

氏 名 (本 国 籍)	毛 坤 明 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 468 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
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	Studies on the Asymmetrical Egg-shape and Its Relationship with the Hatchability in Avian Eggs (鳥類の非対称卵形と孵化との関係に関する研究)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 吉 崎 範 夫 副査 岐阜大学 准教授 岩 澤 淳 副査 静岡大学 教 授 森 誠 副査 信州大学 教 授 小 野 珠 乙

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

鳥類の卵は卵殻及び限界膜を含む卵殻膜で包まれ、非対称橢円体になっている。この橢円体の縦断面は非対称橢円形で、横断面は円形である。限界膜は均一で緻密な物質からなり、卵内水分を保持する主役だと思われるが、孵卵中に薄くなる。この研究は鳥類の卵形形成の仕組みと卵形の繁殖生物学的な意味を解明すること及び限界膜を薄くさせる要因を明らかにすることを目的とした。

第一の実験では、産卵スケジュールがよく分かっているニワトリを材料として、どのようにしてその卵形が決まるのかを調べた。鳥類輸卵管には鳥類特有の膨大部峡部接続部 (MIJ) がある。MIJ からの分泌物は卵白と限界膜の間に形成され、できた構造を囲卵白層と名づけた。囲卵白層は卵白の表面に付いて、表面はスムーズにさせ、その後形成される限界膜の内表面がスムーズにできる基礎となっていることが明らかになった。また、MIJ の管腔は構造的に狭くなっており、膨大部末端で卵は先端が尖った形となる。卵は MIJ から狭部へと通過すると、先端から囲卵白層、限界膜、卵殻膜と順番に包まれ、尖った形はそのままに固定されるという仕組みが明らかになった。

第二の実験は日本ウズラを用い、卵形の意味を調べた。孵卵中、自由放置の卵では、鈍端と鋭端を結ぶ卵軸の角度は約  $13^{\circ}$  (0 日目) から  $19^{\circ}$  (14 日目) へと上昇することを観察した。同時に、鈍端にある気室体積は 0.22ml から 2.16ml に広がった。卵を  $13^{\circ}$  に固定し孵卵すると、孵化率が有意に下がった。内膜からたんぱく質 P300 を分離した。この P300 は峡部の管腔上皮細胞から分泌され、卵殻膜繊維の外被となり、また気室を仕切る層となった。特に鈍端では内外膜の間に多量に溜まって介在層になることが分かった。非対称橢円体は、卵が卵管狭部を通過する間に鈍端側に気室をつくる形であり、放卵された際、

鈍端が上を向く形であり、また乾燥した環境で孵卵したとき、鈍端の位置がさらに上昇する形であって、この卵形が高い孵化率をもたらしている。

第三の実験は、鳥類胚体外組織において限界膜を薄くさせる要因を解明することを目的とした。胚体外組織から 17.5kDa の酵素は検出した。ゼラチン ザイモグラフィで酵素の活性を調べると、5 日目に一番強かった。局在実験及び電子顕微鏡検査は酵素が無血管漿膜に存在することを示した。この酵素は Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA 及び Boc-Leu-Arg-Arg-MCA に対して高い分解活性を示した。酵素活性の最適 pH は 9 であり、限界膜を分解した。これらの酵素活性は SBTI, leupeptin 及び aprotinin で抑制された。横断面の円形は孵卵中の卵の回転を可能とする。卵の回転は、限界膜と 17.5kDa トリプシン様酵素を分泌する無血管漿膜とが接着する区域を広げるので、限界膜を全表面にわたって、均一かつ効率的に薄くさせることが可能である。限界膜の薄化は、胚のガス交換及び卵殻からのカルシウムの透過を促進する。

以上の結果から、鳥類は陸上へ侵入し、そこで繁殖するための戦略として、非対称楕円体の卵形を進化させたのであろうと結論した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

鳥類の卵は卵殻及び限界膜を含む卵殻膜で包まれ、非対称楕円体になっている。この楕円体の縦断面は非対称楕円形で、横断面は円形である。限界膜は均一で緻密な物質からなり、卵内水分を保持する主役だと思われるが、孵卵中に薄くなる。この研究は鳥類の卵形形成の仕組みと卵形の繁殖生物学的な意味を解明することを目的とした。

第一の実験では、産卵スケジュールがよく分かっているニワトリを材料として、どのようにしてその卵形が決まるのかを調べた。鳥類輸卵管には鳥類特有の膨大部峡部接続部 (MIJ) がある。MIJ の管腔は構造的に狭くなっており、膨大部末端で卵は先端が尖った形となる。卵は MIJ から狭部へと通過すると、先端から囲卵白層、限界膜、卵殻膜と順番に包まれ、尖った形はそのままに固定されると報告している。

第二の実験は日本ウズラを用い、卵形の意味を調べた。孵卵中、自由放置の卵では、鈍端と鋭端を結ぶ卵軸の角度は約  $13^{\circ}$  (0 日目) から  $19^{\circ}$  (14 日目) へと上昇し、同時に、鈍鈍端にある気室体積は 0.22ml から 2.16ml に広がった。卵殻膜内膜から分離したたんぱく質 P300 は峡部の管腔上皮細胞から分泌され、鈍端では内外膜の間に多量に溜まって介在層を形成する。非対称楕円体は、卵が卵管狭部を通過する間に鈍端側に気室をつくる形であり、放卵された際、鈍端が上を向く形であり、また乾燥した環境で孵卵したとき、鈍端の位置がさらに上昇する形であって、この卵形が高い孵化率をもたらすことを明らかにしている。

第三の実験は、鳥類胚体外組織において限界膜を薄くさせる要因を解明することを目的とし、胚体外組織から 17.5kDa の酵素は検出している。ゼラチンザイモグラフィで酵素の活性を調べると、5 日目に一番強く、局在実験及び電子顕微鏡観察で酵素が無血管漿膜に存在することを示している。この酵素は Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA 及び Boc-Leu-Arg-Arg-MCA に対して高い分解活性を示し、酵素活性の最適 pH は 9 であり、SBTI, leupeptin 及び aprotinin で抑制されるのでトリプシン様酵素であるこ

とが分かった。鳥類の孵卵で認められる卵の回転は、限界膜と無血管漿膜とが接着する区域を広げるので、限界膜を全表面にわたって、均一かつ効率的に薄くさせることが可能であり、それが胚のガス交換及び卵殻からのカルシウムの透過を促進すると主張している。以上の結果から、鳥類は陸上へ侵入し、そこで繁殖するための戦略として、非対称楕円体の卵形を進化させたのであろうと結論づけている。

以上について、審査委員は全員一致で、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。

基礎となる学術論文：

Mao, K.M., Sultana, F., Howlader, M.A.R., Iwasawa, A. & Yoshizaki, N. (2006) The magnum-isthmus junction of the fowl oviduct participates in the formation of the avian-type shell membrane. *Zoological Science*, 23: 41-47.

Mao, K.M., Murakami, A., Iwasawa, A. & Yoshizaki, N. (2007) The asymmetry of avian egg-shape: an adaptation for reproduction on dry land. *Journal of Anatomy*, 210: 741-748.