

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23688034

研究課題名(和文)ブタ母乳中タンパク質の網羅解析と機能評価 - 健全離乳システム構築のための基盤研究 -

研究課題名(英文) Analysis on proteins and its function of porcine milk. Aiming the establishment of healthy early weaning system

研究代表者

井上 亮 (INOUE, Ryo)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・講師

研究者番号：70443926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円、(間接経費) 5,940,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の概要は以下の6点である。1.ブタ母乳のタンパク質プロファイルの解明、2.母豚の乳首の解剖学的位置による乳分泌量、抗体濃度の違いの解明、3.ブタ初乳に含まれる細胞の詳細な解析と全細胞に占めるリンパ球の経時的変動の解析、4.ブタ初乳中T細胞で特徴的に発現する遺伝子の特定、5.初乳摂取が仔豚の免疫系の発達に与える影響の解明、6.遺伝子発現の網羅解析による仔豚回腸の発達過程の解析。以上の成果から、ブタ初乳中のタンパク質・細胞の種類・機能を明らかにすることができた。また、ブタ初乳が仔豚の発達に影響を与えること、仔豚回腸粘膜の遺伝子発現パターンが特定の時期に大きく変化することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The summary of the research achievements are; 1. Characterization of porcine milk proteins, 2. Evaluation of secretion volume and immunoglobulin A and G concentrations in sow colostrum from anterior to posterior teats, 3. Analysis of cell population in porcine colostrum, and change in lymphocyte percentage in total cells during 24 hrs after parturition, 4. Identification of characteristic genes expressed in porcine colostrum T cell in comparison to blood T cell, 5. Effect of colostrum intake during first 24 hrs of life on the development of immunity, especially on humoral immunity, in piglets. 6. Analysis on developmental change in gene expression profile in porcine ileum. This research revealed variety and function of porcine colostrum protein and cells. Additionally, this research suggested that colostrum intake affect the development of humoral immunity in piglet and that gene expression profile in ileum drastically changes at a certain period of the development.

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：ブタ 乳 プロテオーム リンパ球 液性免疫 抗体

1. 研究開始当初の背景

近年、養豚では感染率の増加・成長遅延などの問題から、早期離乳が見直され始めている。しかし、長期の哺乳が望ましいことが明らかでも、経済上の理由もありその実現は容易ではない。特に我が国のような集約養豚の場合、敷地面積の問題も生じ、長期哺乳の実現が困難な農家も多い。申請者らは、早期離乳しても弊害が出にくい養豚システムの構築がこれからの養豚に必要であり、そのためには早期離乳に耐えうる健全な腸管免疫系、腸管構造を早期に構築することが必須条件であると考えた。本研究では、その実現の鍵となる母乳に着目した。

母乳はブタを含むすべての哺乳類の生育過程における万能食である。これは、栄養学的組成が仔の生育に適しているということに加え、仔の腸管機能(免疫系・組織構造)の発達を促す成分を多種多量に含んでいることが理由である。このことは養豚分野でも国内外問わず母乳の重要性が認知されている。

2. 研究の目的

母乳中のタンパク質に関する研究は古くから世界中で盛んに行われてきた。しかし、ブタ母乳のプロテオーム解析は未だ行われておらず、ブタの母乳中タンパク質の詳細は未だ不明である。ヒトとウシの母乳では異なったタンパク質が発見されていること、ブタはヒトとは異なる胎盤・消化管構造を有していることを考慮すると、ブタ母乳に特異的なタンパク質が存在している可能性がある。そこで本研究では、まず(1)ブタ母乳のプロテオーム解析による、母乳中タンパク質のより詳細な把握を目的とした。次に、実学的な側面からブタ母乳を検討するために、(2)母豚の乳首の解剖学的位置の違いによる乳量・抗体分泌量を明らかにすることを目指した。さらに、ブタ母乳、特に初乳中に多量のリンパ球が含まれていることがわかったため、(3)初乳中のリンパ球の分娩後24時間の数的変動、(4)初乳中リンパ球の機能解析を目指した。これらに加えて、(5)初乳摂取の仔豚免疫系発達への影響を明らかにすること、(6)仔豚の小腸の発達過程を詳細に解析することを目的とした実験も実施した。

3. 研究の方法

(1)健康な母豚(ラージホワイト×ランドレース)から分娩直後の乳(初乳)及び、分娩から21日目の乳(常乳)を採取した。遠心分離によって得た乳清をSDS-PAGEにより分子量を元に3つの分画し、各分画をそれぞれトリプシン消化した。全ての分画の消化物を混合し、LC/MS/MSによるタンパク質の同定に供した。

(2)分娩から24時間、9頭の健康な母豚(ラ

ージホワイト×ランドレース)から乳首毎に乳を採取し、乳首毎の乳分泌量を測定した。乳の採取は分娩時を0時間として、6時間毎に行った。また、9頭のうち4頭から得られた乳に関しては、乳清を採取し、乳清中のIgG濃度、IgA濃度を測定した。

(3)(2)で採取した乳から細胞を単離し、フローサイトメトリーによりリンパ球・単球・顆粒球の割合を解析した。

(4)健康な母豚2頭(ラージホワイト×ランドレース)の分娩24時間以内に乳を採取した。また、同じ個体からの採血も行った。乳・血液から細胞を単離し、T細胞のマーカー分子であるCD3、ヘルパーT細胞のマーカー分子であるCD4、細胞傷害性T細胞のマーカー分子であるCD8を標的とした蛍光標識抗体で染色した。セルソーターを用いて、CD3+CD4-CD8+細胞、CD3+CD4+CD8+細胞を分取し、全RNAを抽出した。専用キットを用いてcDNAを合成した後、Porcine microarray (Agilent)を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。

(5)健康な母豚5頭(ラージホワイト×ランドレース)から娩出された30頭の仔豚を初乳摂取群、初乳非摂取群の2群に別けた(n=15)。初乳摂取群は自身の母豚の初乳を摂取させ、初乳非摂取群には初乳を摂取させず娩出後24時間の間、人工乳を摂取させた。その後は両群ともに自身の母豚のもとで飼育した。仔豚は21日齢で強制離乳させた。仔豚の21日齢で採血を、28日齢で採糞を行った。血液はIgG濃度、インターロイキン4(IL-4)濃度測定および血液中リンパ球のサブセット解析に供し、糞便は糞中IgA濃度の測定に供した。

(6)仔豚(WLD)を14、21、28及び35日齢で解剖し、回腸粘膜を採取した。全RNAを抽出し、専用キットを用いてcRNAを合成した後、Porcine microarray (Affymetrix)を用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1)ブタ初乳及び常乳のプロテオーム解析の結果、計181種類のタンパク質を同定した。このうち、初乳と常乳に共通して検出されたタンパク質は50種類で例としてカゼイン、 α -、 β -ラクトグロブリンなどが挙げられる。初乳のみで検出されたタンパク質は63種類で、興味深いものとしてはTh1型免疫の活性化に関わるIL-18や、ヒトやウシの初乳・常乳では検出例のない抗菌性タンパク質アズロシジンなどが挙げられる。IL-18は仔豚の免疫系の発達、特にTh2型に偏って出生する仔豚のTh1型への誘導に役だっていると考えられる。アズロシジンは、仔豚の初期感染防御に重要な役割を担うと予想される。

(2) 母豚から初乳を乳首毎に採取したところ、分娩 24 時間の計 5 点のタイムポイントのほとんどで前方(頭部側)の乳首の乳分泌量が多く、後方(肛門側)に行くに従い乳分泌量が少なくなることがわかった。最前列の乳首の乳分泌量は、5 点のタイムポイントのうち 4 点で最後部及び最後部から 2 番目の乳首の乳分泌量よりも有意に高値であった。一例として分娩直後の乳首毎の乳分泌量を示す(図 1)。

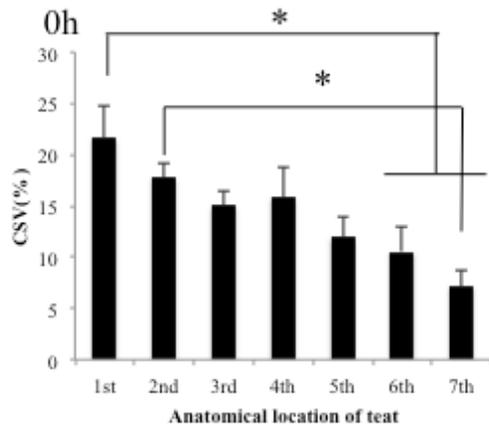


図 1. 分娩直後の乳首毎の乳分泌量; 総量(g)を 100%として各乳首の乳分泌量を%で表す。1st (前方) -7th (後方) *P<0.05

乳首毎に採取した乳清の IgG 及び IgA 濃度と乳分泌量の相関性を確認したところ、分娩 6 時間後では乳分泌量(g)と IgA 濃度に、それ以降のタイムポイントでは乳分泌量と IgG、IgA 濃度両方に統計的に有意な正の相関が認められた。一例として分娩後 21 時間の乳分泌量と IgG、IgA 濃度との相関関係を示す(図 2)。

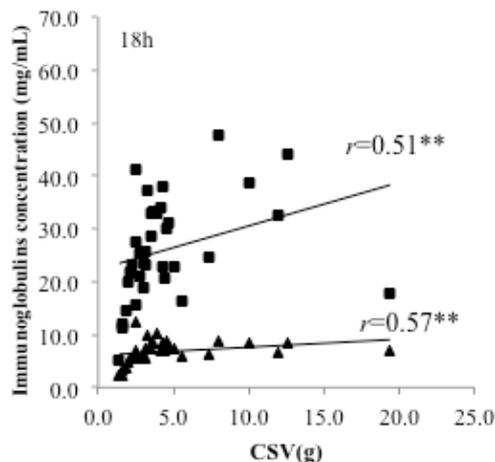


図 2. 分娩後 21 時間の乳分泌量と IgG (■) と IgA (▲) 濃度との関係 **P<0.01

仔豚は乳を摂取する乳首が決まっているが、本成果から前方の乳首から摂取する個体の

方が増体良いことが考えられ、これは既報と一致する。

(3) 分娩 24 時間、5 点のタイムポイントで採取した初乳中の細胞をフローサイトメーターで解析したところ、表 1 のように、顆粒球が大半を占めることがわかった。リンパ球を更に詳細に解析したところ、リンパ球の中では T 細胞が多く、その内訳は CD8 陽性 T 細胞(細胞傷害性 T 細胞) 42.68%、CD4/CD8 二重陽性 T 細胞 32.73%、CD4 陽性 T 細胞(ヘルパー T 細胞) 13.51%であった(表 2)。

表 1

顆粒球	74.70±3.78%
単球	8.64±3.17%
リンパ球	16.70±4.81%

表 2

初乳中リンパ球の内訳	
T細胞	66.93±5.76%
CD4(ヘルパー)	13.51±5.98%
CD8(細胞傷害性)	42.68±9.46%
CD4, CD8二重陽性(DP)	32.73±3.26%
B細胞	IgA陽性
	12.11±4.36%

初乳中の全細胞に占めるリンパ球の割合の経時的変化(分娩 21 時間、8 タイムポイント)を解析したところ、分娩直後をピークに 6-9 時間まで漸次減少し、その後は横ばいに推移した(図 3)。

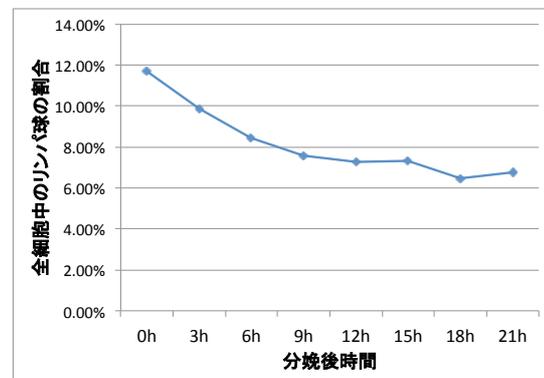


図 3. 初乳中の全細胞に占めるリンパ球の割合(分娩 21 時間)

(4) 初乳中の CD8 陽性 T 細胞、CD4/CD8 二重陽性 T 細胞をセルソーターで分取し、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析し、同様の方法で解析した血液中 T 細胞と比較したところ、初乳の CD4/CD8 二重陽性 T 細胞で、ある接着因子の遺伝子発現が血中の同じサブセットの 4-5 倍、CD8・CD4/CD8 二重陽性 T 細胞の両方で別の接着因子の遺伝子発現が血中の同じサブセットの 5-10 倍であることが明らかになった。さらに短期活性化マーカー遺伝子も初乳の T 細胞(両サブセット)で血中の同じサブセットの 5-10 倍高

発現していることが示唆された。初乳中の T 細胞は生後 24 時間以内に仔豚の体内に移行すると報告されているが、本成果で明らかになった 2 種の接着因子は、この移行に関与する可能性が考えられる。また、短期活性化マーカーが上昇していたことから、初乳中の細胞は分娩時に活性化する可能性が示唆された。

(5) 生後 24 時間初乳を摂取しない初乳非摂取群と、通常通り自身の母豚の初乳を摂取する初乳摂取群の離乳期の血中 IgG 濃度、T 細胞数、B 細胞数、糞便中 IgA 濃度を比較したところ全てで非摂取群が低値を示し、T 細胞数以外は統計的有意差が両群の間に認められた (図 4、5)。

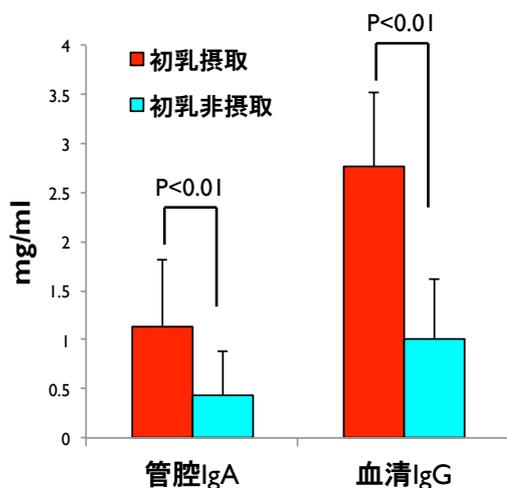


図 4. 血中 IgG 濃度・糞便 IgA 濃度

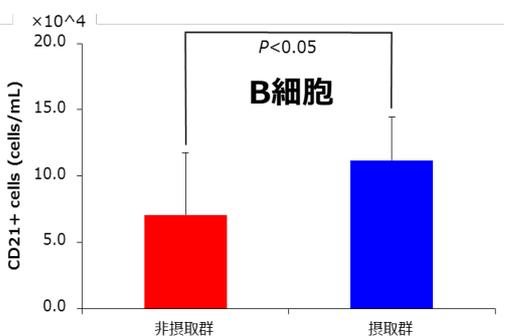


図 5. 血中 B 細胞数

液性免疫に関わる要因で群間に有意な差がみられたため、B 細胞の分裂・増殖、抗体産生に大きく関わる IL-4 の血中濃度を測定したところ、非摂取群ではほとんどの個体で検出限界以下であったのに対し、摂取群では全ての個体で検出された。以上から生後 24 時間の初乳摂取は仔豚の液性免疫の発達に大きな影響を与えることがわかり、その一因として初乳の摂取により血中の IL-4 濃度が上昇することが考えられた。プロテオーム解析では細胞性免疫に関わる分子が初乳に多く検出されたが、IL-4 と始めとする液性免疫の発達に関わる分子も初乳に多く含まれるため、これが仔豚に移行し離乳期の摂取群で濃度が高値となる可能性が考えられる。しかしながら、摂取直後ではなく離乳期で差がみら

れていることから、初乳の別の分子が液性免疫の発達に影響を与えた結果として、IL-4 などの濃度に差が生じている可能性も否定出来ない。

(6) 14、21、28 及び 35 日齢の仔豚の回腸粘膜の遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析したところ、14 日齢から 21 日齢の間に遺伝子発現パターンが大きく変わることが明らかになった (図 7)。日齢間で発現量が有意に異なった遺伝子数は 14-21 日齢間で 6491 個、21-28 日齢間 462 個、28-35 日齢間で 253 個であった。14-21 日齢間で有意に発現量が異なった遺伝子が関わるパスウェイを解析したところ、リンパ球の遊走に関わるパスウェイ「Leukocyte Chemotaxis」などがエンリッチされた。以上から仔豚の回腸粘膜は 14 日齢から 21 日齢にかけて大きく発達することが明らかになった。この時期に乳の成分の変化がある可能性も考えられるため、今後はこの点も含めて検討を行う必要がある。

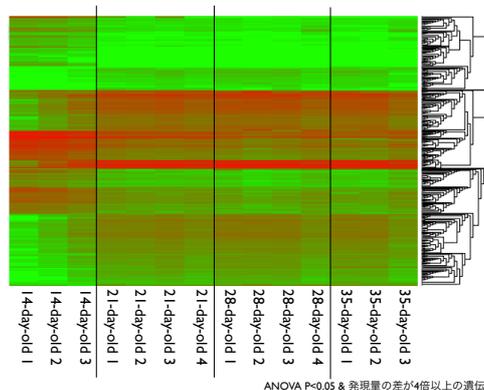


図 6. 各日齢の回腸粘膜遺伝子発現プロファイル

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 The evaluation of secretion volume and immunoglobulin A and G concentrations in sow colostrum from anterior to posterior teats. S.Ogawa, T.Tsukahara, T.Tsuruta, R.Nishibayashi, M.Okutani, M.Nakatani, K.Higashide, S.Iida, N.Nakanishi, K.Ushida and R.Inoue. Animal Science Journal. 査読有、2014, doi: 10.1111/asj.12211
- ② Shotgun proteomic analysis of porcine colostrum and mature milk. S.Ogawa, T.Tsukahara R.Nishibayashi, M.Nakatani, M.Outani N.Nakanishi, K.Ushida and R.Inoue. Animal Science Journal. 査読有、2014, 85 巻 p440-448.

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 井上亮「ブタ初乳についての最新知見」
宮崎しゃくなげ会、宮崎観光ホテル
2014. 7. 18 招待講演（決定済）
- ② M. Nakatani, R. Inoue, D. Kelly,
I. Mulder, K. Fukuta, K. Ushida,
T. Tsukahara 「Postnatal development
of ileum in suckling piglet and
influence of weaning」
9th Joint-Symposium RRI-INRA、AECC
2014. 6. 16-19（決定済）
- ③ 井上亮「初乳免疫の最新知見」
豚病臨床研究会、明治製菓ファルマ本社
2013. 11. 1 招待講演
- ④ 小川将平・塚原隆充・林裕美子・西林僚
一郎・中西信夫・牛田一成・井上亮「初
乳摂取が仔ブタの免疫系の発達に及ぼ
す影響」
第118回 日本畜産学会 つくば国際会
議場
2014. 3. 28
- ⑤ 小川将平・井上亮・西林僚一郎・中西信
夫・塚原隆充・牛田一成「ブタ初乳のシ
ョットガンプロテオーム解析」
第116回 日本畜産学会 安田女子大学
2013. 3. 30
- ⑥ 中谷麻紗子・塚原隆充・井上亮・福田菊
人・牛田一成「初生から仔ブタ腸管免疫
発達と、離乳時期が免疫発達に及ぼす影
響」
第116回 日本畜産学会 安田女子大学
2013. 3. 30
- ⑦ 井上亮「免疫学、栄養学のおよび遺伝子
発現プロファイルという観点から仔ブ
タの離乳時期を考える」
第115回 日本畜産学会 若手企画シン
ポジウム
2012. 3. 28 招待講演

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 亮 (INOUE, Ryo)
京都府立大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号：70443926

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：