

ニワトリ羽毛の形態形成に関する免疫組織化学的検討

中村富美男・平野 大介・三田 晶子・竹之内一昭・近藤 敬治

北海道大学農学研究科畜産資源開発学講座, 札幌市 060-8589

Immunohistochemical study on the morphogenesis of chicken primary down feather

Fumio NAKAMURA, Daisuke HIRANO, Akiko MITA, Kazuaki TAKENOUCI, Keiji KONDO

Research Group of Animal Product Science,
Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589

キーワード: 初生羽, 形態形成, 細胞外マトリックス, β -ケラチン

Key words: Primary down feather, morphogenesis, extracellular matrix, β -keratin

要 約

ニワトリ胚子背部皮膚を用い, 生長に伴う表皮, 基底膜, 真皮構成タンパク質の局在変化を調べ, 羽毛(初生羽)の形態形成に果たす細胞外マトリックスの役割を検討した。

未分化な組織として隆起した羽芽は, 羽髄における線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの蓄積に伴い伸長した。羽芽の尾方への傾斜には, 羽髄基部のⅠ型コラーゲン, フィブロネクチンおよび線維芽細胞の関与が示唆された。羽髄における細胞外マトリックスと線維芽細胞は, 初生羽を形成する表皮細胞の増殖と分化を促進したが, 羽枝と小羽枝の最終的な形態形成, それに伴う β -ケラチンの蓄積と角質化に先行して退縮した。

緒 言

トリの羽毛は, 形状によって正羽, 綿羽, 毛羽の三種類に分けられる。一般にダウンと呼ばれているトリの綿羽は, 絶縁効果が高く, 保温性と防水性に優れ, 軽量で弾力性にも富んでいることから(安倍, 1991), 衣料や寝具の素材として重用されている畜産副生物であり, 綿羽の前記の特性はその構造と成分に依拠している(茂田, 1997)。表皮の変形物である羽毛は, 複雑な形態を示し, 胚子期に綿羽の一種である初生羽として真皮との相互作用により形成される(SENDEL, 1986)。しかし, 羽毛の形態形成過程における真皮や基底膜を構成する細胞外マトリックス(ECM)の具体的な役割や挙動の全容は明らかにされていない。本研究では, 羽芽として初生羽が形成されるニワトリ胚子期

の背部皮膚における表皮, 基底膜および真皮を構成するタンパク質の局在変化を免疫組織化学的に追究し, 羽毛の形態形成に果たすECMの役割を検討した。

材料および方法

北海道大学農学部附属農場で孵卵中のロードアイランドレッド種ニワトリを下記の実験に供試した。

組織化学

孵卵7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17および19日目の背部を採取し, OCTコンパウンドに包埋した後クリオスタットを用いて厚さ10 μ mの矢状断および羽芽の横断と縦断凍結切片を調製した。ホルマリン(10% in PBS)で固定した後, ヘマトキシリン・エオシン(H・E)染色を行う一方, 表皮構成成分としての α -ケラチンと β -ケラチン, 基底膜構成成分としてのⅣ型コラーゲンとラミニン(LN), 真皮構成成分としてのフィブロネクチン(FN), Ⅰ型およびⅢ型コラーゲンに対する抗血清を第一抗体とし, FITC標識した第二抗体により可視化する間接蛍光抗体染色を行った。

電気泳動

孵卵12, 13, 15, 17および19日目の背部初生羽をピンセットで抜き取り, サンプル処理液(2% SDS, 8 M 尿素, 0.1 M β -メルカプトエタノール, 50 mM Tris-HCl, pH 9.8; KEMP and ROGERS, 1972)に4℃で2日間浸漬した後100℃で3分間処理し, 遠心分離(10,000 rpm, 5分)によって得られた上清をSDS-PAGEサンプルとした。尿素を含む10%ゲルを用いて泳動し, CBBで染色した。

結 果

H・E 染色像

孵卵 7 日目のニワトリ背部皮膚において、表皮細胞

の重層化の程度は低く、真皮の線維芽細胞も羽芽原基部を除き全体的には散在していた(図 1 A)。表皮細胞の重層化が進んだ 9 日目には、隆起した羽芽が観察され、真皮の線維芽細胞も幾分高密度化した(図 1 B)。

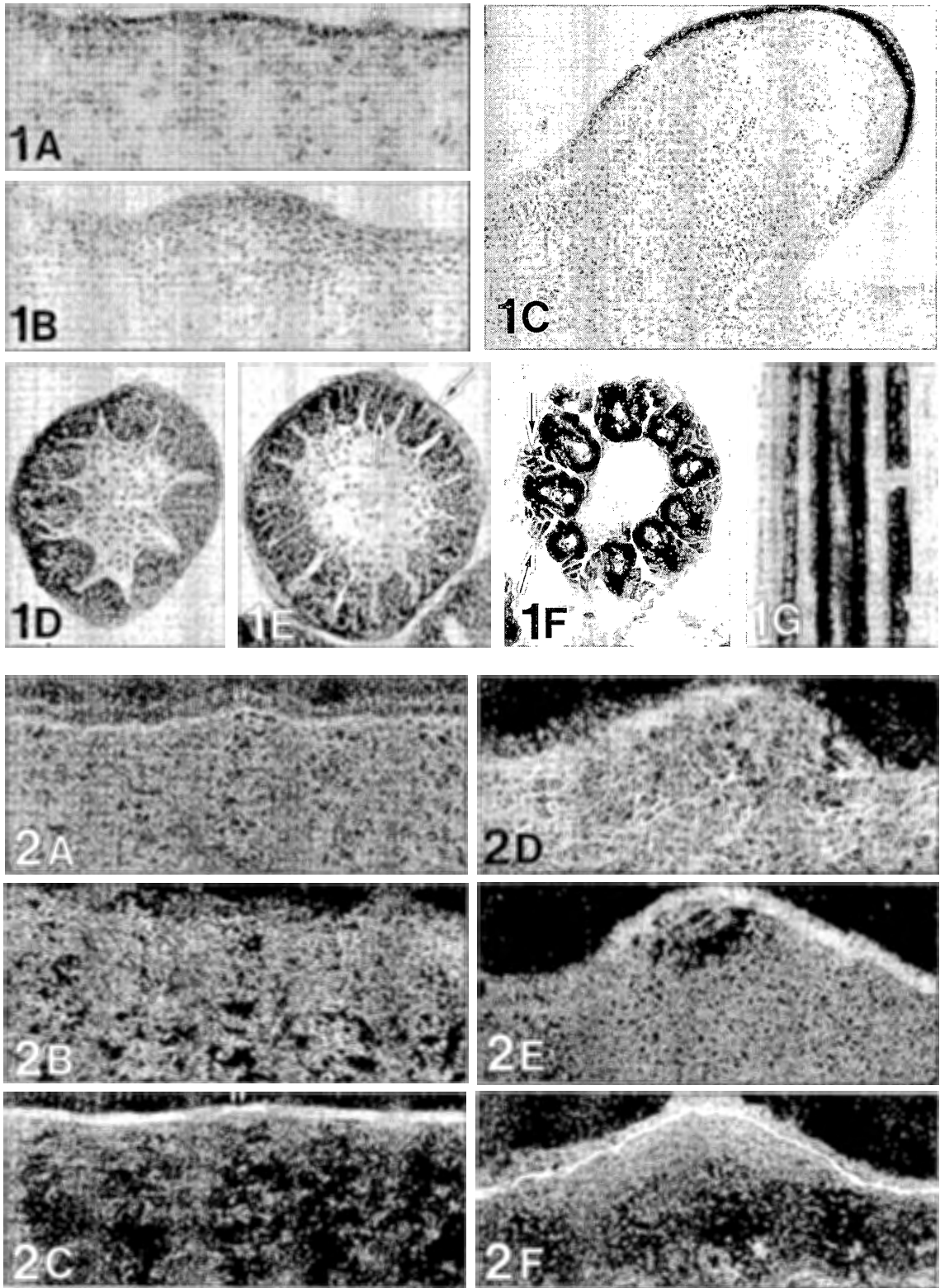


図 1 ニワトリ胚子背部の H・E 染色像

7 日目 (A), 9 日目 (B) および 10 日目背部皮膚矢状断面 (C), 11 日目 (D), 13 日目 (E) および 15 日目羽芽横断面 (F) と 17 日目羽芽縦断面 (G) 像を示す。A の矢印は羽芽原基を, E および F の矢印は小羽枝を示す。x75.

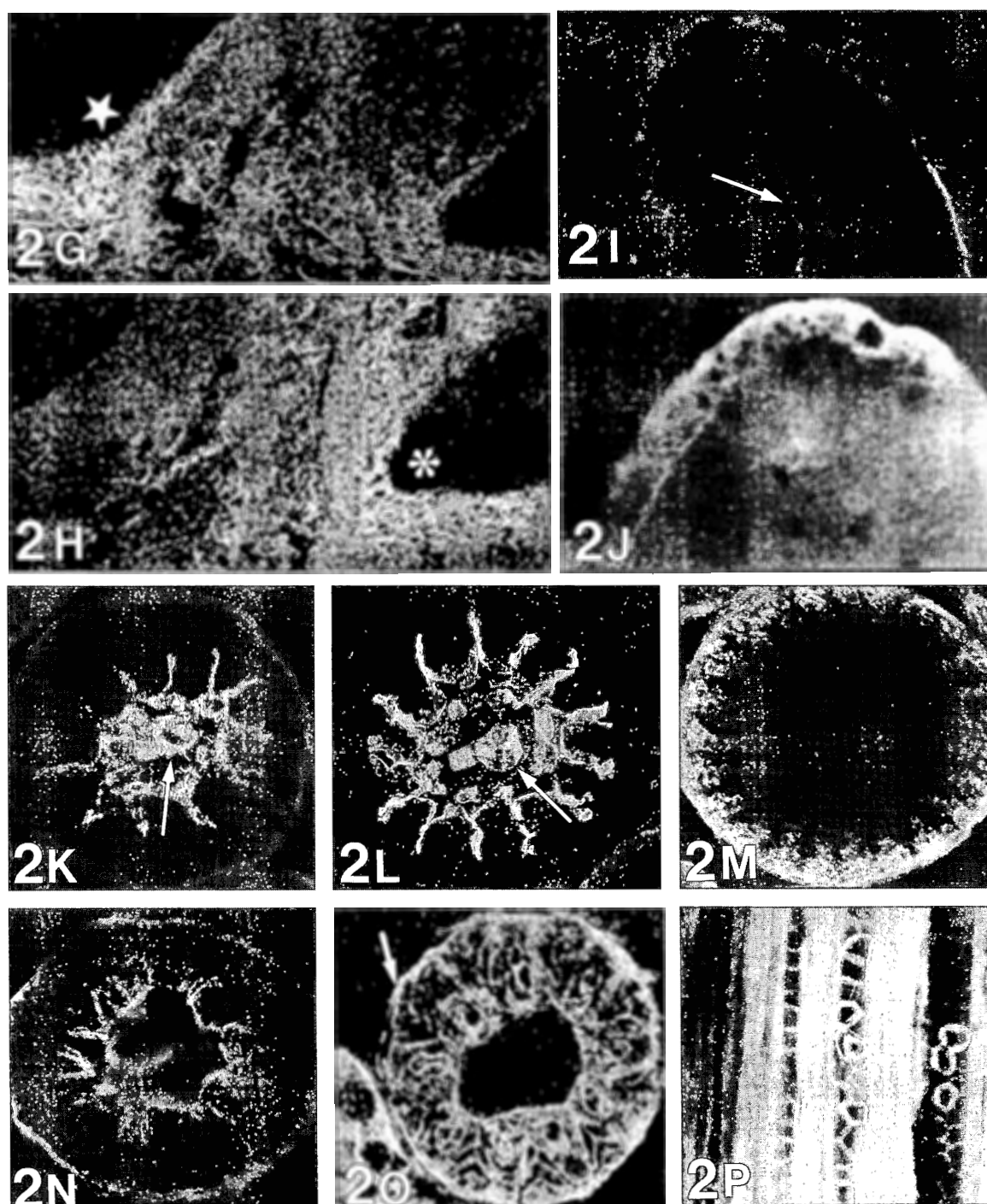


図2 ニワトリ胚子背部の間接蛍光抗体染色像

7日目(A, B, C), 9日目(D, E, F), 10日目(G, H, I, J)の背部皮膚矢状断面, 13日目(K, L, M), 15日目(N, O)の羽芽横断面と19日目(P)の羽芽縦断面を示す. A, D, G, KはI型コラーゲン, EはIII型コラーゲン, IはIV型コラーゲン, B, Hはフィブロネクチン, C, F, Lはラミニン, J, Nは α -ケラチン, M, O, Pは β -ケラチンに対する免疫染色像. AとCの矢印は羽芽原基を, I, K, Lの矢印は羽髓の血管を, Oの矢印は小羽枝を, Gの星印は頭方を, Hの米印は尾方を示す. $\times 90$.

伸長著しい10日目の羽芽は尾方に傾斜し, 羽芽先端部はエオシンにより赤染され, 羽芽内部の真皮に連続した組織である羽髓には線維芽細胞が充満しており, 特に, 基部の頭方側と尾方側には高密度で存在していた(図1C). 羽芽の伸長がさらに進んだ11日目の横断面では, 増殖した表皮細胞が羽髓へ花弁状に陥入して羽

枝の形成を開始しており(図1D), 羽芽の伸長が止まった13日目には, 各花弁内の表皮細胞は索状に配列して小羽枝の形成を開始していた(図1E). 羽髓の退化が明確になった15日目の横断面では, 中空化した羽枝髓と矢羽状の小羽枝に加え色素の沈着も観察され(図1F), 17日目の羽芽縦断面では, 色素が沈着した

羽枝皮質と角質化した小羽枝の規則的な配列が観察された (図 1 G)。

蛍光抗体染色像

α -ケラチンや β -ケラチンに対する明確な陽性反応は 7 日目の背部皮膚では観察されなかったが, I 型コラーゲンは真皮下部や皮下組織では全体に弱く, 羽芽原基と表皮直下では帯状に強く染色され (図 2 A), FN は真皮および皮下組織全体で強く染色されていた (図 2 B). LN は表皮層での強染に加え, 真皮層でも染色されていたが, 基底膜特有の線状像は観察されず (図 2 C), これは IV 型コラーゲンでも同様であった (図省略). 羽芽の隆起に伴って 9 日目では, I 型および III 型コラーゲンの真皮や羽髄における染色性は増加し (図 2 D, E), 基底膜も抗 LN 抗体によって線状に染色されていたが (図 2 F), III 型コラーゲンは表皮細胞層に, LN は表皮細胞層と羽髄にも存在していた (図 2 E, F). 尾方に傾斜した 10 日目の羽芽において, 羽髄全体の陽性反応に加え I 型コラーゲンは羽髄基部の頭方側で, FN は尾方側でより強く染色されていた (図 2 G, H). IV 型コラーゲンに対する陽性反応は表皮下の基底膜および羽髄の血管壁に限定されるようになり (図 2 I), 表皮層における α -ケラチンの存在も観察されるようになった (図 2 J). 孵卵 13 日目の羽芽横断面では, 羽髄全体の陽性反応ではなく血管, 縦溝, 羽枝端部における I 型コラーゲンや LN に対する車軸状の染色像が観察され (図 2 K, L), 対照的に, 抗 β -ケラチン抗体では辺縁の外鞘と縦溝両側の羽枝細胞索が染色されていた (図 2 M). 外鞘最外部と羽枝端における α -ケラチンに対する染色像が観察された 15 日目には (図 2 N), β -ケラチンに対する染色では, 中

空化した羽枝と矢羽状の小羽枝の輪郭が観察され (図 2 O), 19 日目の縦断面では羽枝皮質とその両側を縦走する小羽枝全体が染色されていた (図 2 P)。

SDS-PAGE 像

β -ケラチンの主鎖は孵卵 13 日目に明確なバンドとして出現し, 17 日目まで増加したが 19 日目には減少していた (図 3). 本実験におけるサンプル処理による羽毛ケラチンの可溶化は, 15 日目以降は不完全となり, 遠心分離後の沈殿量は 19 日目には急増していた (図省略)。

考 察

孵卵 9 日目までは表皮におけるケラチンの局在が不明確であったこと, 基底膜を構成するタンパク質である IV 型コラーゲンやラミニンが表皮や真皮にも存在していたこと, III 型コラーゲンが表皮層にも存在していたこと等から, 羽芽は未分化な組織として隆起したと判断される. その後, 羽芽は羽髄における線維芽細胞の増殖と ECM の蓄積に伴って伸長し, 11 日目には, 増殖した表皮細胞の分化により羽枝の形成が開始された. 培養系において I 型コラーゲンと線維芽細胞は表皮細胞の増殖と分化を促進することから (久保ら, 1997), ECM と線維芽細胞が充満した羽髄は, 羽芽の伸長だけではなく羽枝の形成をも促進していると考えられる. また, 線維芽細胞は FN を介してコラーゲンを牽引することが知られていることから (ASAGA *et al.*, 1991), 孵卵 10 日目の羽芽の尾方への傾斜には, 頭方側における I 型コラーゲンの蓄積による尾方への押し出しと, 尾方における線維芽細胞による FN を介したコラーゲンの牽引が深く関与しているものと考えられる. 一方, 羽毛の主要構成タンパク質であり分化指標でもある β -ケラチンは (HAAKE *et al.*, 1984), 小羽枝の形成が開始された 13 日目から急増し, 15 日目の羽枝, 小羽枝の輪郭における局在から 19 日目には小羽枝全体に存在するようになり, さらに角質化により不溶化していた. 羽髄の退化は 13 日目には始っており, ECM は羽髄全体には存在しておらず, 対照的に β -ケラチンは外鞘と羽枝細胞索に局在していた. これらのことから, 初生羽の最終的な形態形成に先行して羽髄は退行し, ECM と線維芽細胞の退縮が羽枝, 小羽枝における β -ケラチンの蓄積と角質化を誘導していると考えられる. しかし, これらの事象をより明確にするには, 日齢ではなくステージ毎のサンプリングとプロテオグリカンを含む多種類の ECM タンパク質に関するさらなる検討が必要であろう.

文 献

安倍直哉 (1991) 羽毛の構造と機能. 週間朝日百科, 6(14): 62-64.

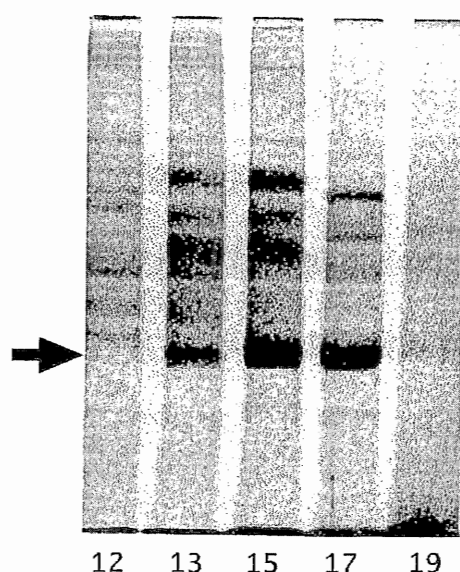


図 3 ニワトリ初生羽の SDS-PAGE 像
矢印は β -ケラチン主鎖の位置を, レーン下の数字は胚齢 (日) を示す.

- ASAGA, H., S. KIKUCHI and K. YOSHIKATO (1991) Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. *Exp. Cell Res.*, **193**: 167-174.
- HAAKE, A. R., G. KONIG and R. H. SAWYER (1984) Avian feather development: relationships between morphogenesis and keratinization. *Dev. Biol.*, **106**: 406-413.
- KEMP, D. J. and G. E. ROGERS (1972) Differentiation of avian keratinocytes: Characterization and relationship of the keratin proteins of adult and embryonic feathers and scales. *Biochemistry*, **11**: 969-975.
- 久保康明・松澤陽子・中村富美男・竹之内一昭・近藤敬治 (1997) 角化細胞の分化に及ぼす線維芽細胞の影響. 北海道畜産学会報, **39**: 47-50.
- SENGEL, P. (1986) Epidermal-Dermal Interaction. *in* Biology of Integument 2. (HAHN, J. B., A. G. MATOLTSY and K. S. RICHARDS, eds) 374-408. Springer-Verlag. Berlin.
- 茂田良光 (1997) 鳥類の羽毛と換羽. *Birder*, **11**: 27-33.