

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660216

研究課題名(和文)リポカリンタンパク質の家畜疾病バイオマーカーとしての利用

研究課題名(英文)Application of a lipocalin towards a biomarker for livestock animal diseases

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鯨偶蹄目に属する各種家畜の疾病と、血液以外の各種体液(唾液、鼻粘液、尿、汗を含む皮膚付着物)中に含まれるリポカリンタンパク質bc0BP及びその類縁タンパク質発現量との関連を明らかにし、バイオマーカーとしての利用可能性を検証した。乳房炎などの諸症状を示す泌乳牛、雌ヒツジ、雌ヤギから採集した唾液、鼻粘液、尿、汗を含む皮膚付着物中のbc0BP及びその類縁タンパク質発現量は、健常個体から採集した体液試料中の発現量と有意差は認められず、bc0BP及びその類縁タンパク質の発現変動をこれら疾病のバイオマーカーとして用いるのは困難であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This project was conducted to estimate protein expression levels of a lipocalin, bc0BP, in several biological fluids, such as saliva, nasal mucosa, urine, and fouling on skin including sweat, except for blood, of cows and its analogs in other domestic farm animals belonging to Cetartiodactyla, and to clarify the relationship of their expression levels in between healthy and sick animals. As the results, there was no significant correlation has been observed in the expression levels of bc0BP and its analogs among the biological fluids of healthy and sick animals such as being affected with mastitis, etc, indicating that bc0BP and its analogs are not suitable for biomarkers.

研究分野：畜産学

キーワード：バイオマーカー リポカリン

1. 研究開始当初の背景

リポカリンはタンパク質スーパーファミリーの名称である。これに属するタンパク質は、アミノ酸配列の相同性が20%未満と非常に低いにもかかわらず、立体構造は高度に保存されている。すなわち、八本の逆平行βシートから構成されるバレルドメインをコアとする分子量約20 kDaの球状タンパク質であり、疎水性に富んだ内部空洞を有する。リポカリンは難水溶性の低分子化合物をリガンドとして空洞内に捕捉し運搬することが可能であり、リガンドに対する特異性の違いにより、脂質の可溶化、匂いやフェロモン物質の結合を介した化学感覚、隠蔽色など多様な生理機能を示す。

ある種のリポカリンタンパク質は疾病に伴い血中濃度が増加するため、バイオマーカーとしての有効性が示されている。例えば、α1-酸性糖タンパク質は外傷や炎症性疾患、腫瘍疾患、感染症などの発症により血中濃度が激増する急性期タンパク質である。また、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンは急性腎不全の早期に血中あるいは尿中濃度が増加するため、注目を集めている。一方、家畜ではウシ乳房炎の発症に伴うリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素の発現量増加が乳中で確認されているが、家畜疾病のバイオマーカー探索はまだ端緒に就いたばかりである。

乳をはじめ各種ウシ体液中には、リポカリンスーパーファミリーに属するタンパク質のひとつ bcOBP が存在する。また、我々の研究室で作製した抗 bcOBP モノクローナル抗体が鯨偶蹄目に属する家畜の類縁タンパク質に対して反応交差性を示すことを見出し、近縁タンパク質とのアナロジーから bcOBP がバイオマーカー候補として非常に有望であると推察した。

2. 研究の目的

鯨偶蹄目に属する各種家畜の疾病と、血液以外の各種体液中に含まれる bcOBP 発現量との関連を明らかにし、バイオマーカーとしての利用可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 抗 bcOBP モノクローナル抗体の調製

液体窒素中で保存した抗 bcOBP モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株を融解し、洗浄後、37°C、CO₂分圧5%の条件下で静置培養した。3日毎に培地交換を行い、適時 ELISA 法により抗体力価を測定した。培養開始2週間後、力価の十分な上昇が見られた細胞を用い、30mLの10%ウシ胎児血清添加 DMEM 培地中で上述の条件下、更に2週間培養し抗体の大量調製を行った。培養終了後、培地上清を回収し、ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を見積もった。同培地上清に0.02%アジ化ナトリウムを添加し、用時まで4°Cで保存した。

(2) 体液試料の採集

各種体液試料を、健全な家畜および患畜から採集した。泌乳牛に関しては帯広畜産大学フィールド科学センターで飼育している個体から、雌ヤギと雌ヒツジに関しては十勝管内酪農家の協力を得て体液試料を採集した。鼻粘液、唾液、および汗を含む皮膚付着物は、生理食塩水を適量含ませた綿球を用いた拭き取りにより採集した。尿は排尿時を見計らい、50mL コニカルチューブに直接回収した。スピナラムを用いて遠心分離により体液試料を綿球から回収し、不純物を除去した。体液試料は、タンパク質画分調製時まで-80にて保存した。

(3) タンパク質画分の回収

上述の体液試料に80%飽和硫酸アンモニウムを添加し、4で一晚保持した。沈殿物を遠心分離により回収し、適量の生理食塩水に再溶解した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物質として用い、ブラッドフォード法により見積もった。調製したタンパク質画分は、用時まで-80にて保存した。

(4) タンパク質の分離と PVDF 膜への固定

各種体液試料から調製したタンパク質画分(タンパク質量5-10μg)と適量の Laemmli サンプルバッファーを混合し100で5分加熱処理したものを、12%アクリルアミドゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動は100V定電圧条件下、室温で約70分間行った。泳動終了後、BioRad社のミニトランスブロットセルを用いたエレクトロブロットングにより、分離したタンパク質をアクリルアミドゲルから PVDF 膜へ転写した。なお、100V定電圧条件下、アイスパックでセルを冷却しながら約60分間転写を行なった。

(5) ウエスタンブロット解析

タンパク質を固定した PVDF 膜に対し、抗 bcOBP モノクローナル抗体を一次抗体(4000倍希釈)、フナコシ社から購入した HRP 標識抗マウス IgM ポリクローナル抗体(1000倍希釈)を二次抗体として用い、常法に従いウエスタンブロット解析を行った。検出試薬には ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare)を用い、ケミルミネッセンス撮影装置はアトー社の AE-9300H Ez-Capture MG を、画像解析にはアトー社の CS Analyzer ver. 3.0 を用いた。なお、対照として組換え体 bcOBP を100 ng 使用した。各種体液試料から調製したタンパク質画分中の bcOBP に由来する陽性バンドの強度は、組換え体 bcOBP のバンド強度に対する相対強度として表した。

(6) 統計解析

健全な家畜個体から得た各種体液中の bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量と、患畜から得た各種体液中の bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量との間の相関を明らかにするため、Excel2013 を使用し Welch の t 検定による統計解析を行なった。

4. 研究成果

鯨偶蹄目に属するウシ, ヒツジ, ヤギから唾液, 鼻粘液, 尿, 汗を含む皮膚付着物を各種体液試料として採集した(表 1-3)。

表 1. 健康個体から採集した体液試料

	泌乳牛	ヤギ(雌)	ヒツジ(雌)
唾液	299	5	5
鼻粘液	299	5	5
尿	53	0	0
皮膚付着物	299	5	5

表 2. 患畜等から採集した体液試料

	泌乳牛	ヤギ(雌)	ヒツジ(雌)
唾液	89	14	13
鼻粘液	89	14	13
尿	15	3	0
皮膚付着物	89	14	13

表 3. 疾病またはホルモン剤処置個体の内訳

	泌乳牛	ヤギ(雌)	ヒツジ(雌)
健康個体	299	5	5
乳房炎	38	7	5
ケトーシス	17	0	0
蹄異常	10	0	0
卵胞嚢腫	5	0	0
血乳症	3	0	0
下顎腫瘤	1	0	0
皮膚炎	3	3	3
肺炎	3	0	0
下痢	0	4	5
排卵誘起	26	0	0
黄体退行誘起	5	0	0
計	410	19	18

抗 bcOBP モノクローナル抗体を一次抗体として用いたウエスタンブロット解析により, 各種疾病に罹患した泌乳牛(89頭), ヤギ(雌 14頭), ヒツジ(雌 13頭)の唾液, 鼻粘液, 尿, 皮膚付着物中の bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量について調査した. 得られたウエスタンブロット解析結果の一例を図 1 に示す. なお, 対照として健康な泌乳牛 299 頭, 雌ヤギ 5 頭, 雌ヒツジ 5 頭から採集した体液試料を使用した. 健康個体における bcOBP 発現量は, 泌乳牛, 雌ヤギ, 雌ヒツジ, 何れにおいても組換え体 bcOBP のバンド強度のおよそ 10 分の 1 から 9 倍程度を与え, これは bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量の個体差およびサンプリング手法に起因すると考えられた. 従って, 本手法では bcOBP あるいはその類縁タンパク質発現量が数十分の一に減少, あるいは数十倍に増加した場合に検出可能であると推察した. 本研究で採集した患畜の唾液, 鼻粘液, 尿, 汗を含む皮膚付着物中における bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量の変動に対し, 泌乳牛(図 2), 雌ヤギ(図 3), および雌ヒツジ(図 4)何れにおいても健康個体と比較して有意差は認められなかった. 以上の結果から, 表 3 に示す疾病に関し, 家畜各種体液中の bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量の変動は, バイオマーカーとして適さないことが示された.

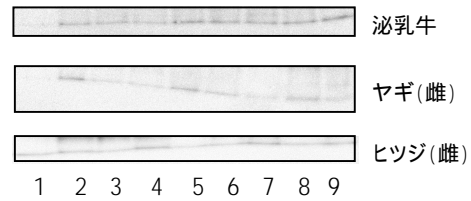


図 1. ウエスタンブロット法による各種体液試料中の bcOBP 及びその類縁タンパク質発現量の解析.

レーン 1, 組換え体 bcOBP; 2, 唾液(健康個体); 3, 唾液(乳房炎); 4, 唾液(皮膚炎); 5, 鼻粘液(健康個体); 6, 鼻粘液(乳房炎); 7, 皮膚付着物(健康個体); 8, 皮膚付着物(乳房炎); 9, 皮膚付着物(皮膚炎).

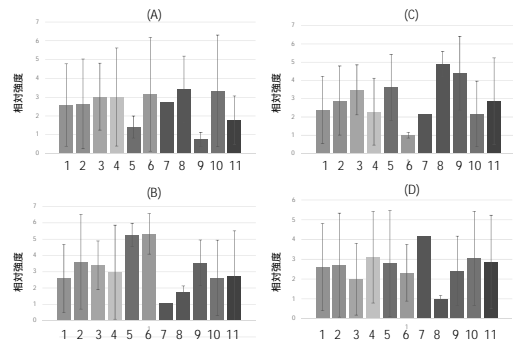


図 2. 各種疾病に関わる泌乳牛各種体液試料中の bcOBP 発現量の変動.

(A)唾液, (B)鼻粘液, (C)尿, (D)皮膚付着物. 1, 健康個体 (n=299); 2, 乳房炎 (n=38); 3, ケトーシス (n=17); 4, 蹄異常 (n=10); 5, 卵胞嚢腫 (n=5); 6, 血乳症 (n=3); 7, 下顎腫瘤 (n=1); 8, 皮膚炎 (n=3); 9, 肺炎 (n=3); 10, 排卵誘起 (n=26); 11, 黄体退行誘起 (n=5). 平均値±標準偏差を示した.

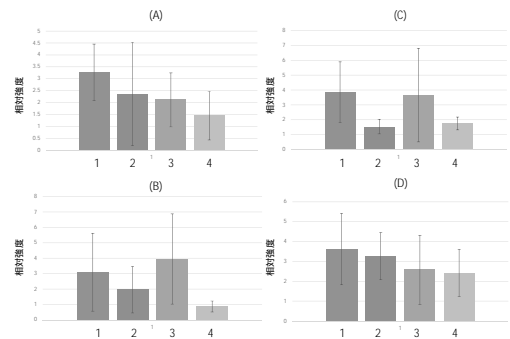


図 3. 各種疾病に関わる雌ヤギ各種体液試料中の bcOBP 類縁タンパク質発現量の変動.

(A)唾液, (B)鼻粘液, (C)尿, (D)皮膚付着物. 1, 健康個体 (n=5); 2, 乳房炎 (n=7); 3, 皮膚炎 (n=3); 4, 下痢 (n=4). 平均値±標準偏差を示した.

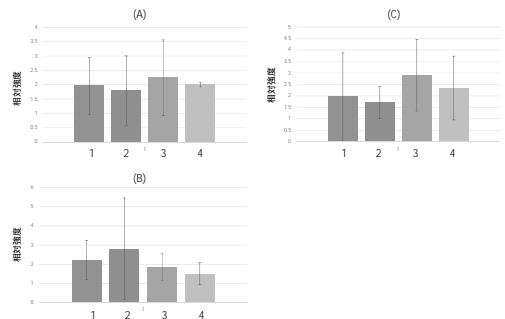


図 4. 各種疾病に関わる雌ヒツジ各種体液試料中の bcOBP 類縁タンパク質発現量の変動.

(A)唾液, (B)鼻粘液, (C)皮膚付着物. 1, 健康個体 (n=5); 2, 乳房炎 (n=5); 3, 皮膚炎 (n=3); 4, 下痢 (n=5). 平均値±標準偏差を示した.

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：