

10 : ウシodorant-binding protein様蛋白質の発現解析

畜産衛生学専攻食肉乳衛生学講座 福田 健二

メールアドレス fuku@obihiro.ac.jp

研究の概要

【目的】

質量分析器を用いたタンパク質同定法により、我々はウシ初乳中にHypothetical protein LOC517854 (similar to odorant-binding protein precursor) が存在することを明らかにした。Odorant-binding protein (OBP) は分子量約 20 kDaの球状タンパク質であり、疎水性低分子化合物の結合および運搬という機能を持つ。OBPは鼻粘膜に存在し、嗅覚や性衝動の惹起への関与が示唆されている。ウシ以外にも、種々の哺乳動物の鼻粘膜にOBPの存在が知られている。これに対し、初乳中にOBPが見出されたのは、母性フェロモン結合物質として同定されたブタ初乳由来OBP一例のみである。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ウシ初乳由来OBP (bovine colostrum OBP, 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。

【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 µg)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(メス, 4週齢)3匹に腹腔内投与した。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マ細胞の細胞融合を行ない、ハイブリドーマ細胞を作製した。培養上清に効率よく抗体を産生するハイブリドーマ細胞を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。

【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脾臓細胞を用い、ハイブリドー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ドーマ細胞のうち、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。

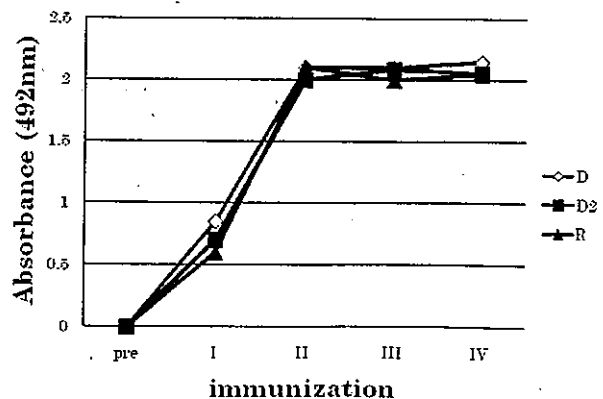


図 1. 血清中の抗体力価

【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ドー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。これまで初乳由来として唯一、ブタ初乳中にOBPが見出されている (Guiraudie-Capraz et al., Chem. Senses 2005, 30, 241-251)。同OBPは、脂肪酸であるcapric acid, lauric acidおよび母性フェロモンであるandrosteno

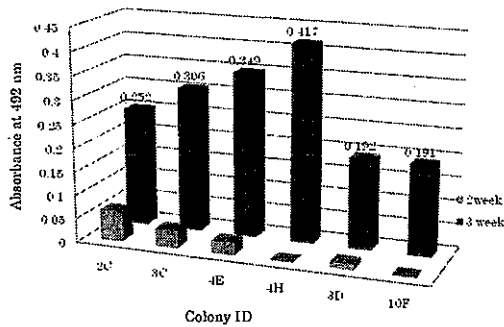


図 2. 限界希釈によるハイブリドーマ細胞のクローン化

あるcapric acid, lauric acidおよび母性フェロモンであるandrosteno

しかし、初乳由来OBPは、新生仔の母体認識に重要な役割を果たすと推測されている。ウシ初乳由来OBPの生理機能について、現在のところ全く不明である。ブタ乳由来OBPと同様に、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。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました帯広畜産大学フィールド科学センターに、厚く御礼申し上げます。また、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 博士に感謝いたします。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 檜 泰典 教授に深謝いたします。