

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570068

研究課題名(和文)ハーダー腺とファブリキウス嚢における新規抗菌ペプチドの探索と発現調節機構の解析

研究課題名(英文) Identification, localization and functional analysis of antimicrobial peptides in the quail Harderian gland and bursa of Fabricius.

研究代表者

小林 哲也 (KOBAYASHI, Tetsuya)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：00195794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ウズラのハーダー腺(HG)とファブリキウス嚢(BF)から抗菌ペプチドのcDNAをクローニングし、その局在や生理機能を解析した。その結果、HGとBFからfowlicidin-2をコードするcDNAクローンが単離され、BFからはさらにfowlicidin-1と-3のcDNAクローンも得た。このうちfowlicidin-2はBFの内腔上皮と濾胞にその発現が認められた。合成fowlicidin-2はグラム陰性菌と陽性菌の生育を濃度依存的に阻害し、その機構は細菌の膜破壊によることが示された。また、大腸菌膜構成要素であり内毒素であるリポ多糖に結合し、その活性を中和することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We intended to obtain cDNAs encoding precursor for antimicrobial peptide fowlicidin (f)-1, -2, and -3 from total RNA samples prepared from the quail bursa of Fabricius (BF) and Harderian gland (HG) by RT-PCR. As a result, f-1, -2, and -3 cDNAs were invariably obtained from the BF. However, only f-2 cDNA was detected in HG, so far studied. In situ hybridization and immunocytochemical analyses revealed that f-2 is expressed in the epithelium of lumen and the lymphoid follicles in the BF. Synthetic f-2 exerted a growth-inhibiting activity toward the gram-negative bacterium *Escherichia coli* and gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* through the destructing the bacterial membrane. Lipopolysaccharide (LPS)-binding assay showed that f-2 possessed an ability to bind the bacterial LPS, which is a constituent of the outer membrane of the gram-negative bacteria. The endotoxin-neutralizing activity of f-2 was also confirmed by the *Lymulus* amoebocyte lysate assay.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：形態・構造

キーワード：抗菌ペプチド 生体防御 ファブリキウス嚢 ハーダー腺

### 1. 研究開始当初の背景

ファブリキウス嚢は鳥類に特有の免疫器官で総排出腔の背側に位置する。この嚢は、B細胞の分化・成熟の場で、主要な免疫器官として機能する。一方、眼球近傍に位置するハーダー腺には抗体産生に関わる形質細胞が存在し、局所免疫を担っていると考えられている。いずれの場合でも、抗体が産生されるまでには時間が必要であることから、その間の宿主の防衛のためには分泌性の抗菌物質による即応的な一次防御機構が存在するものと推測される。特にファブリキウス嚢は特殊な上皮細胞を介して外界異物を取り込み、抗体産生を促していることから、抗菌物質の作用により死滅させた菌体あるいはその破壊片をファブリキウス嚢自身が取り込むことは、より安全で効率的な抗体産生に必須であると推測される。この点を考察するためには、ファブリキウス嚢とハーダー腺から抗菌物質を探索し、その生理活性と発現調節機構及び各器官における生理的役割の解析が必要と考えられるが、これらの研究はほとんど行われていなかった。

### 2. 研究の目的

本課題は、様々な生物種に広く存在し、生体において一次防御機構を担っている分泌性の抗菌物質の中から、分子生物学的手法が適用可能な抗菌ペプチドに着目した。この抗菌ペプチドにより中心的に営まれる先天的免疫システムとリンパ系細胞を中心とした後天的免疫システムの機能的な連携を探るための端緒として、以下の4点を明らかにすることを目的とした。

(1) 抗菌ペプチドの探索と同定、(2) 抗菌ペプチドの生理活性の解析、(3) 抗菌ペプチドの発現器官・細胞の解析、(4) 抗菌ペプチドの発現調節機構の解析

### 3. 研究の方法

(1) 抗菌ペプチドの探索と同定：広く脊椎動物に分布する抗菌ペプチドである cathelicidin を対象に、その前駆体タンパク質分子間で保存的かつ特徴的な領域をもとに PCR 用のプライマーをデザインした。このプライマーを用いて RT-PCR 法を行うことで cDNA を増幅し、クローニング後、塩基配列を決定した。

(2) 抗菌ペプチドの生理活性の解析：クローニングにより同定した抗菌ペプチドの配列情報をもとに、ペプチドを合成した。グラム陰性菌の例として大腸菌を、グラム陽性菌の例として黄色ブドウ球菌を用い、微量液体希釈法により合成ペプチドの抗菌活性を測定した。併せて、抗菌ペプチドを作用させた後の菌細胞の様子を走査型電子顕微鏡で観察した。また、グラム陰性菌の外膜を構成する主要な成分であり内毒素として知られているリポ多糖(LPS)と抗菌ペプチドとの結合能について測定した。さらに *Lymlus Amebocyte*

Lysate (LAL) 試験を用いて、抗菌ペプチドによる LPS 中和作用を調べた。

(3) 抗菌ペプチドの発現器官・細胞の解析：同定した抗菌ペプチドの体内における発現分布を明らかにするため、ファブリキウス嚢とハーダー腺、及びその他の器官を用いた RT-PCR 解析を行った。

この結果をもとに、*in situ* hybridization 法および作製した抗体を用いた免疫組織化学法により、ファブリキウス嚢内における発現細胞を同定した。

(4) 抗菌ペプチドの発現調節機構の解析：抗菌ペプチドの発現調節へのホルモンの関与を探るため、ファブリキウス嚢由来の細胞株 (DT40 株) を用いて、LPS やグルココルチコイドの添加による発現への影響を半定量的な RT-PCR 法を用いて測定した。

### 4. 研究成果

(1) 抗菌ペプチドの探索と同定：ウズラ (*Coturnix japonica*) のファブリキウス嚢から fowlicidin-1、-2、-3 (別名 cathelicidin-1、-2、-3) 前駆体 cDNA をクローン化した。これらの構造には、既知の鳥類の cathelicidin 前駆体と同様に、N 末端側から C 末端側にかけて、シグナル配列領域、cathelin 領域、cathelicidin 領域が存在し、各領域の相同性はシグナル配列領域から cathelicidin 領域にかけて徐々に低下していた。また、cathelicidin 領域から生じる fowlicidin-1 と-3 の相同性は比較的高いが、fowlicidin-2 は両者とはかなり異なっていた。一方、ハーダー腺からも fowlicidin-2 前駆体の cDNA クローンを得た。

(2) 抗菌ペプチドの生理活性の解析：上記 (1) より fowlicidin-2 は、同-1 と-3 とは異なり、独自の配列を持つことが示された。そこで fowlicidin-2 を合成し、微量液体希釈法により抗菌活性を測定した。その結果、合成 fowlicidin-2 は濃度依存的にグラム陰性菌とグラム陽性菌の生育を抑制した。また走査型電子顕微鏡による観察の結果、この作用は膜破壊型の抗菌活性によるものであることが示された。

次いで LPS との結合能を調べた結果、合成 fowlicidin-2 は LPS と特異的に結合すること、また、エンドトキシン活性を検出する LAL 試験により、同ペプチドは LPS 中和能を持つことが示された。

(3) 抗菌ペプチドの発現器官・細胞の解析：fowlicidin-1、-2、-3 前駆体 mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べたところ、fowlicidin-1 mRNA は主にファブリキウス嚢で、また fowlicidin-2 は主にファブリキウス嚢と弱いながらもハーダー腺と肺で発現していた。一方、fowlicidin-3 はファブリキウス嚢、ハーダー腺、心臓、胃、肝臓、肺などの各器官でその発現が認められた。

*In situ* hybridization 法を用いてファブリキウス嚢における fowlicidin-2 mRNA の発

現部位を調べたところ、ファブリキウス嚢内腔の上皮細胞と濾胞内にシグナルが認められた。また、fowlicidin-2 に対する抗体を作製しペプチドレベルでの発現も検討した結果、mRNA と同様の部位に本ペプチドが発現していることが明らかとなった。

一方、比較のため両生類を用いて解析をしたところ、ハーダー腺では gallinacin mRNA が、また舌では chensirin-2CBa と temporin-CBa の mRNA がそれぞれ発現していることが示された。

(4) 抗菌ペプチドの発現調節機構の解析：ニワトリファブリキウス嚢由来の DT-40 細胞から cDNA クローニングにより見つかった cathelicidin-B1 (chCATH-B1) は、LPS 添加により mRNA の発現量が増加し、この発現は抗炎症性作用を有するグルココルチコイドの添加により抑制された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Konishi Y, Iwamuro S, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S. Molecular cloning and multifunctional characterization of host defense peptides from the bullfrog Harderian gland with special reference to catesbeianalectin. *Zoological Science* 30: 185-191 (2013). (査読有)

Suzuki K, Yamada H, Kobayashi T, Okanoya K. Decreased fecal corticosterone levels due to domestication: a comparison between the white-backed Munia (*Lonchura striata*) and its domesticated strain, the Bengalese finch (*Lonchura striata* var. *domestica*) with a suggestion for complex song evolution. *Journal Experimental Zoology Part A, Ecological genetics and physiology*. 317:561-570 (2012). (査読有)

Suzuki K, Matsunaga E, Kobayashi T, Okanoya K. Expression pattern of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in Bengalese finch (*Lonchura striata* var. *domestica*) brain suggest the relation between stress hormone and the song system development. *Neuroscience* 194: 72-83 (2011). (査読有)

Matsunaga E, Suzuki K, Kobayashi T, Okanoya K. Comparative analysis of mineralocorticoid receptor expression among vocal learners (Bengalese finch and budgerigar) and non-vocal learners (quail and ring dove) has implication for the evolution of the avian vocal learning. *Development Growth & Differentiation* 53: 961-971 (2011). (査読有)

[学会発表](計32件)

宍戸駿、大森聖也、近藤洋匡、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ウシガエル舌における抗菌ペプチド遺伝子の発現、日本動物学会関東支部第66回大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(柏)

柿崎諒、蓮沼至、山本和俊、菊山榮、小林哲也：変態期のウシガエル幼生における PRL 受容体と ENaC mRNA の発現動態、日本動物学会関東支部第66回大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(柏)

内山愛里、望月拓也、小西裕己、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：ウシガエルの生体防御における Catesbeianalectin の多機能性日本動物学会関東支部第66回大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(柏)

齋藤朗、川崎はるな、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：トノサマガエル皮膚由来細胞 LAH2 の生体防御ペプチド、日本動物学会関東支部第66回大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(柏)

石川由里那菜、小林哲也、岩室祥一、菊山榮、蓮沼至：アカハライモリ脳における甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体遺伝子の発現、日本動物学会関東支部第66回大会、2014年3月15日、東京大学大気海洋研究所(柏)

近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、古舘宏之、小林哲也：ファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の生理機能の解析、第38回日本比較内分泌学会大会・第40回日本神経内分泌学会学術集会、2013年10月24~26日、宮崎市民プラザ(宮崎)

近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ファブリキウス嚢における fowlicidin の発現と生理機能の解析、日本動物学会第84回、2013年9月26~28日、岡山大学(岡山)

寒河江望、小西裕己、森田愁、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：生体防御ペプチドにおける多機能性の測定法の確立、日本動物学会第84回、2013年9月26~28日、岡山大学(岡山)

近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：鳥類固有の免疫器官における生体防御ペプチド fowlicidin の遺伝子発現とその機能解析、日本動物学会第65回関東支部大会、2013年3月16日、東工大学(東京)

武田あすな、椿卓、奥村和男、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：鳥類免疫器官特異的抗菌ペプチド Cathelicidin-B1 の研究、日本動物学会第65回関東支部大会、2013年3月16日、東工大学(東京)

津田礼乃、寒河江望、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：エゾアカガエル生体防御ペプチドの cDNA クローニングとその機能解析、日本動物学会第65回関東支部大会、2013年3月16日、東工大学(東京)

寒河江望、津田礼乃、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：ペプチドを介した両生類皮膚の防御機構に関する研究：日本動物学会第 65 回関東支部大会、2013 年 3 月 16 日、東工大学（東京）

近藤洋匡、武田あすな、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也：ウズラのファブリキウス嚢における fowlicidin-2 の発現とその機能解析、第 37 回日本比較内分泌学会、2012 年 11 月 29 日～12 月 1 日、福井大学（福井）

津田礼乃、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：Suquence capture に基づくエゾアカガエル抗菌ペプチド遺伝子の効率的クローニング、日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13～15 日、大阪大学（大阪）

武田あすな、椿卓、奥村和男、小林哲也、持田弘、菊山榮、岩室祥一：鳥類免疫器官特異的抗菌ペプチド Cathelicidin-B1 の研究、日本動物学会第 83 回大会、2012 年 9 月 13～15 日、大阪大学（大阪）

小西裕己、蓮沼至、小原祥恵、寒河江望、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：ウシガエルハーター腺由来 Temporin-CBg の機能解析、日本動物学会関東支部第 64 回大会、2012 年 3 月 17 日、東邦大学（習志野）

蓮沼至、中野真紀、皆川温子、岩室祥一、小林哲也、菊山榮：ウシガエル甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体のリガンドに対する反応性、日本比較内分泌学会第 36 回大会、2011 年 11 月 23～25 日、都道府県会館（東京）

小西裕己、川崎はるな、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一：ハーター腺による抗菌ペプチドを介した両生類眼の生体防御、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21～23 日、旭川アリーナ（旭川）

蓮沼至、中野真紀、皆川温子、岩室祥一、小林哲也、菊山榮：ウシガエル甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体のリガンドに対する反応性、2011 年 9 月 21～23 日、旭川アリーナ（旭川）

武田あすな、椿卓、奥村和男、小林哲也、持田弘、菊山榮、岩室祥一：ファブリキウス嚢由来 DT40 細胞における細菌毒素依存的 cathelicidin 遺伝子の発現上昇、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 21～23 日、旭川アリーナ（旭川）

〔その他〕

ホームページ等

[http://endocrine.seitai.saitama-u.ac.jp/research\\_kobayashi.html](http://endocrine.seitai.saitama-u.ac.jp/research_kobayashi.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 哲也（KOBAYASHI, Tetsuya）  
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：00195794

### (2) 研究分担者

菊山 榮（KIKUYAMA, Sakae）  
早稲田大学・教育・総合学術院・名誉教授  
研究者番号：20063638

岩室 祥一（IWAMURO, Shawichi）  
東邦大学・理学部・教授  
研究者番号：70221794

### (3) 連携研究者

該当者なし