

## 8: 野生型ウシ初乳由来odorant-binding proteinのイムノアフィニティ精製

畜産衛生学研究部門 福田健二

メールアドレスfuku@obihiro.ac.jp

**研究の概要****【目的】**

ウシ乳には匂い分子やフェロモン分子などの疎水性低分子化合物を結合および運搬する odorant-binding protein (OBP) が存在する。同タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を固定化したカラム(イムノアフィニティークラム)を用い、ウシ初乳から野生型 OBP を精製し、その諸性質を解析する。

**【方法】**

(1)イムノアフィニティークラム(IAC)の作製を、以下のように行った。抗 OBP モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体を大量調製し、HiTrap IgM Purification HP Column (GE Healthcare)により精製した。次いで CarboLink Coupling Gel & Immobilization Kits (Pierce)を用い、同抗体を固定化したカラムを作製した。(2)溶出条件の検討を、組換え体 OBPを用いて以下のように行った。組換え体 OBP を IAC に添加し、塩(0.2-1 M NaCl)、pH(2.5-5.5)、還元剤(50 mM DTT)、タンパク質変性剤(6 M urea)、および界面活性剤(0.05-0.5% Tween-20)を用いて、吸着タンパク質を最も効率的に溶出する条件を検討した。組換え体 OBP のカラムへの結合および溶出は、BCA 法および Bradford 法による吸着および非吸着画分のタンパク質濃度測定により確認した。(3)野生型 OBP の精製を以下のように試みた。採集した新鮮なウシ初乳2リットルから酸沈殿および遠心分離によりホエイを調製し、IAC に供した。次いで、吸着タンパク質を最適条件により溶出した。ホエイならびに洗浄、非吸着、および吸着画分を 15% SDS-PAGE に供した後、CBB 染色および抗 OBP モノクローナル抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロット法によりタンパク質を検出した。

**【結果】**

CarboLink Coupling Gel(2 ml)に500 µgの抗体を添加したところ、そのうち約100 µg (約0.1 nM)を固定化したIACを作製することができた。同IACに組換え体OBPを200 µg (0.1 nM)添加したところ、その全量が吸着されることを確認した。従って、本実験で作製したIACでは抗体と抗原が1:1の化学量論比で結合していることが示唆された。吸着した組換え体OBPの溶出条件を検討した結果、0.2% Tween-20を用いたとき60.3 µg(吸着タンパク質の約30%)の組換え体OBPが溶出され、これが最も効率よい条件であった。ホエイをIACに供し、上述の条件で溶出を試みた後、得られた各画分を電気泳動し、ウエスタンブロットを行なった。その結果、溶出画分に組換え体OBPと同等の移動度を与える陽性バンドを検出することができたが、高分子量領域に多量の夾雑物質が存在した。ウエスタンブロット法を用いた以前の研究において、抗OBPモノクローナル抗体のウシIgGに対する非特異的吸着を確認したことから、同夾雑物質は初乳に大量に含まれるIgGであると推定した。また、非吸着画分にもOBP陽性バンドが検出されたことから、多量のIgGによる野生型OBPのカラムへの吸着阻害が示唆された。

**【考察】**

本研究では野生型OBPの完全精製には至らなかったが、これは試料中に高濃度で含まれるIgGが原因であると推定された。従って、野生型OBPの完全精製には、試料の前処理としてProtein Aなどを用いたIgGの除去が有効である。また、精製に使用する緩衝液に低濃度の塩を溶存させ、IgGのIACへの非特異的吸着を抑制する必要がある。これまでの研究により、全乳中の野生型OBP濃度は初乳と常乳で同程度ということが明らかとなっている。従って、初乳と比較して格段にIgG濃度の低い常乳を試料として用いることで、より簡便に野生型OBPを精製することが可能となる。