

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06429

研究課題名(和文) 鳥類の卵表面を覆う脂質の定性・定量評価とその機能の解明

研究課題名(英文) Qualitative and quantitative evaluation of lipid coating on avian egg surface

研究代表者

松井 晋 (Shin, Matsui)

東海大学・生物学部・准教授

研究者番号：20727292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：私達の研究室では、細菌などの微生物から胚を守る最初の防御機構となる鳥類の卵表面の撥水性や脂質による卵表面の被覆の機能を統合的に理解することをめざす研究に取り組んでいる。これまでにスズメ目鳥類(スズメ *Passer montanus*、シジュウカラ *Parus minor*)を対象とした研究で、卵表面の撥水性は産卵期から抱卵期にかけて低下する傾向がみられることがわかってきた。また抗菌作用を持つことが知られている尾脂腺(鳥類の尾の付け根にある分泌腺)に由来と考えられる脂質を薄層クロマトグラフィーによって卵表面から検出することに成功し、卵表面を覆う脂質をSPV法で定量的に評価する方法を確立させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類の尾脂腺分泌物は羽毛の維持に役立つことが従来からよく知られているが、それ以外の効果はほとんどわかっていない。今回の研究で、親鳥の尾脂腺に由来する脂質がスズメ目鳥類の卵表面から検出されたことから、尾脂腺分泌物は卵表面の抗菌作用を高めることで子の免疫適格を上昇させて、胚の発育や生存に影響する可能性があることが示唆された。今回の研究成果は宿主-寄生者の相互作用に関する研究課題の発展に寄与する点で学術的意義が高いと考える。また、鳥類保全への今後の貢献が期待できることから社会的な意義もある。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms of antimicrobial defenses on avian eggs, we have been investigating hydrophobicity on the surface of eggshell and the lipid coating partially derived from uropygial gland in Eurasian tree sparrows and Japanese tits. Avian eggs may be under different risk of microbial infections between the egg-laying period that eggs are left on a nest without incubation for a long time before the full incubation and the incubation periods that bird parents incubate and turn their eggs to maintain at a stable temperature and humidity. We found that hydrophobicity on the surface of eggshell during the egg-laying period was higher than that during the incubation period. We also detected lipid partially derived from uropygial gland by using thin-layer chromatography from eggshell surface. In addition, we established a method for estimating total amount of lipid coating the eggshell surface by using the sulfo-phospho-vanillin (SPV) method.

研究分野：動物生態学

キーワード：卵殻表面 鳥類 撥水性 尾脂腺 定量評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の卵における胚死亡を増加させる主要因のひとつとして、病原性をもつ細菌などの感染が挙げられる。細菌などの微生物から胚を守る典型的な防御機構としては、卵殻表面の撥水性を高める物理的な微細構造や、卵白や卵殻膜の中に含まれている細菌に対して溶菌作用などを示す生体防御物質(例:リゾチーム)がよく知られている。

鳥類の卵殻は、細菌などの微生物から胚を守る最初の障壁として重要な役割を担う。卵表面に存在する気孔はガス交換のための通気孔になると同時に、微生物の侵入経路にもなり得る。このため卵表面で微生物の増殖を抑える効果のある撥水性を高める微細構造や、親由来の抗菌作用のある物質(尾脂腺分泌物など)での卵表面の被覆は、胚の発育や生存に影響することが予想される。尾脂腺分泌物は酸性ムチン・中性脂質・糖脂質・リン脂質が主成分で、その役割は、羽毛に撥水性を与えて羽毛のしなやかさを維持すること、羽毛を真菌・バクテリア・外部寄生虫から防御することなどが挙げられる(Salibian & Montalti, 2009)。しかし、鳥類の尾脂腺分泌物が細菌の卵内への侵入を防御する役割は未解明で(Moreno-Rueda, 2017の総説参照)、鳥類の卵表面を覆う脂質については家禽以外の鳥類でほとんど研究例はなく、その機能について未解明な点が多い。

2. 研究の目的

私達の研究室では、細菌などの微生物から胚を守る最初の防御機構となる鳥類の卵表面の撥水性(物理的防御)や脂質による卵表面の被覆(化学的防御)の機能を統合的に理解することをめざす研究に取り組んでいる。

1回の繁殖で複数卵を産む鳥類の場合、親が不在の産卵期と、親がほぼ連続的に卵を温める抱卵期では、卵の置かれる状況が大きく異なる。鳥類では一般的に産卵期は巣に卵が数日間放置され、抱卵期には親鳥は抱卵斑と呼ばれる腹部の皮膚が裸出した部分を卵に接触させて連続的に温め、頻繁に嘴で卵を回転させる転卵行動がみられる。このため鳥類は産卵期と抱卵期との間で卵表面からの細菌などの侵入を防ぐため対抗戦略が異なる可能性がある。

本研究では、スズメ目鳥類(スズメ *Passer montanus*、シジュウカラ *Parus minor*)を対象として、産卵期と抱卵期における卵表面でみられる細菌などの微生物から胚を守る防御機構の違いを明かにすることを目的とした。そこで両種の産卵期と抱卵期の撥水性を測定し、それぞれの繁殖ステージにおける卵表面を覆う脂質量を定量的に評価した。

3. 研究の方法

(1) 野外調査

北海道に設置した調査地にスズメとシジュウカラが利用可能な巣箱を設置した。実験対象とする各種の繁殖巣から1巣あたり1~2卵を採取した。また、スズメ及びシジュウカラの成鳥を捕獲して、尾脂腺分泌物をキャピラリー等で採取した。

(2) 卵表面からの脂質の抽出

卵表面の脂質を定性・定量的に評価するために、まず鳥類の卵表面を覆う脂質を1卵ずつ有機溶媒(アセトン)で抽出した。次に、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、乾固し、残留物をクロロホルムに溶解した。

(3) 薄層クロマトグラフィー(Thin-Layer Chromatography: TLC)による脂質の定性評価

シジュウカラとスズメの卵表面と成鳥の尾脂腺から抽出した脂質について、シリカゲルを固定相として薄層クロマトグラフィーを行った。

(4) SPV法による脂質の定量評価

SPV法による脂質の定量評価のため、検量線作成には0.1mg/mlオリーブオイルのクロロホルム溶液を用いた。複数の試験管に濃度の異なるオリーブオイル溶液を作った。試験管を100のアルミホイルブロックで10分間加熱して室温で放冷後、濃硫酸H₂SO₄を加え再度10分間加熱した。バニリン試薬をタッチミキサーで混合して一定時間静置し呈色させた後、分光光度計を用いて吸光度を測定し、検量線を作成した。

卵表面脂質の定量は一卵の脂質サンプルについてオリーブオイル溶液と同様に吸光度を測定し、検量線を用いて卵表面に付着している総脂質量を求めた。SPV法を用いて、得られた総脂質量から卵表面積1cm²当たりの脂質量を求めた。

これらの研究は、本研究は環境省の捕獲許可及び、東海大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

シジュウカラとスズメの卵の撥水性を測定した結果、両種で共に産卵期の方が抱卵期より撥水性が高かった（松井ら、未発表データ）。ただし、産卵期と抱卵期の卵表面の撥水性の差異には種間で違いがみられた。

卵表面の推定総脂質量は、シジュウカラは産卵期から抱卵期にかけて増加したが、スズメではそのような傾向はみられなかった（松井ら、未発表データ）。

これらの研究成果については、現在、論文化を進めているところである。

<引用文献>

Salibian, A. & Montalti, D. (2009) physiological and biochemical aspects of the avian uropygial gland. *Braz J Biol*, 69: 437-446.

Moreno-Rueda, G. (2017) Preen oil and bird fitness: a critical review of the evidence. *Biol Rev* 92: 2131-2143.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井 晋, 菊池彩加, 梶田 雅人, 竹中 万紀子, 佐藤 敦
2. 発表標題 スズメ目鳥類における卵表面の撥水性
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会（要旨公開, 大会は中止）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 敦, 梶田 雅人, 菊池 彩加, 竹中 万紀子, 松井 晋
2. 発表標題 スズメ目鳥類における卵表面脂質の定量
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会（要旨公開, 大会は中止）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿野凌, 橋本晏奈, 佐藤敦, 竹中万紀子, 松井晋
2. 発表標題 鳥類の卵殻表面構造の種間比較
3. 学会等名 日本生態学会第66回全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井晋, 佐川南美, 石塚拓人, 青木恵利也, 竹中万紀子, 佐藤敦
2. 発表標題 スズメ目鳥類における繁殖ステージの進行に伴う卵殻表面の撥水性の変化
3. 学会等名 日本鳥学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤敦、佐川南美、竹中万紀子、松井晋
2. 発表標題 スズメ目鳥類における尾脂腺由来の卵表面脂質
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会（福岡×オンライン）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 敦 (Sato Atsushi) (80205898)	東海大学・生物学部・准教授 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関