

アミノ酸置換による IgY 抗体の卵黄輸送能の強化と 機能性卵作出への応用

名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授 村井 篤嗣

■ 緒 言

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。卵黄の実質的な形成器官である卵胞は血液中の分子を選択的に輸送する仕組みを備えており、卵胞に内包される卵母細胞の膜上には IgY と相互作用する受容体が存在すると考えられている。しかし、その分子機構は現在なお未解明である。

我々は、優れた抗原特異性を持つ抗体を母ドリから卵へ、卵から次世代ヒナへと高効率で伝播させることを目指して基礎研究を進めてきた。これまでに、IgY の卵黄への取り込みには抗体の Fc 領域が必須であることを明らかにした (Kitaguchi et al., 2008)。さらに、高効率で卵黄内へ輸送される組換え型 IgY-Fc の作出に成功した (Bae et al., 2010)。この IgY-Fc を用いることにより、IgY が卵黄へ効率的に輸送されるために必要なアミノ酸残基の探索に取り組んだ。標的とするアミノ酸残基を側鎖構造が単純なアラニン残基に順次置換し、作出した変異体をウズラに投与した時の卵黄への輸送量を調査した。その結果、IgY-Fc の C₃ 領域を構成する 363 番目のチロシン残基 (Y363) をアラニンに置換すると卵黄輸送量が著しく減少することが判明した。逆に、365 番目のグリシン残基 (G365) をアラニンに置換すると卵黄への輸送量が約 2 倍に増加した。したがって、これらのアミノ酸残基は卵胞に存在する IgY 受容体と相互作用し、IgY の卵黄輸送能を調節する重要な鍵アミノ酸であることが判明した。さらに、この 2 箇所のアミノ酸残基をアラニン以外のアミノ酸に置換することで、卵黄輸送能がより強化された IgY を作出することも可能と考えられた。

本研究では、母ドリ卵胞における IgY 輸送機構の解明と新規機能性を付与した卵生産への応用を最終目標に据え、IgY の Y363 と G365 を網羅的に別の生体アミノ酸に置換した変異体を作成し、それらの卵黄への輸送量を調査し、IgY の卵黄輸送能が強化できるかを調査した。

■ 方 法

1. IgY-Fc 発現ベクターの作製

IgY の重鎖定常領域をコードする遺伝子を増幅するために、ニワトリおよびウズラ脾細胞由来の総 RNA を逆転写して cDNA を得た。その cDNA を鋳型にして Kpn I 制限酵素切断部位を組み込んだセンスプライマーと Xho I 制限酵素切断部位を組み込んだアンチセンスプライマーを用いた PCR により目的の遺伝子を増幅した。増幅した PCR 産物を pSec-Tag2A 哺乳類発現ベクター (Invitrogen) の Xho I、Kpn I サイトに連結し、発現ベクターを構築した。挿入した遺伝子断片の C 末端側には精製用の 6×His タグが付加されるように接続した。この発現ベクターが産生する野生型の IgY-Fc を WT と命名した。

構築した WT の発現ベクターを鋳型として、Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて各種変異体を作成した。作製した変異体発現ベクターは DNA シークエンサーにより塩基配列を解析し、正しく変異が挿入されているかを確認した。

2. 哺乳類細胞による IgY-Fc 変異体の作出と精製

IgY-Fc の WT ならびに変異体の発現ベクターを Free Style Max reagent (Invitrogen) を用いて CHO-S 細胞に遺伝子導入した。5 日間培養して培養液に分泌された IgY-Fc を His アフィニティーカラムで精製した後、透析により PBS にバッファー置換した。

3. SDS-PAGE 解析と DIG 標識

精製した IgY-Fc (2 μ g) は SDS-PAGE で分離後、CBB R-250 で染色を行い、IgY-Fc の精製度と分子サイズの確認を行った。その後、これらの IgY-Fc は内因性の IgY と区別できるよう、ジゴキシゲニン (DIG, Roche Diagnostics) で標識した。

4. IgY-Fc の投与試験と卵黄輸送量の測定

雌ニホンウズラで連産している個体を用いた。環境温度 23 \pm 1 $^{\circ}$ C、照明条件 16L/8D で単飼した。飼料および水は自由摂取させた。

IgY-Fc は各々 40 μ g ずつをウズラの翼下静脈内に投与した。投与後、卵黄への抗体輸送量がピーク

となる 2 日目および 3 日目の卵を回収し、解析まで 4°C で保存した。卵は割卵後、卵白を除き、卵黄約 1g を採取し、氷冷した 5ml の PBS によく溶かした。4°C で一晩静置した後、10,000×g で 25 分間 4°C で遠心し、上清を濾紙で濾過した。この濾液を卵黄からの IgY-Fc 抽出サンプルとした。

卵黄抽出物に含まれる IgY-Fc の定量は抗 DIG 抗体 (1: 250; Roche Diagnostics) を一次抗体とし、HRP 標識抗 DIG 抗体 (1: 8,000; Roche Diagnostics) を二次抗体とした非競合 ELISA 法により測定した。血液中の各種 IgY-Fc の濃度も同様に測定した。

5. 統計処理

卵黄への IgY-Fc の輸送量に処理間で統計的な差異があるかを一元配置分散分析法により解析した。有意差が検出された場合、Dunnett の多重比較法により WT と各種変異体との間に有意差があるかどうかを検定した。統計的な差異は $P < 0.05$ で判定した。図表の数値は平均値 ± 標準誤差で表記した。

■ 結果

1. Y363 変異体の作出と卵黄輸送量

作出した IgY-Fc の変異体を非還元状態と還元状態で SDS-PAGE により分離し、分子サイズと精製度を CBB 染色によって確認した。その結果、予定分子サイズの位置にバンドが確認され、非還元状態ではホモ二量体が産生されていることを確認した (図 1A)。これらのバンドの位置は WT のものと同一であった。Y363N は、非還元状態と還元状態の両条件下で、WT よりも高分子領域にバンドが検出された。Y363N のアミノ酸配列は、NIS363-365 となっており、N 結合型糖鎖が付加されるアミノ酸配列「N-X-S」の条件を満たしていた。よって、Y363N はチロシンをアスパラギンに置換したことで新たな糖鎖が付加され、WT よりも分子サイズが大きくなったと考えられた。すべての IgY-Fc 変異体で、夾雑タンパク質の混在は微量であったため、目的のタンパク質が適切に精製されていると判断した。

Y363 をチロシン以外の全生体アミノ酸へ置換した変異体の卵黄輸送量を WT と比較した。芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンとトリプトファンに置換した変異体 (Y363F, Y363W) は、WT とほぼ同等の卵黄輸送量を保持していた。一方、9 つの変異体 (Y363G, Y363A, Y363S, Y363T, Y363V, Y363I, Y363N, Y363Q, Y363P) で ELISA の検出限界値以下まで卵黄輸送量が減少した。酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) および塩基性アミノ酸 (リシン、ヒスチジン、アルギニン) に置換した変異体 (Y363D, Y363E, Y363K, Y363H, Y363R) の卵黄輸送量は WT の 3-18% 程度まで減少した。

2. G365 変異体の作出と卵黄輸送量

G365 を網羅的に 9 つの生体アミノ酸に置換した変異体の分子サイズと精製度を確認した (図 2A)。全ての変異体は、非還元状態ならびに還元状態ともに WT とほぼ同様の分子サイズにバンドが検出された。これらの変異体の卵黄輸送量を測定したところ、G365 を極性あるいは非極性のアミノ酸に置換した 5 つの変異体 (G365S, G365F, G365M, G365N, G365H) では、WT よりも卵黄輸送量が増加した (図 2B)。最も卵黄輸送量が高値を示したのは G365S であり、WT の約 2.6 倍に増加した。G365 を荷電アミノ酸に置換した変異体 (G365K と G365D) あるいはプロリンに置換した変異体 (G365P) では卵黄輸送量は著しく減少した。

■ 考察

本研究により、IgY が効率的に卵黄へ輸送されるための 363 番目と 365 番目のアミノ酸残基側鎖の性質が明らかになった。芳香族アミノ酸のフェニルアラニンまたはトリプトファンに置換した変異体の卵黄輸送量は WT とほぼ同等であり、他のアミノ酸に置換した変異体のような輸送量の減少は見られなかった (図 1B)。よって、IgY が卵黄へ効率的に輸送されるには 363 番目のアミノ酸残基が芳香族アミノ酸であることが重要と考えられた。芳香族アミノ酸に共通して働く力の 1 つに、カチオン- π 相互作用がある (Ma and Dougherty, 1997)。この力が働いているとすると、IgY 側の芳香族アミノ酸に存在するベンゼン環の π 電子が、受容体側の正に帯電した部位と相互作用すると考えられる。一方、Y363 を酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸に置換した変異体や極性、非極性のアミノ酸に置換した場合には、いずれも卵黄輸送量が減少した。したがって、363 番目のアミノ酸残基には芳香族アミノ酸が配置されることが、IgY が効率的に卵黄に取り込まれるための必須条件であった。しかし、IgY の卵黄輸送量の亢進をもたらす側鎖構造を見出すことはできなかった。

G365 をアラニンに置換した G365A 変異体では、WT の約 2.4 倍まで卵黄輸送量が増加することが先行研究で判明していた。本研究で、G365 をアラニン以外のアミノ酸残基に置換した場合でも、卵黄輸送量が増加することが判明し、このアミノ酸残基の置換は確かに卵黄輸送量の上昇をもたらすことが明らかになった (図 2B)。この上昇をもたらすアミノ酸残基はグリシンとプロリン以外の極性お

よび非極性の側鎖構造を持つアミノ酸であった。この原因の詳細は不明であるが、グリシンは側鎖の立体的構造サイズが最小で、ペプチド結合を形成した時の可動性が高く、IgY の構造が安定化しないと考えられた。グリシンに代わって、メチル基(-CH₃)以上の構造サイズを持つ極性および非極性の側鎖が配置されることで、IgY の構造の安定化が付与される可能性が考えられた。

IgY の C_μ3 領域に存在するアミノ酸残基をただ一箇所のみ別のアミノ酸に置換することで、顕著な卵黄輸送量の増減が見られるのは、おそらく卵黄形成の実質器官である卵胞で卵黄輸送を担う IgY 受容体が存在するためであろう。この IgY 受容体の同定が長年に渡って待望されているが、未だ同定されるには至っていない。卵黄輸送を担う IgY 受容体が発見されれば、より効率的かつ網羅的に、優れた卵黄輸送能を持つ IgY の変異体を発掘、開発することが可能になり、新規の機能が付与された卵の作出に貢献できると確信する。

■ 要 約

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。本研究では、母ドリ卵黄に高効率で輸送され得る IgY を作出することを目指して、IgY の C_μ3 領域に位置する 363 番目のチロシン残基(Y363)とグリシン残基(G365)を網羅的に別のアミノ酸に置換した変異体を作成し、それらの卵黄への輸送量を調査した。IgY 重鎖をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、野生型の IgY-Fc(WT)を作成した。部位特異的変異挿入により、Y363 残基を網羅的に全生体アミノ酸に置換した 18 種類の変異体と G365 を 9 つの生体アミノ酸に置換した変異体を作成した。これらの変異体を産卵ウズラの翼下静脈に投与し、その後に産卵された卵中の卵黄 IgY-Fc 濃度を ELISA により測定した。その結果、Y363 の変異体群では、芳香族アミノ酸のフェニルアラニンとトリプトファンに置換した 2 種類の変異体の卵黄輸送量が WT の卵黄輸送量とほぼ同等であった。一方、それ以外の生体アミノ酸に置換した変異体の卵黄輸送量は著しく低下した。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が、このアミノ酸残基の置換によって IgY-Fc の卵黄輸送能を向上させることはできなかった。G365 の変異体群では、G365 を極性あるいは非極性のアミノ酸に置換した 5 つの変異体の卵黄輸送量が WT のものよりも増加した。最も卵黄輸送量が高値を示した変異体は G365 をセリン残基に置換した変異体であり、WT の約 2.6 倍に卵黄輸送量が増加した。よって、IgY の 365 番目のグリシン残基は卵黄輸送能の強化を目指す上で重要な標的アミノ酸であり、このアミノ酸残基の置換のみで IgY の卵黄輸送能を約 2.6 倍まで強化できることが判明した。

■ 文 献

Bae, H. D., Honda, H., Murota, R., Kobayashi, M., Horio, F., Murai, A., 2010. Production of recombinant chicken IgY-Fc and evaluation of its transport ability into avian egg yolks. *J. Poult. Sci.* 47, 256-261.

Kitaguchi, K., Osada, K., Horio, F., Murai, A., 2008. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 290-299.

Ma, J. C., Dougherty, D. A., 1997. The cation- π interaction. *Chem. Rev.* 97, 1303-1324.

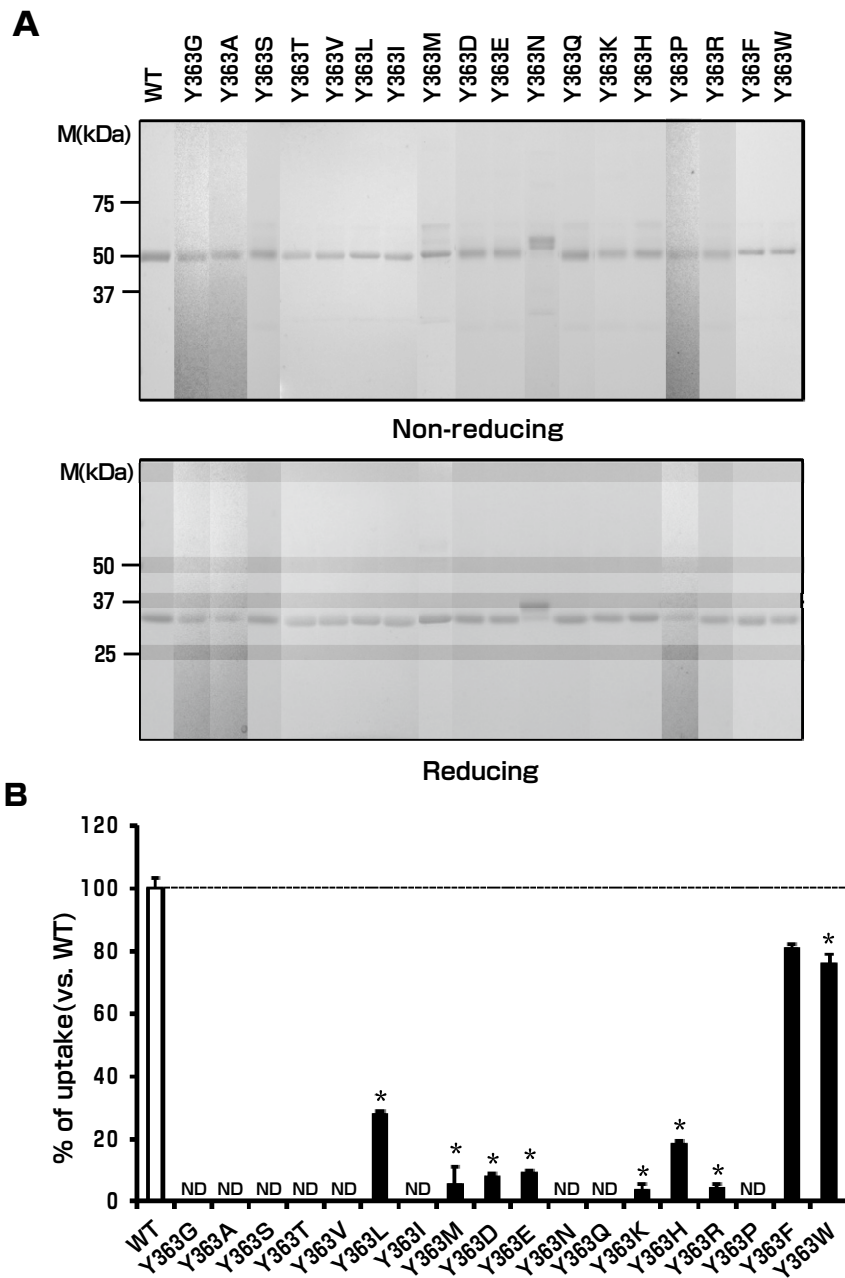


図 1. IgY-Fc(C_μ3-C_μ4 を含む)の 363 番目のアミノ酸残基を全生体アミノ酸に置換した変異体の電気泳動像(A)と卵黄への輸送量(B)。(A)CHO-S 細胞に発現ベクターを導入して、その培養液から抽出した IgY-Fc の野生型(WT)と 18 種類の変異体を精製した。得られた WT と変異体を非還元状態(Non-reducing)あるいは還元状態(Reducing)にて SDS-APGE で分離し、CBB R-250 で染色した。(B)産卵ウズラに WT と変異体をそれぞれ投与し、その後に産卵された卵を回収した。投与後 2 日目と 3 日目に産卵された卵の卵黄に含まれる IgY-Fc 量を ELISA で測定した。*Dunnnett の多重比較により $P < 0.05$ で WT との間には有意差有り。ND, 検出されず。

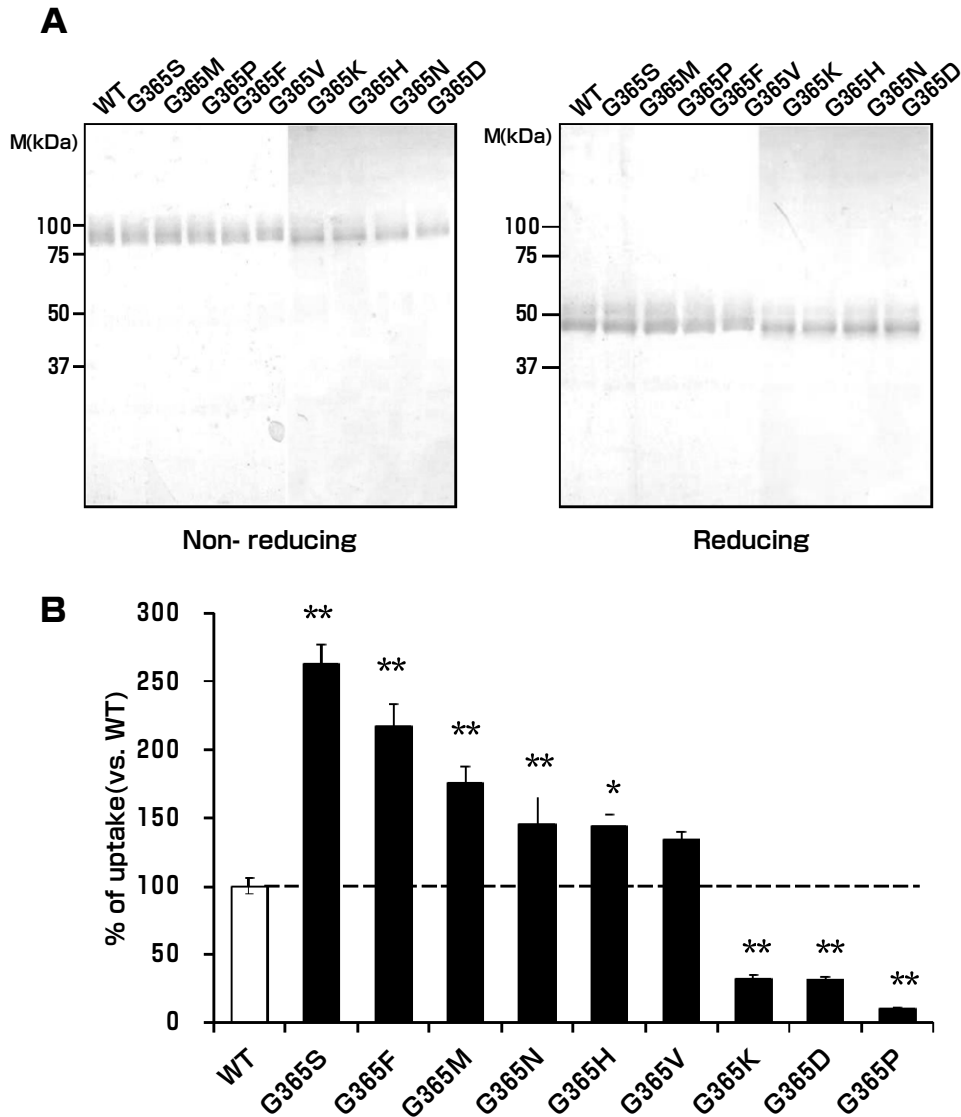


図 2. IgY-Fc(C_μ2-C_μ4 を含む)の 365 番目のグリシン残基を 9 種類の生体アミノ酸に置換した変異体の電気泳動像 (A) と卵黄への輸送量 (B)。 (A) CHO-S 細胞に発現ベクターを導入して、その培養液から抽出した IgY-Fc の野生型 (WT) と 9 種類の変異体を精製した。得られた WT と変異体を SDS-APGE で分離し、CBB R-250 で染色した。 (B) 産卵ウズラに WT と変異体をそれぞれ投与し、その後に産卵された卵を回収した。投与後 2 日目と 3 日目に産卵された卵の卵黄に含まれる IgY-Fc 量を ELISA で測定した。*,**Dunnnett の多重比較により $P < 0.05$ (*) または $P < 0.01$ (**) で WT との間に有意差有り。