

平成21年 5月 26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580310

研究課題名（和文） 鳥類卵胞においてIgY輸送量を制御する鍵因子の解明

研究課題名（英文） Studies on the regulatory factor for IgY transport into avian ovarian follicles

研究代表者

村井 篤嗣（MURAI ATSUSHI）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：10313975

研究成果の概要：抗体は免疫機能を司る重要な機能性タンパク質である。本研究では、鳥類卵胞（卵黄形成の実質器官）へ抗体が輸送される現象に着目し、各種抗体の輸送特性と効率的に卵黄へ輸送されるために必要な抗体の構造条件を調査した。また、卵胞における抗体受容体の探索を試みた。その結果、卵黄へは選択的かつ効率的に鳥類特有の抗体「IgY」が輸送され、さらに、IgYが効率的に輸送されるにはIgYを構成する定常領域が必要不可欠であることが明らかとなった。卵胞組織を構成する最も内層のペリビテリン膜と顆粒膜細胞層でIgYの結合シグナルが観察され、この部位に卵胞内へ効率的に抗体を輸送するための受容体が存在する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：動物栄養生理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：畜産物利用、卵、抗体、IgY、ニワトリ、ウズラ、卵胞、デザイナーエッグ

## 1. 研究開始当初の背景

家禽の優れた産卵能力や飼養管理コスト面から、家禽による組換えタンパク質生産系が有望視されている。卵黄には血液中の抗体が大量に移行することから、医療用のヒト抗体を家禽に生産させようとする試みもなされている。また、抗体を模した組換えタンパク質を血液中に分泌させることで、組換えタンパク質を卵黄へ輸送させることも可能である。

鳥類の卵胞へは、哺乳類のIgGに相当するIgYが血液から卵胞内（卵黄形成の実質器官）へ大量に輸送される。一般に、卵胞へある分子が大量に輸送される場合、その分子は卵母細胞膜上に存在する受容体と結合後、エンドサイトーシスによって卵胞内へ取り込まれる。近年では、IgYと結合するFcRn受容体が発見されたが（West et al., 2004, Immunity, 20: 601-610）、この受容体の結合特性と卵胞に輸送される抗体の種類とが一致せず、他の受

容体の存在が示唆されている (Ward, 2004, *Immunity*, 20: 507-508)。すなわち、現在でも鳥類卵胞における抗体輸送機構は不明のままである。

## 2. 研究の目的

鳥類の卵胞における抗体輸送機構が不明であることに加え、卵胞での抗体輸送は単なる受動的な輸送と考える研究者も多い。そこで、本研究では、鳥類卵胞における抗体輸送機構を明らかにすることを最終目標に据え、卵胞へ輸送される各種抗体の輸送特性を調査することにより、抗体が選択的かつ効率的に輸送されるために必要な構造条件を明らかにしようと試みた。具体的には、以下の3つの研究課題に取り組んだ。

(1) 血液中の IgY は受容体を介したエンドサイトーシスにより、選択的に卵黄へと移行すると考えられている。もし、IgY を積極的に卵黄へ輸送する機構が存在するならば、卵黄 IgY 濃度は血液 IgY 濃度よりも高くなると考えられた。そこで、血液中の IgY 濃度と卵黄中の IgY 濃度を比較し、卵黄への IgY 濃縮倍率を算出することを試みた。

(2) 卵黄には IgY が多量に含まれているが、卵黄への輸送に必要な抗体の構造条件が明確ではなかった。そこで、様々な抗体を外因的にウズラへ投与し、卵黄への輸送量を測定することにより、卵胞への効率的な輸送に必要な抗体構造条件を調査した。

(3) 卵胞には IgY と結合する受容体が存在すると想像されるが、未だその実体は不明である。この受容体を同定することは卵胞輸送に必要な IgY 構造領域の同定にも直結する。そこで、組織学的手法を用いて多層からなる卵胞膜組織の何れの部位に IgY と結合活性を持つ因子が存在するのかを調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) 各種ニワトリ系統における卵黄 IgY 濃度の測定

実験動物：実用採卵鶏として Dekalb および名古屋種の2系統を用いるとともに、ファヨウミ種に由来する近交系の PNP/DO 系統を実験に供した。ニワトリはすべて 14L:10D の照明条件下、水と市販飼料を自由摂取させ、単飼ケージで飼育した。

方法：安定して産卵を行っているニワトリから3日おきに4回血液を採取し、血漿を得た。また、血液採取の開始日から、終了日まで、計10日間に産卵されたすべての卵を採卵し、卵黄中 IgY 濃度を測定した。

Akita and Nakai (1993, *J. Immunol. Methods*, 160: 207-214)の方法に従って卵黄から IgY を

抽出した。抽出操作時に失われる IgY の損失率を補正し、正確に IgY 濃度を測定するため、digoxigenin(DIG)で標識した既知量の IgY を抽出前の卵黄サンプルに加えた。ELISA 法により、卵黄中総 IgY 濃度および DIG 標識 IgY 濃度を測定した。同様に、血漿中 IgY 濃度も ELISA 法により測定した。

### (2) ウズラ卵胞における各種抗体と IgY の輸送特性の解析

#### ①ニワトリ IgY とヒト抗体

実験動物：ニホンウズラを使用した。ウズラはすべて 14L:10D の照明条件下、水と市販飼料を自由摂取させ、単飼ケージで飼育した。方法：ニワトリ IgY, IgA, IgM ならびにヒト単量体 IgA (血液由来)、ヒト多量体 IgA (初乳由来) を購入し、投与抗体として利用した。また、IgY のプロテアーゼ分解産物である、Fc, Fab, F(ab')<sub>2</sub> の各種 IgY 断片も投与した。なお、内因性の抗体と区別するために、これらの投与抗体の一部は DIG で標識した。

安定して産卵を行っているウズラへ各種抗体ならびに IgY 断片を翼下静脈から投与した。卵黄から投与抗体および IgY 断片を抽出し、取り込み量を測定した。

#### ②ニワトリ IgY とウズラ IgY

ニワトリとウズラそれぞれの血液から IgY を抽出し、逆相 HPLC により高度に精製した。これらの IgY を DIG で標識した後、産卵ウズラの翼下静脈へ投与した。卵黄から投与 IgY を抽出し、取り込み量を測定した。また、血液ならびに各種臓器における投与抗体の残存量と蓄積量を測定し、ニワトリ IgY とウズラ IgY のウズラ体内における動態を調査した。

### (3) 組織学的手法によるウズラ卵胞膜組織での IgY 結合活性の検出

産卵ウズラの腹部から卵胞を摘出し、直ちに凍結した。この卵胞組織から凍結切片を作成した。DIG で標識したニワトリ IgY の Fc 断片を準備し、この断片と凍結切片を緩衝液中で反応させた。また、卵胞への輸送効率が低いとされているニワトリ Fab 断片を負の対照区として用いた。卵胞切片との反応後、GFP 標識した抗 DIG 抗体と反応させた。この切片を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、IgY 断片の結合の有無を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) 3系統のニワトリにおける卵黄 IgY 濃度

これまでに報告されたニワトリ卵黄中の IgY 濃度は 1~25 mg/g 卵黄の範囲内にあり、報告例間での濃度差が大きく、正確な IgY 濃度は不明であった。供試鶏の系統差や試料調整時の IgY の損失などが、正確な卵黄 IgY 濃度を測定できない原因として考えられた。そ

ここで、系統間による IgY 濃度差を考慮し、3 系統のニワトリを実験に供した。さらに、卵黄からの IgY の抽出効率を加味し、ELISA 法で測定した卵黄 IgY 濃度を抽出効率で補正した。卵黄からの IgY 抽出効率には系統間で差がなく、50-60% の範囲にあった。この抽出効率で補正した卵黄の水溶性画分における IgY 濃度 (mg/g 卵黄) は、Dekalb が 12.6、名古屋種が 12.1、PNP/DO が 25.0 であった (表 1)。血漿 IgY 濃度と卵黄 IgY 濃度を比較すると、全ての系統で血漿濃度よりも卵黄濃度が高くなった。3 系統のデータをプールし、卵黄への濃縮倍率 (卵黄 IgY 濃度/血漿 IgY 濃度) を計算した所、約 1.7 倍となった。

表 1. 3 つの異なる系統における血漿 IgY と卵黄 IgY の濃度ならびに卵黄 IgY/血漿 IgY 比

	Dekalb	名古屋	PNP/DO
血漿 IgY (mg/mL)	8.9 ± 1.0 <sup>b1</sup>	6.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	14.3 ± 1.5 <sup>a</sup>
卵黄 IgY (mg/mL)	12.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	12.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	25.0 ± 4.2 <sup>a</sup>
卵黄 IgY /血漿 IgY <sup>2</sup>	1.48 ± 0.17	1.92 ± 0.28	1.72 ± 0.16

<sup>a-b</sup> 同一行の異符号間に有意差有り  $P < 0.05$ .

<sup>1</sup> 表中の値は平均値 ± SEM (n=5).

<sup>2</sup> 卵黄の水溶性画分に含まれる IgY の濃度。

以上の結果は、血液中の IgY が濃縮されて卵黄で蓄積されていることを意味し、鳥類の卵胞では選択的な抗体輸送機構が存在する可能性を示唆するものであった。

本研究成果は、過去に一致を見なかったニワトリ卵黄の IgY 濃度について、独自の工夫を加えた測定技法より、正確な卵黄 IgY 濃度の測定を可能にした。これらの内容は基礎的知見の集積としての価値が認められ、国内学術雑誌に原著論文 (雑誌論文の項の③) として掲載された。

## (2) 各種抗体の輸送特性

### ①ニワトリ IgY とヒト抗体

投与した 3 種類のニワトリ抗体 (IgY、IgA、IgM) のうち、IgY の輸送量が最も高くなり、投与した IgY の 22% が卵胞に輸送されることが判明した。さらに、IgY の輸送量には及ばないものの、IgA も卵黄へ輸送されることが判明した。ウズラへ投与した IgA は単量体と多量体が混在していたが、卵黄へ輸送された IgA にはほとんど単量体しか含まれておらず、多量体 IgA は検出されなかった。また、多量体抗体の IgM は卵黄へは輸送されなかった。以上の結果から、多量体を形成する抗体は卵黄へ輸送されにくいと考えられた。

続いて、卵黄へ輸送されると報告されているヒト IgA をウズラへ投与し、卵黄への輸送量を単量体と多量体で比較した。その結果、多量体ヒト IgA は単量体ヒト IgA に比べ、輸送量が約 9 倍低下することが明らかとなった。したがって、卵黄へ効率的に輸送される抗体は単量体を形成している必要があることが判明した。さらに、単量体の抗体であっても、卵胞への取り込み量や取り込み速度は IgY が他の単量体抗体よりも高いことが明らかとなった。

卵胞への効率的な取り込みに必要な IgY 構造領域を調査するため、IgY を酵素分解した IgY 断片 (Fc、Fab、F(ab')<sub>2</sub>) をウズラへ投与し、それらの卵胞への取り込み量を比較した。Fc 断片は IgY と遜色ない量が卵胞へ取り込まれたのに対し、Fc 領域を欠いた Fab 及び F(ab')<sub>2</sub> 断片は卵胞への取り込み量が著しく低下した (図 1)。

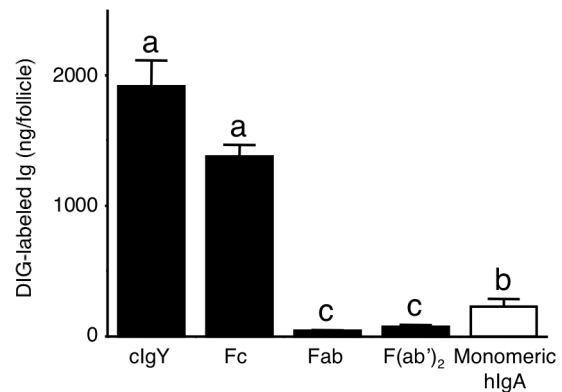


図 1. DIG 標識した IgY と各種 IgY 断片のウズラ卵胞への取り込み量. 20 µg の IgY、IgY 断片 (Fc、Fab、F(ab')<sub>2</sub>) ならびにヒト IgA (monomeric hIgA) を産卵ウズラの翼下静脈より投与し、6 時間後に卵胞を摘出した。卵胞内に取り込まれた DIG 標識抗体量を ELISA により測定した。棒グラフは平均値 ± SEM (n=5)。<sup>a-c</sup> 異符号間に有意差有り ( $P < 0.05$ )。

以上の結果より、IgY の Fc 領域が卵黄への効率的な輸送に必要な不可欠であることが判明した。さらに、鳥類卵胞において選択的な抗体輸送機構が存在する可能性を強力に示唆する結果を得た。

本研究成果は、IgY の構造領域で卵胞内への輸送に関わる領域をはじめて実験的に明らかにしたものである。また、IgY の Fc 領域と様々な機能性タンパク質との複合体を合成することにより、卵黄内へ機能性タンパク質を蓄積できる可能性を示したものである。これらの内容は、本研究全体を通しての主要な研究成果であり、その新規性が認められ、国際学術雑誌に原著論文 (雑誌論文の項の②) として掲載された。

## ②ニワトリ IgY とウズラ IgY

上記「(2)各種抗体の輸送特性 ①ニワトリ IgY とヒト抗体」の実験により、ウズラの静脈へ異種動物にあたるニワトリの IgY を投与すると、全投与量の 22%ものニワトリ IgY がウズラ卵胞へ輸送されることを示した。同種のウズラ IgY をウズラ自身へ投与すれば、より効率的に卵胞へ輸送されることが予測されたが、その真偽は不明であった。そこで、ニワトリ IgY とウズラ IgY のウズラ卵胞への輸送量を比較するとともに、両者の輸送特性を解析した。

予想に反して、ウズラ IgY の卵黄輸送量に比べ、ニワトリ IgY の卵黄輸送量は約 3 倍も高くなった (図 2)。すなわち、異種性のニワトリ IgY の方がより効率的にウズラ卵胞へ輸送されることが判明した。また、血液中の投与ニワトリ IgY と投与ウズラ IgY の経時的濃度変化を調査した所、常にウズラ IgY の濃度がニワトリ IgY の濃度よりも高くなった。すなわち、ウズラ IgY の卵胞輸送量が低い原因は血液中からの消失速度が速いことに起因するものではないと考えられた。

さらに、各種臓器における投与ニワトリ IgY と投与ウズラ IgY の蓄積量を比較した所、卵胞を除く全ての臓器でウズラ IgY の蓄積量がニワトリ IgY の蓄積量よりも高くなった。

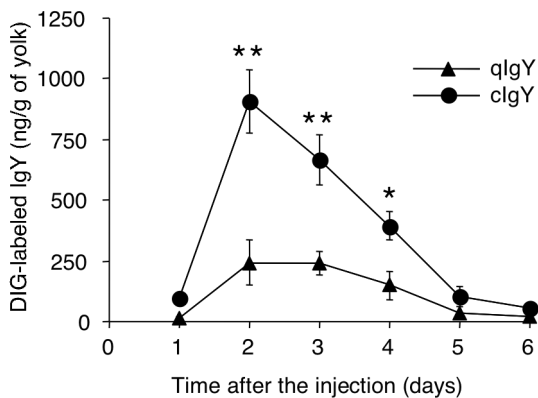


図 2. DIG 標識したニワトリ由来 IgY とウズラ由来 IgY のウズラ卵黄への輸送量. 20  $\mu$ g の両ウズラ IgY (qIgY) とニワトリ IgY (cIgY) を産卵ウズラの翼下静脈より投与し、放卵された卵の卵黄に取り込まれた DIG 標識 IgY 量を ELISA により測定した。値は平均値  $\pm$  SEM (n=5)。\*異符号間に有意差有り (P<0.05)。

以上の結果より、ウズラ卵胞は異種性のニワトリ IgY を効率的に輸送する機構を備えていると結論された。

本結果は我々にとっても予想外のものではあったが、新規性に加えて、デザイナーエッグの創出を企てる際に、卵へ有用タンパク質を効率的に輸送させるための新たな戦略を提供

し得る成果であったことから、国際学術雑誌に原著論文 (雑誌論文の項の①) として掲載された。

## (3) 卵胞での IgY 結合活性の検出

Fc 断片を卵胞切片とインキュベートし共焦点レーザー顕微鏡により観察した所、顆粒膜細胞層の側底面とペリビテリン膜付近に結合シグナルが検出された。同様のシグナルは、Fab 断片を卵胞切片とインキュベートした場合には観察されなかったことから、顆粒膜細胞層もしくはペリビテリン膜に IgY の Fc 領域と結合する分子が存在する可能性が示唆された。

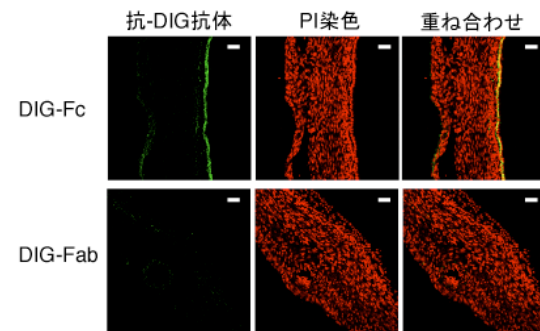


図 3. 卵胞の凍結切片とニワトリ IgY の Fc 断片ならびに Fab 断片との結合. F2 卵胞の凍結切片を DIG 標識した Fc あるいは Fab と反応させ、この断片を GFP で標識した抗-DIG 抗体で検出した。同一の切片をプロビジウムアイオダイド (PI) で染色し、卵胞を構成する細胞の核を染色した。Fc 断片では両写真を重ね合わせると、再内層で緑色と赤色が重なり合い黄色を呈している。倍率 X200。図中の白棒は 50 $\mu$ m。

以上の結果より、卵胞には IgY の Fc 領域と結合する受容体が存在する可能性が示唆された。

従来の研究では、卵胞全体のいずれかに結合因子が存在することは報告されていたが、本結果のように、その結合部位を組織学的に検証したのは世界で初めての成果である。これらの成果は論文としてまとめるには至っていないものの、最終目標である鳥類卵胞での抗体輸送機構を解明する上では、調査対象とすべき組織の部位を特定できたことは、今後の研究推進に大いに役立つ成果と捉えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Bae, H.-D., Kitaguchi, K., Horio, F. and Murai, A. (2009) Higher incorporation of heterologous chicken IgY compared with

homologous quail IgY into egg yolks of Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Poult. Sci.**, refereed, in press.

- ② Kitaguchi, K., Osada, K., Horio, F. and Murai, A. (2008) Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Vet. Immunol. Immunopath.**, refereed, 121: 290-299.
- ③ Kitaguchi, K., Minoura, M., Noritake, M., Mizutani, M., Kinoshita, K., Horio, F. and Murai, A. (2008) Determination of immunoglobulin Y concentration in yolk extract prepared by water dilution method: comparisons among three strains of chickens. **J. Poult. Sci.**, refereed, 45: 82-87.

[学会発表] (計 5件)

- ① 村井篤嗣・BAE, Hae-duck・小澤堯・小林慧三・小林美里・堀尾文彦・古瀬充宏. 孵化直後に残存卵黄を除去したニワトリヒナにおける栄養素代謝の特徴. 日本家禽学会 2009 年度春季大会. 日本大学 藤沢, 2009 年 3 月 28 日.
- ② 村井篤嗣・小林慧三・BAE Haeduck・北口公司・堀尾文彦. ウズラ卵胞におけるニワトリ IgY とヒト IgG の輸送特性: 選択的な抗体輸送機構の存在. 日本家禽学会 2008 年度秋季大会. 北里大学 十和田, 2008 年 8 月 28 日.
- ③ BAE Haeduck・北口公司・堀尾文彦・村井篤嗣. ウズラ卵胞へは異種抗体であるニワトリ IgY が多く取り込まれる: 静脈投与したウズラ IgY とニワトリ IgY の比較. 日本家禽学会 2008 年度春期大会. 常磐大学 水戸, 2008 年 3 月 28 日.
- ④ 北口公司・長田健一・堀尾文彦・村井篤嗣. ウズラ卵胞凍結切片上における IgY 結合活性の組織内局在. 日本畜産学会第 109 回大会. 常磐大学 水戸, 2008 年 3 月 27 日.
- ⑤ 北口公司・箕浦正人・則武美保・水谷誠・木下圭司・堀尾文彦・村井篤嗣. 抽出効率を考慮した卵黄 IgY 濃度の測定: ニワトリ系統間における卵黄 IgY 濃度の比較. 日本家禽学会 2007 年度秋期大会. 岡山大学 岡山, 2007 年 9 月 29 日.

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/study.htm.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村井 篤嗣 (MURAI ATSUSHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授  
研究者番号: 10313975

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

堀尾 文彦 (HORIO FUMIHIKO)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 20165591