

# ウシ odorant-binding protein 様蛋白質に対する モノクローナル抗体の作製

Tamar Japaridze

畜産学研究科畜産衛生学専攻食品衛生学講座（博士前期課程2年）

## 1. 目 的

我々の研究室では、ウシ初乳中に odorant-binding protein 様蛋白質（bovine colostrum odorant-binding protein, bcOBP）が存在することを明らかにした。bcOBP はゲノム中に同蛋白質をコードする遺伝子が見出されたことから存在が示唆されていたが、蛋白質レベルにおいて、しかも初乳中に発現が確認されたのは今回が初めてである。ウシ OBP は鼻粘膜粘液中に存在し、におい物質の結合・運搬に関与していることが報告されているが、その類似蛋白質である bcOBP の生理的意義はまったく不明である。本研究は、bcOBP に対するモノクローナル抗体を作製し、乳中における発現変動解析および生合成に関与する組織の特定を目的とした。

## 2. 方 法

既に作製済みである bcOBP 組換え体を抗原として用いた。His-tag を除去した未変性の抗原（100  $\mu$ g）とアジュバントを混合しエマルジョン化したものを、4回に分けて BALB/c マウス（雌、4週齢）3匹に腹腔内投与した（表1）。免疫前に眼底静脈叢から採血を行ない、ELISA 法により抗体力価の測定を行なった。抗原は100 ng/well、血清および二次抗体（goat anti-mouse IgG-HRP）はそれぞれ500倍および1000倍希釈したものをを用いた。十分な抗体力価の上昇を与えたマウスから胸腺ならびに脾臓を摘出し、定法に従い細胞を調製した。回収した脾臓細胞をフィーダー細胞として用い、胸腺細胞とマウス由来ミエローム細胞の細胞融合を行ない、ハイブリドーマ細

表1 免疫スケジュール

date	recombinant protein	adjuvant ( $\mu$ l)	PBS ( $\mu$ l)
2008. 4. 23	100 $\mu$ g (per mouse)	750	750
2008. 5. 1	100 $\mu$ g (per mouse)	450	450
2008. 5. 13	100 $\mu$ g (per mouse)	750	800
2008. 6. 2	100 $\mu$ g (per mouse)	750	750
2008. 6. 9	10 $\mu$ g (per mouse)	500	500

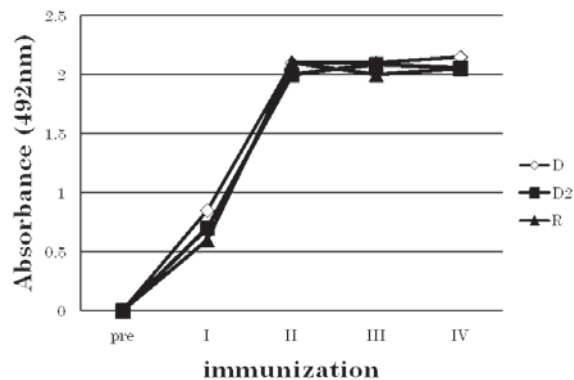


図1 血清中の抗体価

表2 ハイブリードマ細胞培養上清中の抗体力価

Colony ID	96well	48well	colony ID	96well	48well
14	0.139	0.228	41	0.052	0.044
		0.277			0.077
		0.267			0.201
		0.054			0.045
110	0.045	0.07	44	0.078	0.022
		0.006			0.119
		0.11			0.403
		0.109			0.017
23	0.085	0.138	23	0.085	0.07
		0.187			0.111
		0.102			0.044
		0.126			0.127

II limiting dilution time profile

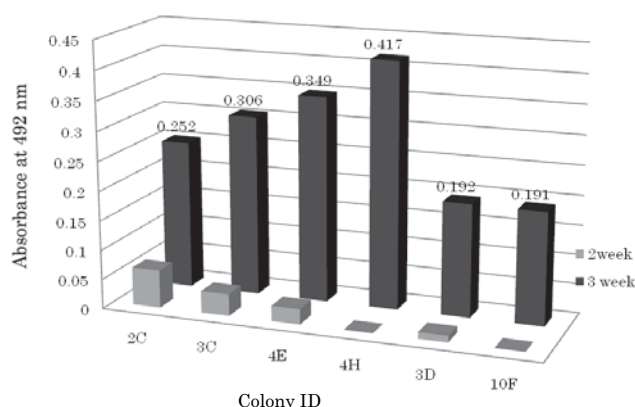


図2 限界希釈によるハイブリードマ細胞のクローン化

胞を作製した。培養上清に効率よく抗体を産生するハイブリードマ細胞を ELISA 法により選択し、限界希釈法によりクローン化した。得られた細胞は DMSO 共存下、液体窒素中で保存した。

### 3. 結 果

免疫した3匹のマウス (D, D2 および R) 全てに抗体力価の上昇が見られた (図1)。また、2回目の免疫以降、抗体力価は波長492 nmにおける吸光度2付近で一定の値を示した。次に、マウスDから調製した脾臓および膵臓細胞を用い、ハイブリードマ細胞の作製を試みた。コロニー形成が認められたハイブリードマ細胞のうち、培養上清中に高い抗体力価を示したコロニー (表2, Colony ID 14および23) から細胞を回収し、限界希釈を行なった。その結果、培養上清中に高い抗体力価を示すコロニー (図2, Colony ID 4E, 4Hおよび10F) が得られたので、これらを回収し、定法に従い DMSO ストックを作製した。

### 4. 考 察

抗bcOBPモノクローナル抗体を効率よく産生するハイブリードマ細胞株の樹立に成功した。現在、同抗体のIgGサブタイプの決定とマウス腹水からの大量調製が進行中である。今後、同抗体を用い、bcOBPの乳中における発現変動解析をウエスタンブロット法により、また、その生合成に関与する組織の特定を組織免疫染色により行なう予定である。ブタ乳中にOBPが存在するという報告がこれまでに1例あり、フェロモン結合タンパク質として同定されている (Guiraudie-Capraz G et al., Chem. Senses 2005, 30: 241-251.)。同様に、bcOBPも乳中におけるフェロモンの結合・運搬あるいは新生仔の母体識別などに関与しているのかも知れない。乳に含まれるOBPの研究はほとんどなく、本実験の成果が、その生理的意義の解明につながる、多くの情報をもたらしてくれると期待している。

## 5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました財団法人帯広畜産大学後援会に、厚く御礼申し上げます。実験を補助していただきました本学産学官連携研究員 仙田晶嗣 博士、本学畜産学部研究員 野崎浩文 博士ならびに本学畜産衛生学研究部門食品衛生学分野 福田健二 助教に感謝いたします。指導担当教官である本学畜産衛生学研究部門食品衛生学分野 浦島 匡 教授に感謝いたします。また、ハイブリドーマ作製に関してご指導いただきました本学食品科学研究部門機能科学分野 櫛 泰典 教授に深謝いたします。

キーワード：初乳，フェロモン，OBP