

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22580307

研究課題名（和文）

母ドリから卵黄へのIgY抗体の輸送を担う新規IgY受容体の同定

研究課題名（英文）

Identification of IgY receptor contributing for IgY uptake into avian egg yolks

研究代表者

村井 篤嗣 (Murai Atushi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10313975

研究成果の概要（和文）：

本研究は、母ドリの卵胞でIgYの取り込みを担うIgY受容体を同定することを目的とした。組換え型のIgY変異体を作成して、それらの卵黄輸送量を調査したところ、363番目のチロシン残基をアラニン残基に置換した変異体は卵黄に輸送されることが判明した。この変異体の卵胞組織での局在を手掛かりにして、卵胞の最内層からIgY受容体の抽出・同定を行った。その結果、IgYの結合活性が検出された画分から、7種類のタンパク質が同定され、その中には卵黄前駆物質のビテロゲニンが含まれていた。ビテロゲニンを介した卵黄へのIgY輸送機構の存在については、今後、更なる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

The present study was conducted to identify a IgY receptor contributing IgY uptake into avian egg yolks. The uptakes of recombinant IgY mutants into egg yolks were determined when intravenously injected into birds. The results showed that substitution of tyrosine residue at 363 of IgY markedly reduced IgY uptake into egg yolks. Since critical hurdle of Y363A mutant transport into egg yolks existed in the innermost layer of avian ovarian follicles, the inner most layer was used for isolation and identification of the IgY receptor. Seven candidate proteins for the IgY receptor was isolated from plasma membrane fraction of the inner most layer of ovarian follicles, which included yolk-precursor protein, vitellogenin. Further studies are necessary to clarify the precise mechanism of IgY uptake mediated by vitellogenin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・ 畜産学・草地学

キーワード：畜産物利用・ニワトリ・ウズラ・卵黄・抗体・IgY・受容体

1. 研究開始当初の背景

母ドリの血中抗体「IgY」は卵黄に取り込まれ、次世代ヒナの免疫能の強化において必要な分子である。卵黄の実質的な形成器官で

ある卵胞には血液から卵黄内へ、選択的にIgYを輸送する「IgY受容体」が存在すると考えられてきた。しかし、卵黄へのIgYの取り込みを担うIgY受容体は未だ発見されて

いない。

我々は、卵黄への IgY 輸送には抗体 Fc 領域が必須であることを見出し、産卵ウズラの血中へ投与すると高効率で卵黄に取り込まれる「組換え型 IgY-Fc」を作出することに成功した。さらに、アミノ酸配列の一部を置換した組換え型 IgY-Fc の変異体の中に、卵黄輸送能が欠如したものを見出した。この結果は、卵黄輸送を担う IgY 受容体の存在を示唆しており、作出した IgY 変異体と IgY 受容体との相互作用に変化が生じた結果と考えられた。

さらに、我々は、ウズラ卵胞組織の凍結切片に IgY の Fc 断片を反応させた時に、卵胞の最内層の組織層で Fc 断片の結合活性を検出した。

これらの結果は、卵胞の組織層に卵黄輸送を担う IgY 受容体が存在する可能性を強く示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、鳥類を含む全ての卵生動物種で発見例がない、母ドリの卵胞で IgY の取り込みを担う IgY 受容体を同定することを目的とした。主に、以下の4項目に着目して研究を推進した。

(1) 我々が作出したニワトリの組換え型 IgY-Fc は、卵胞組織に存在する IgY 受容体の同定を可能にする独自の研究材料である。この組換え型 IgY-Fc の遺伝子に変異を加えることで、様々な IgY-Fc の変異体の作出が可能となる。それらの変異体の卵黄輸送量を測定することで、卵黄輸送に必要な IgY アミノ酸残基が明らかとなり、卵黄輸送能を欠損した変異体や卵黄輸送能が亢進した変異体が得られれば、IgY 受容体を同定に利用できるより有効な研究材料となる。

そこで、IgY-Fc の Cu3-Cu4 境界領域のアミノ酸残基を標的に網羅的なアミノ酸置換を加えた変異体を作成した。それらの変異体を産卵ウズラの血中に投与して卵黄輸送に必要な IgY アミノ酸残基を探索した。また、糖鎖を欠失させた IgY 変異体の輸送量も調査した。

(2) 上記(1)では、産卵ウズラにニワトリ IgY-Fc の変異体を投与する異種間での実験系であった。

近年ウズラ IgY のアミノ酸配列が明らかになり、ウズラの組換え型 IgY-Fc を用いた調査が可能となった。そこで、ウズラの IgY-Fc 変異体を産卵ウズラに投与し、これら変異体の卵黄輸送量を調査することにより、通常の生

理状態により近い条件で卵黄輸送に寄与する IgY アミノ酸残基を探索した。

(3) ニワトリとウズラの IgY-Fc の 363 番目のチロシン残基をアラニン残基に置換した変異体 (Y363A 変異体) は卵黄輸送能が著しく低下することが判明した。卵黄輸送能を欠く Y363A は、IgY 受容体との相互作用が弱く卵胞組織内のいずれかの部位で蓄積していると考えられた。そこで、Y363A の卵胞組織での集積部位を絞り込み、受容体の局在部位の特定を試みた。

(4) 上記(3)の成果により、卵黄輸送を欠損した Y363A 変異体は卵胞の最内層を通過することでできないため、IgY 受容体の局在部位が最内層であるとの確証を得た。そこで、最内層から IgY と結合活性をもつタンパク質の抽出と同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ IgY 重鎖の Cu2 領域の一部と Cu3、Cu4 領域をコードする遺伝子 (333~566 番目のアミノ酸配列をコード) を組み込んだ発現ベクターを用いて野生型 IgY-Fc (WT) を作出した。野生型 IgY-Fc の発現ベクターを鋳型とした部位特異的変挿入により、IgY 定常領域の Cu3-Cu4 境界領域に存在するアミノ酸残基 (Cu3, 358-365 番目; Cu4, 550-557 番目) を部位特異的変挿入法によりアラニン残基に置換した変異体を作成した。さらに、N 結合型糖鎖が付加されている 407 番目のアスパラギン残基をアラニンに置換した変異体 (N407A)、363 番目のチロシン残基を生体アミノ酸に置換した 18 種類の変異体を作成した。これらの変異体 20 µg を産卵ウズラの翼下静脈内に投与し、その後産卵された卵 (卵黄) への輸送量を ELISA により測定した。

(2) ウズラ IgY 重鎖をコードする遺伝子 (333~566 番目のアミノ酸配列をコード) を哺乳類細胞発現ベクターへ組み込み、野生型のウズラ IgY-Fc (WT) を作出した。部位特異的変挿入により Cu3 領域に存在するアミノ酸残基 (Cu3, 361-365 番目) をアラニン残基に置換した変異体を作成した。また、363 番目のチロシン残基を、同じ芳香族アミノ酸に属するトリプトファンまたはフェニルアラニンに置換した変異体 (Y363W 変異体、Y363F 変異体) も作成した。これらの変異体を産卵ウズラの翼下静脈内に投与し、卵黄への輸送量を測定した。

(3) ジゴキシゲニン (DIG) 標識したニワトリ IgY-Fc の WT および Y363A 変異体をそれ

それぞれ産卵ウズラに投与し 30 分後と 2 時間後に卵胞を採取した。パラフィン切片を作製し、免疫組織学的手法により卵胞組織中の両 IgY-Fc を検出した。次に、Alexa-488 で標識した両 IgY-Fc をウズラへ投与し 5 分後に卵胞を採取した。凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で両 IgY-Fc の卵胞組織での分布を観察した。

(4) 卵胞の混合組織層（顆粒膜細胞層、ペリビテリン膜、卵母細胞膜）から形質膜画分を抽出し、SDS-PAGE で分離後リガンドブロッキング法を用いて形質膜画分の IgY 結合活性を検出した。リガンドブロッキング法で検出された IgY 結合活性の原因タンパク質を同定するために、形質膜画分を SDS-PAGE で分離後、結合活性が検出された領域（250-300 kDa）のゲル断片からペプチド断片を溶出し、nano LC-MS/MS で質量分析を行った。その後、同定されたタンパク質の一部について、これらのタンパク質が形質膜画分画分に含まれているかウェスタンブロッティング法により確認した。

4. 研究成果

(1) C_v3 領域のアミノ酸配列をアラニンに置換した変異体のうち、Y363A 変異体では卵黄輸送量が ELISA の検出限界値以下にまで減少し、ほとんど輸送されなかった（図 1）。さらに、L362A 変異体と I364A 変異体では、卵黄輸送量が野生型の輸送量の約 30% にまで減少した。一方、C_v4 領域にアラニン置換を加えた変異体のうち、H550A、E551A、L553A では、それぞれの卵黄輸送量が野生型の 50-70% にまで減少した。以上より、C_v3 と C_v4 の境界領域のアミノ酸配列は IgY の卵黄輸送量を規定する重要な構造アミノ酸であり、特に 363 番目のチロシン残基は IgY 受容体と相互作用するアミノ酸残基である可能性が示唆された。

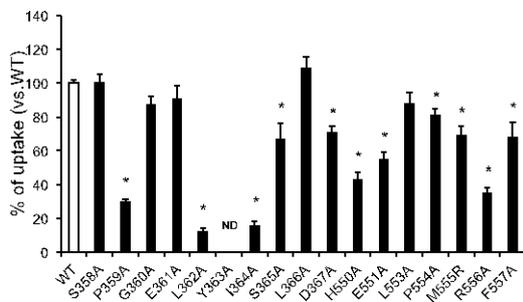


図 1. ニワトリ IgY-Fc 変異体の産卵ウズラ卵黄への輸送量。縦棒は平均値 ± SEM。ND は検出限界以下。n = 20 (WT)、4-5 (変異体)。* WT に対して $P < 0.05$ で有意差あり。

投与した Y363A の体内動態を調査したところ、投与後 24 時間までの血中濃度は Y363A が WT よりも常に高濃度であった。また、WT と Y363A の組織分布を比較すると、Y363A は卵黄以外の全ての組織で WT よりも高レベルか、あるいは同等のレベルで存在していた。したがって、Y363A は血中や主要臓器での動態が極端に変化したのではなく、卵黄輸送能が特異的に失われたと考えられた。

363 番目のチロシン残基を、それ以外の全生体アミノ酸に置換した。その結果、芳香族アミノ酸のトリプトファンとフェニルアラニンに置換した 2 種類の変異体の卵黄輸送量は、WT の卵黄輸送量とほぼ同じレベルであった。よって、IgY の卵黄輸送能の維持には、363 番目のアミノ酸残基の側鎖に芳香族基が必要であることが判明した。さらに、IgY の 407 番目のアスパラギン残基に付加されている N-結合型糖鎖の卵黄輸送への寄与を調査するため、このアスパラギン残基をアラニンに置換した糖鎖欠失変異体 N407A の卵黄輸送量を調査した。その結果、N407A の卵黄輸送量は WT の約 10% まで減少したことから、IgY の効率的な卵黄輸送にはアスパラギン残基への糖鎖付加が必要であると示唆された。

以上より、IgY の効率的な卵黄輸送には C_v3 領域の Tyr³⁶³ を中心とするアミノ酸残基の保持が重要であり、Tyr³⁶³ の位置には芳香族アミノ酸が配置されることが必要であると判明した。また、N⁴⁰⁷ への糖鎖付加も IgY の効率的な卵黄輸送に寄与することが判明した。

(2) ウズラ IgY-Fc の C_v3 領域の 361-364 番目までのアミノ酸残基をそれぞれアラニンに置換した変異体では、卵黄への輸送量が WT の 20% 以下まで低下した（図 2）。また、363 番目のチロシン残基を同じ芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン（Y363F）またはトリプトファン（Y363W）に置換した変異体では輸送量が WT と同等かそれ以上であった。よって、ウズラ卵黄へのウズラ IgY-Fc の輸送には 362-364 番目のアミノ酸残基の保持、特に 363 番目のアミノ酸残基には芳香族アミノ酸が必要であることが判明した。

これらの結果は、ニワトリ IgY-Fc を用いた前述の実験結果と同様であったことから、卵黄輸送に重要な IgY アミノ酸残基は共通しており、IgY 受容体の親和性を考察する上で、重要な情報を得ることができた。

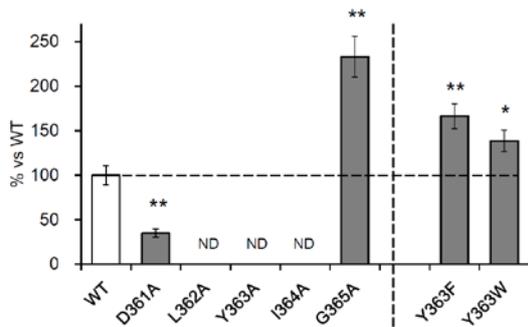


図2. ウズラ IgY-Fc 変異体の産卵ウズラ卵黄への輸送量。縦棒は平均値 ± SEM。NDは検出限界以下。n = 6。
* WT に対して $P < 0.05$ で有意差あり。

(3) 免疫染色により両 IgY-Fc を検出したところ、WT は顆粒膜細胞層より内側と卵黄中で観察されたが、Y363A の集積は観察されなかった (Fig. 1)。次に、直接法で IgY-Fc の検出が可能となるように Alexa-488 標識した WT と Y363A を投与したウズラの卵胞組織切片を用いて蛍光観察を行った。その結果、Y363A は顆粒膜細胞層まで浸潤していることが判明した (Fig. 2)。以上から、IgY の卵黄輸送を担う受容体は、顆粒膜細胞層より内側のペリビテリン膜または卵母細胞膜上に局在していると判断した。

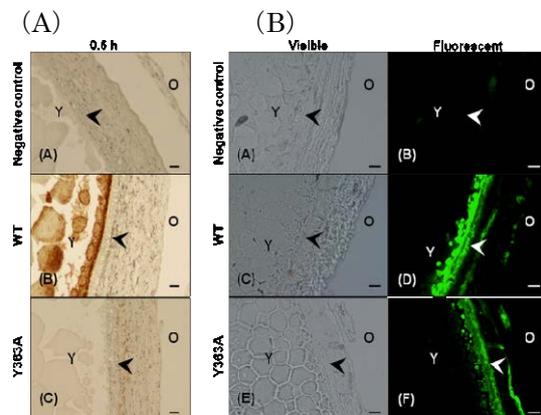


図3. ウズラ卵胞組織における投与 IgY-Fc の検出。(A) DIG 標識したニワトリの WT と Y363A をウズラに 400 μ g 投与し、30 分後に卵胞を採取した。パラフィン切片を作成後、免疫染色で両 IgY-Fc を検出した。Y : 卵黄、O : 卵胞外、矢頭 : 顆粒膜細胞層、スケールバー : 20 μ m。(B) Alexa-488 標識 WT と Y363A を 400 μ g ずつウズラに投与し、5 分後に卵胞を採取した。凍結切片を作成後、蛍光顕微鏡で観察した。Y : 卵黄、O : 卵胞外、矢頭 : 顆粒膜細胞層、スケールバー : 40 μ m。

(4) ニワトリ卵胞組織から抽出した形質膜画分を SDS-PAGE で分離後、HRP 標識 IgY をリガンドブロッティング法を行ったところ、約 250-300 kDa の位置に IgY 結合活性を検出した (図4)。この結合活性のシグナル強

度は、未標識 IgY を競合させると減少または消失したが、未標識の血清ウシアルブミン、ニワトリオボアルブミン、IgY の Fc 断片、Fab 断片、F(ab)²断片を競合させてもシグナル強度に変化はなかった。

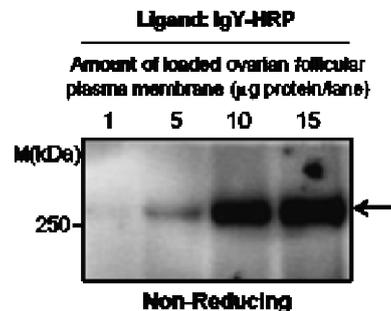


図4. リガンドブロッティング法による形質膜画分での IgY 結合因子の検出。卵胞組織から抽出した形質膜画分を SDS-PAGE で分離後、HRP 標識 IgY を用いて IgY 結合因子を検出した。

続いて、形質膜画分の約 250-300 kDa の領域に含まれるタンパク質をトリプシン消化しペプチド断片の質量分析を行ったところ、8 つのタンパク質が同定された (表1)。

表1. 質量分析で同定されたタンパク質

Protein	MW	score
1 Filamin	275	1033
2 PREDICTED: filamin-B-like [Meleagris gallopavo]	232	938
3 PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 [Meleagris gallopavo]	120	437
4 Actin, cytoplasmic type 5	41	368
5 Vitellogenin-2	204	359
6 Endoplasmic reticulum chaperone protein (HSP90)	91	155
7 80 kDa heat shock protein, mitochondrial	80	122
8 Vitellogenin-1	210	92

形質膜画分の約 250-300 kDa のゲル断片を nano LC-MS/MS により質量分析を行い、タンパク質を同定した。MW : 分子量、Score : Mascot 解析により得られたスコア。

これらのタンパク質の分子量と生理機能からビテロゲニン (VTG) に着目した。VTG が形質膜画分に存在しているかウェスタンブロッティング法で確認したところ、リガンドブロッティング法で IgY 結合活性が検出された分子サイズ (約 250-300 kDa) と同じ位置に VTG が検出された (図5)。以上の結果から、IgY は VTG と結合している可能性が示唆された。VTG はペリビテリン膜または卵母細胞膜上に存在している VLDL/VTG 受容体 (LR8) を介して卵黄中へ輸送されているため、IgY も VTG とともに LR8 を介して卵黄中へ輸送されている可能性が考えられた。

今後は、この可能性を検討するために VTG

と IgY の結合試験を行う必要がある。

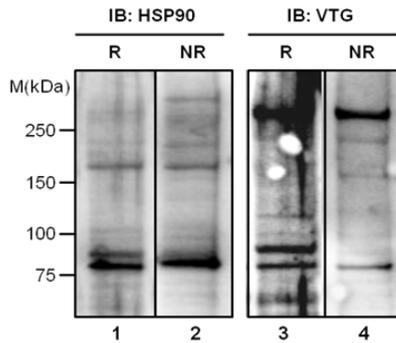


図5. 形質膜画分での HSP90 と VTG の検出。ウェスタンブロッティング法で卵胞組織から抽出した形質膜画分での HSP90 と VTG を検出した。

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 2 件)

- ① Murai, A., Murota, R., Doi, K., Yoshida, T., Aoyama, H., Kobayashi, M. and Horio, F. (2013) Avian IgY is selectively incorporated into the egg yolks of oocytes by discriminating Fc amino acid residues located on the C_μ3/C_μ4 interface. **Develop. Comp. Immunol.**, 39: 378-387. 査読有り。
- ② Takimoto, T., Doi, K., Kobayashi, M., Horio, F. and Murai, A. (2013) Amino acid substitution in the C_μ3 domain causes either elevation or reduction of IgY uptake into egg yolks of quail. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 153: 289-297. 査読有り。

[学会発表] (計 11 件)

- ① 無漏田梨恵・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。トリ卵黄への高効率輸送に寄与する抗体アミノ酸残基の同定：組換え型ニワトリ IgY のウズラ卵黄への輸送量。日本家禽学会 2010 年度秋季大会。信州大学農学部，南箕輪村。2010 年 9 月 15 日。
- ② 村井篤嗣・小林慧三・小林美里・堀尾文彦。プルダウン法によるトリ卵黄への抗体輸送を担う IgY 受容体の探索。日本家禽学会 2010 年度秋季大会。信州大学農学部，南箕輪村。2010 年 9 月 15 日。
- ③ 村井篤嗣・無漏田梨恵・小林美里・堀尾文彦。母ドリ卵黄への高効率輸送に寄与する

IgY アミノ酸残基の同定。日本畜産学会第 113 回大会。東京農業大学。本厚木。2011 年 3 月 27 日。

- ④ 土井香澄・無漏田梨恵・小林美里・吉田敏則・青山博昭・堀尾文彦・村井篤嗣。母ドリ卵胞における IgY-Fc とその変異体の輸送特性の解析。日本畜産学会第 114 回大会。北里大学，十和田。2011 年 8 月 26 日，27 日。
 - ⑤ 無漏田梨恵・土井香澄・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。母ドリ卵黄への輸送に必要な IgY アミノ酸残基の同定。平成 23 年度東海畜産学会秋季大会。名古屋大学。名古屋。2011 年 12 月 13 日。
 - ⑥ 瀧本拓央・土井香澄・無漏田梨恵・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。組換え型ウズラ IgY-Fc を用いた卵黄への輸送に必要なとされる Fc アミノ酸残基の探索。日本家禽学会 2012 年度春季大会。名古屋大学。名古屋。2012 年 3 月 30 日。
 - ⑦ 土井香澄・無漏田梨恵・吉田敏則・青山博昭・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。卵黄輸送能を欠く IgY-Fc 変異体のウズラにおける臓器分布と卵胞組織への浸潤度。日本家禽学会 2012 年度秋季大会。高松市生涯学習センター。高松。2012 年 9 月 7 日。
 - ⑧ 村井篤嗣。母ドリ卵巣における抗体輸送機構に関する研究。2012 年度日本家禽学会秋季大会。高松。2012 年 9 月 7 日。
 - ⑨ 村井篤嗣。卵黄抗体の輸送機構-IgY の定常領域である Fc が輸送に不可欠である-。第 9 回たまご研究会。京都大学。2012 年 10 月 15 日。
 - ⑩ 瀧本拓央・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。ウズラ IgY-Fc 変異体における卵黄輸送量と血中動態との関連。平成 24 年度東海畜産学会秋季大会。名古屋大学。名古屋。2012 年 11 月 19 日。
 - ⑪ 瀧本拓央・土井香澄・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣。ウズラ IgY-Fc を用いた卵黄輸送に必要な Fc アミノ酸残基の探索とその輸送特性の解析。日本家禽学会 2013 年度春季大会。安田女子大学。広島。2013 年 3 月 29 日。
- [図書] (計 1 件)
- ① Murai, A. (2013) Maternal transfer of

immunoglobulins into egg yolks of birds
(Review). **J. Poult. Sci.**, in press. 査読有り.

[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://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/study.htm.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 篤嗣 (MURAI ATSUSHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准
教授

研究者番号 : 10313975

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し