

平成 22 年 3 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006 年度～2008 年度

課題番号：18780220

研究課題名 (和文) 泌乳持続性向上のためのウシ乳腺上皮細胞におけるアポトーシス抑制因子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of anti-apoptosis factors in bovine mammary epithelial cells for improvement of lactation persistency

研究代表者 中島 恵一

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター 自給飼料酪農研究チーム 主任研究員

研究者番号：70362150

研究成果の概要：

本研究では泌乳牛ホルスタイン種の泌乳持続性向上のために、乳汁を合成する乳腺上皮細胞の活性化およびアポトーシスに関わる因子の解析を行った。乳腺上皮細胞において低分子量 heat shock protein である alpha-B-クリスタリンが乳タンパク質の発現に関与していることを明らかにした。また、乳腺の血管新生を促進する血管内皮増殖因子 VEGF の発現が、乳タンパク質と同様に泌乳関連ホルモンにより制御されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：基礎畜産学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：泌乳持続性、乳腺上皮細胞、泌乳牛

1. 研究開始当初の背景

現在の乳牛は1乳期で9,000kg以上の生乳を生産することができるが、泌乳初期の急激な乳量の増加が乳牛個体に大きな負担をかけ、代謝障害や繁殖障害、周産期疾病などが大きな問題となっている。そこでこれらの問題を解決するために、泌乳初期に急激な乳生産をさせるのではなく、泌乳後期に乳量を維持させる泌乳持続性の向上が求められている。乳牛は分娩後300日以上にわたり乳生産するが、1日当たりの乳量は分娩後約30~40日目にピークを迎え、その後は減少する。この乳量の減少は活性型乳腺上皮細胞の減少が主な原因と考えられる。乳腺は妊娠、分娩、泌乳、離乳(乾乳)に伴って発達と退行を繰り返す組織であり、泌乳後期の乳量を維持するためには、その時期の乳腺組織の活性化および退行の抑制が重要である。乳腺において乳汁を合成する乳腺上皮細胞は、前駆細胞から分化することによって乳合成を開始するが、一度分化した後はアポトーシスを迎えることで乳合成が停止する。すなわち、乳腺組織の退行を抑制するためには、細胞レベルでの活性化とアポトーシスの遅延が重要である。

2. 研究の目的

本研究では乳腺上皮細胞において乳合成の持続的活性化、アポトーシスに関する因子を単離し、解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウシ乳腺上皮細胞の調製と培養

ホルスタイン種の乳腺組織を抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)を含むDMEM培地で洗浄した後、ハサミで細断した。それらをコラゲナーゼを含むDMEM培地に懸濁し、37°Cで緩やかに振とう培養した。その懸濁液をフィルター濾過した後、遠心分離により乳腺上皮細胞の細胞塊を含む画分を沈殿させた。ウシ乳腺上皮細胞は10%ウシ胎児血清、インシュリンを含む培地(DMEMまたはRPMI1640)で培養した。

(2) 泌乳期により発現の変動する遺伝子のスクリーニング

泌乳持続性に関わる因子はウシ乳腺組織において泌乳期毎に発現が変動すると予想されたため、ウシ乳腺組織(泌乳初期、中期、後期)からtotal RNAを抽出し、各泌乳期特異的に発現する遺伝子をDNAマイクロアレイ法とDNAサブトラクション法により解析

した。

(3) RNAの抽出および遺伝子発現解析

ウシ乳腺組織および乳腺上皮細胞からのtotal RNAの抽出はIsogen(ニッポンジーン)を用いて行った。VEGF遺伝子の発現は半定量性RT-PCR法により解析した。ウシVEGF用プライマーとして、5'-CTTCACCATGC CAAGTGGTCC-3'および5'-GCTCATCTCT CCTATGTGCTGG-3'を用いた。尚、VEGF遺伝子の発現はベータアクチン遺伝子の発現で補正した。ウシベータアクチン用プライマーとして、5'-TGGACTTCGAGCAGGAGATG-3'および5'-CCGCCGACAGCACCGT GTT-3'を用いた。ラクトフェリン遺伝子の発現はTaqmanプローブを用いたリアルタイムPCR法により定量した。プライマーとして、5'-CTTCACCATGCCAAGTGGTCC-3'および5'-GCTCATCTCTCCTATGTGCTGG-3'、プローブとして、5'-FAM-AGCAAGGC GCAGGAGAAATTTGGAA-BHQ-1-3'を用いた。ラクトフェリン遺伝子の発現はベータアクチン遺伝子の発現で補正した。プライマーとして、5'-AGGTCATCACCATCGGCAAT-3'および5'-TCGTGAATGCCGAGGAT-3'、プローブとして、5'-FAM-TTCCGCTGCCCT GAGGCTCTCTTC-BHQ-1-3'を用いた。

(4) ウシ乳腺組織で発現するVEGF遺伝子のクローニング

ウシ乳腺において発現するVEGF遺伝子をクローニングするために、既に登録されていたウシVEGF164遺伝子の開始コドンを含む領域と、終止コドンを含む領域に対応するプライマー(5'-ATGAACTTTCTGCTCTCT TGGG-3'、5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACA-3')を設計し、泌乳中期の乳腺組織から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。PCR反応の増幅断片は電気泳動によりその長さを確認した後にpGEM-Tベクター(プロメガ)に連結した。挿入したDNA断片の塩基配列はDNAシーケンサー(Applied Biosystems)により決定した。

(5) ウエスタンブロッティング

ウシ乳腺上皮細胞から抽出したタンパク質をSDS-PAGEにより分画し、セミドライ法によりPVDF膜に転写した。ウエスタンブロッティングは抗リン酸化ERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体(New England BioLabs)を用いて行った。

(6) ELISA法によるラクトフェリンの定量

直径 3.5cm の培養用ディッシュに乳腺上皮細胞を播種し、一定時間培養後、生理活性物質（ホルモン、細胞増殖因子等）で細胞を刺激した。さらに一定時間培養後に培養上清を回収した。培地中のラクトフェリン濃度は ELISA キット（ベッチル）により定量した。

(7) siRNA による遺伝子発現抑制

本研究で使用したウシ乳腺上皮細胞は遺伝子導入効率が低かったため、siRNA による alpha-B-クリスタリン遺伝子の発現抑制実験には乳腺上皮細胞の代表的なセルラインである HC11 を用いた。siRNA をトランスフェクションする 48 時間前に、細胞を 24 ウェルプレートの各ウェルに播種し、培養後、siRNA（サンタクルズ）をトランスフェクション試薬と混合し血清不含の培地中に添加した。

4. 研究成果

(1) ウシ乳腺上皮細胞における新たなアポトーシス抑制、乳合成活性化に関わる因子の探索と解析

ウシ乳腺組織において泌乳期特異的に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイ法と DNA サブトラクション法により網羅的に解析した。それらの総合的な分析結果については現在解析中であるが、先行して乳合成の活性化に伴って発現が変動する（泌乳中期に上昇して後期に減少する）遺伝子である血管内皮増殖因子（VEGF）、乳腺退行期の泌乳後期に発現が上昇する遺伝子であるラクトフェリンについて解析を行った。

① VEGF について

血管新生を促進する VEGF は、泌乳に必要なホルモン・栄養素等を乳腺に供給する血管を発達させることにより乳合成を活性化すると考えられる。哺乳動物の VEGF には 5 種類のスプライシングバリエーションが存在することが報告されているが、本研究では RT-PCR 法により、ウシ乳腺組織において VEGF120、VEGF164、VEGF188 の 3 種類が発現していることを明らかにした。ウシ VEGF120 および VEGF188 の塩基配列はデータベースに登録されていなかったため、これらの cDNA をクローニングし、塩基配列を決定した（AB450824、AB455252）。ウシ乳腺組織における VEGF 遺伝子の発現は乳合成活性の高い泌乳中期に乾乳期の約 3 倍に達した（図 1）。

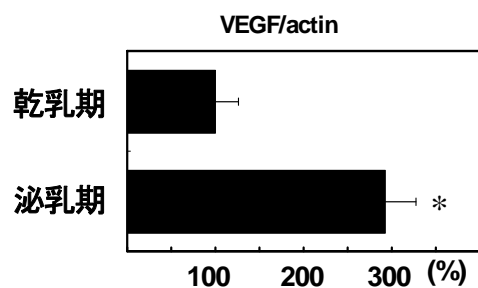


図 1 ホルスタイン種乳腺組織（乾乳期、泌乳期）における VEGF 遺伝子の発現変動 *は乾乳期の発現と比較して有意差が有ることを示す。

またウシ乳腺上皮細胞において泌乳関連ホルモンであるプロラクチンとデキサメサゾン処理により VEGF の発現が約 4 倍に上昇した。乳腺における VEGF の発現機構はカゼイン等の乳タンパク質と共通する部分があることから、VEGF は泌乳持続性を向上させる因子の 1 つであると考えられた。さらにデキサメサゾンとプロラクチンは主要な MAP キナーゼである ERK1/2 をリン酸化するとともに、ERK1/2 の上流に位置するキナーゼ（MEK）の特異的阻害剤 PD98059 により VEGF の発現が減少したことから、デキサメサゾンとプロラクチンによる VEGF 発現誘導には ERK1/2 が関与することが明らかとなった（図 2）。

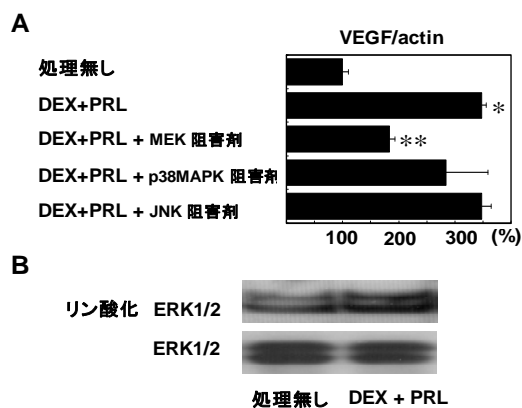


図 2 ウシ乳腺上皮細胞の VEGF 発現に及ぼす MAP キナーゼの関与 A: デキサメサゾン (DEX) とプロラクチン (PRL) 処理による VEGF 発現誘導における MAP キナーゼ経路阻害剤の効果 *は処理無しに対して有意差が有ることを示す。**は DEX+PRL 処理に対して有意差があることを示す。B: デキサメサゾンとプロラクチン処理による ERK1/2 のリン酸化

ウシ乳腺上皮細胞において VEGF のレセプターである Flk1 の mRNA の発現が認められたことから、乳腺上皮細胞が産生する VEGF がオートクラインにより乳腺上皮細胞自身にも作用

することが考えられた。今後、VEGFが乳腺上皮細胞の乳合成活性等に及ぼす影響について解析する予定である。

② ラクトフェリンについて

リアルタイムPCRの結果、ウシ乳腺組織におけるラクトフェリン mRNA の発現は泌乳初期・中期と比較して泌乳後期に上昇した。さらに牛乳由来ラクトフェリンがウシ乳腺上皮細胞の増殖を抑制したことから、泌乳持続性を向上させるためには、乳腺組織におけるラクトフェリンの高発現を抑制することが重要であると考えられた。しかし、ウシ乳腺上皮細胞におけるラクトフェリンの合成機構は未解明な部分が多い。そこでウシ乳腺上皮細胞においてラクトフェリンの合成を促進する因子を探索した。その結果、プロラクチンがラクトフェリンの mRNA 発現および培地中への分泌を促進させることを見出した。しかし、血中プロラクチン濃度は泌乳後期に上昇しないことが報告されていることから、プロラクチンが泌乳後期のラクトフェリン合成を誘導する因子である可能性は低いと考えられた。今後は乳腺退行期のラクトフェリン発現誘導に関与する因子を同定し、泌乳持続性とラクトフェリンの関係を詳細に解析する必要がある。

(2) 低分子量 HSP (Heat Shock Protein) による乳腺上皮細胞のアポトーシス抑制作用および乳合成持続作用の解析

分子シャペロンである HSP は様々な細胞機能(タンパク質のフォールディング、品質管理、輸送、酵素活性の制御等)に必須なタンパク質であることが解明され、近年はアポトーシス抑制因子として注目されている。HSP はその分子量により大別されるが、分子量 20~30 kDa の alpha-クリスタリンドメインを有するファミリーはこれまでに哺乳動物において 10 種類の遺伝子 (HspB1-10) が存在することが報告されている。しかしながら、ウシ乳腺組織における HspB の報告は少ない。RT-PCR 法によりウシ乳腺組織における HspB の発現解析を行ったところ 8 種類の HspB の発現が確認された。そこで、まず初めに代表的な HspB である HSP27 (HspB1) に着目してウシ乳腺上皮細胞における解析を行った。ラクトジェニックホルモンによりウシ乳腺上皮細胞を刺激すると乳合成活性の上昇に伴い、HSP27 の発現及びリン酸化の亢進が認められた。しかし、乳腺上皮細胞において HSP27 の発現を抑制しても、わずかにアポトーシスが促進する傾向がみられたものの、有意な差は検出できなかった。続いて乳腺において発現量の多い alpha-B-クリスタリン (HspB5) について検討した。siRNA 法により乳腺上皮細胞における

alpha-B-クリスタリンの発現を抑制すると乳タンパク質である β カゼインの mRNA 発現が有意に減少した。現在、alpha-B-クリスタリンが乳腺上皮細胞のアポトーシスに及ぼす作用について詳細な解析を進めている。

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 2 件)

① Kei-ichi Nakajima, Masato Nakamura, Akira Ishisaki, Takaharu Kozakai, Synergistic effect of dexamethasone and prolactin on VEGF expression in bovine mammary epithelial cells via p44/p42 MAP kinase *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22:788-795 2009 査読有り

② Kei-ichi Nakajima, Masato Nakamura, Xiao-Dong Gao, Takaharu Kozakai, Possible involvement of prolactin in the synthesis of lactoferrin in bovine mammary epithelial cells *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72:1103-1106 2008 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 中村正斗、中島恵一、高橋雄治 高泌乳牛における乾乳期短縮が泌乳前期の乳生産とエネルギー充足に及ぼす影響 第110回日本畜産学会(日本大学) 2009年3月

② Takaharu Kozakai, Mafuyu Kimura, Akira Ishisaki, Kei-ichi Nakajima The effects of butyrate, EGF, FGF-1 and TGF-B on the expression of sodium/monocarboxylate transporter (SMCT-1), a tumor suppressor in colon cancer, in the epithelial cells of bovine fore-stomach. The 28th Sapporo Cancer Seminer international symposium, TGF-B signaling and cancer (札幌) 2008年6月

③ 中島恵一、中村正斗、小酒井貴晴 ウシ乳腺上皮細胞のラクトフェリン合成におよぼすプロラクチンの影響 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム (札幌) 2008年5月

④ 山崎武志、中島恵一、武田尚人、富樫研治、小酒井貴晴 GH および GHR 遺伝子における SNP の組み合わせがホルスタイン初産牛の泌乳曲線パターンに与える影響 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム(札

幌) 2008年5月

⑤ 中島恵一、中村正斗、小酒井貴晴 ウシ乳腺上皮細胞のラクトフェリン合成に及ぼすプロラクチンの影響 第108回日本畜産学会 (岡山大学) 2007年9月

⑥ 小酒井貴晴、中島恵一、山崎武志、武田尚人、別府哲朗、笹井洋二、須田芳人、菅原真子、富樫研治 ホルスタイン種における成長ホルモン受容体 SNP と泌乳持続性の関係 第107回日本畜産学会大会 (麻布大学) 2007年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター 自給飼料酪農研究チーム 主任研究員 中島恵一
研究者番号: 70362150

(2) 研究分担者

無し

(3) 研究協力者

無し