

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580327

研究課題名（和文）ニホンウズラにおける自然免疫に関与する受容体と抗菌ペプチドの発現

研究課題名（英文）Expression of Toll-like receptor and avian β -defensin in response to bacterium in Japanese quail

研究代表者

原 ひろみ（HARA Hiromi）

東京農業大学・農学部・講師

研究者番号：00343567

研究成果の概要（和文）：成熟したニホンウズラで遺伝的血清中抗体（IgG）濃度が高い系統（H群）と低い系統（L群）の差異の原因を追究するため自然免疫から獲得免疫の架け橋となる分子の発現に着目し、幼雛初期のそれらの分子と腸内細菌叢の発達状態を調べた結果、幼雛初期に自然免疫から獲得免疫の架け橋となる各分子の発現が腸内細菌叢定着と関連して活発的に起こることが示された。

研究成果の概要（英文）：It was shown that the expression of each molecule which becomes the go-between of the acquired immunity from the innate immunity in the early stages of chick related to the intestinal flora colonization and they activation becomes a trigger.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ニホンウズラ、自然免疫、TLR、腸内細菌、IgG

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の原らは、ニホンウズラのニトリに比べて優れた資質としてあげられる抗病性の点に着目し、その潜在的な感染防御力を明らかにするため、リンパ球分離、白血球表面特異抗原の同定（原，渡邊 1993, 1996）、マクロファージの貪食能（Hara et. al., 2004）、ならびに主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）および熱ショックタンパク質（HSP70）遺伝子解析などを通じて、各種の生理遺伝学および分子免疫学的特性について一連の研究を推進してきた（半澤ら，1995，1999a, b, 2004a, b, c, 2005）。また、これらの実験過程で、

その正常血清中 IgG 値が有意に高い個体群（A系）・低い個体群（B系）を見出し、系統として維持・管理している。

そこでこれまでの研究成果を基礎として A・B 両系統間の抗体産生能を獲得するまでの幼雛期の自然免疫系、特に腸管における免疫応答能の差異を明確にすることにより、ニホンウズラの免疫系、抗病性の一端を明らかにできるものと考えた。

腸内細菌叢は、宿主にとっての難消化性物質の消化吸収を補助し、またビタミン類を合成生産するなど栄養生理上、重要な役割を果たすと共に、腸管免疫系に抗原刺激を与え、

さらにこれと協調して腸管内での病原性微生物の増殖を抑える機能を有する。

近年、自然免疫系において微生物固有の分子構造を認識する膜タンパク質受容体の1つである Toll-like receptor (TLR)ファミリーが注目され、自然免疫から早期誘導期そして獲得免疫移行においての重要性が示されている。各 TLR は単独あるいは会合してさまざまな微生物固有抗原を認識する。とりわけ TLR2 ファミリー(ほ乳類では TLR1, 2, 6 および 10) は、グラム陽性菌の細胞壁外膜に存在し、細菌性リポタンパク質 (BLP) や peptidoglycan (PGN) を認識し、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁外膜に多く存在し、B 細胞活性化、強いアジュバント効果、細胞毒性など多彩な作用を示す lipopolysacchride (LPS) を認識するため、腸管における細菌叢の形成に大きな影響を及ぼすものと考えられる。ほ乳類とは異なりニワトリの TLR2 は2つのタイプがあり (Fukui A et al. 2001), この subfamily である TLR 1 にも2つのタイプがある (Yilmaz A et al. 2005)。これらはそれぞれ共発現し、コンビネーションによってその役割を果たしている (Megumi Higuchi et al. 2007)。

一方、体内に侵入した広範囲の病原微生物に対する防御機構を有する抗菌ペプチドは生体内での自然免疫において重要な役割を果たしている。その一つである Defencin (DEF) は植物、昆虫から脊椎動物まで広く生物界で検出されている。また、DEF はグラム陽性菌、陰性菌、原生動物、真菌およびエンベロープを有するウイルスに対して抗菌活性を示す。現在までに鳥類では デフェンシン (DEFB) のみが、ニワトリでは 13 種、ダチョウで 1 種、七面鳥で 3 種、キングペンギンで 2 種およびアヒルで 1 種その遺伝子が同定されている。ニワトリにおいて DEFB の mRNA 発現組織は、1 日齢 (David J Lynn et. al 2004) 2 ヶ月齢 (Yanjing Xiao et. al. 2004) および 3 ヶ月齢 (Chengouan Zhao et. al. 2001) に各組織においてその発現が異なることが報告されている。また、ニワトリの DEFB1 および DEFB2 は大腸菌に対し抗菌活性を示すことも報告されている。

近年、畜産業界においては食の安全を社会的に問われていることから抗生物質、薬剤投与を極力軽減化した生産体系が必要となっている。養鶏業界でもプレ・プロバイオティクスとして飼料中に菌体、その構成成分を添加し、腸内に細菌叢を早期に定着させ、育雛初期での免疫応答の向上を目指す試みがなされている。しかし、この時期の鳥類における腸内細菌叢形成過程における TLR および DEFB の発現状態が成熟後の抗病性に及ぼす影響は、ほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

ニホンウズラの潜在的な感染防御力を解明するために、免疫系の最終産物である免疫グロブリン (IgG) の濃度に正常時で高低の差がある系統を利用し、自然免疫において抗原認識から早期防御機構で働く TLR および DEFB の量的・質的差異を比較解析することが極めて重要であると考えその一端として以下の 3 つを目的とした。

(1) TLR2 および 4 遺伝子の同定と各日齢、各臓器における mRNA 転写量および DEFB の mRNA 転写の有無

(2) TLR 発現ならびに精製 DEFB 画分と抗体応用による抗菌機能解析

(3) 孵化直後から性成熟に到る過程での経時的な腸内細菌叢、TLR ならびに DEFB mRNA 転写量の変動、さらにその発現状態、これら 3 者の相互関係に関する加齢、臓器間での差異の明確化

3. 研究の方法

(1) TLR2 および 4 遺伝子の同定と各日齢、各臓器における mRNA 転写

TLR2 の mRNA 発現解析: TLR2 type1 および type2 特異配列を挟むように共通塩基配列領域でプライマーを設計し、このプライマーを用いてニホンウズラ 1、3、5 および 7 日齢の正常血漿 IgG 値の高い H 群と低い L 群各 3 個体の空腸、回腸、盲腸および結腸より RNA を抽出し濃度測定後、RT-PCR にて cDNA 合成し、それをテンプレートに PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動にて産物を確認した。もとの RNA 濃度から電気泳動像のバンドより各腸の TLR2 発現量を算出し、H と L 群、臓器、日齢間で比較した。

TLR4 の mRNA 発現解析: GgTLR4 (AY064697) のエキソン 2~3 領域を増幅するプライマーを設計し、ニホンウズラのコスミドゲノムライブラリー作製個体のゲノム DNA をテンプレートに PCR 増幅し、得られた産物からプローブを調整し、コロニーハイブリダイゼーション法にてニホンウズラのコスミドゲノムライブラリーをスクリーニングし、TLR4 陽性クローンを選択した。そのクローンについて、TLR4 特異的プライマーによる PCR 増幅、シーケンス解析した。

(2) 抗 DEFB2 および 12 特異抗体作製ならびに精製 DEFB 画分と抗体応用による抗菌機能解析: 抗体作製は既に得られている DEFB2 および 12 の塩基配列よりアミノ酸配列を推定しエピトープを検索/選択後、その合成ペプチドをウサギに免疫する。

・ DEFB の抽出・粗精製とその抗菌性: 腸管および偽好酸球より顆粒内物質を抽出した。偽好酸球は 3 週齢ニホンウズラ雄の系静脈より

密度勾配遠心法により得た。この偽好酸球から浸透圧差と超遠心分離を利用し、顆粒を得、酸性処理により顆粒抽出物を得た。得られた顆粒抽出物の抗菌性活性を寒天内溶菌反応にて測定した。

免疫染色による TLR2 および 4 の局在発現組織は胸腺、嚔嚢、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、盲腸扁桃、結腸、総排泄腔、ファブリキウス嚢をパラフィン包埋し切片を作製した。

抗 TLR4 抗体は塩基配列より得たアミノ酸配列からエピトープを検索し、その合成ペプチド (operon) をウサギに免疫して抗血清として得た。その抗 TLR4 抗体およびすでに作製した抗 TLR2 タイプ共通抗体と FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて免疫染色した。

(3) 幼雛個体における腸内細菌叢の同定

幼雛 0, 1, 3, 5, 7 日齢 (各 6 個体) 計 84 個体を供試し、放血屠殺後、外科的に腸管を摘出し、空腸、回腸、盲腸、結腸に分離し、その内容を好気性菌用非選択 TS 培地および嫌気性菌用非選択 BL 培地にて培養し、グラム染色、コロニー形態により分類済みの細菌群 (延べ 800 サンプル) のうち、嫌気性菌について、DNA 抽出液をテンプレートとして、16S rDNA 特異ユニバーサルプライマーを用い PCR 増幅後自動塩基配列解析装置 (ABI3110) にて塩基配列を決定し、16S rDNA の塩基配列情報を活用し、菌属 (種) を分類した。

4. 研究成果

(1) TLR2 の mRNA 発現解析: ニホンウズラ 1, 3, 5 および 7 日齢の空腸、回腸、盲腸および結腸で RNA 発現を RT-PCR により確認した。ニホンウズラ 1, 3, 5 および 7 日齢の空腸、回腸、盲腸および結腸で RNA 発現を RT-PCR により確認した。さらに cDNA をテンプレートとして得られた PCR 増幅産物の泳動像のバンドの濃さと cDNA テンプレート量の比をもとに求めた index 値を比較解析し、いずれの日齢においても H 群よりも L 群の mRNA 量が多いことが解った (図 1)

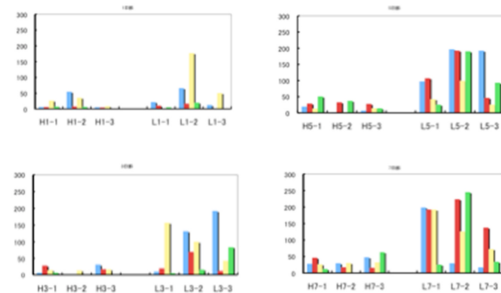


図 1 幼雛各腸管の TLR2 mRNA 発現解析
上左 1 日齢, 下左 3 日齢 右上 5 日齢, 下 7 日齢
各グラフ左 H 群, 右 L 群

TLR4 の mRNA 発現解析ニホンウズラゲノムライブラリーより選択したクローンには PCR 増幅、シーケンス解析よりニワトリの exon1-3 に相同の塩基配列が含まれていることを確認し、さらにそのクローンよりニワトリ TLR4 遺伝子 (11,700bp) の 72% の領域に相当するニホンウズラ TLR4 の 8,439bp を決定し、ORF 塩基配列よりその SMART 構造を解析した。ニホンウズラではニワトリと比較し 1 塩基欠損/挿入がありこのためアミノ酸 31 残基のうち 27 残基が異なる領域があった (図 2)。mRNA 発現解析は Exon3 領域内を増幅するプライマーを設計し、4 週齢ニホンウズラの 18 臓器由来 cDNA をテンプレートに PCR 増幅し、いずれの臓器においても増幅産物が得られ塩基配列より TLR4 であることが確認された。



図 2 TLR4 の SMART 構造

(2) DEFB2 および 12 特異的抗体作製

抗 DEFB2 抗体作製では選択したエピトープである合成ペプチドに対して抗体価の上昇が認められず、エピトープを再選択の必要性が考えられた。

ニホンウズラ 5 羽を供試し、5 羽全ての偽好酸球から前述方法にて顆粒抽出液を得た。得た抽出液の抗菌性活性を溶菌反応法のディスクおよびコロニー法にて確認した。したがって、精製を進め、抗菌活性を示す分子の同定へ進める。

抗 TLR2 type 共通ペプチド抗体を用いてニホンウズラ 3, 4 週齢の腸管: 十二指腸、回腸、空腸、盲腸、結腸、およびリンパ臓器: 胸腺、脾臓、ファブリシウス嚢、盲腸扁桃を免疫組織染色した。各臓器内で散在するリンパ球および集簇リンパ球、濾胞内リンパ球および上皮性細胞が強い陽性を示した。幼雛 5, 7 日齢ではいずれの臓器においても TLR4 は全体的に各臓器において強く発現していることが確認された。さらに両 TLR とも成長するにつれて発現量が増加した。よって幼雛の段階から TLR4 が先行して強く発現し、TLR2 と共に病原体認識能力としての抵抗力を備えていると確認された。

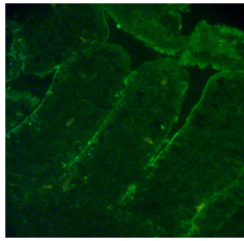


図3 ニホンウズラ 3週齢盲腸扁桃
TLR2 免疫染色像

(3) 幼雛個体における腸内細菌叢の同定
嫌気性菌非選択 BL 培地よりコロニーとして得られた嫌気性菌の 16SrDNA 解析では 15 科 31 属を同定し(表 1,2)、3 羽以上に検出された 8 科 16 属が群・日齢により変動が顕著であった。腸内細菌叢の菌種は 5,7 日齢が 3 週齢、成熟個体のそれに類似していたのに対し、空腸の嫌気性菌総菌数は、1,3 日齢で L 群が MH 群より有意に高く、IgG 濃度と盲腸の好気性総菌数に有意な正の相関があった。また、空腸の嫌気性グラム陽性桿菌、嫌気性総菌数、好気性グラム陽性桿菌、回腸の好気性グラム陽性桿菌に有意な負の相関があった。

表 1 グラム陽性菌各属における検出個体数

門	目	科	属	L群			MH群			合計		
				1日齢	3日齢	7日齢	1日齢	3日齢	7日齢			
Firmicutes	Clostridia	Clostridaceae	Clostridium	2	1	0	0	1	1	1	7	
			Un-classified Clostridiales	0	3	1	2	0	1	0	0	7
			Sulfolobus	0	0	1	1	0	1	2	0	5
			Coprococcus	0	2	3	1	0	1	1	2	10
			Dorea	0	1	2	0	0	1	0	0	4
			Asaetobacter	0	0	0	0	1	0	0	0	1
			Ruminococcus	0	1	2	0	0	1	1	0	5
			Osseobacterium	0	0	0	0	0	0	1	1	1
			Enterococcus	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Enterococcus	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Un-classified Firmicutes	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Un-classified Firmicutes	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Acidithiobacillus	0	1	0	0	0	0	0	1	2
			Veillonella	0	0	1	0	0	0	0	0	1
			Parvimonas	0	0	0	0	0	0	1	1	1
			Parvimonas	1	0	0	0	1	0	0	0	2
Bacillales	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	0	1	1	1	1	0	0	1	6
			Enterococcus	1	2	1	1	1	0	0	0	6
			Streptococcus	0	1	1	1	0	0	0	1	4
			Un-classified Firmicutes	0	3	0	0	0	1	1	0	6
Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Callitriche	0	0	1	1	0	0	1	2	4
			Onosella	0	1	0	0	0	0	1	2	4
Bifidobacteriales	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	0	1	1	1	0	0	0	0	3

表 2 グラム陰性菌各属における検出個体数

門	目	科	属	L群			MH群			合計		
				1日齢	3日齢	7日齢	1日齢	3日齢	7日齢			
Proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Phyllobacterium	0	0	1	0	0	0	0	1	
			Enterobacteriaceae	1	3	1	2	2	1	0	2	12
Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	1	1	0	1	0	0	0	0	3
			Proteus	0	1	0	1	0	0	0	0	2
			Enterobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			Un-classified Proteobacteria	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Proteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Gallibacterium	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Desulfovibrio	0	1	0	0	0	0	0	1	2
Proteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteriaceae	Campylobacter	0	1	0	0	0	0	0	0	1
			Bacteroides	0	2	3	1	0	3	1	3	13
Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Megamonas	0	2	3	2	0	1	1	3	12
			Peptostreptococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	0	1	1	0	0	0	1	1	4

TLR4 が TLR2 よりも幼雛での発現は高く、空腸の嫌気性グラム陽性桿菌および嫌気性総菌数が IgG 濃度の変動に関連し、それが回腸での TLR2 発現差を誘導したと推測された。ニホンウズラは幼雛期 3~5 日の間で自然免疫から獲得免疫の架け橋となる誘導が腸内細菌叢定着と関連して活発的に起こることが推察された。

これらは幼雛初期段階での遺伝的生理機能制御が成熟個体の免疫系へ大きな影響を与えることを示唆し、獲得免疫誘導発達をより明確化するのに重要であり意義があるものである。

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)
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 ひろみ (HARA Hiromi)
東京農業大学・農学部・講師
研究者番号: 00343567

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し