

ファブリキウス嚢由来の抗菌ペプチドの探索とその発現調節機構の解析

プロジェクト代表者：小林哲也（理工学研究科・准教授）

1 序論

ファブリキウス嚢はB細胞の分化・増殖に関わる鳥類に固有な一次リンパ器官で、胚期に総排泄腔の背側の腸管が膨らんで形成される。この嚢は、主に皮質および髄質構造を持つ多くのリンパ濾胞から構成されるが、これらは、濾胞関連性上皮と呼ばれる貧食能のある特殊な上皮を介して外界からの抗原刺激を受けることで、嚢内でB細胞の成熟が進むものと推測されている(1)。

脳下垂体から分泌される α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) は、メラニン合成の刺激作用や摂食調節作用などを示す。さらに近年、免疫機能を調節し(2, 3)、抗菌活性をもあわせもつことが明らかにされている(4)。代表者はこれまでの解析で、 α -MSH 抗体に対し陽性反応を示す物質がファブリキウス嚢内に存在することを示してきた。 α -MSH は、脳下垂体において前駆体ペプチドであるプロオピオメラノコルチン(POMC)からプロセシング酵素 PC1/3 と PC2 の働きによって切り出される。しかしながら、 α -MSH 抗体に対し陽性反応を示す物質のファブリキウス嚢内における合成経路とその生理作用についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究ではニホンウズラを用い、これらの点について探ることをとした。

2 材料と方法

材料：5～6週齢の雄のニホンウズラ(*Coturnix coturnix japonica*)および胚からファブリキウス嚢を摘出し液体窒素で凍結させた後、実験に用いるまで -80℃ で保存した。

mRNAの発現：ファブリキウス嚢から抽出したRNAを用いて逆転写を行ないcDNAを合成した。ニワトリのPOMC、PC1/3、PC2およびメラノコルチン受容体の塩基配列を参考にプライマーを作成し、これらを用いてPCR反応を進め、目的遺伝子のmRNAの発現を検討した。

免疫組織化学： α -MSHを発現している細胞がPC1/3あるいはPC2も共発現しているのかを、免疫蛍光染色 (α -MSH) と in situ RT-PCR(PC1/3あるいはPC2)を用いた二重染色法により検討した(5)。ファブリキウス嚢の切片はDNase I で処理後、rTth 酵素を用いてone-step RT-PCR を行なった。アルカリフォスファターゼ標識ジコキシゲニン抗体で反応後、NBT/BCIP により発色し、PC1/3あるいはPC2のmRNAの検出を行なった。さらに、同じ切片に α -MSH抗体、続いてCy3標識IgG抗体を反応させ、 α -MSHタンパク質の発現を検討した。

質量分析：ファブリキウス嚢の酸抽出物を、逆送カラム(ODS-120T)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより、アセトニトリルの濃度勾配(10-70%、0.1%のトリフルオロ酢酸を含む)を利用して分画した。各画分中の α -MSH抗体陽性物質の量は、 α -MSHに対する時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)により測定した(6)。加えて、MALDI-TOF MS による質量分析を行なった(7)。

3 結果と考察

代表者は、これまでの解析で α -MSH抗体に対し陽性反応を示す物質がファブリキウス嚢内に存在することを示してきた。一般に、 α -MSHは脳下垂体においてPOMC遺伝子の翻訳後、プロセシング酵素であるPC1/3およびPC2の作用によって組織特異的に切り出される。そこで、5～6週齢の雄ニホンウズラのファブリキウス嚢を用いて、POMC、PC1/3、PC2、さらに、POMC系ペプチドの受容体(CMC)のmRNAの

発現をRT-PCR法により解析した。また、成鳥のファブリキウス嚢には常在細菌が存在していることから、常在細菌の存在しない胚期のファブリキウス嚢も用いて同様の検討を行った。その結果、いずれの試料においてもPCR反応産物中に目的サイズのバンドの増幅が認められ、各遺伝子のmRNAの発現が確認された。

次に、プロセシング酵素(PC1/3あるいはPC2)のmRNAの発現を *in situ* RT-PCR法により、さらに α -MSH関連ペプチドの発現を免疫蛍光染色により検討した。その結果、濾胞内に多数の α -MSH抗体陽性細胞が観察された。加えて、これら細胞の多くに プロセシング酵素のmRNAも発現していることが示された。そこで、成鳥のファブリキウス嚢からタンパク質を酸抽出し、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分画し、それぞれの画分に含まれる α -MSH抗体陽性物質の量をTR-FIAにより測定した。含有量の多い画分の質量分析を行なったところ、その成分の一つとしてDes-acetyl- α -MSHの存在が確認された。

鳥類のファブリキウス嚢は、B細胞の分化・増殖の場として知られ、後天性生体防御システムの一翼を担っている。このため、ファブリキウス嚢に関する研究は、これまで抗体の多様性獲得機構の解析に重点がおかれてきた。一般に、脊椎動物における生体防御は、先天性及び後天性の生体防御システムにより維持されているが、ファブリキウス嚢における先天性生体防御システムに関する研究はほとんどなされていない。興味深いことに、 α -MSH は免疫機能を調節し(2, 3)、さらに、 α -MSH 関連ペプチドは抗菌活性をもあわせ持つ(4)。したがって、今回の結果から、ファブリキウス嚢で合成される α -MSH 関連ペプチドは、メラノコルチン受容体を介してオートクラインあるいはパラクライン作用によりファブリキウス嚢の機能を調節することに加え、抗菌物質として直接作用することで先天性生体防御システムに寄与している可能性が示唆される。今回ファブリキウス嚢で同定されたDes-acetyl- α -MSHを含む α -MSH 関連ペプチドの抗菌活性の解析、加えて、これらペプチドの発現調節機構の解析は、ファブリキウス嚢における先天性免疫システムを考察する際の重要な課題と考えられる。

4 参考文献

1. Cooper MD, Lawton AR, Kincade PW. A two-stage model for development of antibody-producing cells. 1972. Clin. Exp. Immunol. **11**: 143-149.
2. Buggy, J.J. 1998. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. Biochem. J. **331**: 211-6.
3. Lyons, P.D. & J.E. Blalock. 1997. Pro-opiomelanocortin gene expression and protein processing in rat mononuclear leukocytes. J. Neuroimmunol. **78**: 47-56.
4. Cutuli, M., S. Cristiani, J.M. Lipton, & A. Catania. 2000. Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. J. Leukoc. Biol. **67**: 233-9.
5. Nakakura T, Yoshida M, Dohra H, Suzuki M, Tanaka S. 2006. Gene expression of vascular endothelial growth factor-A in the pituitary during formation of the vascular system in the hypothalamic-pituitary axis of the rat. Cell Tissue Res. **324**: 87-95.
6. Amiya N, Amano M, Takahashi A, Yamanome T, Yamamori K. 2007. Profiles of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the Japanese flounder as revealed by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay and immunohistochemistry. Gen Comp Endocrinol. **151**: 135-41.
7. Kobayashi Y, Sakamoto T, Iguchi K, Imai Y, Hoshino M, Lance VA, Kawauchi H, Takahashi A. 2007. cDNA cloning of proopiomelanocortin (POMC) and mass spectrometric identification of POMC-derived peptides from snake and alligator pituitaries. Gen Comp Endocrinol. **152**: 73-81.