



# 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	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000252">http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000252</a>

氏名(本国籍)	柴田 光浩 (三重県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第807号
学位授与年月日	令和5年9月15日
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	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
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 八代田 真人 副査 岐阜大学 教授 岩 澤 淳 副査 静岡大学 教授 笹 浪 知 宏

## 論文の内容の要旨

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、卵黄囊があるが、そのうち卵黄囊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、卵黄囊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、卵黄囊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、胚においてそれらの役割を果たす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、卵黄囊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囊は退縮するため、その意義は低く見積もられてきたが、ヒトでは卵黄囊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囊は胚発生に不可欠であるといえる。本研究はその卵黄囊に着目した。

第1部では、鳥類と哺乳類を中心に、卵黄囊の構造、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、卵黄囊という器官をあらためて俯瞰した。

第2部では、卵黄囊の多岐にわたる機能のうち、代謝機能に着目した。卵黄囊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、糖代謝機能に着目し、(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、遊離脂肪酸およびグリセロール)の測定を行った。これらのデータを統合することで、卵黄囊の代謝臓器としての役割を詳細に明らかにした。

まず第1部では、羊膜類の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絨毛という、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ことを

指摘した。続いて、卵黄嚢に焦点を当てた。ニワトリの卵黄嚢は巨大だが、孵化までに胚に吸収される。また、哺乳類の卵黄嚢は卵黄を含んでおらず、妊娠 10 週頃から退縮し始める。こうした理由から胎盤や肝臓などの他の臓器に比べ、あまり注目されていない。しかし、卵黄嚢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分泌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。各プロセスを推進する細胞内・細胞外のシグナル伝達や転写因子、そしてそれらの相互関係、さらには卵黄嚢の本質的な機能の保存、動物種を超えた基盤遺伝子を詳細に比較することは、基礎的な生物学的興味だけでなく、家禽・家畜の生産性を支える鍵として必要であることを指摘した。

続いて第2部では、採卵鶏の卵黄嚢膜を孵卵 3 日目から孵化後 3 日目まで毎日採取し(n=7-9)、糖新生の鍵酵素(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、細胞質およびミトコンドリアのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ)の mRNA 発現および酵素活性を定量した。卵黄嚢膜の乳酸、トリグリセリド、遊離脂肪酸、グリコーゲン、グルコース、および血糖値も測定した。調査したすべての酵素の mRNA 発現と活性が認められた。発現量や酵素活性の違いは、胚の発生環境と発生段階ごとの生理的要求を反映していると思われた。すなわち、孵卵 1 週目から 2 週目半ばまでは、糖新生酵素の発現量と活性および乳酸濃度が高く、漿尿膜の毛細血管が完成する前の胚の低酸素状態を反映して、乳酸からの糖新生が活発であることが示唆された。胚が好气的状態にある第 2 週半ばから第 3 週半ばにかけて、卵黄嚢内のトリグリセリドと遊離脂肪酸の含量が増加した。卵黄脂質のトリグリセリドは加水分解されてエネルギー源となる遊離脂肪酸を生成し、グリセロール骨格は糖新生に利用される可能性がある。胚が再び嫌気状態になると考えられる 3 週目後半には、グルコース-6-ホスファターゼのみの mRNA 発現と酵素活性が高くなり、卵黄嚢内のグリコーゲン量が減少していることが確認された。したがって、この時期は糖新生の活性が低く、卵黄嚢膜に貯蔵された糖質が血液中に分泌され、孵化のためのエネルギーとなっていることが示唆される。本研究では、卵黄嚢膜が孵卵中のニワトリ胚の重要な糖新生器官であることを確認できた。また、本研究では、産卵鶏の胚を用い、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点を特に強調できる。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嚢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。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」と呼んだ卵黄嚢膜に関して、本研究は、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た。

本学位論文の研究は、卵黄嚢に関する基礎的な生理学・生化学研究である。しかしながら、こうした基礎的な知見は家禽・家畜の生産性を支える鍵として役立つものであることを本学位論文内で指摘した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

鳥類の胚発生において卵黄は唯一の栄養源である。卵黄に含まれる脂質を糖に変えるには糖新生を行う必要があるが、胚発生の初期では糖新生の主要器官である肝臓は発達していない。そこで、申請者は孵卵の初期から存在している卵黄嚢膜が胚発生に必要な

エネルギーを生み出す糖代謝の機能を持つとの仮説を立て、その解明に取り組んだ。申請者は、孵卵3日目から孵化後3日目までのニワトリ卵黄囊膜において糖新生に関連する主要酵素の mRNA の発現と活性を確認した。また、その発現レベルと酵素活性の違いは、胚の発生環境と発生段階ごとの生理的要求を反映している可能性が高く、1) 低酸素状態の孵卵初期では乳酸からの糖新生が活発であり、2) 好気状態にある2週半ば以降は卵黄囊内のトリグリセリドを基質とした糖新生を行い、3) 再び嫌氣的になる3週目後半では卵黄囊内に貯蔵された糖質を孵化のためのエネルギーとしていることを示した。これらの成果は、孵化中のニワトリ胚の重要な糖新生器官としての卵黄囊膜の役割を明らかにしたものであり、鳥類の胚発生のメカニズムに新たな知見を加えるものである。

#### 基礎となる学術論文

- 1) Shibata M, Iwasawa A and Yayota M: Gluconeogenesis in the yolk sac membrane: Enzyme activity, gene expression, and metabolites during layer chicken development. *Journal of Poultry Science*, 60: 2023020, 2023..
- 2) Shibata M, Makihara N and Iwasawa A: The yolk sac's essential role in embryonic development. *Review in Agricultural Sciences*, Accepted for publication on 14 Aug., 2023.

#### 既発表論文

- 1) Too, H.C., M. Shibata, M. Yayota, V.M. Darras and A. Iwasawa: Expression of thyroid hormone regulator genes in the yolk sac membrane of the developing chicken embryo. *Journal of Reproduction and Development*, 63(5), 463-472, 2017.
- 2) Too, H.C., M. Shibata, M. Yayota and A. Iwasawa: Iodothyronine deiodinase: Key enzymes behind the action of thyroid hormone. *Reviews in Agricultural Science*, 5, 45-55, 2017.