

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03128

研究課題名(和文) PLA2R受容体による鳥類卵黄への抗体輸送機構の解明と高IgY卵創出への応用

研究課題名(英文) Study on the mechanism of antibody transport to avian egg yolks by PLA2R receptor and its application to produce eggs rich in IgY

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の卵黄にはIgY抗体が蓄積しており、次世代ヒナの免疫能の強化に必須である。本研究では、PLA2Rが卵黄へのIgY輸送を担う受容体であることを証明しようとした。PLA2Rは卵胞膜細胞層の毛細血管終末部に発現することが判明した。IgY変異体のFcRYへの結合解析により、輸送効率の高い変異体(G365A)はPLA2Rへの結合活性が強く、輸送効率の低い変異体(G365D、N408A)はPLA2Rへの結合活性が弱いことが判明した。卵黄へ輸送されないY363A変異体はPLA2Rへの結合親和性が著しく強いことが判明した。よってPLA2Rが卵黄へのIgY輸送を調節する鍵となる受容体であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLA2Rが鳥類の母子免疫を制御する鍵受容体であることが明らかにされたことで、母子免疫という多くの生物種が保有する事象の仕組みの一端が明らかとなった。そして、FcRY/IgY相互作用を制御することで、鳥類の卵黄中のIgY量を増やし、鳥類の新生ヒナの免疫力を高めるための新しい戦略を提供できる可能性を秘める。遺伝子改変されたFcRY/IgY相互作用によって引き起こされる免疫異常も慎重に考慮した上で、今後の研究戦略を練る必要がある。

研究成果の概要(英文)：Avian IgY antibodies are accumulated in egg yolks to protect against infection, and they are essential for strengthening the immune function of the next generation of chicks. In this study, we aimed to examine that PLA2R is the receptor responsible for IgY transport to the egg yolk. By investigating localization of PLA2R expression in the ovary, we found that PLA2R is expressed in the terminal capillaries of the theca cell layer of the ovarian follicle. Binding analysis of IgY mutants to PLA2R showed that the mutant with high transport efficiency (G365A) had strong binding activity to PLA2R, while the mutants with low transport efficiency (G365D, N408A) had weak binding activity to PLA2R. As an exception, the Y363A mutant, which is not transported to the egg yolk, was found to have a significantly strong binding affinity to PLA2R and was difficult to dissociate. Therefore, it was found that PLA2R is the key receptor that regulates IgY transport to the egg yolk.

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 IgY 抗体 母子免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鳥類では、母ドリで産生された IgY が二段階でヒナへ輸送される母子免疫機構を備えている。これにより、ヒナの未熟な免疫機能が補強される。IgY 輸送の1段階目では、卵巣において母ドリの血中から卵黄へ IgY が輸送される。2段階目では胚発生後期に卵黄中の IgY が胚循環血へと輸送される (Kowalczyk et al. 1985)。しかし、1段階目の母ドリの体内で IgY が卵黄へと輸送される機構は未だ不明である。卵黄への IgY 輸送機構の解明は、卵抗体の生産やヒナの免疫機能の強化に直結することから、この受容体の同定を世界中の研究者が目指してきた。

当研究室の先行研究において、IgY 欠損ニワトリでは卵黄への IgY 取り込み能力が増強し、その卵胞では Phospholipase A2 receptor (PLA₂R) の発現量が増加していることが明らかとなった (Murai et al. 2020)。鳥類の PLA₂R は卵黄嚢で強く発現し、母子免疫の第2段階である卵黄から胚循環血へ IgY を輸送する受容体として考えられてきた (Tesar et al. 2008)。さらにウズラ卵胞の免疫組織染色によって、PLA₂R が卵胞 Theca 層の基底膜付近でも強く発現していることが明らかとなった。これらの結果から、PLA₂R は母子免疫の第2段階だけでなく、第1段階の母ドリの血液から卵黄への IgY 輸送を担う受容体である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

鳥類の卵黄には感染防御能を持つ IgY 抗体が蓄積しており、次世代ヒナの免疫能の強化に必須である。この IgY の輸送は卵胞に存在する IgY 受容体との結合により行われると考えられているが、その同定例はない。我々は、鳥類のみで抗体受容体としてはたらく「ホスホリパーゼ A₂ 受容体 (=PLA₂R)」が母ドリの卵胞で発現すること、さらにこの受容体に対する中和抗体の投与が卵黄への IgY 輸送量を減少させることを見出した。

本研究では、PLA₂R が卵黄への IgY 輸送を担う受容体であることを証明し、この輸送の分子機構を解明することを目的とした。そのために、PLA₂R の母ドリ卵巣での局在を詳細に調査するとともに、PLA₂R と IgY との結合動態を調査した。さらに、PLA₂R が卵黄への IgY 輸送を制御することを証明するために、CRISPR-Cas9 システムによる PLA₂R 欠損ウズラの作出を目指した。

3. 研究の方法

3-1. ニワトリとウズラの卵胞における PLA₂R 発現局在の解析

ニワトリは単冠白色レグホーン由来の実用採卵鶏 (*Gallus gallus domestics*; ジュリアライト) の雌鶏を使用した。ウズラはニホンウズラ WE 系 (*Coturnix japonica*) の雌を使用した。ニワトリは中性ホルマリンで灌流固定した。卵胞、肺、腎臓、空腸、脾臓、肝臓、大動脈、頸部血管を採取し、パラフィンブロックに包埋した。また、ウズラの卵胞は中性ホルマリンで浸漬固定してからパラフィンブロックに包埋した。

パラフィン包埋したサンプルを滑薄切し、免疫染色に供試した。ニワトリおよびウズラ組織の PLA₂R の染色には一次抗体として当研究室で作成したウサギ由来抗ニワトリ PLA₂R 抗体 (抗 cPLA₂R 抗体) を使用した。ウズラ組織の内皮細胞の染色にはウズラ内皮細胞マーカー QH1 (AB_531829, DSHB) を一次抗体として使用した。正立顕微鏡 (BX51, オリンパス) および共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D, オリンパス) を用いて観察した。

3-2. PLA₂R を固相化したマイクロプレートを用いた IgY とその変異体の結合特性の解析

分泌型の PLA₂R を固相化した 96 ウェルプレートを用いて、PLA₂R に対するウズラ IgY-Fc の野生型 (WT)、卵黄輸送能が異なる 2 種類の IgY-Fc 変異体 (Y363A、G365A) の結合量を解析した。さらに、4 種類の変異体 (Y363A、G365A、G365D、N408A) を用いてジゴキシゲニン標識したウズ

ラ IgY (DIG-IgY) との競合試験を行った。

3-3. 分子間相互作用解析システム BLItz を用いた PLA2R 結合親和性の測定

バイオレイヤー干渉 (BLI) 法を用いて IgY-Fc 変異体の PLA2R 結合親和性を測定した。BLI 法は、バイオセンサー上に固相化された分子と測定溶液中の別の分子との相互作用を、光の干渉波の変化で観測する技術である。センサーチップに His タグを介して分泌型 PLA2R を固相化した。この PLA2R に対する WT、Y363A、G365A の結合量と動態を解析した。

3-4. CRISPR-Cas9 システムによる PLA₂R 欠損ウズラの作出

PLA₂R 欠損ウズラの作出では、DF1 細胞 (ニワトリ繊維芽細胞株) に数種類の候補ガイド RNA の発現ベクターを導入し、single strand annealing アッセイ法を利用して PLA₂R 遺伝子の切断効率が最も高いガイド RNA を選抜した。続いて、ウズラの受精卵にガイド RNA を発現するゲノム編集用発現ベクターを導入し、ゲノム編集が生じた個体をスクリーニングした。このゲノム編集の過程で、PLA₂R 遺伝子の切断が生じた部位に緑色蛍光タンパク質が組み込まれるよう細工を加え、遺伝子編集が生じた個体を容易に検出できる実験系を確立した。

4. 研究成果

ニワトリとウズラの卵巣における PLA2R 発現局在を免疫組織染色で調査した。ニワトリとウズラの卵胞ともに、PLA2R は theca (卵胞膜層) の内層で発現が確認された (図 1)。Theca の内層には毛細血管の終末部が分布する。そこで、ウズラの卵胞について抗 PLA2R 抗体と血管内皮マーカー (QH1) の蛍光多重染色を試みた。その結果、PLA2R は theca 内層の QH1 陽性細胞のうち、基底膜に接する細胞で発現していた (図 2)。これにより、卵胞では、theca interna の毛細血管終末部に発現する PLA2R が血中 IgY を卵胞中へと輸送する可能性が示唆された。

PLA2R 固相化マイクロプレートを用いて、卵黄輸送効率が異なる IgY-Fc 変異体と PLA2R との結合量と競合活性を解析した。全長 IgY と PLA2R の結合量を測定したところ、pH 6.0 では濃度依存的に PLA2R へ結合したが、pH 7.4 では全く結合しなかった。IgY-Fc 変異体も同様に、pH 6.0 で PLA2R に対して用量依存的に結合した (図 3A)。そこで、様々な pH (pH 4.0-7.4) における野生型 IgY-Fc (WT) と各 IgY-Fc 変異体の結合量を測定した。WT と全ての IgY-Fc 変異体は pH 5.5 で PLA2R に強く結合し、pH 6.5 以上では全く結合しなかった (図 3B)。全ての pH において、G365A は WT と同等の結合量を示した。一方、

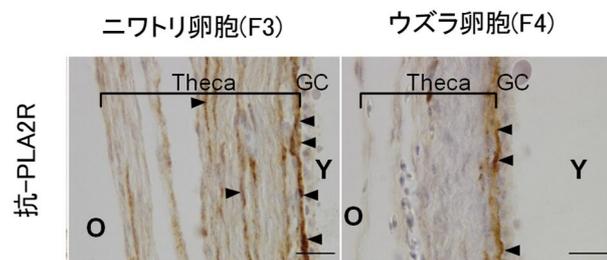


図1.免疫組織化学分析によるニワトリ卵胞 (F3) およびウズラ卵胞 (F4) の PLA2R の検出 (× 100)。矢頭が PLA2R の陽性反応。切片は抗 FcγR 抗体で染色した。スケールバー、20 μm。O, 細胞外; Y, 卵黄; Theca, 卵胞膜層; GC, 顆粒膜細胞層。

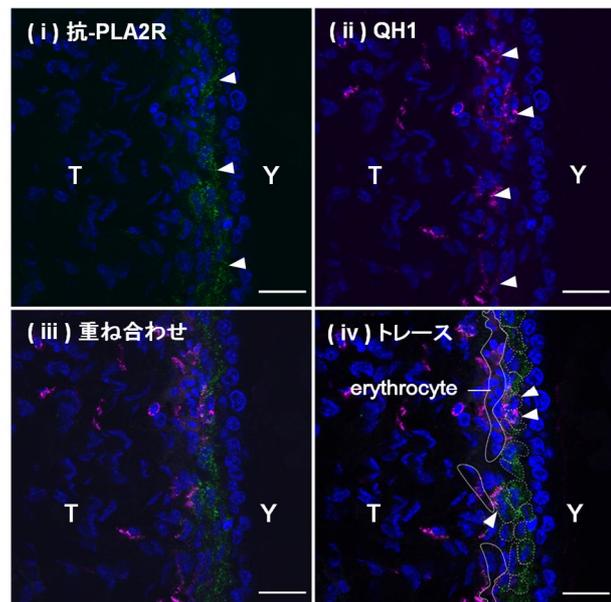


図2.ウズラ卵胞の共焦点画像。抗 PLA2R 抗体 (緑) とウズラ内皮細胞マーカー QH1 (マゼンタ、元の倍率、× 100) で染色。核は DAPI (青) で染色。矢頭が陽性反応あるいは共局在。トレースでは、細胞の輪郭を破線で記入した。スケールバー、20 μm。Y, 卵黄; T, 卵胞膜層; erythrocyte, 赤血球。

pH 5.0-6.0 において、Y363A は WT や G365A の約 2 倍多く PLA2R に結合した。また、卵黄へ輸送されやすい G365A 変異体は PLA2R への結合量が多く、競合活性が高いことが明らかとなった(図 3C)。一方で卵黄へ輸送されにくい G365D 変異体と N408A 変異体は、PLA2R 競合活性が低くなった(図 3D)。これらの結果から、IgY-Fc 変異体群の PLA2R 結合特性と卵黄輸送効率に関連性があることが示され、PLA2R が卵黄への IgY 輸送を調節する受容体であることが示唆された。

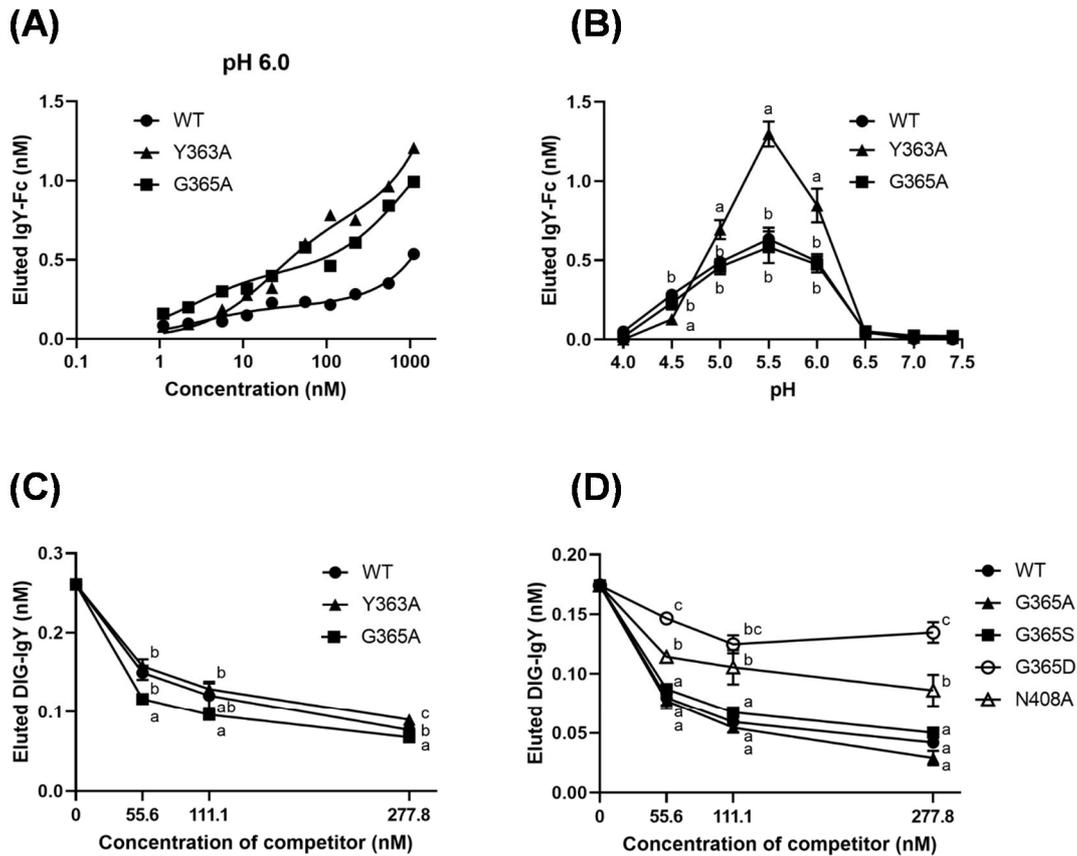


図3. 様々なIgY-Fc 変異体のPLA2Rへの結合活性。(A) 96 ウェル プレートに分泌型 PLA2R 固定化し、ウズラ IgY-Fc 変異体とともに pH 6.0 (1.1~1,111 nM, n = 1) でインキュベートした。結合した IgY-Fc 変異体の濃度を ELISA で測定した。(B) pH 4.0~7.4 でのウズラ IgY-Fc 変異体の FcRY への pH 依存的結合活性 (n = 3)。(C および D) DIG 標識ニワトリ IgY を PLA2R 固定化プレートに加え、競合物質として様々な濃度の IgY-Fc 変異体を加えた (n = 3)。PLA2R に結合した DIG-IgY の濃度は、ELISA で測定した。平均 ± 標準偏差。同じ濃度内の文字 a、b、c は、p < 0.05 で有意差あり。WT、組み換えウズラ野生型 IgY-Fc。

続いて、バイオレイヤー干渉法を用いて IgY-Fc 変異体の PLA2R への結合親和性を測定した。その結果、G365A は PLA2R への結合親和性が WT よりも高くなった(表 1)。さらに G365A は PLA2R への結合速度が約 2.2 倍高く、解離速度も約 1.3 倍高くなった。よって、G365A は細胞内で PLA2R に強く結合し、pH 7.4 の細胞外では PLA2R から速やかに解離するため、卵黄へ輸送されやすいと推察された。一方、卵黄へほとんど輸送されない Y363A は WT や G365A よりも PLA2R への結合親和性が高くなった。さらに WT と比較して、PLA2R からの解離が著しく遅くなった。この結果から、Y363A は一旦 PLA2R と結合すると解離しづらいため、卵黄へ輸送されにくいと推察された。また、Y363A は human PLA2R に対しても強い結合親和性を示したことから、他の受容体や卵

表1. BLItz による測定で得られた pH 5.5 での K_D , k_a , k_d 値

IgY or IgY-Fc (concentration; nM)	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	R^2
qIgY (100, 200, 300, 400, 600)	275	3.5×10^4	9.5×10^{-3}	0.977
WT (100, 200, 400, 600)	333	1.9×10^4	6.5×10^{-3}	0.982
Y363A (50, 100, 150, 200, 300, 400, 600)	65	2.3×10^4	1.5×10^{-3}	0.999
G365A (100, 200, 300, 400, 600)	197	4.2×10^4	8.2×10^{-3}	0.985

BLItz Pro ソフトウェアを使用して、様々な濃度で測定したセンサーグラム(未掲載)から計算された、qIgY および IgY-Fc 変異体の PLA2R への結合親和性。

胞組織にも結合・吸着し易いと推察された。これらの結果から、PLA2R が鳥類の卵黄への IgY 輸送を担う受容体である可能性が極めて高いことが明らかとなった。

PLA₂R 欠損ウズラを作出するために、ウズラの受精卵にガイド RNA を発現するベクターを導入し、ゲノム編集が生じた個体をスクリーニングした。その結果、発生したウズラの中に PLA₂R 遺伝子の途中でゲノム DNA が切断されて遺伝子編集が生じた個体を確認した。一方で、このウズラには別の箇所でもゲノム編集が生じるオフターゲット効果が観察されたことから、目的とするゲノム編集ウズラの作出には至らなかった。PLA₂R 欠損ウズラの作出は今後の課題として残された。

本研究により、PLA₂R は卵胞の Theca 層に広く分布する毛細血管の内皮細胞で発現していることが明らかとなった。この pH 依存的な結合様式と卵胞における発現局在から、PLA₂R を介した母ドリの循環血から卵胞への IgY 輸送モデルを推測した (図 4)。このモデルでは、母親の循環血中の IgY が非特異的に毛細血管内皮細胞に取り込まれると、細胞内の初期エンドソーム (弱酸性) で PLA₂R と結合し、細胞内を横断して卵黄側へと輸送される。エンドソームが細胞膜と融合すると、pH 7.4 の細胞外に曝され、PLA₂R から解離し、Theca 層と基底膜の境目に放出されると考える。その後、IgY は基底膜や GC 層などを通過し、卵黄へと輸送されると推察した。

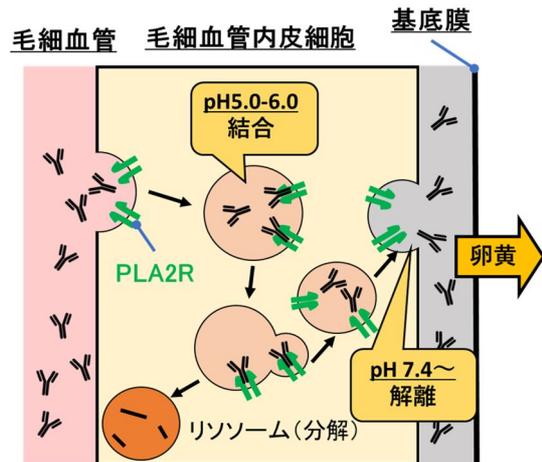


図 4. 卵黄への IgY 輸送のモデル。母ドリの循環血液から卵黄への IgY 輸送における PLA₂R の潜在的な局在と関与を示す。PLA₂R は、卵黄膜層の毛細血管内皮細胞のエンドソーム内に局在する。IgY は、エンドソーム内の PLA₂R に pH 5.0 ~ 6.0 で結合する。PLA₂R に結合した IgY は細胞膜の反対側に輸送される。一部の IgY はリソソームで分解される。輸送された IgY は、卵黄膜層と基底膜の境界で放出され、卵黄に輸送されます。

以上から、PLA₂R が探し求めてきた鳥類の卵黄への IgY 輸送を担う受容体である可能性が極めて高いことを見つけ出した。しかし、今回の実験では細胞内における PLA₂R の働きを直接観察しておらず、推測した卵黄への IgY 輸送モデルは不確かである。よって、PLA₂R を発現する細胞で、IgY や IgY-Fc 変異体群の経細胞輸送を再現し、卵黄輸送能との関連性を立証する必要がある。さらには、PLA₂R が卵黄への IgY 輸送を担う受容体であることを直接的に示すためには、今後 PLA₂R をノックアウトしたトリを作出し、卵黄への IgY 輸送を解析する必要がある。

引用文献

- Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J & Roth TF (1985) Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54, 755-762.
- Murai A, Hamano T, Kakiuchi M, Kobayashi M & Horio F (2020) Evaluation of a receptor gene responsible for maternal blood IgY transfer into egg yolks using bursectomized IgY-depleted chickens. *Poult Sci* 99, 1914-1920.
- Tesar DB, Cheung EJ & Bjorkman PJ (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.

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 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 -

1. 著者名 渡辺駿斗, 村井篤嗣	4. 巻 5
2. 論文標題 加齢による産卵率低下の原因探索：産卵ピーク期とリタイア期における脂質代謝特性の比較	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 養鶏の友	6. 最初と最後の頁 40-42
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 -

〔学会発表〕 計4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輸送特性の解析
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

1. 発表者名 森大樹・Gong Shengnan・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣
2. 発表標題 産卵期のウズラにおいて脂肪肝を誘導する栄養因子の探索とその発症機構の解析
3. 学会等名 2021年度日本家禽学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 岩澤淳, 村井篤嗣	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 6
3. 書名 生物の科学 遺伝	

1. 著者名 村井篤嗣	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)アドスリー	5. 総ページ数 8
3. 書名 「トリ類」. 実験動物の技術と応用 入門編	

1. 著者名 村井篤嗣	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)アドスリー	5. 総ページ数 10
3. 書名 「トリ類」. 実験動物の技術と応用 応用編	

〔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
研究 分 担 者	水島 秀成 (Mizushima Shusei) (20515382)	北海道大学・理学研究院・助教 (10101)	

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