解糖系経路で代謝されるか、グリコーゲンとして貯蔵されるか、グルコースとして血液中に放出されるはずである。グルコースとして放出された場合、単に血中グルコース濃度を上昇させるか、発生と孵化のためのエネルギーとして利用されるか、肝臓などの胚臓器に送られグリコーゲンとして貯蔵されるかの使われ方が考えられる。

卵黄囊膜のグリコーゲンとグルコース含量は、E17 のピークに向かって増加する (図 8)。この傾向は、これまでの報告 (Thommes and Just, 1964; Yadgary and Uni, 2012) と一致している。Yadgary and Uni (2012) は、卵黄囊膜のグリコーゲン合成酵素の遺伝子発現が、E11-E21 の間に、ほぼ直線的に徐々に増加することを報告している。これらの結果は、卵黄囊膜にグリコーゲンが孵卵期間中継続的に貯蔵されていることを示している。Willier (1968) は E5 から E15 のニワトリ胚の卵黄囊膜におけるグリコーゲンの細胞内局在を詳細に組織学的に検討し、グリコーゲンの合成、貯蔵、輸送の流れが頂膜側 (卵黄) から基底膜側 (血管) へ向かっていることを示唆した。

G6Pase 活性は E14 までと E18 以降で有意に高いか、高い傾向にあるが、その活性は孵卵期間中続く。これらのデータは、Kusuhara and Ishida (1974) による卵黄囊膜の酵素組織化学的観察で、G6Pase が E12 から E20 まで細胞質で一様に検出されたことと一致する。グルコースは細胞膜のグルコーストランスポーターを通過できるが、グルコース 6 リン酸は通過できないので、G6Pase の存在によって卵黄囊膜のグルコースが血液中に分泌される。Kusuhara and Ishida (1974) の所見と本研究は、ニワトリの卵黄囊が肝臓や腎臓のように血液中にグルコースを分泌できる器官であることを意味している。

E3 から C3 まで毎日採取したサンプルについて、Rice *et al.* (2014) の論文 (F: GAAGGTGGAGGAGGCCAAA, R: TTTCATCGGGTCACAGTTTCC) で使用したニワトリプライマーセットを用いてコンベンショナル PCR を行い、インスリン非依存性グルコーストランスポーター GLUT2 が全日で卵黄囊膜に発現していることを確認した (データは示していない)。卵黄囊膜における GLUT2 の遺伝子発現は、E2-E4 については Nakazawa *et al.* (2011) が報告している。Yadgary *et al.* (2011, 2014) は、E11 と E21 の間に、GLUT2 と別のグルコーストランスポーターであるナトリウムグルコーストランスポーター (SGLT1) の遺伝子発現を発見した。哺乳類の小腸 (Drozdowski and Thomson, 2006) および腎臓 (Ghezzi *et al.*, 2018) では、SGLT1 は先端側に、GLUT2 は基底側に局在している。卵黄囊膜の細胞におけるこれらのトランスポーターの組織学的局在は報告されていないが、本研究で示された E3 から C3 までの GLUT2 の毎日の存在は、卵黄囊膜で合成され貯蔵されたグルコースが、この期間に実際に血管に分泌され、血糖値を上昇させる可能性を示唆している。

第6節 結論

鳥類は高血糖の動物であり、胚発生の過程で血糖値は徐々に上昇する。ニワトリ胚の孵卵期間中の血中グルコース濃度を調査した報告によると、孵化に向けて血中グルコース濃度は上昇する傾向にある。しかし興味深いことに、これらの報告では増加は直線的ではない。例えば、Roy *et al.* (2013) は、E9-E13、E14-E17、E18-E21 では血糖値は有意に上昇しなかったと報告している。本研究では、E15 で血糖値が有意に上昇した後、E20 でのみ血糖値が有意に上昇した (図 8)。血糖値の特徴の違いは、使用した鶏の品種によるものかもしれない。しかし、特定の期間で上昇が見られないということは、その期間中、新たに生成されたグルコースが主に血糖値の上昇以外に使われたことを意味すると考えられる。本研究の結果と一致すると、グルコースはグリコーゲンとして貯蔵されるために使用されたと推測できる。このことは、E15-E17 (E19) の間に卵黄囊膜のグリコーゲンが有意かつ持続的に増加したことからも支持される (図 8)。

本研究では、産卵鶏のニワトリ胚を用い、孵卵期間のできるだけ初期から孵化直後まで、代謝産物や遺伝子の発現、酵素の活性を毎日測定した。この実験により、孵卵期間中の環境 (酸素供給など) や発育の必要性に応じた卵黄囊膜によるグルコース産生の首尾一貫した姿を提示することができた。今回の結果は、個々のプロセスに関する今後の詳細な研究への布石となるだろう。さらに、Willier (1968) が卵黄とニワトリ胚の間の卵黄物質の移動の「中継点」と呼んだ卵黄囊膜に関して、この研究は、何が (ホルモン、代謝因子、細胞内シグナル伝達分子) 切り替えの制御をしているのか、いつ切り替えが起こるのか、それぞれの代謝の流れはどの程度大きいのか、という問題を、未解決の重要な生化学的問題として提起している。

総合結論

本研究では、羊膜動物の胚発生に不可欠な胚体外膜のうち、進化上もっとも古くから存在すると言われている「卵黄嚢」に着目した。卵黄嚢は卵黄の表面を覆う巨大な膜組織であるが、その機能は単に卵黄に蓄えられた栄養を胚に送るだけではない。特に発生の初期段階、胚の臓器が未成熟・未完成のうち、胚内臓器の代わりに卵黄嚢が様々な働きをしていることが報告されている。

本論文の第1部では、鳥類と哺乳類を中心に、脊椎動物の卵黄嚢の構造や発生、機能について比較し、まとめた。卵黄嚢は卵黄に蓄えられた栄養素を胚に輸送するだけの器官ではなく、造血機能、エネルギー代謝、生理活性物質の発現など、様々な機能を有することで、胚発生を支えている。これらの機能は、胚発生の間、卵黄嚢が継続して存在し続けている爬虫類や鳥類に限らず、母体と胎児が胎盤を介して接続されていて卵黄嚢の存在が一時的である哺乳類においても共通している。すなわち、脊椎動物では正常な胚発生に卵黄嚢は必要不可欠な臓器であるといえる。

さらに、卵黄嚢の有する代謝機能のうち、特に「糖代謝」に関する機能について、より詳細を明らかにすることを試み、本論文の第2部にまとめた。卵黄嚢膜における糖新生主要酵素の発現および酵素活性、さらにグルコース、グリコーゲン、乳酸、遊離脂肪酸およびトリグリセリドなどの代謝産物を、孵卵期間を通して孵化直後まで毎日測定した。これらのデータを統合することによって、卵黄嚢膜における糖代謝機能が画一的なものではなく、胚の酸素環境や発生段階に伴うエネルギー需要の変動に合わせて巧みに変化していることを発見した。

以上より、多様な役目を担う「卵黄嚢」について、その機能をより明らかにすることができたと考える。と同時に、卵黄嚢にはまだ不明な点も多く、その全貌をより詳細に解明することは興味深いテーマであるといえる。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、岐阜大学教授 岩澤淳先生には終始適切な助言と丁寧なご指導を賜りました。心より感謝いたします。また、岐阜大学教授 八代田真人先生と静岡大学教授 笹浪知宏先生には研究の進め方などについて丁寧なご指導を賜りました。謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、サンプル採取および論文の作成をお手伝いいただきました岐阜大学比較生化学研究室の牧原菜々子さんに深く感謝いたします。また、本研究に多大なご協力をいただいた本研究室の皆様に感謝いたします。

引用文献

Al-Adhami MA and Kunz YW. (1977). Ontogenesis of haematopoietic sites in *Brachydanio rerio* (Hamilton-buchanan) (teleostei). *Dev. Growth. Differ*, 19: 171-179.

Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaün J and Dieterlen-Lièvre F. (2003). Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*, 130: 5437-5444.

Baginski ES, Foà, PP and Zak B. (1974). Glucose-6 phosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU ed.). Vol. 2. pp. 876-880. Academic Press, New York and London.

Ballard FJ and Oliver IT. (1963). Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 578-588.

Bauer R, Plieschnig JA, Finkes T, Riegler B, Hermann M and Schneider WJ. (2013). The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288:1088–1098.

Beuchat CA and Chong CR. (1998). Hyperglycemia in hummingbirds and its consequences for hemoglobin glycation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol*, 120: 409-416.

Bell DJ and Sturkie PD. (1965). Chemical composition of blood. In: *Avian Physiology* 2nd edition (Sturkie PD, ed.), pp.32-84, Cornell University Press. Ithaca.

Berdahl DM, Blaine J, Van Voorhis B and Dokras A. (2010). Detection of enlarged yolk sac on early ultrasound is associated with adverse pregnancy outcomes. *Fertil Steril*, 94: 1535-1537.

Blair JE and Hedges SB. (2005). Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Mol. Biol. Evol*, 22: 2275–2284.

Blackburn DG. (2020). Functional morphology, diversity, and evolution of yolk processing specializations in embryonic reptiles and birds. *J. Morphol*, 2021: 995-1014.

- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Burton GJ, Hempstock J and Jauniaux E. (2001). Nutrition of the human fetus during the first trimester - a review. *Placenta*, 22: S70-76.
- Campbell J, Wathen NC, Merryweather I, Abbott R, Muller D and Chard T. (1994). Concentrations of vitamins A and E in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed*, 71: F49-50.
- Carter AM and Enders AC. (2004). Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod. Biol. Endocrinol*, 2: 46.
- Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Elliot MG, Gong S, Burton GJ and Charnock-Jones DS. (2017). RNA-seq reveals conservation of function among the yolk sacs of human, mouse and chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 114: E4753-4761.
- Cogburn LA, Trakooljul N, Chen C, Huang H, Wu CH, Carr W, Wang X and White III HB. (2018). Transcriptional profiling of liver during the critical embryo-to-hatchling transition period in the chicken (*Gallus gallus*). *BMC Genomics*, 19: 695.
- Curthoys NP and Gstraunthaler G. (2001). Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 281: F381-90.
- Darras VM. (2019). The role of maternal thyroid hormones in avian embryonic development. *Front. Endocrinol*, 10: 1-10.
- De Groef B, Grommen SVH and Darras VM. (2008). The chicken embryo as a model for developmental endocrinology: development of the thyrotropic, corticotropic, and somatotropic axes. *Mol. Cell. Endocrinol*, 293:17-24.
- Deltour L, Montagutelli X, Guenet JL, Jami J and Páldi A. (1995). Tissue- and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene, *Ins2*. *Dev. Biol*,

168: 686-688.

De Oliveira JE, Uni Z and Ferket PR. (2008). Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *World's Poultry Science Journal*, 64: 488-499.

Drozdowski L and Thomson ABR. (2006). Intestinal sugar transport. *World Journal of Gastroenterology*, 12: 1657-1670.

Elsaid R, Soares-da-Silva F, Peixoto M, Amiri D, Mackowski N, Pereira P, Bandeira A and Cumano A. (2020). Hematopoiesis: a layered organization across chordate species. *Front. Cell. Dev. Biol*, 8: 606642.

Etches RJ. Embryonic development. (1996). In: *Reproduction in Poultry* (Etches RJ ed.). pp. 40-73. CAB International. Oxon.

Evans RM and Scholz RW. (1973). Development of renal gluconeogenesis in chicks fed high fat and high protein "carbohydrate-free" diets. *Journal of Nutrition*, 103: 242-250.

Exalto N. (1995). Early human nutrition. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 61: 3-6.

Farese RV Jr, Cases S, Ruland SL, Kayden HJ, Wong JS Young SG and Hamilton RL. (1996). A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice. *J. Lipid. Res*, 37: 347-360.

Fletcher DL, Britton WM, Rahn AP and Savage SI. (1981). The influence of layer flock age on egg component yields and solids content. *Poultry Science*, 60: 983-987.

Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.

Freeman BM. (1969). The mobilization of hepatic glycogen in *Gallus domesticus* at the end of incubation. *Comp. Biochem. Physiol*, 28: 1169-1176.

Freyer C, Zeller U and Renfree MB. (2003). The marsupial placenta: a phylogenetic analysis. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol*, 299: 59-77.

- Freyer C and Renfree MB. (2009). The mammalian yolk sac placenta. *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol*, 312B: 545-554.
- Galdos-Riveros AC, Favaron PO, Will SEAL, Miglino MA and Maria DA. (2015). Bovine yolk sac: from morphology to metabolomic and proteomic profiles. *Genet. Mol. Res*, 14: 6223-6238.
- Ghezzi C, Loo DDF and Wright EM. (2018). Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia*, 61: 2087–2097.
- Groothuis TGG and von Engelhardt N. (2005). Investigating maternal hormones in avian eggs. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1046: 168-180.
- Guedes PT, Oliveira BCEPDd, Manso PPdA, Caputo LFG, Cotta-Pereira G and Pelajo-Machado M. (2014). Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. *PLoS One*, 9: e90975.
- Hanson RW, Reshef L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, 66: 581-611.
- Hargrove JL (2005) Adipose energy stores, physical work, and the metabolic syndrome: lessons from hummingbirds. *Nutr. J*, 4: 36.
- Harr KE. (2002). *Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review*. *Vet. Clin. Pathol*, 31: 140-151.
- Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK and Puigserver P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411: 21-35.
- Hazelwood RL and Lorenz FW. (1959). Effects of fasting and insulin on carbohydrate metabolism of domestic fowl. *Am. J. Physiol*, 197: 47-51.
- Hesseldahl H and Larsen JF. (1969). Ultrastructure of human yolk sac: Endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am. J. Anat*, 126: 315-335.

- Hod Y, Cook JS, Weldon SL, Short JM, Wynshaw-Boris A and Hanson RW. (1986). Differential expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 478: 31-45.
- Hoffer LJ. (1990). Cori cycle contribution to plasma glucose appearance in man. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14: 646-648.
- Iuchi I and Yamamoto M. (1983). Erythropoiesis in the developing rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*: histochemical and immunochemical detection of erythropoietic organs. *J. Exp. Zool*, 226: 409-417.
- Ivanisevic M, Djelmis J, Jalsovec D and Bljajic D. (2006). Ultrasonic morphological characteristics of yolk sac in pregnancy complicated with type - 1 diabetes mellitus. *Gynecol Obstet Invest*, 61: 80-86.
- Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C and de Bruijn M. (2005). From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp. Hematol*, 33: 1029-1040.
- Jauniaux E, Johns J, Gulbis B, Spasic-Boskovic O and Burton GJ. (2007). Transfer of folic acid inside the first-trimester gestational sac and the effect of maternal smoking. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 197: e1-6.
- Jollie WP. (1990). Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. *Teratology*, 41: 361-381.
- Jones CJ and Jauniaux E. (1995). Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. *Micron*, 26: 145-173.
- Jones CJP (1997) The life and death of the embryonic yolk sac. In: *Embryonic medicine and therapy*. (Jauniaux E, Barnea ER and Edwards RG, eds.), pp.180-196, Oxford University Press. Oxford.
- Kanai M, Soji T, Sugawara E, Watari N, Oguchi H, Matsubara M and Herbert DC. (1996).

Participation of endodermal epithelial cells on the synthesis of plasma LDL and HDL in the chick yolk sac. *Microsc. Res. Techniq*, 35: 340-348.

Karlsen HO, Johnsen SL, Rasmussen S, Trae G, Reistad HM and Kiserud T. (2019). The human yolk sac size reflects involvement in embryonic and fetal growth regulation. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 98: 176–182.

Klasing KC. (1998). Ontogeny of digestive capacity and strategy. In: *Comparative Avian Nutrition*. pp.62-63, CAB International. New York.

Kozyraki R and Gofflot F. (2007). Multiligand endocytosis and congenital defects: roles of cubilin, megalin and amnionless. *Curr. Pharm. Des*, 13: 3038-3046.

Kusuhara S, Ishida K. (1974). Histochemical observations on the enzymes of chicken yolk sac membrane. *British Poultry Science*, 15: 391-394.

Latzko E and Gibbs M. (1974). Alkalische C1 Fructose-1,6-disphosphatase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU ed.). Vol. 3. pp. 881-884. Academic Press. New York and London.

Lindsay DJ, Lovett IS, Lyons EA, Levi CS, Zheng XH, Holt SC and Dashefsky SM. (1992). Yolk sac diameter and shape at endovaginal US: predictors of pregnancy outcome in the first trimester. *Radiology*, 183: 115-118.

Lloyd JB, Beckman DA and Brent RL. (1998). Nutritional role of the visceral yolk sac in organogenesis-stage rat embryos. *Reprod. Toxicol*, 12: 193-195.

Lloyd JB, Brent RL and Beckman DA. (1996). Sources of amino acid for protein synthesis during early organogenesis in the rat. III. methionine incorporation. *Placenta*, 17: 629-634.

Lu JW, McMurtry JP and Coon CN. (2007). Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. *Poultry Science*, 86: 673-683.

Martinez del Rio C and Gutiérrez-Guerrero YT. (2020). An evolutionary remedy for an

abominable physiological mystery: Benign hyperglycemia in birds. *Journal of Molecular Evolution*, 88: 715–719.

McGrath KE and Palis J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp. Hematol*, 33: 1021-1028.

Merad Z and Wild AE. (1992). The route of maternal IgM transport to the rabbit fetus. *Placenta*, 13: 291-304.

Meyuhas O, Boshwitz C and Reshef L. (1971). Phosphoenolpyruvate carboxylase decarboxylation catalyzed reaction in cytosol of rat adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 250: 224-237.

Mikkola HKA and Orkin SH. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133: 3733-3744.

Mobbs IG and McMillan DB. (1981). Transport across endodermal cells of the chick yolk sac during early stages of development. *American Journal of Anatomy*, 160: 285–308.

Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB Christensen EI and Nexø E. (1996). Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 93: 8612-8617.

Moore GE, Abu-Amero SN, Bell G, Wakeling EL, Kingsnorth A, Stanier P, Jauniaux E and Bennett ST. (2001). Evidence that insulin is imprinted in the human yolk sac. *Diabetes*, 50: 199-203.

Moran Jr. ET. (2007). Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poultry Science*, 86: 1043–1049.

Murat JC and Serfaty A. (1974). Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clinical Chemistry*, 20: 1576-1577.

Nagai H, Shin M, Weng W, Nakazawa F, Jakt LM, Alev C and Sheng G. (2018). Early hematopoietic and vascular development in the chick. *The International Journal of*

Developmental Biology, 62: 137-144.

Nakazawa F, Alev C, Jakt LM and Sheng G. (2011). Yolk sac endoderm is the major source of serum proteins and lipids and is involved in the regulation of vascular integrity in early chick development. *Developmental Dynamics*, 240: 2002–2010.

Nelson P, Yarnell G and Wagle SR. (1966). Biochemical studies of the developing embryo: II. Studies on CO₂ fixation enzymes. *Arch. Biochem. Biophys*, 114: 543-546.

Noble RC and Cocchi M. (1990). Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Prog. Lipid. Res*, 29: 107-140.

Nogales FF, Beltran E and Gonzalez F. (1993). Morphological changes of the secondary human yolk sac in early pregnancy wastage. In: *The Human Yolk Sac and Yolk Sac Tumors* (Nogales FF ed.). pp. 174-194. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Opie LH and Newsholeme EA. (1967). The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochemical Journal*, 103: 391-399.

Ornoy A and Miller RK. (2023). Yolk sac development, function and role in rodent pregnancy. *Birth. Defects. Res*, 2023: 1-12.

Palis J and Yoder MC. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp. Hematol*, 29: 927-936.

Papaioannou GI, Syngelaki A, Poon LC, Ross JA and Nicolaides KH. (2010). Normal ranges of embryonic length, embryonic heart rate, gestational sac diameter and yolk sac diameter at 6 - 10 weeks. *Fetal Diagn Ther*, 28: 207-219.

Pereda TJ and Motta PM. (1999). New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Med. Electron. Microsc*, 32: 67-78.

Pereda J, Correr S and Motta PM. (1994). The structure of the human yolk sac: A scanning and transmission electron microscopic analysis. *Arch. Histol. Cytol*, 57: 107-117.

Plonne D, Winkler L, Franke H and Dargel R. (1992). The visceral yolk sac -an important site of synthesis and secretion of apolipoprotein B containing lipoproteins in the fetoplacental unit of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1127: 174-185.

Pulikanti R, Peebles ED, Keirs RW, Bennett LW, Keralapurath MM and Gerard PD. (2010). Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation. *Poult. Sci*, 89: 860-865.

Rice BB, Zhang W, Bai S, Siegel PB, Cline MA and Gilbert ER. (2014). Insulin-induced hypoglycemia associations with gene expression changes in liver and hypothalamus of chickens from lines selected for low or high body weight. *General and Comparative Endocrinology*, 208: 1-4.

Romanoff AL. The extraembryonic membranes. (1960a). In: *The Avian Embryo* (Romanoff AL ed.). pp. 1038-1140. The Macmillan. New York.

Romanoff AL. Appendix. (1960b). In: *The Avian Embryo* (Romanoff AL ed.). pp. 1141-1151. The Macmillan. New York.

Romanoff AL and Romanoff AJ. (1963). Chemical composition. In: *The Avian Egg* (Romanoff AL and Romanoff AJ eds.). pp. 311-366. John Wiley and Sons. New York.

Ross C and Boroviak TE. (2020). Origin and function of the yolk sac in primate embryogenesis. *Nat. Commun*, 11: 1-14.

Rossi M and Pompei C. (1995). Changes in some egg components and analytical values due to hen age. *Poultry Science*, 74: 152-160.

Roy TK, Iwasawa A, Shimizu Y, Kageyama K and Yoshizaki N. (2013). Ontogenic profile of gluconeogenic key enzyme gene expressions in embryonic chicken liver and muscle. *Journal of Poultry Science*, 50: 381-387.

Roy TK, Iwasawa A, Shimizu Y, Kageyama K and Yoshizaki N. (2013). Ontogenic profile of hexokinase and glucokinase mRNA expressions in embryonic chicken liver and muscle. *J. Poult. Sci*, 50: 270-274.

- Rui L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4: 177-197.
- Salvante KG, Lin G, Walzem RL and Williams TD. (2007). Characterization of very-low density lipoprotein particle diameter dynamics in relation to egg production in a passerine bird. *J. Exp. Biol*, 210: 1064-1074.
- Sato M, Tachibana T, Furuse M. (2006). Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143: 382-388.
- Savon S, Hakimi P and Hanson RW. (1993). Expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase in avian liver during development. *Biology of the Neonate*, 64: 62-68.
- Schneider WJ. (2016). Lipid transport to avian oocytes and to the developing embryo. *J. Biomed. Res*, 30: 174-180.
- Shand JH, West DW, McCartney RJ, Noble RC and Speake BK. (1993). The esterification of cholesterol in the yolk sac membrane of the chick embryo. *Lipids*, 128: 621-625.
- Shand JH, West DW, Noble RC and Speake BK. (1994). The esterification of cholesterol in the liver of the chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta*, 1213: 224-230.
- Shen CS and Mistry SP. (1979a). Development of gluconeogenic, glycolytic, and pentose-shunt enzymes in the chicken kidney. *Poultry Science*, 58: 663-667.
- Shen CS and Mistry SP. (1979b). Effect of fasting and fasting and refeeding on hepatic and renal gluconeogenic enzymes in the chicken. *Poultry Science*, 58: 890-895.
- Shenstone FS. (1968). The gross composition, chemistry, and physical-chemical basis organization of the yolk and white. In: *Egg Quality: A Study of the Hen's Egg*. (Carter TC, ed.), pp. 89-103, Oliver and Boyd. Edinburgh.
- Sheng G and Foley AC. (2012). Diversification and conservation of the extraembryonic tissues in mediating nutrient uptake during amniote development. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1271: 97-103.

Shibata M, Iwasawa A and Yayota M. (2023). Gluconeogenesis in the yolk sac membrane: enzyme activity, gene expression and metabolites during development of the layer chicken. *J. Poult. Sci*, 60: accepted for publication.

Speake BK, Murray AM and Noble RC. (1998). Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid. Res*, 37: 1-32.

Speier JS, Yadgary L, Uni Z and Wong EA. (2012). Gene expression of nutrient transporters and digestive enzymes in the yolk sac membrane and small intestine of the developing embryonic chick. *Poul. Sci*, 91: 1941-1949.

Stampone C, Nicotra M, Muttinelli C and Cosmi EV. (1996). Transvaginal sonography of the yolk sac in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound*, 24: 3-9.

Stark R and Kibbey RG. (2014). The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840: 1313-1330.

Starck JM. (2021). Morphology of the avian yolk sac. *J. Morphol*, 282: 959-972.

Stern CD and Downs KM. (2012). The hypoblast (visceral endoderm): an evo-devo perspective. *Development*, 139: 1059-69.

Takahashi K, Yamamura F and Naito M. (1989). Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J. Leukoc. Biol*, 45: 87-96.

Tavian M and Peault B. (2005). The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Exp. Hematol*, 33: 1062-1069.

Tazawa H. (1980). Oxygen and CO₂ exchange and acid-base regulation in the avian embryo. *American Zoologist*, 20: 395-404.

Tazawa H, Visschedijk AH, Wittmann J, Piiper J. (1983). Gas exchange, blood gases and acid-base status in the chick before, during and after hatching. *Respiration Physiology*, 53: 173-

185.

Thomas T, Southwell BR, Schreiber G and Jaworowski A. (1990). Plasma protein synthesis and secretion in the visceral yolk sac of the fetal rat: Gene expression, protein synthesis and secretion. *Placenta*, 11: 413-430.

Thommes RC and Just JJ. (1964). Endocrine control of yolk sac membrane glycogen levels in the developing chick embryo. I. Glucagon. *General and Comparative Endocrinology*, 4: 614-623.

Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, de Mesy-Bentley KK, Waugh R and Palis J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblastprecursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*, 109: 1433-1441.

Too HC, Shibata M, Yayota M, Darras VM and Iwasawa A. (2017). Expression of thyroid hormone regulator genes in the yolk sac membrane of the developing chicken embryo. *Journal of Reproduction and Development*, 63: 463-472.

Utter MF and Keerch DB. (1963). Pyruvate carboxylase I Nature of the reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 238: 2603-2608.

Van Herck SLJ, Geysens S, Delbaere J, Tylzanowski P and Darras M. (2012). Expression profile and thyroid hormone responsiveness of transporters and deiodinases in early embryonic chicken brain development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349: 289-297.

Vasse J and Beaupain D. (1981). Erythropoiesis and haemoglobin ontogeny in the turtle *Emys orbicularis* L. *J. Embryol. Exp. Morph*, 62: 129-138.

Vleck CM and Bucher TL. (1998). Energy metabolism, gas exchange, and ventilation. In: *Avian Growth and Development* (Starck JM and Ricklefs RE eds.). pp. 89-116. Oxford University Press. New York.

Wakayama T and Kusuhara S. (1991). Yolk absorption in the chick before and after hatching –ultrastructural study of the yolk sac, intestine and liver–. *Jpn. Poult. Sci*, 28:

321-327. (In Japanese with English abstract)

Wang Y, Kwon H, Su X and Wondisford FE. (2020). Glycerol not lactate is the major net carbon source for gluconeogenesis in mice during both short and prolonged fasting. *Molecular Metabolism*, 31: 36-44.

Watford M. (1985). Gluconeogenesis in the chicken: Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Federation Proceedings*, 44: 2469-2474.

Watford M, Hod Y, Chiao YB, Utter MF and Hanson RW. (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. *Journal of Biological Chemistry*, 10: 10023-10027.

Willier BH. (1968). Glycogen synthesis, storage and transport mechanisms in the yolk-sac membrane of the chick embryo. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 161: 89-117.

Wong EA and Uni Z. (2021). Centennial review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poultry Science*, 100: 1008212021: 1-13.

Xu E, Zhang L, Yang H, Shen L, Feng Y, Ren M and Xiao Y. (2019). Transcriptome profiling of the liver among the prenatal and postnatal stages in chickens. *Poult. Sci*, 98: 7030-7040.

Yadgary L, Yair R and Uni Z. (2011). The chick embryo yolk sac membrane expresses nutrient transporter and digestive enzyme genes. *Poultry Science*, 90: 410–416.

Yadgary L and Uni Z. (2012). Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. *Poultry Science*, 91: 444–453.

Yadgary L, Kedar O, Adepeju O and Uni Z. (2013). Changes in yolk sac membrane absorptive area and fat digestion during chick embryonic development. *Poultry Science*, 92: 1634–1640.

Yadgary L, Wong EA and Uni Z. (2014). Temporal transcriptome analysis of the chicken embryo yolk sac. *BMC Genomics*, 15: 690-704.

Yamane T (2018) Mouse yolk sac hematopoiesis. *Front. Cell. Dev. Biol*, 6: 80.

Yang S, Wei Z, Wu J, Sun M, Ma Y and Liu G. (2021). Proteomic analysis of liver tissues in chicken embryo at Day 16 and Day 20 reveals antioxidant mechanisms. *J. Proteomics*, 243: 104258.

Yarnell GR, Nelson PA and Wagle SR. (1966). Biochemical studies of the developing embryo: I. Metabolism of gluconeogenic precursors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 114: 539-542.

Yoshizaki N, Ito Y, Hori H, Saito H and Iwasawa A. (2002). Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. *Development, Growth and Differentiation*, 44: 11–22.

Yoshizaki N, Soga M, Ito Y, Mao KM, Sultana F and Yonezawa S. (2004). Two-step consumption of yolk granules during the development of quail embryos. *Dev. Growth. Differ*, 46: 229-238.