

# VMO1 の鶏卵形成における役割とヒトへの生理作用に関する研究

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系・教授 相川 京子

## ■ 緒言

VMO1 (vitelline membrane outer layer protein1) は鶏卵の卵黄膜外層の主要なタンパク質<sup>1,2)</sup>で、ヒトやラクダの涙<sup>3)</sup>で検出されており、またヒト肺や肝臓、脾臓で遺伝子発現が高い。しかし、鶏卵の形成過程における役割や、ヒトにおける生物学的機能は未解明である。また、鶏卵の卵黄膜成分は食用以外に活用されておらず、VMO1 に何らかの生理作用が見つかれば、医療材料や薬剤、化粧品、食品開発等に活用し、鶏卵の新たな付加価値の創出にもつながる可能性がある。申請者はこれまでに、ニワトリとヒト VMO1 の遺伝子組み換えタンパク質の調製法を確立し、VMO1 の物理化学的特性を解析するとともに、生理活性の探索を進めてきた。2023 年度は以下の二つの課題に関して検討を行った。

- 1) ニワトリ VMO1 産生細胞の特定と VMO1 が関わる卵黄膜外層形成のしくみ
- 2) ヒト角膜細胞の増殖や分化における VMO1 の活性

## ■ 方法

- 1) ニワトリ VMO1 産生細胞の特定と VMO1 が関わる卵黄膜外層形成のしくみ

ニワトリ由来材料(固定組織、cDNA、培養細胞、特殊培地)は、名古屋大学大学院生命農学研究科附属鳥類バイオサイエンス研究センターより西島謙一教授の協力により入手した。卵巣は白色卵黄と卵巣組織から4部位を、輸卵管は漏斗部、膨大部を5部位にわけ、子宮部を含め10種類の部位について材料を採取した(図1)。ニワトリ VMO1 に対する特異的抗体(抗 VMO1 抗体)を作製した。その際に、ニワトリ VMO1 の部分ペプチド配列の合成ペプチドを作製し、抗原として用いた。ニワトリ組織のホルマリン固定切片を作製し、抗 VMO1 抗体を使って免疫組織染色を行った。ニワトリの卵巣、輸卵管、子宮の各組織から RNA を抽出し、RT-PCR で VMO1 の発現量を比較した。

- 2) ヒト角膜細胞の増殖や分化における VMO1 の活性

ヒト角膜由来不死化細胞(HCLE)を慶應大学医学部眼科より供与いただいた。HCLE の分化段階は KRT12 の発現の変化を指標に決定した。培地に VMO1 を添加して数日間培養し、増殖性は細胞数の評価で、分化度合いはトランスウェルに播種した細胞の経上皮抵抗を測定することと、ローズベンガル色素の透過性を指標とした。

## ■ 結果

ニワトリ輸卵管と子宮、卵巣の各部位で VMO1 遺伝子発現量を比較したところ、VMO1 は、卵黄が排卵された後に取り込まれ、初めに接触する輸卵管の部位にのみ高く発現していることがわかった。これは、卵白の主要成分であるオボアルブミンが輸卵管全体に発現している結果と対照的であった(図2)。卵白成分が付着する前に卵黄表面が VMO1 で覆われることで卵黄膜外層の成熟が進むと予想され、VMO1 の機能的な重要性を窺わせる結果と言える。ニワトリ VMO1 の部分ペプチドを抗原として用いて作製した抗体の特異性を ELISA とイムノブロットで調べたところ、ヒト VMO1 には結合せず、ニワトリ VMO1 に特異的であることがわかった。RT-PCR で VMO1 の発現が高かった2、3の試料についてホルマリン固定切片を作製し、抗 VMO1 抗体で免疫化学染色を行った。その結果、VMO1 は輸卵管の特定の細胞で発現していることがわかった。

ヒト角膜由来細胞を播種後、KRT12 遺伝子の発現量を経時的に比較し、分化のタイミングを調べたところ、播種後11日で KRT12 が上昇したことから、以降播種後11日を分化細胞として使用することとした。分化前で細胞に増殖性が高い時期(増殖期)の細胞と、分化後の細胞の培地に VMO1 を添加し、増殖性と上皮形成能をコントロールと比較した。その結果、増殖期では HCLE の増殖が低下し、分化に達する時間が延長した。また、分化後では経上皮抵抗が上昇し、細胞間接着の形成不全が起こった可能性が示唆された。一方、分化後に VMO1 を添加した場合は、ローズベンガルの色素透過性がコントロールと比較して低下したことから、分化が促進された可能性が示唆された。増殖期において見られた VMO1 による細胞増殖抑制は、コンフルエントになる前に VMO1 によって分化誘導され、増殖性が低下した結果とも考えられる。

## ■ 考 察

ニワトリ VMO1 は卵巣では発現しておらず、排卵後の卵黄が初めに接触する輸卵管部位で高く発現されていた。VMO1 は卵形成の初期で分泌され、卵黄を被覆していると考えられる。VMO1 による卵黄の被覆の役割として、卵黄の物理的な強度を高めることやカラザの成分であるオボムチンの吸着を助けることや、卵の成熟における役割も想定される。遺伝子組み換え VMO1 を調製した際に、VMO1 は細胞からの分泌性が顕著に高かった。ニワトリ体内でも卵黄が通る刺激により輸卵管細胞からも高濃度で分泌されることが推定された。

VMO1 が *in vivo* で角膜細胞の増殖や分化を調節することがわかった。今後はより生体内に近い環境や細胞材料で活性を確認する必要があるとともに、増殖や分化に導く細胞内情報伝達系を特定する必要がある。

## ■ 要 約

ニワトリとヒト VMO1 について生物学的機能を明らかにするための研究を行った。ニワトリ輸卵管の VMO1 の発現部位は卵黄が排卵され、輸卵管に入る部位であり、卵白成分が付着する前に VMO1 は卵の表面を覆い、卵黄の保護等にはたらく可能性が考えられた。

ヒト VMO1 に見出された培養角膜細胞の分化を促進活性は、VMO1 を角膜の保護等に活用できる可能性を示唆しているが、シグナル伝達機構など機序解明が必要である。

## ■ 文 献

- 1 Kido S, Doi Y, Kim F. et al. (1995) Characterization of Vitelline Membrane Outer Layer Protein I, VMO-I : Amino Acid Sequence and Structural Stability. *J Biochem.* 117 : 1183-1191.
- 2 Guérin-Dubiard C, Pasco M, Mollé D, et al. (2006) Proteomic analysis of hen egg white. *J Agric Food Chem.* 54 : 3901-3910.
- 3 Wang Z, Chen Z, Yang Q, et al. (2014) Vitelline membrane outer layer I homolog interacts with lysozyme C and promotes the stabilization of tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55 : 6722-6727.

A



B



C

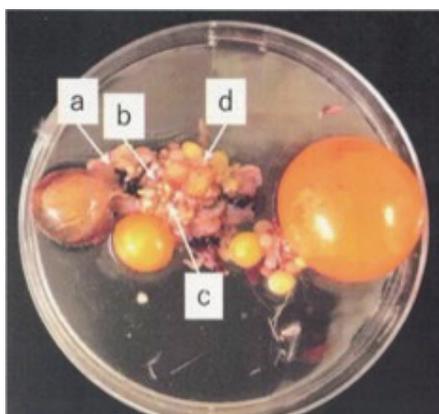


図1 ニワトリ卵巣、輸卵管、子宮

A. ニワトリ輸卵管と子宮、B. 五つの部位(1～5)に分けた輸卵管と、子宮(6)の各部。C. 卵巣を組織(1、2)、白色卵黄(<2 mm、3)、白色卵黄(約2 mm、4)として採取した。

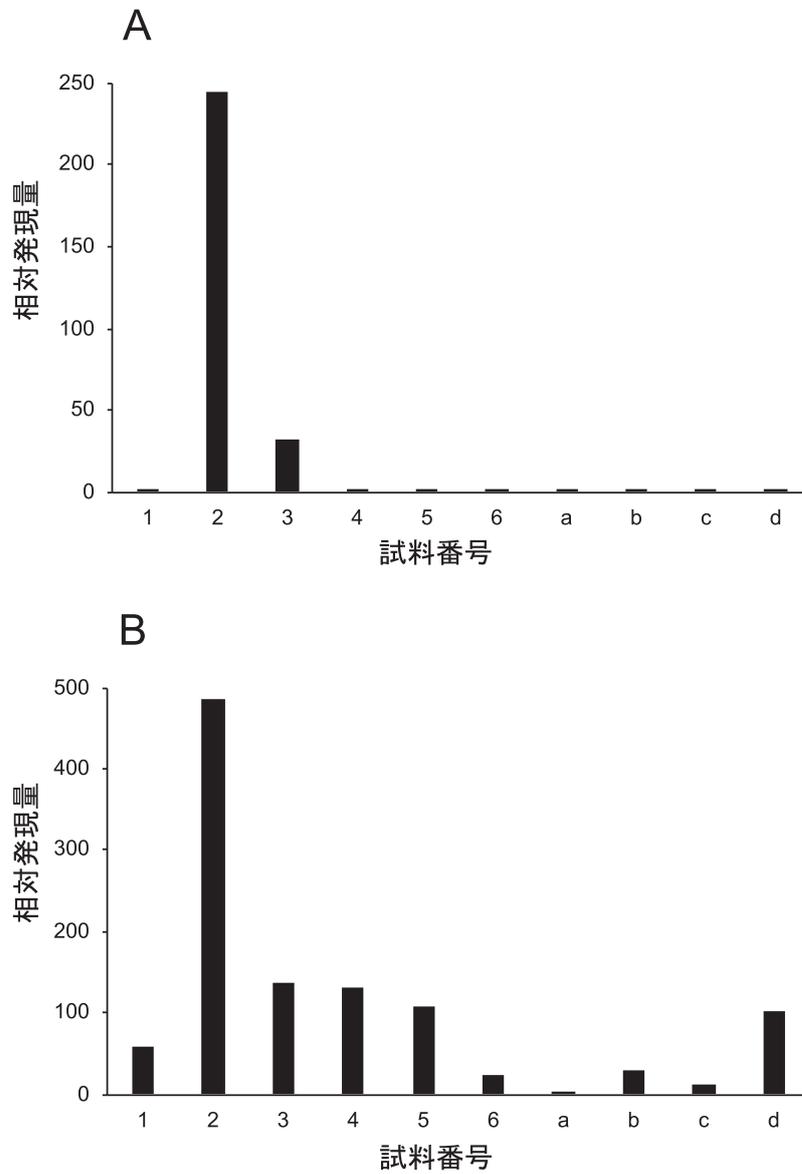


図2 VMO1の遺伝子発現量(RT-PCR)

採取したニワトリ試料よりRNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを調製し、PCRでVMO1遺伝子とオボアルブミン遺伝子を増幅した。 $\beta$ -アクチン遺伝子発現に対して標準化した値を提示した。

A. VMO1、B. オボアルブミン