

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450407

研究課題名(和文) 網羅的RNAシーケンス解析を活用した卵黄抗体の輸送を担うIgY受容体の同定

研究課題名(英文) Identification of IgY receptor responsible for IgY uptakes into egg yolks by comprehensive RNA sequencing analysis

研究代表者

村井 篤嗣 (Murai, Atsushi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10313975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：母ドリ卵黄へのIgY抗体の輸送を担う受容体の同定を目指し、ニワトリ卵胞の最内層で発現する全RNA配列を網羅的に獲得した。配列解析により9,848の既知遺伝子の転写産物の発現が確認された。この中に3種類の既知IgY受容体の転写産物が含まれていたが、それらの発現は低レベルであった。配列解析結果からのIgY受容体候補の選抜を効率化するために、IgY輸送能に特徴があるトリ集団の発掘を試みた。抗体産生能を消失したIgY欠損鶏では卵黄へのIgY輸送能が最大で3倍に亢進し、網羅的発現解析でのIgY欠損鶏の有用性が判明した。閉鎖系集団で維持されたウズラ6系統の卵黄輸送能に顕著な差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to identify an IgY receptor contributing IgY uptake into avian egg yolks. Analysis of comprehensive RNA sequence in chicken ovarian follicles showed expression of 9,848 transcripts. Three already known IgY receptors were included in these transcripts, but their expression levels were low. To proceed an efficient selection of candidate gene from whole transcripts, chicken or quail groups possessing novel IgY uptake ability were explored. IgY-deficient chickens subjected to brusectomy increased IgY uptakes into egg yolks by 3-fold, suggesting usefulness of this chickens model for comprehensive RNA sequencing analysis. No remarkable changes were observed in ability of IgY uptakes into egg yolks among six quail stains.

研究分野：動物栄養生理学

キーワード：畜産物 卵 ニワトリ ウズラ IgY 抗体 受容体 網羅的発現解析

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必須な分子である。この卵黄への IgY 取り込みは「IgY 受容体」との結合により効率的かつ選択的に行われることから、この受容体の同定が待望されている。これまでの研究により、IgY の変異体が、卵黄への IgY 輸送の鍵となる卵胞の最内層を通過できないことを見出した。よって IgY 受容体がこの最内層に存在する可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

(1) 母ドリ卵黄への IgY 輸送を担う受容体の同定を目指し、次世代シーケンサーを活用して卵胞の最内層で発現する全遺伝子を効率的かつ網羅的に獲得して、その中から卵黄への IgY 取り込みを担う IgY 受容体の抽出を試みた。

(2) 網羅的な遺伝子発現解析によって得られた膨大な RNA 配列の中から、IgY 受容体の候補遺伝子を抽出することは極めて困難であることが判明した。そこで、IgY の卵黄輸送能に差があるニワトリ集団やウズラ集団を創出あるいは発掘し、これらのモデル動物を網羅的遺伝子発現解析に供試することで、IgY 受容体の選抜を可能にすることを目指した。

特徴的な IgY の卵黄輸送能を持つニワトリ集団を見出すために IgY 欠損鶏の作出を目指した。鳥類特有の免疫器官であるファブリキウス嚢を胚期に外科的に除去することで IgY 欠損鶏を作出することが可能である。IgY 欠損鶏では IgY が体内で枯渇するため卵黄への IgY 取り込みを担う受容体の発現変動が期待できる。そこで、IgY 欠損鶏の作出ならびにこのニワトリにおける IgY の卵黄輸送能を調査した。

また、特徴的な IgY 卵黄輸送能を遺伝的に保有するウズラ集団を見出すために、6 つのウズラ系統の内因性 IgY 濃度 (血液および卵黄) ならびに IgY の卵黄輸送能を調査した。

3. 研究の方法

(1) 産卵期の採卵鶏 (Julia Light®) 成熟雌から 2 番目および 3 番目に大きい卵胞 (F2 卵胞および F3 卵胞) を摘出し、これらの卵胞の内層を採取した。採取した卵胞内層から総 RNA を抽出した。このサンプル中の mRNA を逆転写して cDNA を獲得し、約 100bp に断片化された cDNA の配列を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて網羅的に解析した。得られた配列情報をニワトリゲノム配列にマッピング後、発現量を算出した。マッピングされなかった遺伝子断片は再構築 (de novo アセンブリ) を行った。

(2) 孵卵 18 日目のニワトリ胚からファブリキウス嚢を外科的に除去し、これをファブリ

キウス嚢除去群 (以下、Bx 群) とした。対照群は無処置のまま孵化させた。孵化後、雄ヒナはすべて除外し、雌ヒナのみを選抜した。育成期間中は、体重測定と ELISA による血中 IgY 濃度の測定を継続的に行った。産卵開始後、産卵率を測定するとともに、血中及び卵黄中の IgY 濃度を測定した。続いて、卵黄輸送能を調査するためジゴキシゲニン標識したニワトリ IgY (100 µg/羽) を Bx 群と対照群の翼下静脈に投与して、その後に産卵された卵の卵黄に移行した標識 IgY 量を ELISA で測定した。

(3) 閉鎖系集団で維持された 5 系統の雌ウズラ (AWE, DB, L, Pansy, WE) と市販の雌ウズラを用いた。全てのウズラから採血と採卵を行い、抗ウズラ IgY 抗体を用いた ELISA 法で血中と卵黄中の内因性 IgY 濃度を測定した。また、ジゴキシゲニンで標識した組み換え型 IgY-Fc を各ウズラの翼下静脈に投与した (20 µg/100 g 体重)。産卵された卵の卵黄に含まれる標識 IgY-Fc の濃度を ELISA 法で測定し、外因性 IgY の卵黄輸送量の指標とした。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサーによる配列解析の結果、全 16,000 の転写産物が取得され、そのうち既知の転写産物は 9,848 遺伝子であった (図 1)。

全転写産物 :34,365

FPKM 値が 0 の転写産物を除外

24,775 転写産物	
不明	コーディング
4,281	20,494

重複配列を除外

16,000 転写産物		
不明	コーディング	
4,222	11,778	
	同定	未同定
	9,848	1,930

図 1. ニワトリ卵胞内層における網羅的転写産物の解析結果。16,000 個の転写産物を対照に解析を進めた。

本解析で検出された転写産物の中に卵母細胞の外層マトリックスである ZP3 や卵黄へのリポタンパク質の輸送を担う VLDL 受容体 (VLDLR) といった、顆粒膜細胞で豊富に発現する遺伝子の存在が確認された (表 1)。また、既知の IgY 受容体である CHIR-AB1 およびそのアイソタイプの CHIR-B3、さらには卵黄嚢膜から胚への IgY の輸送を担う FcRY をコードする遺伝子

(*PLA2R1*) の発現が確認された。しかし、その発現量の指標となる FPKM 値は全ての既知 IgY 受容体で極めて低値であった。

また、ニワトリゲノム配列にマッピングされなかった未知の遺伝子断片の配列を再構築したところ、16,423 個の遺伝子断片配列が再構築された。これらの中から、既知 IgY 受容体と類似の配列を持つものを BLAST 検索したが、類似性の高い配列を見出すことはできなかった。以上の結果より、取得された遺伝子断片の中から IgY 受容体の候補遺伝子を選抜することはできなかった。

表 1. 網羅的転写産物の解析により明らかになった卵胞内層における代表的な遺伝子とその発現レベル

ローカス	長さ (bp)	遺伝子名	FPKM	機能と特徴
10.2131956-2134350	1,377	ZP3	19,309	発現量最大。内層のペリビテリン層を構成。
Z:26415506-26431202	4,212	VLDLR	125	リポタンパク質受容体。卵黄前駆物質の取り込み。
AADN030156 06.1:4691-8821	3,276	CHIR-B3	10.5	既知IgY受容体。免疫系細胞で発現。
AADN030176 85.1:20-3463	2,078	CHIR-AB1	0.401	既知IgY受容体。免疫系細胞で発現。
7:21327980-21363749	5,410	PLA2R1 (FcRY)	0.015	既知IgY受容体。卵黄囊膜でのIgY輸送

本実験により、次世代シーケンサーによって得られた膨大な転写産物の遺伝子配列情報から目的とする IgY 受容体の候補遺伝子を抽出することは極めて困難であることが判明した。本解析に供試したサンプルは通常ニワトリの卵胞組織のみであったことから、候補遺伝子を絞り込むための手掛かりが不足していたことが問題であった。網羅的解析により IgY 受容体の候補遺伝子を探索する場合、IgY の卵黄輸送能に差がある別々の集団を準備する必要があると考えられた。例えば、IgY の卵黄輸送能が高い集団と低い集団の 2 つから卵胞組織を得て、これらの卵胞組織で発現する遺伝子を網羅的に比較解析することで、目的とする IgY 受容体の候補遺伝子を効率的に抽出することが可能となる。

そこで、続いての実験では、特徴的な卵黄輸送能を持つトリ集団を発掘するために、以下の 2 つの比較集団で卵黄輸送能を調査することとした：1) 体内の IgY を枯渇させることで IgY の卵黄輸送能が変動することを期待して、IgY 欠損鶏を作出する。2) 遺伝的に IgY 卵黄輸送能が異なるウズラ集団を見つけ出すために 6 系統のウズラ集団の IgY 卵黄輸送能を調査する。

(2) 育成期間中の体重は二群間で差は見られなかった。対照群では血中 IgY 濃度は成長とともに増加したが、Bx 群では徐々に減少した (図 2)。16 週齢時のスクリーニングで、血中 IgY 濃度が対照群の 20 分の 1 までしか下がらない Bx 群の個体を以降の実験から除外

した。

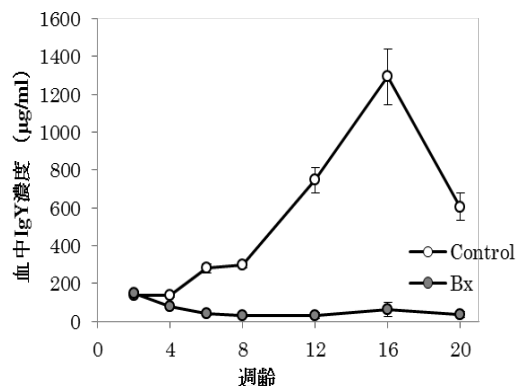


図 2. 対照区 (Control) とファブリキウス囊除去手術区 (Bx) の経時的な血中 IgY 濃度の変化。血中の IgY 濃度を ELISA によって測定した。縦棒は平均値 ± SEM。n=5。

産卵開始後の Bx 群の産卵率は対照群とほぼ同等であった。産卵開始後の血中および卵黄中の内因性 IgY 濃度は Bx 群が対照群の 100 分の 1 以下となった。したがって内因性 IgY 濃度が十分に低値であっても産卵能力を維持しているニワトリ集団を IgY 欠損鶏と定義し、以降の解析に使用した。

外因的に投与した IgY の卵黄輸送実験では Bx 区でも投与 2 日から 7 日後のすべての卵で IgY が輸送されていることが確認された (図 3)。さらに、投与 2 日から 7 日後すべての卵で Bx 区の卵黄輸送量は対照区よりも 2 から 3 倍有意に高くなった。この原因は不明であるが、血中の IgY が枯渇することによって卵黄への代償的な IgY 取り込み能が亢進した可能性が考えられた。すなわち、IgY 欠損鶏では卵黄への IgY 輸送を担う IgY 受容体を高レベルに発現している可能性が高いことを示唆する。

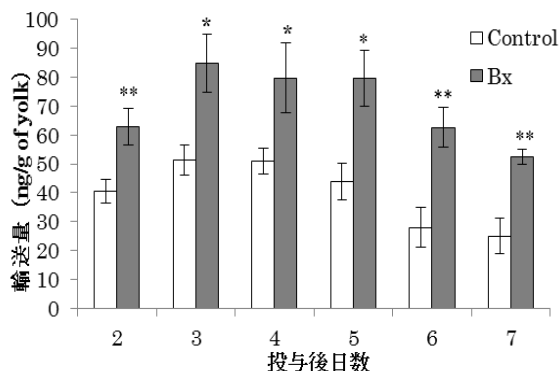


図 3. 対照区 (Control) とファブリキウス囊除去手術区 (Bx) の血中に投与した標識 IgY の卵黄への輸送量。標識した IgY (100 µg) を対照区と Bx 区に静脈注射し、投与 2~7 日後の卵の卵黄への輸送量を ELISA によって測定した。縦棒は平均値 ± SEM。n=5。\*P<0.05、\*\*P<0.01。

本試験により、内因性 IgY が著しく低く、産卵能力の高い IgY 欠損鶏の作出に成功した。この IgY 欠損鶏は通常のニワトリよりも優れた IgY 輸送能を保持しており、卵黄輸送を担う IgY 受容体同定のためのモデル動物として優れた生理的特性を持つことが判明した。

(3) 6 系統の雌ウズラを対象にして血中と卵黄中の IgY 濃度を測定した。血中の内因性 IgY 濃度は系統間で有意な差があり、その差は最大で 2.5 倍 (AWE vs Pansy; 図 4) であった。卵黄中の内因性 IgY 濃度も系統間で有意な差があり、最大で 2.6 倍の差 (AWE 2.6 vs Pansy 0.99; mg/g 卵黄) があった。また、血中と卵黄中の内因性 IgY 濃度には、正の相関があった ( $|R|=0.786, P<0.0001$ )。

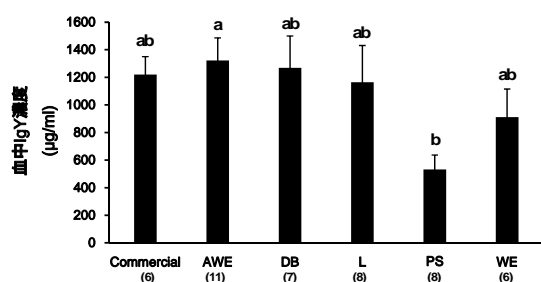


図 4. 6 系統のウズラの血中 IgY 濃度。ELISA によって測定した。縦棒は平均値 ± SEM。括弧内はサンプル数。ab;  $P<0.05$ 。

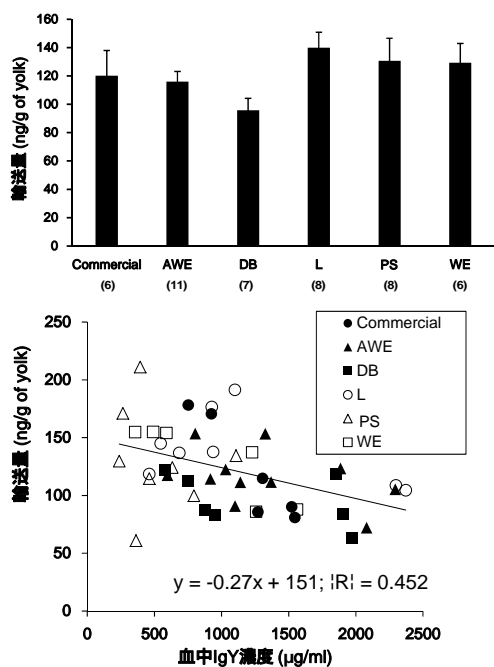


図 5. 6 系統のウズラの血中に投与した標識 IgY-Fc の卵黄への輸送量 (上) ならびに血中 IgY 濃度との相関 (下)。標識した IgY-Fc (20 µg/100 g 体重) を静脈注射し、投与 2 および 3 日後の卵の卵黄への輸送量を ELISA によって測定した。縦棒は平均値 ± SEM。括弧内はサンプル数。

外因性 IgY の卵黄輸送量は系統間で有意な差は見られなかったが、内因性 IgY 濃度とは逆方向に増減する傾向があった (図 5)。血中 IgY 濃度と外因性 IgY の卵黄輸送量には負の相関があり ( $|R|=0.452, P<0.0016$ )、外因性 IgY の卵黄輸送時に血中 IgY と拮抗したと推測された。

本実験により、各種ウズラ系統における血液中と卵黄中の IgY 濃度を掌握することができた。これまでに、ウズラの卵黄中 IgY を定量的に測定した報告は見当たらず、本研究によりはじめて明らかとなった。一方、外因性 IgY の卵黄輸送量については系統間で顕著な差を見出すことはできず、今後、さらに多くのウズラ系統を対象にした調査が必要と考えられた。

## 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)

Murai, A., Kitahara, K., Okumura, S., Kobayashi, M. and Horio, F. (2016) Oral antibiotics enhance antibody responses to keyhole limpet hemocyanin in orally but not muscularly immunized chickens. *Anim. Sci. J.*, 87, 257–265. Doi: 10.1111/asj.12424. 査読有。

Murai, A., Kakiuchi, M., Hamano, T., Kobayashi, M., Tsudzuki, M., Nakano, M., Matsuda, Y. and Horio, F. (2016) An ELISA for quantifying quail IgY and characterizing maternal IgY transfer to egg yolk in several quail strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 175, 16–23. Doi: 10.1016/j.vetimm.2016.04.013. 査読有。

〔学会発表〕(計 6 件)

瀧本拓央・土井香澄・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣. 組換え型ウズラ IgY を用いた卵黄輸送に必要な IgY アミノ酸残基の探索. 第 1 回ウズラ研究会. 名古屋大学. 名古屋. 2013 年 12 月 10 日.

村井篤嗣. 鳥類の母子免疫機能の仕組み: 卵黄への IgY 取り込みの分子基盤. 第 8 回 JAB 特別セミナー. 広島大学. 広島. 2014 年 2 月 3 日.

村井篤嗣. 母ドリの卵黄への IgY 取り込みの分子基盤. 平成 26 年度家畜栄養生理研究会春季集談会. 日本獣医生命科学大学. 武蔵境. 2014 年 5 月 17 日.

濱野貴仁・垣内美紗子・伊藤優里・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣. ファブリキウス囊を除去した超低濃度 IgY ニワトリの産卵能力と卵黄への IgY 輸送能. 日本家禽学会 2015 年

春季大会. 宇都宮大学. 宇都宮. 2015年3月30日.

垣内美紗子・濱野貴仁・中野幹治・松田洋一・都築政起・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣. 各種ウズラ系統における内因性 IgY 濃度の調査ならびに外因性 IgY の卵黄輸送特性. 日本家禽学会 2015 年度秋季大会. 酪農学園大学. 江別. 2015 年 9 月 10 日.

濱野貴仁・垣内美紗子・伊藤優里・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣. IgY 欠損鶏の産卵形質の評価と母子免疫機構解明への活用. 日本畜産学会第 121 回大会. 日本獣医生命科学大学. 武蔵境. 2016 年 3 月 28 日.

〔図書〕(計 3 件)

村井篤嗣. (2014) 母ドリの卵黄への IgY 取り込みの分子基盤. 栄養生理研究会報, 58, 9-17. 査読有。

村井篤嗣. (2014) 卵の特徴. ニワトリの科学 (古瀬充宏 監修・編集), pp. 126-134. 総ページ 202. 朝倉書店.

村井篤嗣. (2016) 脂質 .ウズラ. 動物の栄養第 2 版 (唐澤豊・菅原邦生 編), pp. 20-26, 247-251. 総ページ 338. 文永堂出版.

〔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/research.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