

仔牛の小腸における抗菌性タンパク質 Chemerin の産生

および腸内細菌叢に与える影響

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 動物機能栄養学 久保田奏子

1. 背景および目的

消化管疾病は乳用仔牛の傷病事故原因の約45%を占めており、酪農生産において大きな問題となっている。受動免疫動物である仔牛では、獲得免疫よりも先行して安定的に働く自然免疫が疾病の防止に重要な役割を果たすと考えられる。自然免疫系因子である抗菌性タンパク質は腸管上皮において病原微生物を直接殺菌する物質であり、病原体の増殖や侵入を防ぐ腸管バリア機構の一翼を担う。本研究室では、これまでにChemerinと呼ばれる新規抗菌性タンパク質が仔牛の小腸において高発現している事を明らかにした。Chemerinは大腸菌や黄色ブドウ球菌などの病原微生物に対する増殖阻害作用が報告されているため、仔牛の腸管バリア機構における抗菌因子としての働きが予想される。したがって本研究では、仔牛の小腸におけるChemerinの産生様式および小腸内細菌の活性に与える影響を検討した。

2. 方法

実験1) 仔牛の小腸におけるChemerinの発現解析を行った。3週齢, 13週齢, 10ヶ月齢のホルスタイン種仔牛から十二指腸, 空腸, 回腸を採取し, 免疫染色法およびqRT-PCR法, ウェスタンブロット法によりChemerin産生細胞の組織内局在の検討, およびChemerin遺伝子とタンパク質の発現量解析と成長に伴う発現量変化を検討した。

実験2) 3ヶ月齢のホルスタイン種仔牛から小腸内容物を採取し, Chemerin添加培養試験を行った。McDougall's bufferと等量混合した小腸内容物に, Chemerinペプチド(Val⁶⁶-Pro⁸⁵に相当)を終濃度1 μg/mLおよび10 μg/mLになるように添加し, 37°Cで18時間培養を行った。培養したサンプルは短鎖脂肪酸濃度の測定および細菌数の定量に供した。

3. 結果と考察

Chemerin産生細胞は小腸陰窩の底部に多数存在している事が観察された。抗菌物質の多くは陰窩細胞から産生されることから, 既知抗菌因子とChemerinの産生部位に類似性が認められた。また, 小腸各部位においてChemerinと既知抗菌因子のmRNAコピー数を比較すると, 十二指腸においてChemerinは高発現しており, 空腸および回腸では既知抗菌因子と同等レベルの発現量であった。さらに, Chemerinの遺伝子およびタンパク質の発現量については, 各齢で大きな変動は見られなかった。したがって, Chemerinは既知抗菌因子よりも腸管バリア機構に対する寄与度が高く, 仔牛の成長を通して安定的に発現すると考えられた。Chemerinペプチド添加培養試験では, 培養物中の短鎖脂肪酸濃度および各細菌の存在比率についてコントロール区と処理区で有意な差は見られなかった。Chemerinは病原微生物に対して抗菌活性が報告されているが, 本研究において細菌への影響は不明瞭であった。その理由として, Chemerinは選択的抗菌活性を持つ可能性がある事や, 本試験の培養法が生体内の環境と異なっていた可能性などが考えられた。以上より, Chemerinは仔牛の小腸陰窩において既知抗菌因子と比較して同等以上の量で安定的に産生されており, 腸管バリア機構に寄与する新規因子である可能性が示唆された。