

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21369

研究課題名（和文）鳥類と哺乳類におけるPLA2R受容体の生理機能の発掘：血中抗体の延命化機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of physiological function of PLA2R receptor in birds and mammals: Study on prolonged antibody concentration in blood

研究代表者

村井 篤嗣（Atsushi, Murai）

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10313975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：鳥類と哺乳類でホスホリパーゼA2受容体（PLA2R）の周知の生理機能が異なる。鳥類ではPLA2Rが抗体受容体として機能するが、哺乳類では受容体機能は知られていない。本研究では、PLA2Rによるトリ抗体（IgY）の輸送機能の実証と、ヒトPLA2Rが抗体受容体として機能するのかを調査した。ニワトリのPLA2Rを強制発現させた細胞培養系を確立して、トリのPLA2Rは抗体受容体であること、トリのPLA2RがIgYの細胞内輸送（トランスサイトーシス）を促進することを実証し、鳥類の血中抗体濃度の維持にPLA2Rが関与することを示した。一方、ヒトのPLA2Rは抗体受容体としての機能を持たないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鳥類と哺乳類のPLA2Rが全く異なる機能を持つことが判明した。鳥類のPLA2Rは主たる免疫グロブリンであるIgYを分解することなく細胞内を輸送する能力を持つことが判明し、PLA2Rが抗体寿命を延長させる本体であることを確信した。今後、免疫機能が增强された感染症に罹患しづらいニワトリ、抗体を大量に含む機能性卵の作出に応用が可能な成果である。

ヒトPLA2Rの生物学的存在意義は依然として不明である。しかし、ヒトPLA2Rが抗体受容体としての機能を持たないことが明確となったため、抗体受容体としての機能が腎疾患であるネフローゼ症候群の原因因子ではないことが判明した点は意義深い。

研究成果の概要（英文）：Physiological functions of the phospholipase A2 receptor (PLA2R) differ between birds and mammals. Avian PLA2R functions as an antibody receptor, but it is unknown whether mammalian PLA2R functions as an antibody receptor or not. In this study, we investigated a potential of chicken antibody (IgY) transport by chicken PLA2R, and further investigated whether human PLA2R functions as an antibody receptor. We established a cell culture system in which chicken PLA2R was expressed, and demonstrated that chicken PLA2R is an antibody receptor and that chicken PLA2R promotes intracellular transport (transcytosis) of IgY, suggesting that PLA2R is involved in prolongation of blood IgY concentration. On the other hand, it was found that human PLA2R does not function as an antibody receptor.

研究分野：栄養生理学

キーワード：畜産学 栄養生理学 ニワトリ ヒト 抗体 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液を循環する免疫グロブリン G (IgG) の寿命は他の血中タンパク質よりも長い。これは、血管の内皮細胞やリンパ球に発現する FcRn と呼ばれる受容体が、細胞内に取り込まれた IgG をリサイクリングすることで IgG を分解経路から離脱させるためである。しかし、FcRn が存在するのは哺乳類だけであり、鳥類では別の IgG 延命化機構が存在すると考えられてきたが明らかにされていない。

我々は、母ドリから次世代ヒナへの抗体輸送機構の解明に取り組んできた。その過程で、鳥類では抗体受容体として働くことが知られている「ホスホリパーゼ A2 受容体 (PLA2R)」の機能阻害が血中の IgY (哺乳類の IgG に相当) の濃度を延命化することを発見した。当初、鳥類の PLA2R は、胚発生後期に卵黄嚢膜を通過して IgY を胚へと輸送する IgY 受容体として同定された (West et al., 2004)。PLA2R は IgY と酸性条件で 2 : 1 の割合で結合し IgY の輸送を制御する (Tesar et al., 2008)。しかし、鳥類の PLA2R が血中の IgY を延命化するのは不明であった。

一方、哺乳類の PLA2R が抗体受容体として働くとの報告はない。PLA2R が発見された当初は、細胞外に放出された酵素ホスホリパーゼ A2 を速やかに消去するための受容体と考えられてきた。しかし、現在では、哺乳類の PLA2R の生物学的存在意義は不明である。一方、ヒトの自己免疫疾患の治療対象としてこの受容体が注目を集めている。日本で約 16,000 人の患者がいるネフローゼ症候群 (尿からタンパク質が多量に漏れて、低タンパク質血症が起こる指定難病) の原因解析により、この責任抗原が腎系球体で発現する PLA2R であることが発見された。すなわち、PLA2R が何らかの抗体受容体機能を持つことで自己免疫による攻撃を受け易いと考えられた。しかし、哺乳類の PLA2R が抗体受容体として働くのかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、鳥類の血中抗体の延命化機構を解明するため、PLA2R による IgY のリサイクリング機能を実証することを第 1 の目的とした。そこで、MDCK 細胞株 (イヌ腎臓尿管上皮細胞) に一過的に PLA2R を大量発現させる実験系を確立し、PLA2R が IgY の再循環 (リサイクル) や経細胞輸送 (トランスサイトーシス) に寄与するのかを調査した。

(2) 哺乳類の PLA2R の機能には不明な点が多い。ヒトの PLA2R に対するヒト抗体への集積はヒト膜性腎症の引き金となる。しかし、ヒトの PLA2R が抗体受容体として働くかは不明である。そこで、本研究では、ヒト PLA2R に対してヒト IgG が結合するのかを調査した。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ PLA2R の全長遺伝子を哺乳類細胞用発現ベクターに連結した。MDCK 細胞にリポフェクション法でニワトリ PLA2R の発現ベクターと空ベクター (Mock) を導入し、以下の項目について検討した。1) 遺伝子導入後の 4 つのタイムポイント (24, 48, 72, 96 時間後) での PLA2R の経時的な発現変化を Western blotting 法で調査した。トランスウェル (図 1) に細胞を播種し、遺伝子導入後に頂端側の培養液に添加した IgY を細胞に取り込ませた後、頂端側へのリサイクル量、基底側へのトランスサイトーシス量を ELISA 法で測定した。

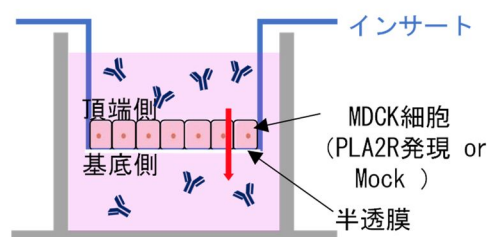


図1. トランスウェル断面図

(2) ヒト PLA2R の分泌シグナルと膜貫通領域を除いた遺伝子断片 (Origene Co. Ltd.) を哺乳類細胞用発現ベクターに連結した。この発現ベクターを ExpiCHO-S 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来の浮遊細胞) に遺伝子導入して、分泌型のヒト PLA2R タンパク質を生産した。また、ニワトリ PLA2R とトリ IgY は pH6.0 で強く結合することがわかっている。そこで、陽性対照として分泌型のニワトリ PLA2R を作出した。これらの PLA2R タンパク質の C 末端に付加された His タグを利用して PLA2R を精製した。

銅 (Cu²⁺) が固定化された 96 ウェルプレートに His タグを介してヒト PLA2R とニワトリ PLA2R を固定化した。このウェルプレートにヒト PLA2R とニワトリ PLA2R (1 μg/ウェル) を pH6.0 と pH7.4 の条件下で添加した。ウシ血清アルブミンを加えた緩衝液でブロッキングした後、ニワトリ IgY、ヒト IgG、ヒト IgG4 (0.5 μg/ウェル) を添加した緩衝液をウェルに加えて、その後、PLA2R に結合した抗体を回収した。ELISA で、回収した溶液中の抗体濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) これまでに、PLA2R を恒久的に発現する MDCK 細胞株を用いて IgY の輸送試験を行ってきたが、十分量の IgY の輸送を検出することができなかった。そこで、MDCK 細胞に一過

的に PLA2R を大量発現させる実験系を確立して、鳥類の PLA2R が IgY の再放出 (リサイクリング) や経細胞輸送 (トランスサイトーシス) に寄与するのかを調査した。

MDCK 細胞にリポフェクション法でニワトリ PLA2R の発現ベクターを遺伝子導入した。リポフェクションから 24 時間後をピークに、MDCK 細胞でのタンパク質レベルでの PLA2R 発現量は経時的に減少した (図 2)。PLA2R タンパク質の発現量は、24 時間後の細胞と比較して 96 時間後の細胞で約 40% まで減少した。よって、PLA2R タンパク質の発現のピークは遺伝子導入から 24 時間後であることが判明した。

トランスウェルに播種した MDCK 細胞にニワトリ PLA2R を強制発現させて、その後 IgY の輸送試験を実施した。IgY を添加した培養液で 4 時間培養 (パルス) した後、培養液を除去して細胞を回収した。また、同様のパルス処理を行った後、IgY を含まない新しい培地を加えてさらに 2

時間培養 (チェイス) し、トランスウェルのインサート内とインサート外の培地をそれぞれ回収した。その結果、MDCK 細胞に取り込まれた IgY 量は PLA2R 群と Mock 群で差はなかった (図 3A)。2 時間のチェイス後に回収したインサート外の培地に含まれる IgY 量は、Mock 群よりも PLA2R 群で約 1.6 倍高くなった (図 3B)。すなわち、細胞内に取り込まれた IgY が細胞を横断するトランスサイトーシス量が、PLA2R の発現によって増強されることが判明した。一方、インサート内の培地に含まれる IgY 量は、PLA2R 群で増加傾向にあったものの、両群間で有意な差は無かった (図 3C)。すなわち、一旦細胞内に取り込んだ IgY を細胞外に再放出するリサイクリングには、PLA2R の強制発現による影響は見られなかった。

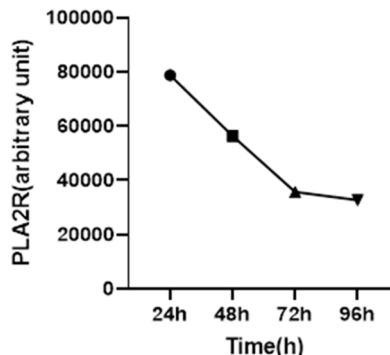


図2. MDCK II 細胞における一過性の PLA2R 強制発現によるタンパク質発現レベルの経時変化
ニワトリ PLA2R 発現ベクターを MDCK II 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間経過した細胞を回収した。ウェスタンブロッティング法で、PLA2R タンパク質の発現レベルを測定した。

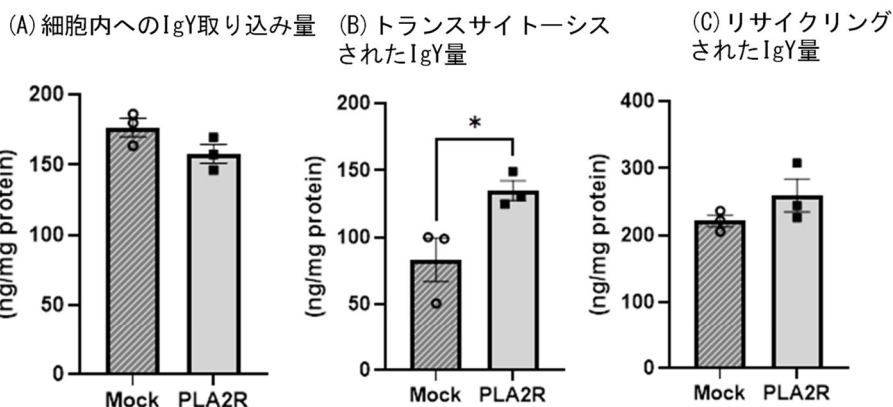


図 3. 一過性に PLA2R を強制発現させた MDCK II 細胞での IgY 輸送量
トランスウェルで細胞を培養して、回収した細胞とインサート内外の培地を回収し、サンプルとした。培地サンプルは ELISA 法により IgY 濃度を測定した。(A) IgY を培地に添加して 4 時間の細胞内への IgY 取り込み量。(B, C) 細胞に IgY を取り込ませた後、2 時間の培養を行った後のインサート外の培地 (B) とインサート内の培地 (C) に含まれる IgY 濃度を測定した。* Student's t-test at $P < 0.05$ ($n=3$, 平均値 ± 標準誤差)。

本試験により、鳥類の PLA2R は抗体受容体としてはたらいっており、PLA2R が IgY の細胞内輸送を増強することが示された。この機能が血液中を循環する IgY の延命化と関連するのは不明であるが、鳥類 PLA2R によるトランスサイトーシス機能は、細胞内に取り込まれた IgY を細胞内での分解経路から離脱させる現象と相矛盾しない。今後は、PLA2R 遺伝子を欠損したトリを作出することで血中 IgY の半減期が短くなるのか、さらにはどの組織や細胞で発現する PLA2R が IgY の延命化に寄与するのかを明らかにする必要がある。

(2) 陽性対照のニワトリ PLA2R (cPLA2R) は pH6.0 の条件下で IgY と強固に結合したが、pH7.4 では、pH6.0 よりも大幅に IgY との結合が減少した (図 4 左)。一方、ヒト PLA2R (hPLA2R) は IgY と pH6.0 と 7.4 の条件下で弱く結合するが、いずれの pH 条件でもヒト自身の IgG とは結合しなかった (図 4 右)。さらに、同様の実験系を使ってヒト IgG4 もヒト PLA2R とは結合しないことを確認した。また、本法よりも検出感度が高いプルダウン法でも解析を行って、ヒト PLA2R とヒト IgG が結合しないことを確認した。以上より、ヒト PLA2R はヒト自身の IgG に対する抗体受容体としては機能しないことが判明した。

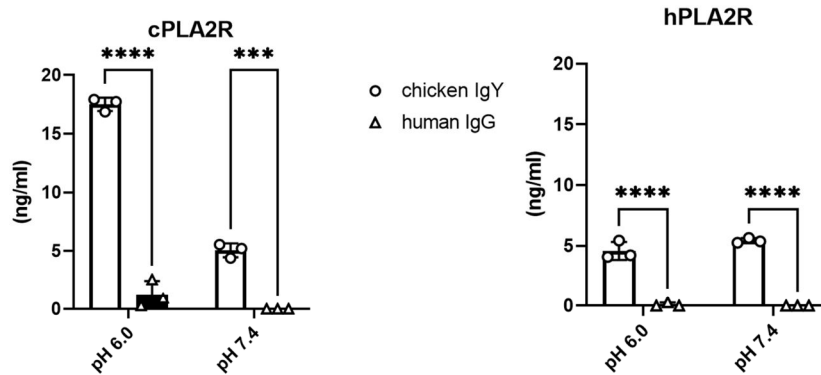


図4. ニワトリPLA2R (左) とヒトPLA2R (右) のニワトリIgYとヒトIgGに対する結合量

銅が固定化された96ウェルプレートにHisタグを介してヒトPLA2RとニワトリPLA2Rを固定化した。このウェルプレートにヒトPLA2RとニワトリPLA2R (1 μ g/ウェル) をpH6.0とpH7.4の条件下で添加した。結合した抗体量をELISA法で測定した。***, **** Tukey-Kramer, $P < 0.001$ or $P < 0.0001$ ($n=3$, 平均値 \pm 標準誤差)。

以上から、哺乳類の PLA2R と鳥類の PLA2R は相同な分子であるが、互いの機能は大きく異なることが推測された。ヒトの膜性腎症患者では、集積する IgG4 の糖鎖グリコシル化パターンが正常人の IgG4 とは異なることが報告されている (Haddad et al., 2021)。膜性腎症患者の抗体を構成する糖鎖構造の違いが PLA2R との相互作用を変化させる要因の一つかもしれない。

< 引用文献 >

Haddad, G., Lorenzen, J. M., Ma H., de Haan, N., Seeger, H., Zaghrini, C., Brandt, S., Kolling, M., Wegmann, U., Kiss, B., Pal, G., Gal, P., Wuthrich, R. P., Wuhrer, M., Beck, L. H., Salant, D. J., Lambeau, G. and Kistler, A. D. (2021) Altered glycosylation of IgG4 promotes lectin complement pathway activation in anti-PLA2R1-associated membranous nephropathy. *J Clin Invest* 131, e140453.

Tesar, D. B., Cheung, E. J. and Bjorkman, P. J. (2008) The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 19, 1587-1593.

West, A. P., Herr, A. B. and Bjorkman, P. J. (2004) The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. *Immunity* 20, 601-610.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 岩澤淳, 村井篤嗣	4. 巻 75
2. 論文標題 ニワトリ卵の生物学-ヒヨコを生み出し、支える栄養成分	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物の科学 遺伝	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 3.Murai, A.*, Hamano, T., Kakiuchi, M., Kobayashi, M. and Horio, F.	4. 巻 99
2. 論文標題 Evaluation of a receptor gene responsible for maternal blood IgY transfer into egg yolks using bursectomized IgY-depleted chickens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Poult. Sci.	6. 最初と最後の頁 1914-1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psj.2019.11.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本真由子・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣
2. 発表標題 産卵ウズラへの抗PLA2R抗体の投与は卵黄へのIgY輸送量を減少させる
3. 学会等名 2021年度日本家禽学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木諒・大島健司・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣
2. 発表標題 母ドリの卵巣と全身組織におけるPLA2R受容体の発現局在とIgY輸送特性の解
3. 学会等名 2021年度日本家禽学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木諒・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣
2. 発表標題 産卵期のニワトリおよびウズラにおけるIgY受容体「PLA2R」の発現局在解析
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------