

ケモカインを分子標的とした鶏腸管の免疫臓器の形成機序解明

東北大学大学院農学研究科動物機能形態学分野・助教 古川 睦実

■ 目的

腸管に発達する免疫臓器(GALT)は、腸管腔の外来抗原に対する免疫応答を担う場であり、多数のリンパ球から構成される。GALTの最大の役割は、B細胞を活性化させ、IgA抗体を産生する形質細胞への最終分化を促すことである。我々は、鶏を対象とした免疫学研究を通じて、鶏の腸管では既存の盲腸扁桃(盲腸基部)に加えて、広大な表面積を有する盲腸全体にもリンパ球が多数集積した鶏最大のGALT(Cecal patch: CP)が発達していることを見出した。加えて、CPはB細胞から形質細胞への最終分化の場として機能している一方で、盲腸扁桃はB細胞の最終分化のみならず初期分化の場としても機能するという驚くべき事実を見出し、盲腸扁桃/CPを軸とした、鶏特有の粘膜免疫システムを世界に先駆けて提唱してきた。研究チームが受けた昨年度の助成研究を通して、盲腸扁桃/CPの形態形成メカニズムの理解を目的とした、経時的な解析を実施した。その結果、鶏GALTの原基においてT細胞やB細胞が増加する同時期に、発現量が顕著に変化するリンパ球集積に関わるケモカイン(CXCL13, CXCL12, CCL19)を同定することに成功した。しかしながら、家禽ではそれらをタンパク質レベルで検出するツール(例:抗体)が確立されておらず、転写から翻訳に至る分子の発現を完全に解析することは容易でない。そこで本研究では、鶏ケモカインの機能解明に資する解析ツールを作出することで、ケモカインの発現部位と集積リンパ球の局在に関する位置情報を整理し、各ケモカインの役割に関する考察を深めていく。

■ 方法

i) 鶏GALT形成に関わると予想されるケモカイン(CXCL13, CXCL12, CCL19)をリコンビナントタンパク質として作出し、それをマウスに免疫することで、組織学的解析に応用可能な同分子に対するポリクローナル抗体を作出する。

ii) 課題i)で精製した抗体を用いて、孵化前後にかけての盲腸扁桃/CPにおけるリンパ球と鶏ケモカインの局在変化を組織学的に解析することで、鶏GALTの形態形成における各ケモカインの役割を定義する。

■ 結果および考察

構築した発現プラスミドを用いて、まず大腸菌 Rosetta™ 2(DE3)を形質転換し、培養時間6時間、培養温度29°C、IPTGは0.1mMでタンパク質発現誘導をおこなった。大量培養後の菌体ペレットは破砕用バッファーで懸濁し、超音波破砕後に得られた水溶性画分に含まれるリコンビナントタンパク質をProfinity eXact fusion-tag systemを用いて精製した。最終的に、ポリクローナル抗体の作出に十分量である約5mgのリコンビナントタンパク質の精製に成功した。現在、マウスに各ケモカインのリコンビナントタンパク質をアジュバンドと共に皮下注射し、血液中の抗体価をモニタリング中である。今後、抗体価が最大に達した際に、マウスから全血を採取し、抗体の精製をおこなう予定である。作出する抗体に加えて、各種細胞マーカーに対する市販抗体を用いた共染色によって、各ケモカインを発現する細胞種を同定することができれば、鶏腸管免疫の発達メカニズムの理解が飛躍的に深まると考えられる。

■ 結語

本研究では、鶏ケモカインの機能解明に資する解析ツールの確立に挑戦し、3種類のリコンビナントタンパク質の作出に成功した。今後、これら鶏ケモカインを認識する抗体を作出し、鶏GALTの形成プロセスにおける各ケモカインの役割を定義していく必要がある。また、本助成研究で作出した組換えタンパク質は、細胞走化性アッセイなど種々の解析に用いることができるため、各ケモカインとリンパ球の関係性をより明確化できると考えられる。