

# 尿素加等電点電気泳動法による牛乳蛋白質多型の検出

横濱 道成・平山 博樹

東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-24

## Detection of cow milk protein polymorphisms by urea-isoelectric focusing

Michinari YOKOHAMA and Hiroki HIRAYAMA

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry,  
Tokyo University of Agriculture 196 Aza-Yasaka, Abashiri-shi  
099-24

キーワード : 乳蛋白質多型, カゼイン ( $X_{S1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ),  $\beta$ -ラクトグロブリン, ホルスタイン種, 等電点電気泳動  
Key words : Milk protein polymorphisms, Casein ( $X_{S1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ),  $\beta$ -Lactoglobulin, Holstein-Friesian, Isoelectric focusing

### 要 約

網走市, 上湧別町および池田町で飼養されているホルスタイン種を対象として, 乳蛋白質多型検出法の検討と, 乳蛋白質型の遺伝子頻度およびそれに基づき種雄牛の遺伝子型の推定を行った。型判定には尿素加ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (UIEF) を用い, 脱脂乳, カゼイン (Cn) および乳清を試料としてそれぞれ泳動することで, 効率よく乳蛋白質多型を検出することができた。各蛋白質型の遺伝子頻度は,  $\alpha_{S1}$ -Cn 座位の B および C 遺伝子がそれぞれ 0.982 および 0.018,  $\beta$ -Cn 座位の A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>3</sup> および B 遺伝子がそれぞれ 0.353, 0.620, 0.012 および 0.015,  $\kappa$ -Cn 座位の A および B 遺伝子がそれぞれ 0.862 および 0.138 であった。また  $\beta$ -ラクトグロブリン (Lg) 座位では A および B 遺伝子がそれぞれ 0.341 および 0.659 であった。乳蛋白質型判定を行った乳牛の種雄牛 22 頭について乳蛋白質遺伝子型の推定を行った結果, これら 4 遺伝子座位全てについて型を推定することができたのは 3 例であった。

### 緒 言

牛乳中の成分として知られる乳蛋白質は, チーズやヨーグルトなどの生産に利用され, さらには接着剤などの材料として工業的利用もされている。また, バターの消費が減少し, 加工原料乳の乳蛋白質に対する需要の増大からその価値が見なおされており, 現在では乳価算出の過程のなかに無脂固形分が加味されるに至っている。

現在, 日本国内の乳牛育種において, 乳蛋白質に対する遺伝的改良は乳蛋白質量もしくはその率といった表現形質をもとに行われているが, チーズなどの加工製品を多く消費する欧米諸国では, 乳蛋白質遺伝子の多型情報を利用した改良が始まりつつある (広瀬; 1992)。

乳蛋白質には, 主要成分として  $\alpha_{S1}$ -カゼイン (Cn),  $\beta$ -Cn,  $\kappa$ -Cn,  $\beta$ -ラクトグロブリン (Lg) および  $\alpha$ -ラクトアルブミン (La) などが含まれる。これらの蛋白質には遺伝的多型が存在し, この遺伝子型をマーカーとして乳牛の選抜を行うことで乳量, 乳蛋白質量もしくはチーズ加工能などを向上させ得るという可能性が示唆されている (GIBSON; 1990, MARZIALI and NG-KWAI-HANG; 1986)。

本研究は, より迅速で簡易的な乳蛋白質型判定法の検討, 道東地域における乳蛋白質型頻度の把握および種雄牛の乳蛋白質遺伝子型の推定を目的として行った。

### 材料および方法

供試乳は, 網走市, 上湧別町および池田町の酪農家各 1 戸から, ホルスタイン種合計 167 頭より採集した。採取サンプルは, 3,000 rpm, 20 分の遠心分離を行い, 脂肪および夾雑物を除去後  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

乳蛋白質型判定は, SEIBERT *et al.* (1985) と辻および村 (1987) の方法を一部改良した尿素加ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (UIEF) を用いて行った。

ゲル調製は, まず尿素 6.72 g, 60%ポリアクリルアミド 1.06 ml, 3%N, N'-メチレンビス(ビス)1.06 ml, 5%過硫酸アンモニウム 70  $\mu\text{l}$  およびアンフォライト

を蒸留水で14 mlにメスアップし、尿素を攪拌によりよく溶した。アンフォライトは、pH 4.2-4.9(ファルマシア)168  $\mu$ l, pH 3.0-5.0(セルバ)84  $\mu$ l, pH 4.0-6.0 (LKB) 42  $\mu$ l, pH 5.0-7.0 (LKB) 42  $\mu$ lおよびpH 2.0-4.0 (セルバ) 20  $\mu$ lを用いた。次いで減圧脱気した後、N, N, N', N'-テトラ-メチレンジアミンを35  $\mu$ l加え、静かに混和して、ゲルが160×120×0.4 mmとなる大きさのゲル枠に注ぎ、重合を行った。

泳動用の試料には、脱脂乳、カゼインおよび乳清の3種類を用意した。カゼインおよび乳清は、脱脂乳100  $\mu$ lに1 N 酢酸をパスツールピペットで1滴加え、10分間静置した後に10,000 rpmで10分間遠心分離を行いカゼインを沈澱させることで調製した。脱脂乳100  $\mu$ lおよび脱脂乳100  $\mu$ lから調製したカゼインは、3%メルカプトエタノールを含む8 M 尿素サンプル処理液300  $\mu$ lを加えた後で用いた。乳清はそのまま試料として用いた。

厚手濾紙(8×160 mm: ADVANTEC No.526)を電極として使用し、+極には5%グリセリンを含む0.2 M 酢酸液、-極には5%グリセリンを含む0.2 M リジン液を用いた。泳動条件は350 V, 10 Wで、20分間の予備泳動後、サンプルを陽極側から2 cmの位置に濾紙片(3×5 mm)に染み込ませてのせ、1500 V, 10 Wの泳動条件で15分間泳動し、濾紙片を取り除いた後さらに1.5時間泳動した。

染色は0.1% (W/V) コマシーブリリアントブルーR, 50% (V/V) メタノール, 7% (V/V) 酢酸を含む溶液で10分間行い、脱色は20% (V/V) メタノール, 7% (V/V) 酢酸を含む溶液でバンドがはっきりと確認できるようになるまで行った。

種雄牛の遺伝子型は、UIEF法により型判定された泌乳牛のうち、同じ種雄牛を父にもつ泌乳牛個体からの乳蛋白質データを集計して、その遺伝状況から推定した。

### 結果および考察

まず各乳蛋白質の分離位置を同定するために、ウシ乳蛋白質標品( $\alpha$ -CASEIN C7891,  $\beta$ -CASEIN C6905,  $\kappa$ -CASEIN C0406,  $\beta$ -LACTOGLOBULIN L6879: SIGMA CHEMICAL CO.) (Lane1~4)と乳サンプル(Lane5~7)の泳動を行った(図1)。これらの泳動位置は $\alpha_{s1}$ -Cnがもっとも陽極側より、 $\kappa$ -Cnがもっとも陰極側よりとなり、中央部の集中した位置のバンドは $\beta$ -Cnおよび $\beta$ -Lgであった。次にカゼイン成分の酸沈澱性質を利用して、カゼイン成分と乳清成分を分離し、それぞれ泳動を行った。その結果は図2に示したように、 $\beta$ -CnのA<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>, A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>およびA<sup>2</sup>B型の5タイプが容易に判定できた。さらにこの泳動像では、 $\alpha_{s1}$ -CnのBおよびBC型、 $\kappa$ -CnのA, BおよびAB型の判定も可能であった。また $\kappa$ -CnのBおよび

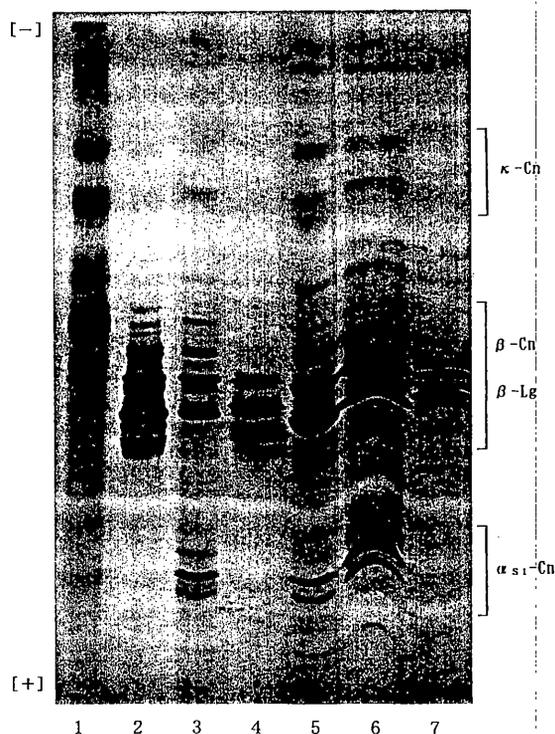


Fig. 1 Identification of cow milk protein types by Urea-isoelectric focusing. Lane 1~3; purified casein samples, Lane 4; purified  $\beta$ -lactoglobulin samples, Lane 5; skim milk sample, Lane 6; casein sample, lane 7; whey sample

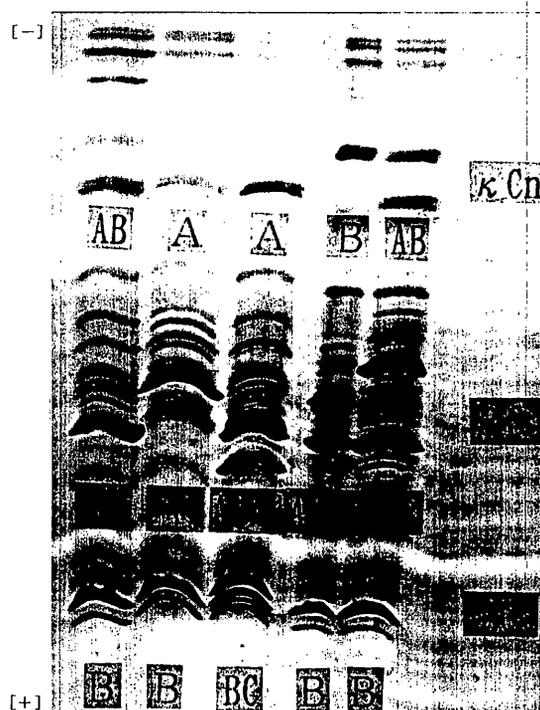


Fig. 2 Patterns of  $\alpha_{s1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn and  $\kappa$ -Cn variants by Urea-isoelectric focusing.

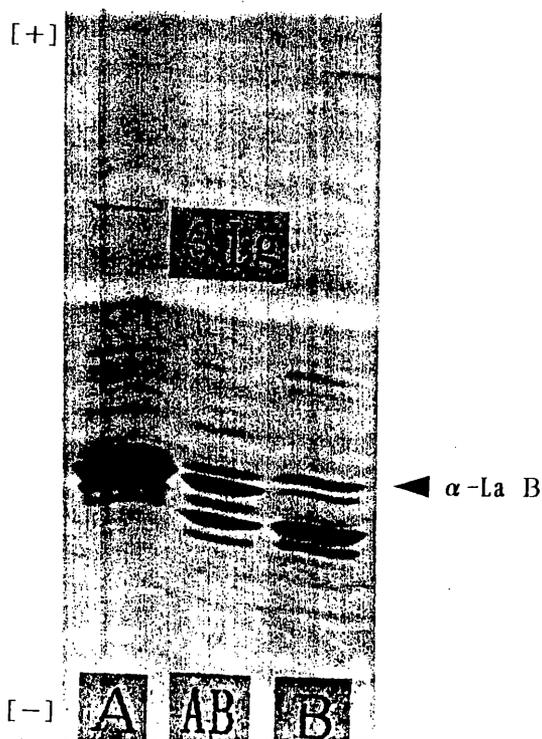


Fig. 3 Patterns of  $\beta$ -Lg variants by Urea-isoelectric focusing.

AB型では、 $\kappa$ -Cn領域の陽極側に薄い付属バンドが観察され、これはB型の標識バンドとして利用することができた。図3の乳清サンプルの泳動像では、 $\beta$ -LgのA、BおよびAB型を検出することができた。また $\beta$ -Lg領域の陽極側に $\alpha$ -LaのB型と考えられるバンドが観察されたが、変異は検出されなかった(◀で示す)。これらの結果から、主要な乳蛋白質型は、カゼインおよび乳清をサンプルとした泳動をそれぞれ行うことで判定可能ことがわかった。これは酸性およびアルカリ性ゲルをそれぞれ用いるポリアクリルアミドゲル電気泳動法に比べ、同一の試薬、ゲルおよび泳動条件で主要蛋白質型を判定できるという点ですぐれており、サンプル添付用濾紙片の大きさもしくはのせ方を調整することで一度に分析できるサンプル数を増やせるため、効率的な方法である。

各乳蛋白質型の遺伝子頻度は表1に示した。この値はこれまでの報告(阿部ら; 1975)とよく一致するが、 $\beta$ -CnA<sup>1</sup> 遺伝子よりもA<sup>2</sup> 遺伝子の頻度が高いという点で異なっていた。また $\beta$ -Cnおよび $\beta$ -Lg座位では、わずかながら地域差も観察されたが、これは使用される種雄牛の片寄りに起因して、頻度が変化してき

たものと思われた。さらに、 $\beta$ -CnA<sup>1</sup> およびA<sup>2</sup> 遺伝子における頻度の逆転は、今回は等電点の差異のみによって分離したためではないかと推察された。しかし、 $\chi^2$  検定の結果、これらの遺伝子頻度はいずれもHardy-Weinbergの法則に従うものであった。 $\kappa$ -Cnおよび $\beta$ -Lg座位ではそれぞれB(0.138)およびA遺伝子(0.341)の頻度が低い結果となったが、このような遺伝子型の乳牛はその他の乳牛に比べ乳量、乳蛋白質量が多く、その乳はチーズの生産性がすぐれているという報告もあるため(GIBSON; 1990, MARZIALI and NG-KWAI-HANG; 1986)、これらの選抜の余地の存在を示す結果となった。また $\alpha_{s1}$ -CnBおよび $\beta$ -CnA遺伝子(A<sup>1</sup>A<sup>2</sup>A<sup>3</sup>)の選抜も乳量および乳蛋白質量を向上させるという報告もあるが(GIBSON; 1991, NG-KWAI-HANG *et al.*; 1984)、これらの頻度はすでに高く( $\alpha_{s1}$ -CnB; 0.982,  $\beta$ -LgA; 0.985)、選抜できる可能性が低いことがわかった。

娘牛の乳蛋白質型をもとにした種雄牛の遺伝子型の推定は、22頭について行ったが、 $\alpha_{s1}$ -Cn、 $\beta$ -Cn、 $\kappa$ -Cnおよび $\beta$ -Lg座位全てについて遺伝子型が推定できたのは3例のみであった(表2および3)。娘牛およびその母牛の乳蛋白質型を比較することにより、より正確な推定を行うことができるが、そのような組合せのサンプルは入手しがたかった。この方法では、 $\beta$ -Cn型のように対立遺伝子数の多い座位は特に推定が困難になり、多くの娘牛の乳蛋白質型を調べる必要があるため、後代検定時に型判定を行うならば本方法でも種雄牛の遺伝子型が容易に判定可能と考えられた。近年、種雄牛もしくは未経産牛に対しては、血液などを材料としてDNAレベルで直接遺伝子型を判定する方法が開発されている。しかし、乳用牛の大多数をしめる泌乳牛を対象とする場合、経費およびサンプル採取の煩雑さを考えると、UIEF法は極めて簡易的で安価な方法と考える。

謝 辞

本研究遂行にあたり貴重な試料を提供して頂いた、卯原内酪農組合の各位および上湧別町の竹内氏に深謝いたします。

文 献

阿部恒夫・小松正憲・大石孝雄・影山晟(1975)和牛および日本におけるヨーロッパ系牛の乳蛋白質の遺伝的多型。日畜会報, 46: 591-598

Table 1 Gene frequencies of milk protein types.

Loci	$\alpha_{s1}$ -Cn		$\beta$ -Cn			$\kappa$ -Cn			$\beta$ -Lg	
	B	C	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	B	A	B	A	B
Allele										
Gene frequency	0.982	0.018	0.353	0.620	0.012	0.015	0.862	0.138	0.341	0.659

Table 2 Frequency of genotypes in daughter cattle.

Bull No.	$\alpha_{s1}$ -Cn		$\beta$ -Cn				$\kappa$ -Cn		$\beta$ -Lg		
	B/B	B/C	A <sup>1</sup> /A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup> /A <sup>2</sup>	A <sup>1</sup> /A <sup>2</sup>	A <sup>2</sup> /A <sup>3</sup>	A/A	A/B	A/A	B/B	A/B
H 330 (12)	0.92	0.08	0.00	0.50	0.42	0.08	0.58	0.42	0.33	0.25	0.42
H 511 (11)	1.00	0.00	0.27	0.09	0.64	0.00	0.82	0.18	0.00	0.55	0.45
H 349 ( 9)	1.00	0.00	0.13	0.25	0.62	0.00	0.88	0.12	0.13	0.25	0.62

( ) : Number of daughter cattle.

Table 3 Genotypes of bulls estimated from daughter's phenotypes.

Bull No.	Loci			
	$\alpha_{s1}$ -Cn	$\beta$ -Cn	$\kappa$ -Cn	$\beta$ -Lg
H330	B/B	A <sup>2</sup> /A <sup>2</sup>	A/B	A/B
H511	B/B	A <sup>1</sup> /A <sup>2</sup>	A/A	B/B
H349	B/B	A <sup>1</sup> /A <sup>2</sup>	A/A	A/B

GIBSON, J. P.(1990) Is there profit in a protein gene.

Holstein Journal, **12** : 29

広瀬可恒 (訳) (1992) 遺伝子マーカー情報を繁殖計画のなかにまで取り入れるべきだろうか. SIRE, **234** : 12-16

MARZIALI, A. S. and K. F. NG-KWAI-HANG, (1986) Effects of milk composition and genetic polymor-

phism on coagulation properties of milk. J. Dairy Sci., **69** : 1793-1798

NG-KWAI-HANG, K. F. J. F. HAYES, J. E. MOXLEY, and H. G. MONARDES, (1984) Association of genetic variants of casein and milk serum proteins with milk, fat, and protein production by dairy cattle. J. Dairy Sci., **67** : 835-840

SEIBERT, B. G. ERHARDT, and B. SENFT, (1985) Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by isoelectric focusing. Anim. Blood Grps. Biochem. Genet., **16** : 183-191

辻莊一・榎村宙子 (1987) ウシミルク蛋白質の遺伝的多型の分析における薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法の有効性. ABRI, **15** : 17-21