

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21697

研究課題名（和文）オドラント結合蛋白の精液証明への利用とその生理学的意義の探索

研究課題名（英文）Verification of semen by using odorant binding protein 2 and investigation of physiological significance of odorant binding protein 2

研究代表者

小湊 慶彦（Kominato, Yoshihiko）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30205512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、OBP2Bを利用した精液証明方法を開発し、性犯罪捜査へ貢献することを目的に本研究を実施した。抗OBP2B抗体と用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、良好な結果が得られ、OBP2Bを利用した精液証明方法の基礎的な実験が完了した。今後はELISA法、イムノプロット法、イムノクロマト法の開発をする予定である。次に、OBP2Bに結合する分子種を同定することを目的に、培養細胞上清を材料に抗OBP2B抗体を用いた免疫沈降実験を行い、OBP2B分子の免疫沈降に関しては良好な結果が得られた。しかし、母乳を材料としての免疫沈降は、母乳の脂肪やpH等からOBP2B分子の免疫沈降は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、OBP2Bを利用した精液証明方法を開発し、性犯罪捜査へ貢献することが本研究の目的の一つである。本研究の実施により、OBP2Bを利用した精液証明方法開発の基礎研究は完了した。また、OBP2Bに関する研究報告は少なく、その結合する物質、輸送される物質は未知であることから、その生理学的意義も未解明である。一方、OBP2Bの分布から受精や新生児の栄養補給への関与が推測される。そこで、OBP2Bに結合する物質を同定し、生理学的意義を明らかにすることが本研究のもう一つの目的である。即ち、本研究は、犯罪捜査へ貢献するとともに、生殖医療や母子保健への貢献を目指すものである。

研究成果の概要（英文）：Odorant binding protein 2B, OBP2B, is known to be present in secretion from mammary gland and prostate gland, suggesting that the protein is involved in nutrition of infant or fertilization by transport of a small molecule with physiological activity through binding. However, the physiological role of OBP2B has not been defined, since the substance bound by OBP2B has not been identified. Based on the characteristics of OBP2B, it is possible to develop a method to identify semen in crime scene using demonstration of OBP2B. Thus, we carried out Western blot using anti OBP2B monoclonal antibody with success for preliminary study for developing a verification method of semen in specimen collected from crime scene. Therefore, OBP2B seems a good candidate for developing a method to verify semen using immunological methods such as immunochromatography or ELISA. Second, we tried to identify a molecule bound to OBP2B in milk by immunoprecipitation with antibody without success.

研究分野：法医学

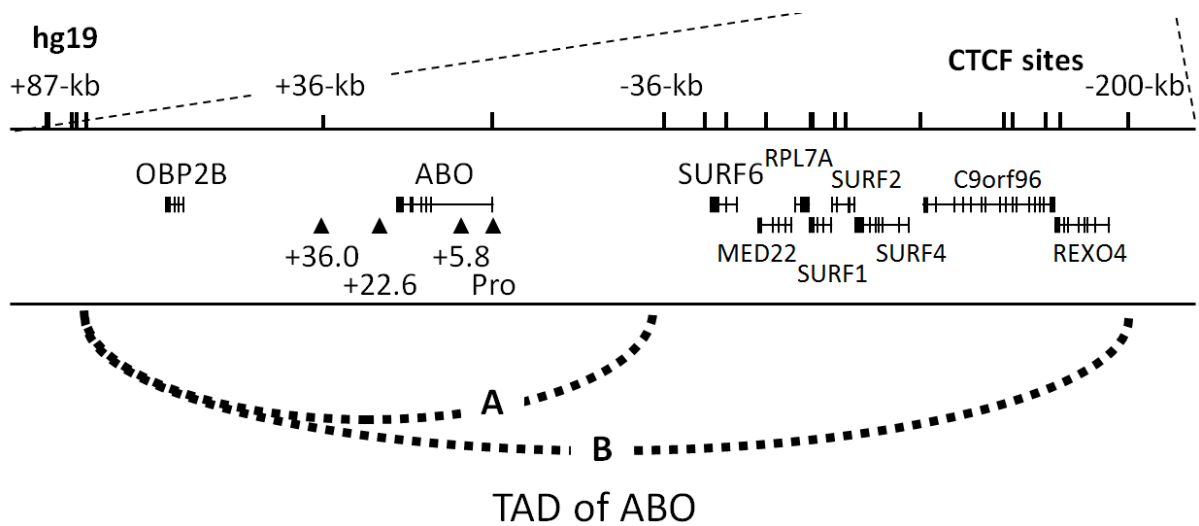
キーワード：OBP2B遺伝子 ABO遺伝子

1. 研究開始当初の背景

オドラント結合蛋白 Odorant Binding Protein 2B(OBP2B)は前立腺液、母乳等に含まれることから、OBP2B は受精や新生児の栄養に関わることが考えられる。OBP2B は籠の様な立体構造をとり、籠の中に脂溶性物質を中に入れることが予想されているが、生体における結合分子種は未確定である。従って、OBP2B の生理的な機能が未解明である。つまり、「未知の物質がオドラント結合蛋白 OBP2B に結合し、受精や新生児の栄養補給に働くことから、オドラント結合蛋白 OBP2B は生命にとって必須である」ことが予想される。一方、OBP2B は前立腺液中に存在することから、法医学や警察鑑識領域においては、精液の証明に利用できる可能性がある。

ところで、OBP2B をコードする遺伝子は ABO 遺伝子の 45 kb セントロメア側にある。我々は 9 番染色体長腕 34.3 に存在する ABO 遺伝子の転写調節機構を調べ、プロモーター、赤血球系細胞特異的転写調節領域 (+5.8-kb site)、上皮細胞特異的転写調節領域 (+22.6-kb site) を同定した。ゲノム編集を用いて+22.6-kb site を欠失した胃癌培養細胞 KATOIII を作製すると、ABO 遺伝子と OBP2B 遺伝子の発現が低下することが観察された。クロマチンは転写因子 CTCF 結合領域を介してループ構造をとり、その内部で遺伝子発現が制御されることが明らかになっている。クロマチンループ構造は連続的に変形しても性質が保たれることを考慮し、トポロジカル関連ドメイン(Topologically Associated Domain, TAD) と呼ばれる。ABO 遺伝子周囲にはループ形成に基づく TAD A-B が想定されている (Lu Y et al. *Nucleic Acid Res* 2017;45:D643-49、図 1)。従って、上皮細胞では ABO 遺伝子と OBP2B 遺伝子が同一の TAD 内に存在し、同一の転写制御を受けている可能性が示唆される。すなわち、ABO 遺伝子と OBP2B 遺伝子は エンハンサーシェアリングをしているように見える。一方、ABO 式血液型の存在理由や進化学的に ABO 遺伝子が消滅しない理由は大きな謎である。ABO 遺伝子は糖転移酵素をコードし、塩基の変異に基づき、N-アセチルガラクトサミンやガラクトースの転移、転移酵素活性の消失から A 型、B 型、O 型抗原が産生される。これらの抗原構造に差異があることを考えると、生命にとって ABO 遺伝子が不可欠と考えることは困難である。そのような状況から、「OBP2B 遺伝子は生命にとって必須で、それが発現するには ABO 遺伝子の上皮細胞特異的転写調節領域+22.6-kb site が不可欠で、ABO 遺伝子の O アレルは機能の蛋白をコードするが、ABO 遺伝子が消滅せずに保存されることになる」が推測される。

図1 . ABO 遺伝子と周囲のループ形成に基づく Topologically Associated Domain . ABO 遺伝子とその周囲に存在する遺伝子を示す。また、クロマチンループ形成に関わる転写因子 CTCF の結合部位を示す。さらに、ABO 遺伝子と OBP2B 遺伝子を包含するループを示す。



2 . 研究の目的

本研究は、オドラント結合蛋白 OBP2B の生理学的意義を明らかにし、OBP2B を利用した精液証明を性犯罪捜査に利用することを目的とするものである。オドラント結合蛋白 OBP2B に関する研究報告はほとんどなく、その結合物質は未知で、その生理学的意義も未解明であり、推測される生理学的意義として、受精や新生児の栄養補給への関与が挙げられる。また、性犯罪捜査への応用もない。従って、本研究は未知の分野への挑戦であり、これらは新たな性犯罪捜査方法の開発、生殖医療や母子保健に資するものである。一方、オドラント結合蛋白 OBP2B の生理学的意義が明確化され、生命維持に必須であることが分かれば、「なぜ ABO 遺伝子は消滅しないのか？」という問いに対する回答、エンハンサーシェアリング、が支持されることになり、遺伝進化学上の貴重な例となる。

3 . 研究の方法

ウエスタンブロッティング KATOIII 細胞に対して Total Protein Extraction Kit (TaKaRa) を用いて、細胞溶解液を調整した。一方、KATOIII 細胞を無血清培地において 72 時間培養後に得られた培養上清を Ultr-10K (Merck Millipore, Burlington, MA) を用いて濃縮し、培養上清を調整した。細胞溶解液、または培養上清に対して、ラビット抗 OBP2B モノクローナル抗体 (MA5-30722, Thermo Fisher Scientific) 及びラビット抗 OBP2B ポリクローナル抗体 (MA5-46552, Thermo Fisher Scientific) を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) により化学発光を行い、LAS-3000 と MultiGauge v3.0 (FujiFilm, Tokyo, Japan) で電気泳動イメージを得た (Sano R, et al. *Scientific Reports*. 2021; 11: 7325)。

免疫沈降 KATOIII 細胞の濃縮培養上清に対して、ラビット抗 OBP2B モノクローナル抗体又はラビット抗 OBP2B ポリクローナル抗体、Pierce Classic IP Kit を用いて、免疫沈降を行い、前述

のウエスタンブロッティングを行い、免疫沈降物を評価した。また、市販の母乳を購入し、免疫沈降を試みた。

4. 研究成果

OBP2B を用いた精液証明方法を開発することを目的に、抗 OBP2B モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングの条件検討を行った。抗 OBP2B モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を準備し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、抗 OBP2B モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングで良好な結果が得られた（図 2）。そのことから、抗 OBP2B 抗体を用いた精液証明方法の準備ができた。実用を鑑みると、ドットプロット法、ELISA 法、イムノクロマト法を開発する必要があり、上記のウエスタンブロッティングの結果はそれらの実現可能性が高いことを示唆している。

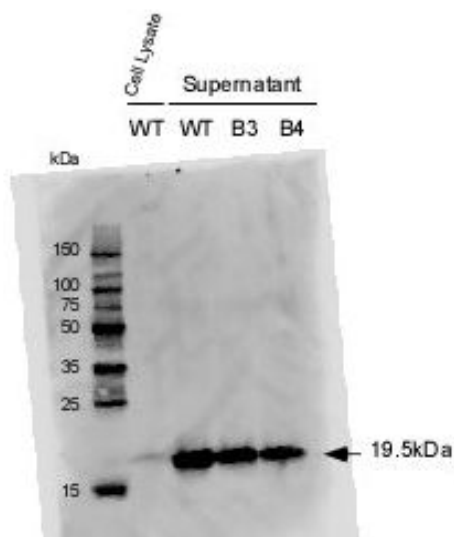


図 2. 抗 OBP2B モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング. WT は KATOIII 細胞、B3 と B4 は上皮細胞特異的転写調節領域 (+22.6-kb site) 欠損を導入した KATOIII 細胞である。

次に OBP2B に結合する分子種を同定するために、抗 OBP2B モノクローナル抗体を用いた免疫沈降後に、OBP2B に結合している分子種を質量分析する計画した。初めに、抗 OBP2B モノクローナル抗体を用いた免疫沈降を行い、沈降物のウエスタンブロッティングを行ったところ、OBP2B が免疫沈降していることが分かったが、免疫沈降する蛋白量は少量で、免疫沈降の効率が悪かった。そこで、免疫沈降に用いる抗体を抗 OBP2B ポリクローナル抗体に変更し、免疫沈降法を行ったところ、それなりの蛋白量の沈降を得ることが出来た。

次に、市販の母乳を購入し、免疫沈降を試みようとしたが、母乳のままでは脂肪が多く、また、免疫沈降に用いる緩衝液に比べると pH や電解質成分に差異があるため、免疫反応や沈降が生じるかについて疑問が生じており、それらの問題を解決する必要が出た。母乳の脱脂を行い、蛋白を濃縮した形で免疫沈降を行ったが良好な結果を得ることは出来なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuda H, Sano R, Hayakawa A, Takahashi Y, Okawa T, Kubo R, Takei H, Awata S, Tokue H, Akuzawa H, Yuasa M, Kominato Y.	4. 巻 52
2. 論文標題 Investigation of the applicability of virtual gastroscopy based on postmortem computed tomography to detect changes in the stomach, along with reports of three rare cases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leg Med (Tokyo).	6. 最初と最後の頁 101898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.legalmed.2021.101898.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa A, Sano R, Takahashi Y, Okawa T, Kubo R, Harada M, Fukuda H, Yokohama A, Handa H, Kawabata-Iwakawa R, Tsuneyama H, Tsukada J, Kominato Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Reduction of blood group A antigen on erythrocytes in a patient with myelodysplastic syndrome harboring somatic mutations in RUNX1 and GATA2.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 469-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/trf.16766.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Y, Hayakawa A, Sano R, Fukuda H, Kubo R, Tokue H, Okawa T, Kawamura M, Kominato Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Usefulness of a tissue optical clearing technique for forensic autopsy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Forensic Sci.	6. 最初と最後の頁 1124-1131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1556-4029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kominato Y, Sano R, Takahashi Y, Hayakawa A, Ogasawara K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Human ABO gene transcriptional regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 860-869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/trf.15760.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa Akira, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Kubo Rieko, Harada Megumi, Omata Masato, Yokohama Akihiko, Handa Hiroshi, Tsukada Junichi, Takeshita Haruo, Tsuneyama Hatsue, Ogasawara Kenichi, Kominato Yoshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 RUNX1 mutation in a patient with myelodysplastic syndrome and decreased erythrocyte expression of blood group A antigen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 184-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15628.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima T, Kawabata-Iwakawa R, Kaneko Y, Hamano SI, Sano R, Tamura S, Hasegawa H, Kobari T, Kominato Y, Nishiyama M, Kurabayashi M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Novel Cardiocerebral Channelopathy Associated with a KCND3 V392I Mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Heart J.	6. 最初と最後の頁 1049-1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-203.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yoichiro, Sano Rie, Hayakawa Akira, Fukuda Haruki, Kubo Rieko, Okawa Takafumi, Tokue Hiroyuki, Takei Hiroyuki, Kominato Yoshihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Superimposed CT imaging using fusion function to visualize the relationship between the knife and the wound path in a stabbing victim	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Forensic Sciences	6. 最初と最後の頁 1148 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.14653	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sano R, Takahashi Y, Fukuda H, Harada M, Hayakawa A, Okawa T, Kubo R, Takeshita H, Tsukada J, Kominato Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 A cell-specific regulatory region of the human ABO blood group gene regulates the neighborhood gene encoding odorant binding protein 2B.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 7325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86843-6.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Y, Hayakawa A, Sano R, Fukuda H, Harada M, Kubo R, Okawa T, Kominato Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitors suppress ACE2 and ABO simultaneously, suggesting a preventive potential against COVID-19.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 3379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82970-2.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 瞳子 (Hirano Touko) (20643810)	群馬大学・大学院医学系研究科・技術職員 (12301)	
研究分担者	窪 理英子 (Kubo Rieko) (40747127)	群馬大学・医学部・技術職員 (12301)	
研究分担者	高橋 遥一郎 (Takahashi Yoichiro) (50640538)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	佐野 利恵 (Sano Rie) (70455955)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	
研究分担者	早川 輝 (Hayakawa Akira) (90758575)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------