

氏名(本国籍)	武石 勝 (埼玉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第134号
学位授与年月日	平成22年9月10日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	ニワトリの卵胞発育におけるプラスミノゲン・アクチベーターの関与
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 土井 守 副査 静岡大学 教授 高坂 哲也 副査 岐阜大学 准教授 岩澤 淳

論文の内容の要旨

成熟したニワトリの卵巣には数千個の卵胞が存在し、卵胞のヒエラルキーを形成している。卵胞発育では、小卵胞の急速成長相への転移にエストラジオール 17β (E2) の関与が報告されているが、卵胞の顆粒層細胞の細胞外マトリックスの再構築に関与することが知られているプラスミノゲン・アクチベーター (PA) の関与については未だ解明されていない。また、卵黄前駆物質の取り込みは、卵細胞膜のエンドサイトーシスにより起こることが明らかにされているが、約1日の排卵周期中における取り込みの動態は良く知られていない。さらに、排卵周期での卵胞重量増加に伴う卵黄前駆物質の卵胞への取り込み調節には、PA が関与する可能性が考えられているが、その時間的経緯などが十分に検討されていない。そこで本研究ではこれらのことを明らかにしようとした。

最初の実験では、顆粒層細胞で合成される PA が小卵胞の急速成長相への転移に関与するか否かを検討した。その結果、卵胞重量は F6 から F5 にかけて有意に増加したが、PA 活性と E2 濃度は転移に先立って F8 から F7 にかけて PA 活性と E2 濃度が共に増加し、しかも F7 で最も高い値を示した。顆粒膜の DNA 含量は F9 から F5 にかけて徐々に増加した後、その後は一定に推移した。顆粒層細胞層の形態は、F9~F6 は複層だったが、F5~F1 は単層であった。これらのことから、小卵胞の急速成長相への転移は F6 で起こったと推察され、小卵胞の急速成長相への転移には E2 のみならず、顆粒膜における PA 活性も関与していることが示唆された。

次の実験においては、卵胞重量の変化に伴う卵黄前駆物質であるビテロゲン (VTG) の血漿中レベルと卵黄膜内層中のレベルを測定した。卵胞重量はいずれの卵胞においても、F1 の排卵 19-20 時間前から 10-11 時間前に相当する時期にかけて増加し、その後はほぼ同じレベルで推移した。血漿 VTG レベルは、排卵周期中においてほぼ一定の値で推移したのに対して卵黄膜内層の VTG レベルは、いずれの卵胞においても F1 の排卵 22-23 時間前から増加し、F1 では排卵 13-14 時間前に、F3 と F5 では F1 の排卵 16-17 時間前に相当する時期において最も高いレベルを示した後、急激に減少し、その後は低いレベルで推

移した。これらのことから、卵胞重量の増加に先立ち、卵黄膜内層中の VTG が増加することが示され、排卵周期中における VTG の卵胞への取り込みの様相が明らかとなった。

最後の実験では、約 1 日の排卵周期中の様々な時間に F1 と F2 の卵胞を採取し、卵胞重量と顆粒膜における PA 活性を測定した。排卵周期中における DNA 当たりに換算した顆粒膜 PA 活性は、F1 と F2 共に、F1 の排卵 22-23 時間前から 16-17 時間前に相当する時期にかけて有意に増加し、排卵 13-14 時間前まで高い値を維持した後、排卵 4-5 時間前に相当する時期にかけて徐々に低下した。顆粒膜 PA 活性と排卵周期中における卵胞重量の増加の間に相関関係が存在した。以上のことから、ニワトリの卵胞発育における顆粒膜の PA 活性は、E2 とともに小卵胞の急速成長相への転移に関与することが推察され、卵黄前駆物質の取り込みによる排卵周期中の卵胞重量の増加に関与する可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、成熟したニワトリの卵胞発育に関するプラスミノゲン・アクチベーター (PA) の役割を解明しようとしたものである。

ニワトリの卵胞発育過程で、卵胞の顆粒層細胞の細胞外マトリックスの再構築に関係しているといわれている PA の関与については未だ解明されていない。また、卵胞発育の際に、卵黄前駆物質が肝臓で作られ卵胞へ取り込みが行われるが、卵細胞膜のエンドサイトーシスにより起こる取り込みに対して PA がどのように関与しているのかの詳細が不明である。そこで武石氏は、以下の 3 つの研究で明らかにした。

まず、顆粒層細胞で合成される PA が小卵胞の急速成長相への転移に関与するか否かを検討するために、最大卵胞 (F1) の排卵 18 時間前に相当する時期に、大きさが 9 番目の卵胞 (F9) から F1 までの卵胞を採取し、卵胞膜の E2 濃度、顆粒膜の PA 活性と DNA 含量を測定し、さらに別の個体から同様に採取した卵胞より組織切片を作成し、卵胞組織を観察した。その研究から、小卵胞の急速成長相への転移は F6 で起こったと推察され、小卵胞の急速成長相への転移には E2 のみならず、顆粒膜における PA 活性も関与していることを明らかにした。

次に、約 1 日の排卵周期中の様々な時間に、F1、F3、F5 の卵胞を採取し、重量と共に、卵黄前駆物質であるビテロゲン (VTG) の血漿中レベルと、VTG が卵細胞に取り込まれる際に必ず通過する卵細胞のすぐ外側の組織である卵黄膜内層中のレベルを詳細に検討した。この研究から、血漿 VTG レベルは、排卵周期中においてほぼ一定の値で推移したのに対し、卵黄膜内層の VTG レベルは卵胞発育に伴い特徴的な動態を示すことを明らかにした。その結果、卵胞重量の増加に先立ち、卵黄膜内層中の VTG が増加することを示し、排卵周期中における VTG の卵胞への取り込みの様相を明らかにした。

最後に、約 1 日の排卵周期中の様々な時間に F1 と F2 の卵胞を採取し、卵胞重量と顆粒膜における PA 活性と DNA 含量を測定した。この結果、排卵周期中において DNA 当たりに換算した顆粒膜 PA 活性は、F1 と F2 共に、F1 の排卵 22-23 時間前から 16-17 時間前に相当する時期にかけて有意に増加し、排卵 13-14 時間前まで高い値を維持した後、排卵 4-5 時間前に相当する時期にかけて徐々に低下した。従って、顆粒膜 PA 活性の変化と排卵周期中における卵胞重量の増加には相関関係があることを明らかにした。

以上の武石氏の研究から、成熟したニワトリの卵胞発育における顆粒膜の PA 活性

は、E2の変動とともに小卵胞の急速成長相への転移に関与することが推察され、卵黄前駆物質の取り込みによる排卵周期中の卵胞重量の増加に関与することが明らかとなった。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文は以下の通りである。

1) 武石 勝・小池達大・西田沙世・山村奈美子・石川信幸・後藤尚也・渋井仁志・土井 守・上吉道治, ニワトリの排卵周期中における血漿と卵黄膜内層中のビテロゲン (VTG) レベル, 日本家禽学会誌 (日本家禽学会), 第 45 巻, 第 J 1 号, J 1~J 8, 2008 年 4 月.

2) 武石 勝・安住水穂・西田沙世・山村奈美子・後藤尚也・渋井仁志・土井 守・上吉道治, ニワトリ卵胞顆粒膜におけるプラスミノーゲン・アクチベーター活性と小卵胞の急速成長相への転移との関係, 日本家禽学会誌 (日本家禽学会), 第 46 巻, 第 J 1 号, J 1~J 8, 2009 年 4 月.

3) 武石 勝・安住水穂・西田沙世・山村奈美子・後藤尚也・土井 守・上吉道治, ニワトリの排卵周期中における卵胞重量の増加と顆粒膜プラスミノーゲン・アクチベーター活性との関係, 日本家禽学会誌 (日本家禽学会), 印刷中(2010 年 10 月 25 日発行予定).

その他参考となる学術論文は、合計 10 編 (筆頭 1 編、その他 9 編) である。