

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780268

研究課題名(和文)ウシLAOを発現するTgマウスの作出の試み 乳房炎抵抗性動物作出を目指して

研究課題名(英文)Generating bovine LAO expressing Tg mice

研究代表者

永岡 謙太郎(Nagaoka, Kentaro)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60376564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにおいてL型アミノ酸オキシダーゼ(LAO)は、ミルク中で過酸化水素を発生させ乳腺の抗菌維持に重要である。しかし、乳房炎の多発する乳牛において、その発現量は低く、ウシ型LAOタンパクが実際に抗菌性を持つが不明である。本研究において、カイコ系を用い作製したウシ型LAO組換えタンパクはマウス型と同様に過酸化水素発生能を有することが明らかとなり、また、ウシ型LAO発現Tgマウスの作出に成功した。今後、Tgマウスを用いることでウシ型LAOが生体内で抗菌的に機能するかの解析が可能となり、乳房炎抵抗性ウシ作出に向けた有用なモデル動物になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the mouse, L-amino acid oxidase is known as anti-bacterial factor by producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammary glands. In the dairy cattle, mastitis is the most frequent disease and the expression level of LAO mRNA is considerably lower than that in mice. In this studies, we generated recombinant LAO protein encoding bovine LAO using silkworms system and confirmed the ability for production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. We also generated bovine LAO expressing Tg mice. The generated Tg mice will be useful animal model to investigate whether bovine LAO reveals anti-bacterial effect in vivo and to indicate LAO gene is strong candidate for the production of mastitis-resistant cattle.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：乳房炎 アミノ酸 抗菌物質

1. 研究開始当初の背景

乳房炎は乳牛で多発する疾病であり、世界に共通して最難治疾病の一つとされている。その治療費と牛乳の出荷停止、完治後の乳量減少による経済的損失は大きく、日本における年間被害額は数百億円、世界全体では約3-4兆円と報告されている。近年、乳牛の育種・改良目標において、従来の乳量、乳成分改良に加え、乳房炎に罹りにくい個体の選抜を目指し乳汁中の体細胞数の改善が指標に加えられた。また、乳房炎抵抗性に関わる遺伝子の探索も様々な研究機関において盛んである。

我々はマウスミルク中にL型アミノ酸オキシダーゼ(LAO)が多く含まれ、LAOはミルク中に存在する遊離アミノ酸を分解し過酸化水素を発生させることで乳腺内の抗菌維持に重要な役割を担うことをLAO KOマウスを用いて明らかにしてきた。一方、乳牛の乳腺においてもLAO mRNAの存在は確認されたが、その発現量はマウスに比べ限りなくゼロに等しい。以上の結果から、乳牛においてLAO発現を高めることができれば、乳房炎抵抗性ウシの作出が可能となることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、実際にウシ遺伝子配列LAOタンパクがマウスと同様に抗菌性を示すかどうかを明らかにすることを目的に以下の研究を行う。

1. ウシ型LAO組換えタンパクを作製し、in vitroにおける抗菌性を検討する。
2. ウシ型LAOを発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、in vivoにおける抗菌性を検討する。
3. 乳牛およびマウス乳腺におけるLAO発現解析

Tgマウスについては、KOマウスをバックグラウンドに作出を目指し、LAO KOマウスを現在の乳牛、bLAO Tgマウスを育種改良後の乳牛に見立てることで、ウシを用いた研究を行うための有益な知見収集に役立つと考えられる。

3. 研究の方法

<ウシ型LAO組換えタンパクの作製>

In vitroにおいて、ウシ由来のLAOが過酸化水素産生および抗菌活性を有するかを確認するために哺乳細胞、酵母およびカイコ発現系を用いてウシ型LAO組換えタンパクの作製を行った。

得られた組換えタンパクを用いLAO活性、すなわち必須もしくは非必須アミノ酸存在下での過酸化水素の発生量を測定をした。

<ウシLAO Tgマウスの作製>

In vivoにおいてウシLAOが抗菌作用を有し、乳腺内感染防御に機能するかを検討するため、LAO KOマウスを用いウシLAO発現トランスジェニックマウス(bLAO Tgマウス)

の作出を行った。

乳腺特異的プロモーター(Whey acidic protein プロモーター)の下流にウシLAO cDNAを繋ぎ、野生型マウスの受精卵にインジェクション、胚移植を行いTgマウスを得た。

<ウシ乳腺におけるLAO発現変化の解析>

ホルスタイン種全20頭より、新鮮乳腺組織を採取し、リアルタイムPCR法にてLAO発現量を測定した。

<マウスLAO発現解析>

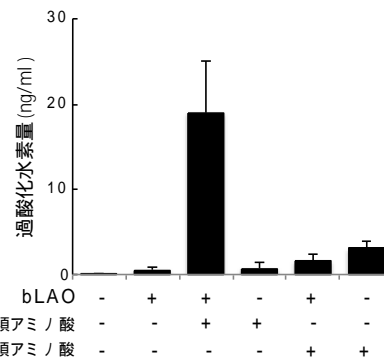
LAO発現における泌乳誘導ホルモンおよびエピジェネティック制御の関与を検討するため、マウス乳腺上皮細胞を用いて解析を行った。

4. 研究成果

<ウシ型LAO組換えタンパクの作製>

哺乳細胞、酵母およびカイコ発現系を用いて、ウシ型LAO組換えタンパクの作製を行った。哺乳細胞系と酵母系では活性測定に十分な発現タンパクが得られなかったが、カイコ発現系において最終的に2mgのウシ型LAO組換えタンパクを得た。得られたLAO組換えタンパクは必須アミノ酸存在下で過酸化水素を発生させた(図1)。

図1 組換えウシ型LAO活性測定



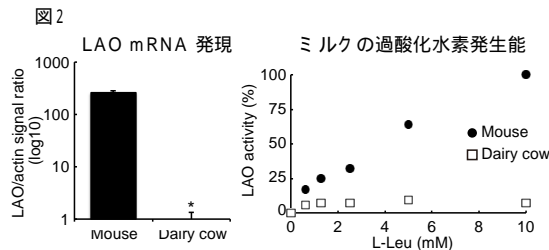
また、非必須アミノ酸存在下では過酸化水素発生は認められなかった。ウシ型LAOタンパクはマウス型と同様に過酸化水素発生能を有し、in vitroおよびin vivoにおいて抗菌性を示す可能性が高い。現在、ブドウ球菌に対する抗菌試験を行っている。

<ウシLAO Tgマウスの作製>

乳腺特異的WAPプロモーター制御性ウシLAO発現Tgマウスの作製をおこなった。約500個の受精卵を使用し30匹の子マウスを得た。PCRにてウシLAO遺伝子の挿入を確認したところ、1匹のマウスでウシ型LAOを保持することが確認された。現在、LAO欠損マウスとの交配を行っており、マウスLAO欠損ウシ型LAO発現個体が得られ、数が揃った時点でin vivoブドウ球菌経乳頭感染実験を行う。

<ウシ乳腺における LAO 発現変化の解析>

ホルスタイン種全 20 頭から乳腺組織を採取し、リアルタイム PCR 法にて LAO 発現量を測定した。カゼイン発現量を指標に乾乳期と泌乳期を、また屠場にて獣医師の診断で正常と乳房炎を区別した(乾乳期 4 頭、乳房炎 5 頭、正常泌乳期 11 頭)。全体としてはこれまでの結果と同様に、マウスに比べるとかなり低い結果であり、ミルク中の過酸化水素発生能も認められなかった(図 2)。

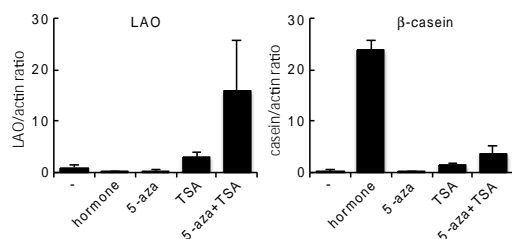


また、LAO 発現は乾乳期において泌乳期より高く、乳房炎牛において正常牛より高い傾向が得られた。

<LAO 発現解析>

マウスにおいて LAO は泌乳中に高い発現が見られることから、LAO 遺伝子は泌乳ホルモンにより制御されることが示唆されてきた、しかし、マウス乳腺上皮細胞に対して泌乳ホルモン処理を行っても LAO 発現の上昇は認められなかった。さらにマウス(B6 マウス)およびウシ(ホルスタイン)の LAO 上流約 2kb の上流域解析においても、泌乳ホルモン処理で転写活性の上昇は認められなかった。マウスの妊娠初期と泌乳期の乳腺組織におけるメチル化解析の結果、泌乳期においてヒストン H3 K27 のメチル化の減少が確認され、乳腺上皮細胞に対する 5-aza および TSA 処理で LAO 発現の上昇が確認された(図 3)。

図3 LAO発現におけるエピジェネティック制御機構の関与



ウシにおいても同様の結果が得られており、LAO 発現にはクロマチン構造の変化が必要となる可能性が示唆された。

本研究において、ウシ型 LAO もマウスと同様に過酸化水素発生能を示したことから、LAO はウシ乳腺内においても抗菌性を示すことが考えられる。今後、作出した Tg マウスの解析と共に、ウシ乳腺において発現が抑えられている機構、特にエピジェネティック制御を回避させる方策を検討することで乳房炎抵抗性ウシの作出が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Nagaoka K, Zhang H, Arakuni M, Taya K, Watanabe G. Low expression of the antibacterial factor L-amino acid oxidase in bovine mammary gland. *Animal Science Journal*. 2014 in press 査読有
2. Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Taya K. Epithelial cell differentiation regulated by MicroRNA-200a in mammary glands. *PLoS One*. 8(6): e65127. doi:10.1371/journal.pone.0065127, 2013. 査読有
3. 永岡謙太郎, 張 浩林, 荒邦昌宏, 渡辺元. ウシ乳腺組織における L 型アミノ酸オキシダーゼの発現解析. 第 18 回日本乳房炎研究会プロシーディング. 27-29. 2014 査読無
4. 永岡謙太郎, 渡辺元, 田谷一善. ミルク中 L-amino acid oxidase (LAO) による乳腺感染防御機構. 第 16 回日本乳房炎研究会プロシーディング. 37-40. 2012 査読無

[学会発表](計4件)

1. 永岡謙太郎, 臼田賢人, 辨野義己, 渡辺元. マウスの母乳に含まれる L 型アミノ酸オキシダーゼの乳子に対する影響. 乳腺泌乳研究会 2013/12 東京
2. Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Richter JD. Involvement of CPEB1 in breast cancer metastasis. *The American Society for Cell Biology Annual Meetings 2013/12 New Orleans, Louisiana*
3. 永岡謙太郎, 張浩林, 荒邦昌宏, 渡辺元. ウシ乳腺組織における L 型アミノ酸オキシダーゼの発現解析. 日本乳房炎研究会 2013/10 東京
4. Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Epithelial cell differentiation regulated by microRNA-200a in mammary gland. 17<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction 2012/7 Vancouver, Canada

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~nvetphys/>

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/36/0003600/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永岡 謙太郎 (NAGAOKA, Kentaro)

東京農工大学・大学院農学研究院・テニユ

アトラック助教

研究者番号：60376564

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：