

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26440161  
 研究課題名(和文) 抗菌ペプチドによる免疫器官の機能調節と高速分子進化法を用いた高機能アナログの創出  
  
 研究課題名(英文) The role of antimicrobial peptides on the function of the bursa of Fabricius:  
 Do they bridge innate and adaptive immunity in avian?  
  
 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウズラのファブリキウス嚢(BF)から抗菌ペプチドとして知られる fowlicidin-1(f1), -2(f2), -3(f3), cathelicidin-B1(cb1)前駆体cDNAをクローン化した。これらペプチドのmRNAは、f1とf3がBFの濾胞間上皮細胞で、f2とcb1が濾胞間上皮と濾胞内で発現していた。ウズラへのLPSとLTAの投与は、それぞれBFにおけるf3とf1発現を上昇させたが、デキサメタゾン投与はf3の上昇を抑制した。合成f1とf2はLPSとLTAに対して結合し、更に、マウスの抗体産生を刺激した。加えて、高速分子進化法によりLPS結合能を有するペプチドの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：We cloned a cDNA encoding the precursors of fowlicidin-1(f1), -2(f2), -3(f3) and cathelicidin-B1(cb1) from the quail bursa of Fabricius. In situ hybridization experiments demonstrated that these mRNAs were invariably detected in the inter-follicular epithelium. In addition, f2 and cb1 mRNAs were also detected in the follicles. A broth dilution analysis showed that the synthetic compounds f1 and f2 exerted potent antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*. A binding assay demonstrated that synthetic these peptides showed binding activity for the LPS. An electromobility shift assay revealed that these peptides also bound to the LTA. Enhancement of f3 and f1 mRNA expressions was noted following intravenous injections of LPS and LTA into the quail, respectively. Dexamethasone treatment suppressed the LPS-induced f3 mRNA expression. Female mice injected with ovalbumin and f1 or f2 showed higher ovalbumin-specific antiserum titers than female mice injected with ovalbumin alone.

研究分野：形態・構造

キーワード：抗菌ペプチド ファブリキウス嚢 ウズラ

## 1. 研究開始当初の背景

鳥類に特有の免疫器官として知られるファブリキウス嚢は、B細胞の分化・成熟の場で、総排出腔から取込んだ抗原を嚢内に取込み、抗原の提示を行う。これに対し、鳥類のハーダー腺には抗体産生に関わる形質細胞が、また両生類のハーダー腺には炎症反応に関わるマスト細胞が、それぞれ分布している。一般に、細菌の感染から抗体が産生されるまでには時間が必要であることから、ファブリキウス嚢及びハーダー腺は分泌性の抗菌物質を合成・分泌することで、外界から侵入する細菌に対し迅速な一次防御を行っていると考えられる。事実、代表者らは、鳥類のハーダー腺及びファブリキウス嚢から fowlicidin-1~3 を、両生類のハーダー腺から chensirin-2CB、temporin-CBa、catesbeianalectin 等の抗菌ペプチドを同定した。このうち、fowlicidin-2 は抗菌活性を有し嚢を覆う上皮細胞で発現していること、catesbeianalectin は抗菌活性に加えマスト細胞脱顆粒作用を有していること等も併せて示した。しかしながら、これら抗菌ペプチドの発現調節機構や生理的役割については未だ十分に明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

抗菌ペプチドによる生体防御(先天的免疫システム)と抗体産生による生体防御(後天的免疫システム)とは、個々に独立したものとして研究がなされているが、代表者らは早くから両者の間には密接な関係が存在すると予見し、体内の抗菌ペプチドシステムの活性化から抗体産生に直結する器官として、鳥類のファブリキウス嚢に着目した。加えて、抗菌ペプチドがそのアミノ酸配列に基づく物理化学的性質に依存して抗菌活性を発揮するため、抗生物質と比べて耐性菌を生じにくいことを利用し、抗菌ペプチドを実験的に改変することで、抗菌性の増強が可能であることにも注目した。

以上を踏まえた本課題では、代表者らが既に鳥類や両生類の免疫器官(ファブリキウス嚢、ハーダー腺等)において同定した抗菌ペプチドを対象とし、(1)ホルモン及び細菌成分による抗菌ペプチドの発現調節を検討するとともに、(2)免疫器官の機能に関する抗菌ペプチドの生理的役割については抗菌ペプチドが抗体産生を誘起する可能性を探ることとした。さらに、(3)高速分子進化法の適用により高い活性を有した抗菌ペプチドアナログの創出のためには、その技術的基盤を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ホルモン及び細菌成分による抗菌ペプチドの発現調節: cathelicidin ファミリーの抗菌ペプチド (fowlicidin-1, -2, -3, cathelicidin-B1) 前駆体タンパク質の cDNA に対する特異的プライマーを作製した。続い

て、ウズラ (*Coturnix japonica*) の器官から抽出した全 RNA を用いた RT-PCR 法を行うことで cathelicidin ファミリーの cDNA を増幅し、塩基配列を決定した。

ファブリキウス嚢内における各抗菌ペプチドの mRNA とペプチドの発現部位は、*in situ* hybridization 法、及び、我々が作製した抗体を用いた免疫組織化学的手法により解析した。

さらに、グラム陰性菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖 (LPS)、グラム陽性菌の細胞壁構成成分リポテイコ酸 (LTA)、および抗炎症性ホルモンとして知られるグルココルチコイドのアナログであるデキサメタゾン (DEX) のウズラへの投与が、ファブリキウス嚢内における抗菌ペプチド mRNA 発現に与える影響について Real-time PCR 法を用いて測定した。

(2) 免疫器官の機能に関する抗菌ペプチドの生理的役割: 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。このペプチドを用いて微量液体希釈法を行うことで、大腸菌(グラム陰性菌)と黄色ブドウ球菌(グラム陽性菌)に対する抗菌活性を測定した。また、LPS 及び LTA の抗菌ペプチドに対する結合能について評価した。

マウス(雌)に、抗菌ペプチド及び抗原としてオボアルブミンを投与し、数週間後に採血した。オボアルブミンに対する抗体価を酵素免疫測定法により測定することで、抗菌ペプチドが抗体産生に与える影響を検討した。

(3) 高速分子進化法の適用により高い活性を有した抗菌ペプチドアナログの創出: ランダムな配列を含む cDNA を新型マイクロアレイ MMV に分注した後に、PCR 反応を行った。続いて、この cDNA を鋳型とし *in vitro* 転写・翻訳を行い、ペプチドライブラリーを作成した。各ペプチドの LPS 結合能を測定した後、結合能が高いペプチドを選択し、これを用いて、再度、同様の操作を繰り返し行うことで、LPS 結合能が高いペプチドの cDNA をクローニングした。

## 4. 研究成果

(1) ホルモン及び細菌成分による抗菌ペプチドの発現調節: ウズラのファブリキウス嚢から fowlicidin-1, -2, -3, cathelicidin-B1 前駆体 cDNA をクローン化した。これらの構造内には、N 末端側から、シグナル配列領域、cathelin 領域、cathelicidin 領域が認められた。また、cathelicidin-B1 と fowlicidin-1 ~ -3 との相同性は、fowlicidin-1 ~ -3 の間の相同性よりも低かった。

ファブリキウス嚢内における fowlicidin-1 mRNA の発現部位を *in situ* hybridization 法を用いて検討したところ、嚢内腔の濾胞間上皮細胞で発現していた。また、fowlicidin-1 抗体を作製しペプチドレベルの発現も検討したところ、mRNA と同じ部位に本ペプチドが

発現していた。併せて、fowlicidin-2、-3、cathelicidin-B1 mRNA の発現も解析した結果、fowlicidin-3 は fowlicidin-1 と同じ濾胞間上皮で、fowlicidin-2 と cathelicidin-B1 は濾胞間上皮と濾胞内で発現していた。

ウズラへの LPS と LTA の投与は、それぞれファブリキウス嚢における fowlicidin-3 と -1 の mRNA 発現を上昇させた。一方、これらの上昇は DEX の投与により低下した。

(2) 免疫器官の機能に関する抗菌ペプチドの生理的役割：合成 fowlicidin-1, -2 を用いて微量液体希釈法により抗菌活性を測定したところ、濃度依存的に大腸菌と黄色ブドウ球菌の生育を抑制した。また、合成 fowlicidin-1, -2 は LPS と LTA に対して結合能を示した。

マウスの抗体産生に対する fowlicidin-1, -2 の効果を測定したところ、オポアルブミン単独投与よりも、fowlicidin-1, -2 の同時投与のほうが、オポアルブミンに対する抗体価が上昇することが示された。

(3) 高速分子進化法の適用により高い活性を有した抗菌ペプチドアナログの創出：新型マイクロアレイ MMV 中で、ランダム DNA 配列を *in vitro* 転写・翻訳して得たペプチドに対して、引き続き LPS 結合能でスクリーニングをすることで一次淘汰ペプチドペプチド(複数)を得た。この分子情報をもとに二次 DNA ライブラリーを作成し、一次と同様な過程を繰り返すことで、最終的に高い LPS 結合能を示すペプチドを得ることに成功した。

## 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 5 件)

- 1) Takeda A, Tsubaki T, Sagae N, Onda Y, Inada Y, Mochizuki T, Okumura K, Kikuyama S, Kobayashi T, Iwamuro S. Bacterial toxin-inducible gene expression of cathelicidin-B1 in the chicken bursal lymphoma-derived cell line DT40: Functional characterization of cathelicidin-B1. Peptides. 59:94-102 (2014) 査読有
- 2) Sharma H, Ohtani F, Kumari P, Diwan D, Ohara N, Kobayashi T, Suzuki M, Nemoto N, Matsushima Y, Nishigaki K. Familial clustering of mice consistent to known pedigrees enabled by the genome profiling (GP) method. BIOPHYSICS 10:55-62 (2014) 査読有
- 3) Suzuki K, Matsunaga E, Yamada H, Kobayashi T, Okanoya K. Avian Biology Research, Complex song development and stress hormone levels in the

Bengalese finch. Avian Biology Research, 7(1):10-17 (2014) 査読有

- 4) Sawada K, Saito S, Horiuchi-Hirose M, Sato C, Aoyama J, Kobayashi T. Brain volumetry: A quantitative approach for detecting region-specific structural abnormalities. Congenital Anomalies 55: 71-72 (2015) 査読有
- 5) 岩室祥一, 小林哲也. 「生体防御・社会性守, 魔弾の射手: 両生類の先天的防御機構」, 比較内分泌学, 43(161):85-86 (2017) 査読有

[学会発表](計 24 件)

- 1) Ikeda T, Kondo H, Nunomura D, Furudate H, Yamanaka N, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Kobayashi T. Regulation of mRNA expression and biological effects of fowlicidin-1, -2, -3 in the quail (*Coturnix japonica*) bursa of Fabricius. RegPep2016, 2016 年 7 月 12-14 日, Rouen( France)
- 2) 岩室祥一, 小林哲也. 日本比較内分泌学会シンポジウム「内分泌現象から見た生物の不思議 - 時・継・愛・恒・巡・守 - 」, 「第 7 巻 生体防御・社会性 - 守 魔弾の射手: 両生類の先天的防御機構」, 第 41 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム, 2016 年 12 月 9-11 日, 北里大学相模原キャンパス(神奈川県, 相模原市)
- 3) ファムディン・ユイ 蓮沼 至, 岩室祥一, 菊山 榮, 小林哲也. ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) における  $\beta$ -Defensin の遺伝子発現, 第 41 回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム, 2016 年 12 月 9-11 日, 北里大学相模原キャンパス(神奈川県, 相模原市)
- 4) 中野真樹, 小林浩志, 杉山恵利香, 藤澤静香, 小林哲也, 菊山 榮, 蓮沼 至, 岩室祥一. ウシガエル生体防御ペプチド catesbeianalectin の脳内発現解析, 2016 年 12 月 9-11 日, 北里大学相模原キャンパス(神奈川県, 相模原市)
- 5) 小川大輔, 古川真帆, 持立真希, 小林哲也, 菊山 榮, 蓮沼 至, 岩室祥一. リュウキュウアカガエル (*Rana ulma*) 皮膚の生体防御ペプチド, 2016 年 12 月 9-11 日, 北里大学相模原キャンパス(神奈川県, 相模原市)
- 6) 池田拓実, 近藤洋匡, 布村大樹, 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-1, -2, -3 mRNA の発現, 第 40 回鳥類内分泌研究会, 2016 年 11 月 3-4 日, ホテルメルパルク松山(愛媛県, 松山市)
- 7) Ohara N, Kobayashi T. Impaired lipid metabolism in growth-retarded mice. CompBiol 2015 広島大会(第 40 回日本比較内分泌学会・第 40 回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第 37 回大会

- 合同大会), 2015年12月11-13日, JMS アステールプラザ(広島県, 広島市)
- 8) Yamada K, Urabe A, Hashida Y, Minagawa A, Nakano M, Shindo H, Hasunuma I, Yamamoto K, Kikuyama S, Kobayashi T. Involvement of  $Ca^{2+}$  influx in the TRH-induced RPL release from the pituitary gland of the bullfrog. CompBiol 2015 広島大会(第40回日本比較内分泌学会・第40回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会), 2015年12月11-13日, JMS アステールプラザ(広島県, 広島市)
- 9) Ikeda T, Nunomura D, Kondo H, Furudate H, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Kobayashi T. Expression of fowlicidin 1-3 mRNAs in the quail (*Coturnix japonica*) bursa of Fabricius. CompBiol 2015 広島大会(第40回日本比較内分泌学会・第40回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会), 2015年12月11-13日, JMS アステールプラザ(広島県, 広島市)
- 10) Mizuta K, Ukaji S, Saito A, Tazato S, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S, Iwamuro S. Molecular cloning and expression analysis of gene encoding host defense peptide in amphibian skin cell lines with special reference to acyclic brevinin-1. CompBiol 2015 広島大会(第40回日本比較内分泌学会・第40回日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会第37回大会合同大会), 2015年12月11-13日, JMS アステールプラザ(広島県, 広島市)
- 11) Nishigaki K, Kuroda T, Gautum SG, Masubuchi Y, Iwano M, Takeuchi N, Furukawa T, Kitamura K. Recombination-driven protein evolution strategy "Progressive Library Method": Its success with no exception, BMB2015 (Biochemistry and Molecular Biology), 2015年12月1-4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県, 神戸市)
- 12) 岩室祥一, 小林哲也. シンポジウム「両生類はワンダーランド(4)」オーガナイザー、「抗菌戦線異状アリ?」, 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月17-19日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
- 13) 池田拓実, 布村大樹, 近藤洋匡, 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-3 の発現解析, 日本動物学会第86回新潟大会, 2015年9月17-19日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県, 新潟市)
- 14) Nishigaki K, Furukawa T, Takeuchi N, Saiki T, Hongo A, Iwano M, Yuuki Masubuchi Y, Suzuki M. First success in selection of functional peptides using a novel concept microarray MMV - A breakthrough for cell-based screenings. 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13-15日, 金沢大学角間キャンパス(金沢県, 金沢市)
- 15) 池田拓実, 近藤洋匡, 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抗菌ペプチド fowlicidin-3 の発現解析第67回 関東支部大会, 2015年3月14日, 早稲田大学・先端生命医科学センター(東京都, 新宿区)
- 16) 岩室祥一, 川名夏未, 山中菜々子, 稲田豊里, 白石貴如, 森田愁, 多賀井千尋, 川崎 広明: Differential modes of antimicrobial action of histones against Gram-negative and Gram-positive bacteria. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)
- 17) Kobayashi T, Nakano M, Minagawa A, Iwamuro S, Yamamoto K, Hasunuma I, Kikuyama S. Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor mediating the prolactin secretion in the bullfrog pituitary. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会, 2014年11月7-9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県, 岡崎市)
- 18) Kondo H, Takeda A, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Furudate H, Kobayashi T. Tissue expression and biological effects of fowlicidin-2 in the quail Bursa of Fabricius. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会, 2014年11月7-9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県, 岡崎市)
- 19) Shishido S, Omori S, Kondo H, Konishi Y, Sagae N, Hasunuma I, Iwamuro S, Kikuyama S, Kobayashi T. Molecular cloning, localization analysis and multifunctional characterization of host defense peptides in the tongue of *Rana catesbeiana*. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会, 2014年11月7-9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県, 岡崎市)
- 20) Iwamuro S, Konishi Y, Uchiyama E, Mochizuki T, Sugiyama E, Hasunuma I, Kobayashi T, Kikuyama S. Molecular cloning and multifunctional characterization of catesbeianlectin from the bullfrog Harderian gland. 第39回日本比較内分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会合同大会, 2014年11月7-9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県, 岡崎市)

- 21) 岩室祥一, 多賀井千尋, 森田 愁, 白石貴如, 川崎 広明. Histones as antimicrobial agents. 第 51 回ペプチド討論会, 2014 年 10 月 22-24 日, 徳島大学 (徳島県, 徳島市).
- 22) 竹内尚紀, 永野富郎, 西垣功一. MMV-4SR: Development of basic detection system in Single Cell Biology (SCB), 生物物理学会第 52 回, 2014 年 9 月 25-27 日, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市)
- 23) 稲田豊里, 岩室祥一: 生体防御分子としてのヒストン H3 の発現調節機構の解明. 日本動物学会第 85 回大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 東北大学 (宮城県, 仙台市)
- 24) 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 fowlicidin2 の生理的役割. 日本動物学会第 85 回大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 東北大学 (宮城県, 仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

岩室祥一, 小林哲也, 裳華房, 東京  
「ホルモンから見た生命現象と進化」シリーズ, 第 7 巻「生体防御・社会性生体防御ペプチドによる両生類の先天的防御機構」  
2016 年 11 月, P148-159.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

〔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・教育総合学院・名誉教授  
研究者番号: 20063638

西垣 功一 (NISHIGAKI, Koichi)  
埼玉大学・大学院理工学研究科・名誉教授  
研究者番号: 10107378

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

(3) 連携研究者: 該当者なし

(4) 研究協力者: 該当者なし