

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23688032

研究課題名（和文）ウシ乳に見出された odorant-binding protein の生理機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of physical function of an odorant-binding protein found in bovine milk

研究代表者

福田 健二（FUKUDA KENJI）

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：80419217

研究成果の概要（和文）：ウシ初乳に見出された bovine colostrum odorant-binding protein (bcOBP) は、リポカリンスーパーファミリーに属する運搬タンパク質である。bcOBP は乳だけでなく唾液、鼻粘液、羊水、膣分泌液、血漿にも含まれており、mRNA の発現は広範な組織で認められた。結合可能なリガンドに対する bcOBP の選択性は極めて高いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Bovine colostrum odorant-binding protein (bcOBP), found in bovine colostrum, is a transport protein belonging to lipocalin superfamily. bcOBP was present not only in milk but also in saliva, nasal mucus, vaginal discharge, and blood plasma. Its mRNA was widely expressed in several tissues. bcOBP was highly specific in terms of ligand recognition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	8,800,000	2,640,000	11,440,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：運搬タンパク質、リポカリン、フェロモン

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、odorant-binding protein (OBP) に相同性を示す微量タンパク質がウシ初乳中に存在することをプロテオーム解析の手法を用い明らかにした。当初、ウシ鼻粘膜由来 OBP (bOBP) に関する研究は良く進んでおり、その役割は、におい分子の結合および運搬と考えられていた。一方、哺乳類の乳に含まれる OBP に関する知見は殆ど無く、ウシ初乳由来 OBP (bcOBP) がどのような生理機能を有するか不明であった。bcOBP は bOBP と同様にリポカリンと呼ばれるタンパク質スーパーファミリーに属することが予想された。同スーパーファミリーに属するタンパク質は、アミノ酸配列の保存性が低いにもかかわらず、

立体構造が高度に保存されている。それらは分子量 20 kDa 程度の小型球状タンパク質であり、内部に疎水性アミノ酸側鎖に囲まれた空間を有する。この内部空間に疎水性低分子化合物を取り込むことができ、何をリガンドとして結合するかによって、ビタミン輸送、匂いやフェロモンの知覚、隠蔽色、神経細胞の成長、抗炎症性など様々な生理機能を示すことが知られていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、機能未知タンパク質である bcOBP の役割を明らかにし、乳の生理機能に関して新たな知見を得ること、並びに畜産物利用に寄与することである。研究期間内に明

らかにしようと試みたのは、以下の点である。

- (1) 種々のウシ体液（血液、唾液、鼻粘液、尿、羊水、汗、涙、臍分泌液、乳）中における bcOBP 発現量

- (2) bcOBP が発現している生体組織
- (3) bcOBP が乳中で結合している天然リガンド（におい分子あるいはフェロモン分子をはじめとする疎水性低分子化合物）
- (4) bcOBP のリガンド結合特異性（どのような化学物質を結合しうるか）

### 3. 研究の方法

#### (1) bcOBP の発現解析

種々の雌ウシ (Friesian-Holstein) から体液（血液、唾液、鼻粘液、尿、羊水、汗、涙、臍分泌液、乳）を採取する。各体液試料から粗タンパク質画分を硫酸沈殿法により調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、抗 bcOBP モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法により bcOBP を検出し、発現量を見積もる。次に、bcOBP が発現していると予想される器官から体組織を採取する。組織から全 RNA の抽出および mRNA の調製を行い、リアルタイム RT-PCR 法により bcOBP の発現器官を特定する。同時に組織切片を作製し、ジアミノベンジジンを用いた発色法にて組織免疫染色を行い、顕微鏡観察により bcOBP が発現している細胞を特定する。

#### (2) bcOBP の天然リガンドの同定

抗 bcOBP モノクローナル抗体を固定化したアフィニティーカラムを作製し、野生型 bcOBP の精製を行う。条件検討を行い、天然リガンドの効率的な遊離条件を見出す。野生型 bcOBP から遊離した天然リガンドを GC-MS あるいは TOF-MS による構造解析に供する。搾乳直後の乳から揮発性あるいは不揮発性の疎水性分子を、HPLC を用いて分離する。どのピーク成分が bcOBP に結合可能か明らかにし、LC-MS や NMR による構造解析に供する。

#### (3) bcOBP のリガンド結合特異性の解析

組換え体 bcOBP を用いてリガンド結合特異性の解析を行う。野生型 bcOBP が十分に得られた場合は、組換え体との比較実験も併せて行う。蛍光光度計を用い、蛍光物質と脂肪族化合物、芳香族化合物、複素環式化合物、テルペノイドなど種々の疎水性低分子化合物との結合阻害実験により、bcOBP のリガンド結合特異性を明らかにする。組換え体 bcOBP を作製し、対照として使用する。結合阻害実験によるリガンド結合特異性の解析が困難な場合は、放射性同位体で標識した疎水性低分子化合物を購入または作製し、bcOBP を PVDF 膜に固定化し、ウェスタンブロット法によりリガンド結合特異性を明らかにする。また、

示差走査熱量計を用いたリガンド結合特異性の解析を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) bcOBP の発現解析

ウェスタンブロット解析を実施した結果、泌乳期の雌ウシの初乳、常乳、唾液、鼻粘液、羊水、臍分泌液、血漿に陽性バンドを検出したが、涙、汗、尿では検出限界未満であった（図 1）。また、分布パターンに個体間差はなかった ( $n = 3$ )。分娩直後に採集した初乳中の bcOBP 濃度は  $181 \pm 39 \mu\text{g/L}$  と見積もられ、全乳中の濃度は少なくとも分娩後 10 日まで一定であった（図 2）。乳以外の各種体液中の濃度は、乳と同程度か、より少ないと推定された。血漿中の bcOBP 濃度は分娩日に最も高く、分娩後 20 日では有意に低下した。TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR を実施した結果、涙腺、乳腺組織、耳下腺、扁桃腺、気道上皮組織、鼻粘膜組織、嗅覚上皮、鋤鼻器官、子宮内膜組織、臍粘膜組織、リンパ節やその他臓器に幅広く bcOBP の mRNA 発現が認められた（図 3）。発現量が最も高かったのは涙腺であり、その他組織における発現量は涙腺の  $10^{-3} \sim 10^{-6}$  程度であった。また、個体間における差異も認められた ( $n = 1 \sim 3$ )。各種組織切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは特異的に染色された細胞は検出されず、bcOBP の低発現量を反映した結果と推察した。

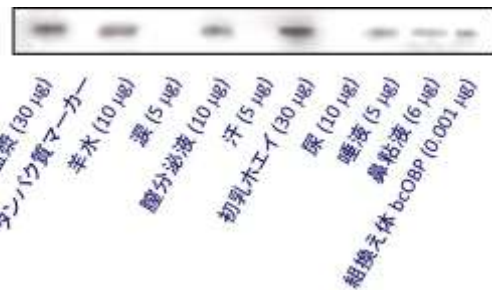


図 1. ウシ各種体液中における bcOBP の発現

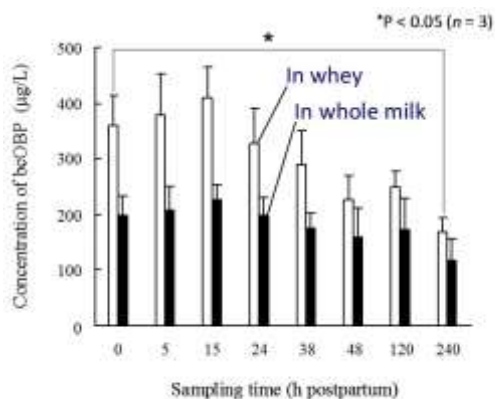


図 2. 乳中における bcOBP 濃度の経時的変化

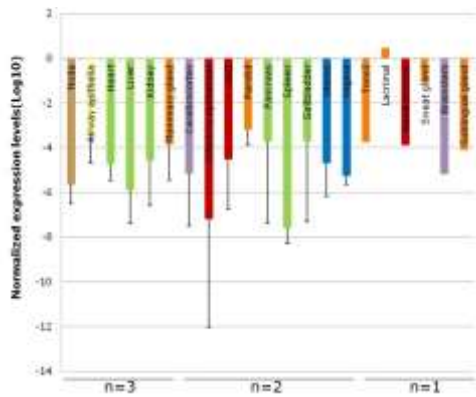


図3. ウシ各種組織における bcOBP の mRNA 発現

### (2) bcOBP の天然リガンドの同定

Protein G Sepharose を充填した IgG 除去カラムによる前処理, 抗 bcOBP モノクローナル抗体固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーならびに Toyopearl HW-55F を用いたゲルろ過により, 野生型 bcOBP を電気泳動的に単一に精製した. 0.2% Tween-20 を用いた場合, 抗 bcOBP モノクローナル抗体固定化カラムから最も効率よく bcOBP を溶出することが可能であった. 10 リットルのウシ常乳から脱脂乳を調製したのち酸沈殿によりカゼインを除去し, 残ったホエイ画分から上述の方法にて野生型 bcOBP の精製標品 0.5 mg を得た. これを種々の pH, 温度, 還元剤濃度で処理し, 遊離した揮発性化合物を捕集し GC-MS による解析を試みたが, 天然リガンドの同定には至っていない.

### (3) bcOBP のリガンド結合特異性の解析

蛍光プローブを用いた競合的結合阻害実験により, 組換え体 bOBP および bcOBP のリガンド結合特異性を調査した. 組換え体 bOBP は蛍光プローブとして 1-aminoanthracene (1-AMA) を結合したが ( $K_d = 0.12 \pm 0.04 \mu M$ ), 組換え体 bcOBP は 1-AMA を結合せず, 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid (bis-ANS) を結合した ( $K_d = 0.65 \pm 0.28 \mu M$ ) (図4). 既報の通り, 組換え体 bOBP は脂肪酸, テルペン類, シクロペンタン誘導体, アルデヒド類, 芳香族化合物, 複素環式化合物などに対し幅広い結合性を示したが, 組換え体 bcOBP はオレイン酸に対してのみ弱い結合性を示したことから ( $IC_{50} > 40 \mu M$ ), 組換え体 bcOBP は組換え体 bOBP と比較してリガンドに対する選択性が非常に高いことが明らかとなった (図5). また, リガンド分子には比較的大きな空間を占める疎水性領域と部分的な負電荷を有することが bcOBP との結合に必要なことが示唆された.

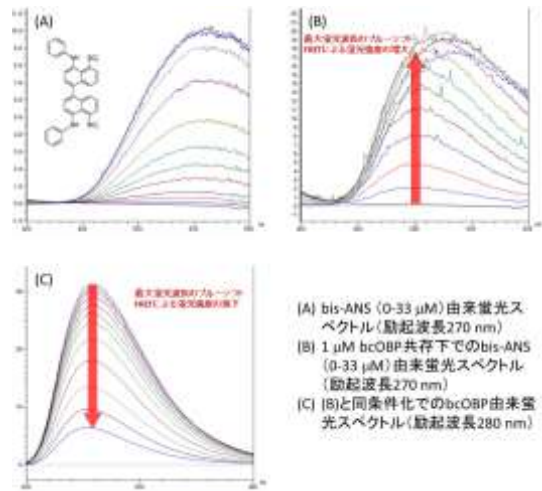


図4. 組換え体 bcOBP と bis-ANS との結合

リガンド候補物質	組換え体 bOBP		組換え体 bcOBP	
	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$K_d$	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$K_d$
脂肪酸類				
ノドニルブタン酸	>10000	ND	ND	ND
ラリジン酸	>40	ND	ND	ND
オリスチン酸	>100	ND	ND	ND
パルミチン酸	>1000	ND	ND	ND
ステアリン酸	>10000	ND	ND	ND
オレイン酸	22.8	2.42	>40	ND
パルミトリン酸	>50	ND	ND	ND
リノール酸	>90	ND	ND	ND
リノレン酸	26.3	2.79	ND	ND
フェニール類				
メクレンゾール	>1000	ND	ND	ND
複素環式化合物				
ユビンチリノメチキシピラジン	14.6	1.58	ND	ND
シトキシニメチルピラジン	>100	ND	ND	ND
キノリン	13.8	1.47	ND	ND
テルペノイド				
1,6-シキオール	2.30	0.245	ND	ND
リナロール	9.81	1.04	ND	ND
ゲラニオール	3.58	1.02	ND	ND
メントール	10.9	1.28	ND	ND
リモネン	5.12	0.545	ND	ND
β-カロテン	>1000	ND	ND	ND
アルコール				
1-オクタノール	14.4	1.53	ND	ND
2-フェニルエタノール	11.7	1.24	ND	ND
エステル				
ジヒドロシヤモシニルメチル	7.40	0.789	ND	ND
ラウリル硫酸ナトリウム	>10000	ND	ND	ND
アルデヒド				
1096-2-ノナール	2.18	0.232	ND	ND
ペンタアルデヒド	21.7	2.23	ND	ND
ステロイド				
コレステロール	>1000	ND	ND	ND
コール酸	>10000	ND	ND	ND
デヒドロコロール酸	>1000	ND	ND	ND
デオキシコロール酸	>1000	ND	ND	ND
ケノオキシコロール酸	>100	ND	ND	ND
β-コロール酸	>100	ND	ND	ND
ビタミン				
ビタミン <sub>0</sub>	>100	ND	ND	ND
ビタミン <sub>0</sub>	>100	ND	ND	ND

図5. 組換え体 bOBP と bcOBP のリガンド結合特異性

### (4) 乳における bcOBP の役割

ブタ乳に性フェロモン結合タンパク質として見出された OBP の生体内分布パターンが bcOBP とよく似ていること, また, フェロモン結合性タンパク質として知られる aphrodisin や probasin に保存されるアミノ酸配列 (CxxxC モチーフ) を bcOBP が有することから, 乳中の bcOBP はフェロモンの結合および運搬に関与する可能性が示唆された. フェロモンによる個体の行動制御は, 通常, 非常に特異性の高いものであり, bcOBP がリガンド分子に対して高い選択性を示すことも上述の推論を支持する.

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ウシ初乳由来 bcOBP の生体内分布並びにリガンド結合特異性を明らかにしたのは、国内外問わず初の知見である。海外研究者から共同研究の打診が一件あり、ダニの感染防御に bcOBP が関与する可能性について検証する予定である。

(6) 今後の展望

組換え体 bcOBP を用いた実験により、同タンパク質が bis-ANS と非常に安定な複合体を形成することが明らかとなった。複合体は 4℃ で少なくとも数週間は安定であり、pH4.0 でもほとんど bis-ANS は遊離せず、数十万倍の希釈によっても bis-ANS の結合は維持される。確立した野生型 bcOBP 精製法で用いられる操作によっても、bis-ANS はほぼ遊離しないことを確認しており、野生型 bcOBP が天然リガンドを結合した状態で精製可能であると推察している。今後、より多量のウシ初乳あるいは常乳から野生型 bcOBP を調製し、天然リガンドの同定を進めるとともに、共同研究により立体構造の解析を進める予定である。組換え体 bcOBP の立体構造解析は、現在進行中である。

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 1 件)

- ① Tamar Japaridze, Akitsugu Senda, Hirofumi Nozaki, Mayumi Yanagida, Takumi Suzuki, Khuukhenbaatar Ganzorig, Yasunori Kushi, Katsuya Kida, Tadasu Urashima, Rupert M. Bruckmaier, Kenji Fukuda, Cloning, monoclonal antibody production, and bodily distribution pattern of a bovine lipocalin、Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、76 巻、2012、712-720

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kenji Fukuda, Carrier proteins in milk: basic and potential applications、The 2nd International Seminar on Animal Industry 2012、2012 年 7 月 5 日
- ② Tamar Japaridze, 福田 健二, 片山 翔太, 木田 克弥, Rupert Bruckmaier, 浦島 匡、ウシリポカリンの生体内分布、日本農芸化学会 2011 年度大会、2012 年 3 月 25 日
- ③ 福田健二, Tamar Japaridze, 高松真理佳, 片山翔太, 浦島 匡、ウシ初乳由来

odorant-binding protein の生体内分布、日本酪農科学会 2011 年度シンポジウム、2011 年 9 月 22 日

- ④ Tamar Japaridze, Takumi Suzuki, Katsuya Kida, Rupert Bruckmaier, Tadasu Urashima, and Kenji Fukuda, Expression Profile of Bovine Colostral Odorant Binding Protein in Various Biological Fluids of Dairy Cow、7th International Conference on Farm Animal Endocrinology、2011 年 8 月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 健二 (FUKUDA KENJI)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：80419217