

ウシ乳蛋白質成分に対するモノクローナル抗体の作製

横濱 道成・近藤 民章・中川 中・平山 博樹

東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-24

Development of Monoclonal Antibodies Specific Cattle Milk Proteins

Michinari YOKOHAMA, Tamiaki KONDOH, Ataru NAKAGAWA, 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: モノクローナル抗体, ウシ乳蛋白質, ウェスタンブロッティング, 2次元電気泳動

Key words: monoclonal antibody, cattle milk protein, western blotting, two-dimensional electrophoresis

要 約

ウシ乳蛋白質主要4成分(β -ラクトグロブリン, κ -カゼイン, α_{S1} -カゼイン, β -カゼイン)の定量, 蛋白質型の判定および分離精製の試薬開発を目的として, モノクローナル抗体(mAb)を作製した。今回の試みでは38株の抗体産生細胞が得られ, 同定の結果, ウシ乳蛋白質主要4成分をそれぞれ認識する8つのmAb産生細胞株(B α -Cn1, B β -Cn1, B β -Cn2, B κ -Cn1, C κ -Cn2, C β -Lg1, C-Post BSA1)が確立できた。抗体産生細胞株の培養上清より得られたmAbの抗体価は500~10,000倍であり, そのアイソタイプはIgG1(5株), IgG3(1株), IgG2a(1株), IgM(1株)であった。

緒 言

今日における消費者の嗜好性の多様化, ウシ乳成分のさまざまな加工製品への利用にともない乳蛋白質成分の生産量向上が望まれている。特定した乳蛋白質型およびその成分量は乳製品製造能に関係していることが指摘されており, また乳蛋白質の特定遺伝子型が乳量および乳蛋白質量と関連性があると報告されている(GIBSON; 1990, MARZIALI and NG-KWAI-HANG; 1986)。このようなことから乳牛の改良にあたって, 今後は乳蛋白質成分含量や乳蛋白質の特定遺伝子を対象とした選抜の実施が予想される。従って, 各乳蛋白質成分含量は従来の乳量や乳脂率と同様に乳牛の改良を実施する上で重要な経済形質の一つになると考えられる。

本研究では各乳蛋白質成分 [β -ラクトグロブリン(β -Lg), κ -カゼイン(κ -Cn), β -カゼイン(β -Cn),

α_{S1} -カゼイン(α_{S1} -Cn)]の定量, 蛋白質型の判定および分離精製の試薬の開発を目的として, 細胞融合法によるmAbの作製を試みた。

材料および方法

(1) 供試動物および免疫抗原

免疫動物にはBALB/cおよびCF#1系マウスを用い, 免疫抗原にはホルスタイン種の混合脱脂乳を用い5週間にわたり計3回行った。1回目は脱脂乳とフロイントの完全アジュバントを等量混合し, エマルジョンを形成させたもの200 μ lを腹腔内に注入した。2回目は不完全アジュバントを用いて同様に免疫した。最終免疫では, 脱脂乳と滅菌生理的食塩水を等量混合したもの100 μ lを腹腔内に注入した。

(2) 細胞融合

細胞融合は常法に従って最終免疫の3日後に摘出したマウス脾細胞と, ミエローマ細胞(P3 \times 63-Ag8.U-1)を用いPEG(MW=3000)によって行った(GODING; 1980)。

(3) スクリーニング

ハイブリドーマ抗体のスクリーニングは, ウェスタンブロット法(W.B.法)により実施した。mAbの反応パターンと, あらかじめ検索された1次元および2次元泳動パターンとの比較により, mAbの認識抗原を同定した。

(4) クローニングおよびmAbアイソタイプの決定

特異的反応を示す細胞株については限界希釈法を用いたクローニングを2回実施した。mAbのアイソタイプはキット(アマシャムジャパン)により決定した。

(5) 1次元および2次元電気泳動による分離パターンの検索

ハイブリドーマ抗体のスクリーニングをW.B.法で実施するため, 1次元泳動パターンをSDS-PAGE法

により検索した。検索に使用したサンプルにはウシ乳蛋白質標品 (β -Lg, κ -Cn, β -Cn, α -Cn: SIGMA CHEMISAL CO.)とウシ脱脂乳を用い、それら泳動像の比較により4成分の分離域を決定した。また2次元電気泳動上の4成分の分離域も同様のサンプルを用い決定した (YOKOHAMAら; 1987, 横濱ら; 1989)。

結果および考察

(1) ウシ主要乳成分の分離パターンの検索

各乳蛋白質成分に対する mAb の認識抗原を同定する資料を作製するため、まず1次元 (SDS-PAGE) および2次元電気泳動法により、ウシ乳蛋白質主要4成分 (β -Lg, κ -Cn, β -Cn, α -Cn) 標品を用い、その分離パターンの検索を行った (図1)。各成分はそれぞれ

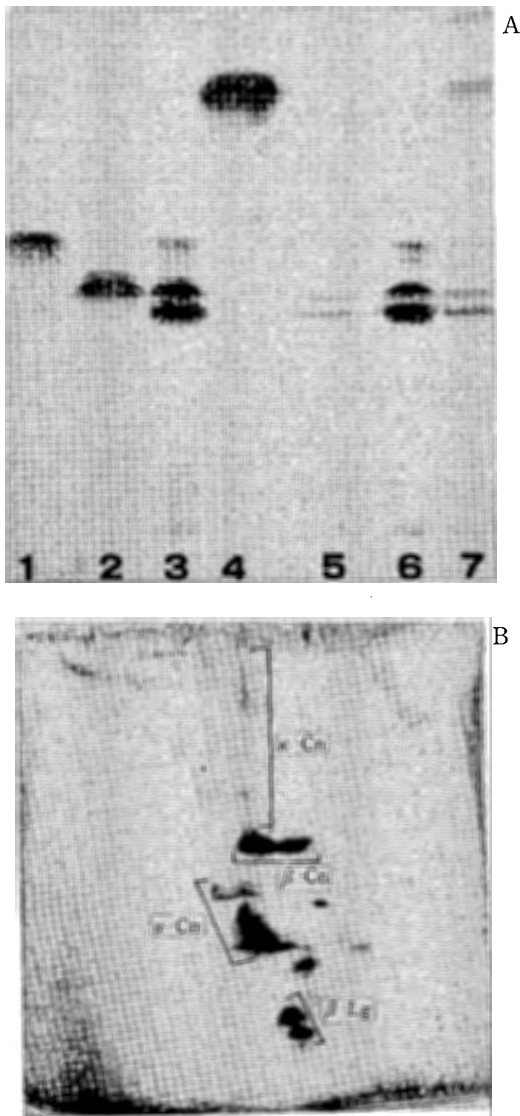


Fig.1 SDS-PAGE (A) and two-dimensional electrophoretic (B) patterns of cattle milk protein
 1. κ -Casein 2. β -Casein 3. α -Casein
 4. β -Lactoglobulin 5. Skim milk 6. Casein
 7. Whey

特徴ある分離パターンを示し、mAb が認識するウシ乳蛋白質成分の同定資料として使用した。

(2) 細胞株の確立および mAb のキャラクターゼーション

細胞融合の結果、ハイブリドーマの形成はマイクロタイタープレートの672穴中536穴 (79.8%) に認められた。mAb の W.B. 法による反応性と作製した1次元分離パターンとの比較を実施した結果、38株 (5.7%) の細胞株において反応性を確認し、mAb 認識蛋白質領域も同定された (図2)。これら細胞株をクローニングした結果、ウシ乳蛋白質成分に対する特異抗体を分泌する抗体産生細胞株8株を分離した。

W.B. 法でのスクリーニングにおいて、mAb の認識抗原の分離域の検索は可能であったが、その認識抗原の正確な同定については困難であった。そこで2-Dプロット法における mAb の反応性と、作製した2次元分離パターンとの比較を行い、作出抗体が認識する抗原蛋白質の正確な同定を試みた (図3)。その結果、ウシ乳蛋白質主要4成分に対する mAb 産生細胞株 [抗 β -Lg mAb 産生細胞株 (1株), 抗 κ -Cn mAb 産生細胞株 (3株), 抗 β -Cn mAb 産生細胞株 (2株) および抗 α -Cn mAb 産生細胞株 (1株)] 7株が確立された (表1)。また今回の実験では認識抗原の同定ができなかった mAb が1種類存在したが W.B. 法による分析の結果、ウシ血清アルブミンと電気泳動的易動度が類似しておりウシ乳蛋白質成分を特異的に認識する抗体と考えられた (表1, 図2)。

β -Cn を認識する2種類の mAb および κ -Cn を認識する3種類の mAb の反応性の違いを確認するため、各 mAb の反応性とプロット膜の CBB 染色との比較を実施した。その結果、2種類の β -Cn 認識 mAb および3種類の κ -Cn 認識 mAb はそれぞれ異なった反

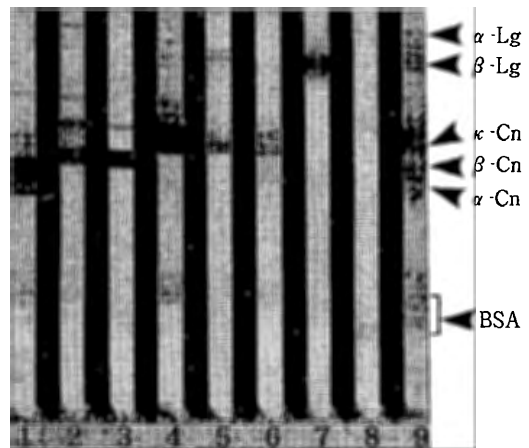


Fig.2 Detection of monoclonal antibodies by western blotting with SDS-PAGE
 1. B α -Cn1 2. B β -Cn1 3. B β -Cn2 4. B κ -Cn1
 5. C κ -Cn1 6. C κ -Cn2 7. C β -Lg1
 8. C-Post BSA1 9. Positive control

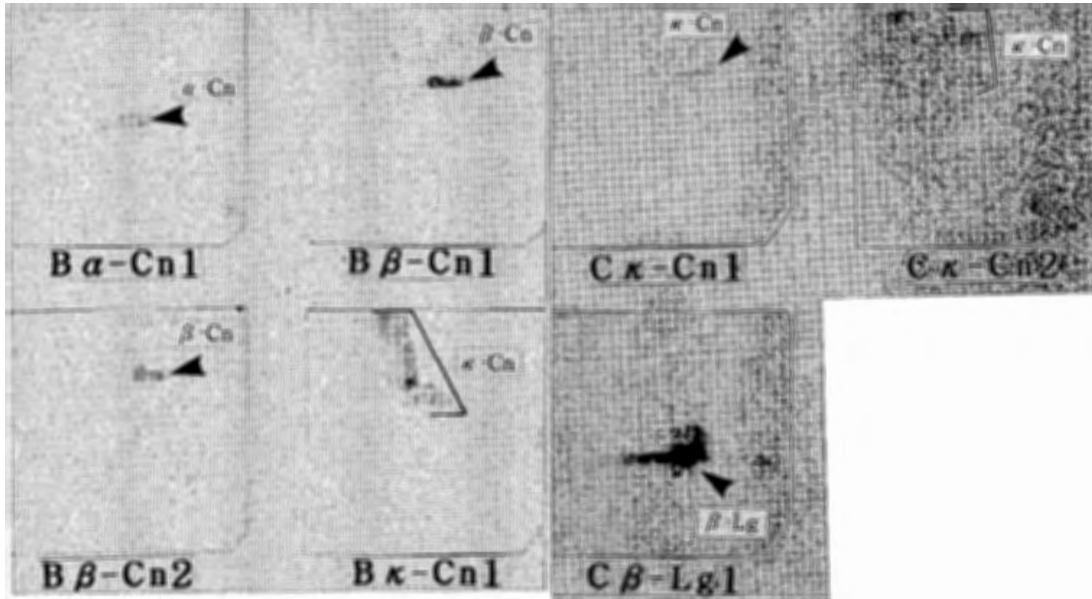


Fig.3 Detection of monoclonal antibodies by western blotting with 2-DE

Table 1. Hybridoma Cell Lines Established

Cell Strain	Recognition Antigen	Antibody Titer	Isotype
Bα-Cn1	α-Casein	10,000	G1κ
Bβ-Cn1	β-Casein	500	G1κ
Bβ-Cn2	β-Casein	10,000	G1κ
Bκ-Cn1	κ-Casein	1,000	G1κ
Cκ-Cn1	κ-Casein	10,000	G3κ
Cκ-Cn2	κ-Casein	10,000	Mκ
Cβ-Lg1	β-Lactoglobulin	2,500	G2ακ
C-Post BSA1	Like BSA	10,000	G1κ

BSA: Bovine Serum Albumin

応パターンが観察された(図3)。よって今回作製されたβおよびκ-Cnに対するmAbはそれぞれ同一抗原を認識しているが、その認識エピトープは異なるものと考えられた。

作出抗体の抗体力価は、細胞株の*in vitro*培養において、培養フラスコ内の細胞の80%以上の細胞が死滅した時点の培養上清を回収し、W.B.法で測定した。その結果、今回作製したmAbは500~10,000倍の抗体力価を有していた(表1)。また作出抗体のアイソタイ

プはIgG1が5株、IgM、IgG2aおよびIgG3が1株ずつであり、抗体のL鎖はすべてκ型であった(表1)。

文 献

- GIBSON, J. P. (1990) Is there profit in a protein gene. *Holstein Journal*. **12**: 29
- MARZIALI, A. S. and K. F. NG-KWAI-HANG, (1986) Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk., *J. Dairy Sci.*, **69**: 1793-1798
- GODING, J. W. (1980) Antibody production by hybridoma., *J. of Immunological Methods*, **39**: 285-308
- YOKOHAMA M., H. GAWAHARA, T. MANABE, T. OKUYAMA and K. MOGI, (1987) On the identification map of thoroughbred horse plasma proteins by microscale multisample two-dimensional electrophoresis. *Jpn. J. Zootech.Sci.*, **58**: 245-252
- 横濱道成・天野 卓・茂木一重 (1989) 二次元電気泳動法による馬乳蛋白質の同定分布図および泌乳期間における経時的変化 *日畜会報* **60**: 450-458