

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19244

研究課題名（和文）卵黄を取り込むトリ卵母細胞で高発現する新奇受容体のリガンド探索と生理機能の発掘

研究課題名（英文）Investigation of ligands against an unique receptor expressing in avian oocytes and its physiological function

研究代表者

村井 篤嗣（Murai, Atsushi）

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）：我々は、母子免疫の仕組みを解明する過程で、全ての動物種で同定例がない新奇な受容体LRP2Lを発見した。本研究ではLRP2Lの内因性リガンドの同定を最終目標とし、LRP2Lのニワトリとマウスでの発現特性の解析および血中の内因性リガンドを探索した。ニワトリの卵巣では、LRP2Lは白色卵胞でその発現が最も高く、発育段階が進むにつれて減少することが判明した。また、マウスの精巣や卵巣でも本遺伝子が発現することが判明した。分子サイズが異なる分泌型のリコンビナントLRP2Lを作出しニワトリ血液中の内因性リガンドを探索したが、有力なリガンドの同定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRP2L受容体の血中内因性リガンドは依然として明らかではないが、LRP2Lの卵母細胞膜での発現の特徴、哺乳類におけるオルソログ遺伝子の発現についての知見を得ることができた。今回作出したLRP2Lのミニタンパク質を活用して、LRP2Lのリガンド探索や生理的役割を解析することで、鳥類だけではなく、幅広い生物種での本受容体の機能が明らかにされていくであろう。本研究は、生殖機能を制御する新しいホルモンや機能性成分の発見につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the process of elucidating the mechanism of maternal immunity in avian species, we discovered a novel receptor, LRP2L, which has not been identified in any animal species.

In this study, to identify the endogenous ligand of LRP2L, we examined the expression characteristics of LRP2L in chickens and mice and searched for endogenous ligands in the chicken blood. In chicken ovaries, LRP2L was found to be most highly expressed in white follicles and to decrease as the developmental stage progresses. We also found that this gene is expressed in the testes and ovaries of mice. We synthesized secretory recombinant LRP2L with different molecular sizes and searched for endogenous ligands in chicken blood, but were unable to identify a potent ligand.

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 卵 栄養素 脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鳥類の卵黄は母ドリの血液中の成分が卵母細胞内に蓄積したものである。この血液成分の卵黄への輸送は選択的であり、一部の血液成分が卵黄として大量に蓄積する。卵黄に取り込まれる血液成分の一つに抗体があり、この抗体は次世代のヒナへもそのまま受け継がれ、免疫機能が未熟な新生ヒナを感染症などから保護する。この仕組みは母子免疫と呼ばれており、ほとんどの動物種が同様の仕組みを持っている。

我々は、母子免疫の仕組みを解明する過程で、全ての動物種で同定例がない新奇な受容体「LRP2L」(Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 2-Like)を発見した。これまでに、LRP2Lの構造を解析したところ、エンドサイトーシスシグナルを有する全長2,217アミノ酸残基の一回膜貫通型のタンパク質であることが判明した。遺伝子レベルでの発現は卵母細胞が特に高く、タンパク質レベルでは卵母細胞膜で強く発現することが判明した。したがって、この受容体は卵黄成分の蓄積を制御する中核の受容体である可能性が示唆された。

一方、LRP2LのIgY受容体機能を調査するためには、相互作用を鋭敏に検出できるように高純度、かつ大量のLRP2Lが必要である。しかし、母ドリの体内から卵母細胞膜を採取し、LRP2Lタンパク質を単離・精製するのは技術的に極めて困難である。また、LRP2Lは膜タンパク質であり、ジスルフィド結合や糖鎖付加などの様々な翻訳後修飾を受けることから、受容体機能を保持したままLRP2Lタンパク質を大量合成するには哺乳類や鳥類などの動物細胞を用いる必要があった。しかし、LRP2Lは約300kDaの巨大分子であるため哺乳類細胞では大量の調整が困難であることが予想された。

一方、哺乳類におけるLRP2Lの相同(オーソログ)遺伝子の探索をゲノムデータベース上で進めた。しかし、何れの哺乳動物でもその生理機能は不明であり、その組織発現特性も不明であった。

2. 研究の目的

LRP2Lは、血液中のリポタンパク質と結合するリポタンパク質受容体ファミリー(LRPファミリー)に分類される。LRPファミリーは2マクログロブリンやリポタンパク質など様々な物質をリガンドにもつマルチリガンド受容体であること、LRP2LはLRPファミリーに特徴的な受容体介在性エンドサイトーシスを誘導するモチーフを持つことから、卵黄に何らかの物質輸送を担う受容体である可能性が考えられた。そこで本研究課題ではLRP2Lの内因性リガンドの同定を目標とし、LRP2Lのニワトリとマウスでの発現特性の解析および血中の内因性リガンドを探索した。

3. 研究の方法

3-1. ニワトリ卵胞の卵母細胞膜におけるLRP2Lタンパク質発現レベルの解析

ニワトリから卵巣を摘出し、各卵胞を分離した。さらに、卵胞の外層と内層(卵母細胞膜を含む)を分離した。卵胞内層の形質膜を可溶化し、LRP2Lのタンパク質レベルでの発現をウエスタンブロッティング法で解析した。

3-2. マウスの各種組織におけるLRP2L遺伝子の発現解析

雌雄各2匹のC3H-HeNマウスの解剖を行い、前頭葉、大脳皮質、肝臓に加え、雄の場合は精巣と精巣上体脂肪、雌の場合は卵巣周囲脂肪、卵巣を摘出した。これらの組織から総RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを作成した。NCBIゲノムデータベースに登録された遺伝子配列に基づいてプライマーを設計し、任意の3か所で逆転写PCRを行い、それぞれの組織でLRP2L遺伝

子が発現しているのかを調査した。

3-3. 組換え LRP2L タンパク質の作出と LRP2L のリガンドの探索

哺乳類細胞株の CHO-S 細胞を用いて、LRP2L のリガンド結合領域を 4 種類の異なる長さで持つ組換えタンパク質を作出した。これらの LRP2L タンパク質 (アミノ酸数がそれぞれ 2005, 1628, 1325, 705) を精製し、その産生量を評価したところ 1628 個のアミノ酸からなる組換えタンパク質の産生量が最も高くなった。そこで、この LRP2L-1628 タンパク質を使って、ニワトリの血液中成分と結合する因子を探索した。

ニワトリから血液を採取し、密度勾配遠心法により、比重が異なる 4 つの画分に分離した。それぞれの画分はその比重により、含まれるリポタンパク質成分が異なる。VLDL 画分 (比重 $d < 1.021$ g/mL) LDL 画分 (比重 $d < 1.041$ g/mL) HDL 画分 (比重 $d < 1.210$ g/mL) 残差画分の 4 画分を使用した。

プルダウン法により、LRP2L-1628 と結合する成分を、4 つに分画した血液成分から分離した。溶出したサンプルを電気泳動により分離し、銀染色法さらにウエスタンブロットング法により解析した。検出抗体には apoB (VLDL) 抗体を用いた。また、銀染色法で有力な候補リガンドのバンドが検出された場合、切り出したゲル断片をトリプシンによってゲル内消化を行い、消化されたペプチド断片を nano LC-MS/MS で解析した。その後、Mascot search によるデータベース検索を行いタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

卵胞の発育ステージ別の LRP2L タンパク質レベルの発現解析の結果、いずれの発育ステージでも LRP2L タンパク質は発現していることが判明した。さらに白色卵胞において発現が最も高く、卵胞発育が進むにつれ低下していることが判明した (図 1)。この結果から、単位タンパク質当たりでの LRP2L の存在割合は白色卵胞で高く、発育段階が進み、卵母細胞膜が巨大化するにつれて減少すると判断された。卵胞の何れの発育ステージで大量のリガンドを取り込んでいるのかは不明であるものの、単位面積当たりでのリガンドの取り込み量は早期の発育ステージで高い可能性が示唆された。

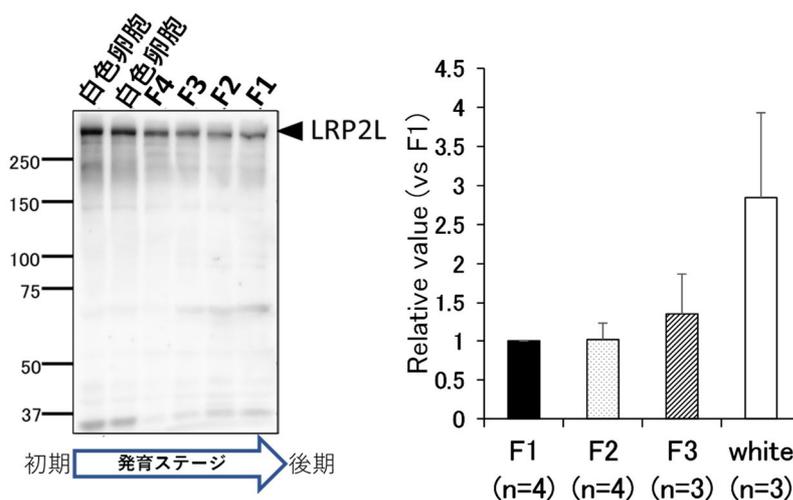


図1. ニワトリ卵胞の卵母細胞膜を含む画分におけるLRP2Lタンパク質の発現レベル。(左)ウエスタンブロットング法による解析結果。(右)バンド強度を定量化した結果。

雌雄 2 匹ずつのマウスから精巣・卵巣、肝臓、脂肪組織、前頭葉、大脳皮質を採取して

mRNA を抽出した。NCBI ゲノムデータベースに登録された遺伝子配列に基づいてプライマーを設計し、任意の3か所で逆転写PCRを行った(図2)。その結果、いずれの組織においても推定転写開始点から数えて1,458 bp~1,735 bpにあたる278 bpの遺伝子断片が増幅されなかった。一方2.962 bp~3,194 bp、5,093~5,306 bpの遺伝子断片は、肝臓のcDNAからは雌雄ともに増幅されず、精巣・卵巣、前頭葉、大脳皮質では増幅された。脂肪組織では少量の増幅が確認された、マウス LRP2L オルソログの転写は他の LRP 受容体ファミリーが発現する肝臓や脂肪組織では低く、生殖器官や中枢神経などの組織で盛んに発現している可能性が示唆された。

続いて、LRP2L の内因性リガンドの探索を行った。c-Myc タグによるプルダウンが可能な4種の分子サイズが異なる分泌型のリコンビナント LRP2L を作出し、ニワトリ血液から超遠心により分画した4つのリポタンパク質画分との相互作用を調査した。最も組み換えタンパク質の生産効率が高い1628 アミノ酸残基のリコンビナント LRP2L と4つのリポタンパク質画分(VLDL, LDL, HDL, 残渣)を用いて結合試験を行い、それらのサンプル c-Myc タグによるプルダウンによって溶出してウエスタンブロッティング法並びに銀染色法で解析した。VLDL 画分、LDL 画分、残渣画分では有力な候補タンパク質は見つからなかった。HDL 画分では、約 50 kDa の位置に、LRP2L を含む場合にしか見えないバンドが観察された。そこで、このバンドを切り出して、質量解析を行ったところ、CHO 細胞由来の lipase であることが判明し、ニワトリ血液由来のタンパク質ではないことが判明した。よって、本試験では LRP2L の有力なリガンドの同定には至らなかった。今後は適切な結合試験・解析方法を選択・開発しながら LRP2L の真のリガンドを探索する必要がある。

LRP2L の血中内因性リガンドは依然として明らかではないが、LRP2L の卵母細胞膜での発現の特徴、哺乳類におけるオルソログの発現についての知見を得ることができた。今後、LRP2L の真のリガンド探索や生理的役割の解析などを筆頭に、新規の LDL 受容体ファミリーである LRP2L のさらなる生理機能を調査していく必要がある。

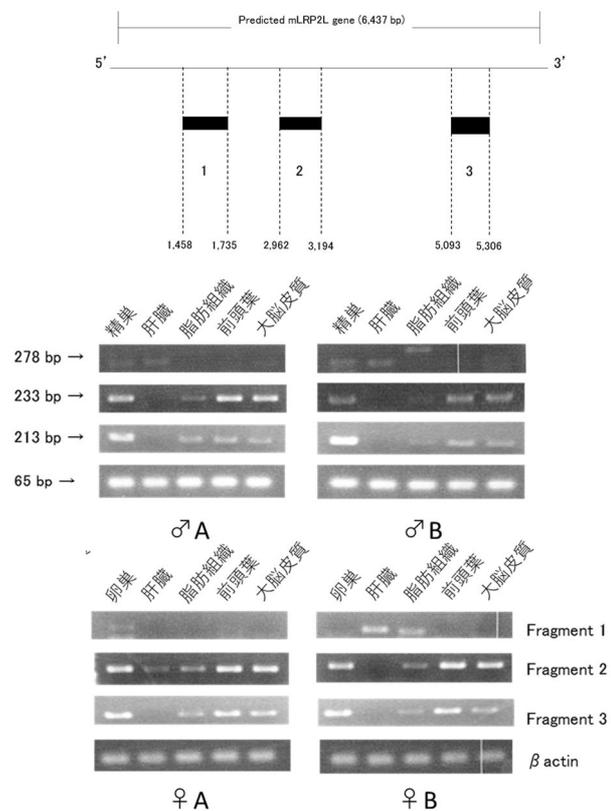


図2. 雌雄マウスの各種臓器におけるLRP2L遺伝子の発現レベル解析。(上)増幅に使用したプライマーの位置、(中)♂マウスにおける解析結果、(下)♀マウスにおける解析結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡本真由子・佐々木諒・兒島孝明・村井篤嗣 |
| 2. 発表標題 卵黄輸送能が異なる IgY 変異体とホスホリパーゼ A2 受容体の分子間相互作用解析 |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 村井篤嗣 |
| 2. 発表標題 鳥類の母子免疫と卵黄抗体の輸送制御 |
| 3. 学会等名 第81回日本栄養・食糧学会中部支部大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡本真由子・佐々木諒・兒島孝明・村井篤嗣 |
| 2. 発表標題 卵黄への IgY 輸送を担う候補受容体 PLA2R と IgY-Fc 変異体との結合特性の解析 |
| 3. 学会等名 2023年度日本家禽学会秋季大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|