

## ウシ乳蛋白質の免疫化学的定量

平山 博樹・横濱 道成

東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-24

## Quantitative analysis of cow milk proteins by immunochemical method.

Hiroki HIRAYAMA and Michinari YOKOHAMA

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, モノクローナル抗体, ELISA, カゼイン,  $\beta$ -ラクトグロブリンKey words: Milk protein polymorphism, Monoclonal antibody, ELISA, Casein,  $\beta$ -lactoglobulin

## 要 約

ウシ乳蛋白質の遺伝的多型は、乳牛の遺伝的改良の際のマーカーとして利用できると考えられており、遺伝的多型と乳蛋白質生産性の関連を検索するために、乳蛋白質の免疫化学的定量を試みた。定量は、モノクローナル抗体を用いた ELISA 法により行い、乳蛋白質のうち  $\alpha_{S1}$ -カゼイン (Cn),  $\beta$ -Cn,  $\kappa$ -Cn および  $\beta$ -ラクトグロブリン (Lg) についてそれぞれ個別に定量を実施した。定量された蛋白質量は、各蛋白質における遺伝的多型間で比較を行った。その結果、 $\alpha_{S1}$ -Cn では BB 型、 $\beta$ -Cn では A<sup>2</sup>A<sup>2</sup>, A<sup>1</sup>A<sup>2</sup> および A<sup>2</sup>B 型、 $\kappa$ -Cn では BB 型、 $\beta$ -Lg では AA および AB 型の乳が、その他のものよりもそれぞれ成分量が高い結果となった。

## 緒 言

牛乳中に含まれるカゼインやホエーといった蛋白質は、食品としてのみならず、工業用など多岐にわたって利用されており、利用技術の向上にともない、今後乳蛋白質利用の場は拡大していくものと思われる (中江; 1988)。また乳蛋白質の持つ生理活性など、様々な機能に関する研究も進められている (上野川ら; 1994)。

このような需要や畜産の現状を考えると、蛋白質や脂肪といった成分単位もしくは各蛋白質単位での改良が必要となるが、そのひとつの方法として乳蛋白質の遺伝的多型を指標とした乳牛改良があげられる。乳蛋白質型と生産性の関係については多くの試験が行われており (GIBSON; 1990, MARZIALI and NG-KWAI-

HANG; 1986)、アメリカでは乳牛改良のための標識遺伝子情報の提供が行われている (広瀬; 1992)。

本試験では、各種乳蛋白質成分量とそれぞれの遺伝的多型との関連性を調査することを目的として、モノクローナル抗体 (mAb) を用いた ELISA 法による特異的定量を行い、遺伝的多型間での比較を行った。

## 材料および方法

供試乳は、網走市卯原内地区の酪農家 17 戸から採集し、3,000 rpm で 20 分間の遠心分離により脂肪および夾雑物を除去後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。各乳蛋白質の定量は、尿素加等電点電気泳動法 (横濱および平山; 1996) により乳蛋白質型を判定した後、 $\alpha_{S1}$ -Cn (BB 型: 48 例, BC 型: 16 例),  $\beta$ -Cn (A<sup>1</sup>A<sup>1</sup> 型: 48 例, A<sup>2</sup>A<sup>2</sup> 型: 48 例, A<sup>1</sup>A<sup>2</sup> 型: 48 例, A<sup>1</sup>B 型: 22 例, A<sup>2</sup>B 型: 31 例, A<sup>3</sup> 遺伝子を含むヘテロ型: 8 例),  $\kappa$ -Cn (AA 型: 48 例, BB 型: 9 例, AB 型: 48 例) および  $\beta$ -Lg (AA 型: 48 例, BB 型: 48 例, AB 型: 48 例) について実施した。

ELISA 法は、捕捉抗体を用いず、固相に直接コーティングされた抗原に抗乳蛋白質 mAb (横濱ら; 1996) を反応させ、アルカリフォスファターゼで標識された抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として検出した。標準曲線の作成は、ウシ乳蛋白質標品 ( $\alpha$ -Cn C7891,  $\beta$ -Cn C6905,  $\kappa$ -Cn C0406,  $\beta$ -Lg L6879; SIGMA CHEMICAL CO.) を用いて行った。これら標品は、ケルダール法により測定した窒素量から蛋白含有率を補正し、さらに精製が完全でないため目的蛋白質の含有率を補正して標準抗原液として用いた。

## 結果および考察

各乳成分 ( $\alpha_{S1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn,  $\kappa$ -Cn および  $\beta$ -Lg) に対

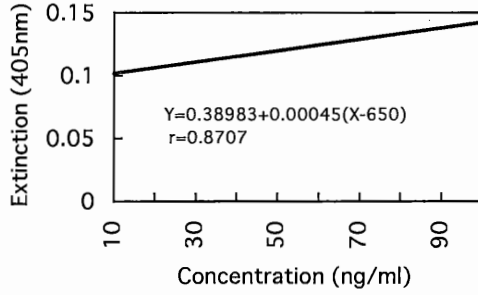


Fig.1  $\alpha_{S1}$ -Cn Standard curve

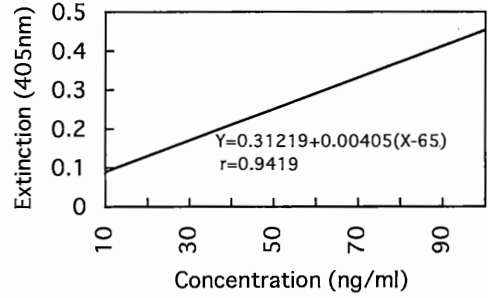


Fig.2  $\beta$ -Cn standard curve

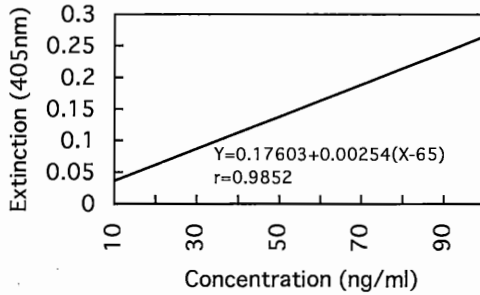


Fig.3  $\kappa$ -Cn Standard curve

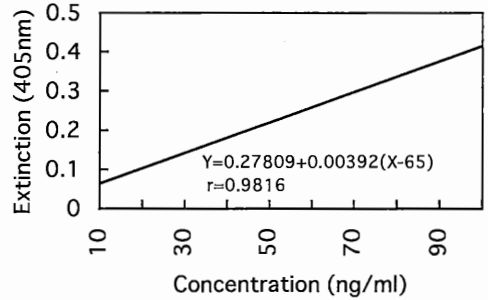


Fig.4  $\beta$ -Lg Standard curve

Table 1 Relationship between cow milk protein polymorphism and amount of each component

Loci	Phenotype	Number of samples examined	Extinction $\pm$ S.E. (405nm)
$\alpha_{S1}$ -Cn	BB	48	0.503 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
	BC	16	0.2962 $\pm$ 0.0146 <sup>b</sup>
$\beta$ -Cn	A <sup>1</sup> A <sup>1</sup>	48	0.4025 $\pm$ 0.0119 <sup>b,c</sup>
	A <sup>2</sup> A <sup>2</sup>	48	0.4963 $\pm$ 0.0185 <sup>a</sup>
	A <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	48	0.4328 $\pm$ 0.0155 <sup>a,b,c</sup>
	A <sup>1</sup> B	22	0.3504 $\pm$ 0.0083 <sup>d</sup>
	A <sup>2</sup> B	31	0.4437 $\pm$ 0.01 <sup>a,b</sup>
	A <sup>2</sup> /?	8	0.409 $\pm$ 0.0177 <sup>b,c</sup>
$\kappa$ -Cn	AA	48	0.4114 $\pm$ 0.0146 <sup>a</sup>
	BB	9	0.5924 $\pm$ 0.0717 <sup>b</sup>
	AB	48	0.4986 $\pm$ 0.0147 <sup>c</sup>
$\beta$ -Lg	AA	48	0.3207 $\pm$ 0.0175 <sup>a</sup>
	BB	48	0.2325 $\pm$ 0.0153 <sup>b</sup>
	AB	48	0.2896 $\pm$ 0.0133 <sup>a</sup>

a, b, c, d: Values followed by the differ letter are significantly different at 1% level.

する標準曲線は、405 nm での吸光度をもって作成した (図 1~4)。 $\alpha_{S1}$ -Cn ではやや低い相関係数 ( $r=0.8707$ ) となったが、 $\beta$ -Cn、 $\kappa$ -Cn および  $\beta$ -Lg では  $r=0.94$  以上となり、ほぼ直線関係にあった。

次に、 $\alpha_{S1}$ -Cn、 $\beta$ -Cn、 $\kappa$ -Cn および  $\beta$ -Lg についてそれぞれ定量した結果 (吸光度 405 nm) を示す (表 1)。 $\alpha_{S1}$ -Cn では、BB 型 0.503 $\pm$ 0.02、BC 型 0.2962 $\pm$ 0.0146 となり BB 型が有意に高い結果となった。 $\beta$ -Cn では、A<sup>1</sup> A<sup>1</sup> 型 0.4025 $\pm$ 0.0119、A<sup>2</sup> A<sup>2</sup> 型

0.4963 $\pm$ 0.0185、A<sup>1</sup> A<sup>2</sup> 型 0.4328 $\pm$ 0.0155、A<sup>1</sup> B 型 0.3504 $\pm$ 0.0083、A<sup>2</sup> B 型 0.4437 $\pm$ 0.01 および A<sup>2</sup> 遺伝子を含むグループ 0.409 $\pm$ 0.0177 となった。これらのうち A<sup>2</sup> 遺伝子を含むグループ、すなわち A<sup>2</sup> A<sup>2</sup> 型、A<sup>1</sup> A<sup>2</sup> 型および A<sup>2</sup> B 型は、0.43 以上で有意に高い結果となった。 $\kappa$ -Cn は、AA 型 0.4114 $\pm$ 0.0146、BB 型 0.5924 $\pm$ 0.0717 および AB 型 0.4986 $\pm$ 0.0147 であった。 $\kappa$ -Cn では、9 例と例数は少ないものの BB 型が最も高い値を示し、次いで AB 型、AA 型という順でこれ

らの間に有意な差が認められ、*B* 遺伝子を含むグループで蛋白量が多い傾向にあった。ホエー蛋白質中の  $\beta$ -Lg は、AA 型  $0.3207 \pm 0.0175$ 、BB 型  $0.2325 \pm 0.0153$  および AB 型  $0.2896 \pm 0.0133$  となり、AA および AB 型のグループと BB 型の間に有意な差が検出され、*A* 遺伝子を含むグループが蛋白量の多い傾向にあった。

今回の試験結果では、 $\alpha_{s1}$ -Cn で BB 型、 $\beta$ -Cn では  $A^2$  遺伝子を含む型、 $\kappa$ -Cn では BB 型、 $\beta$ -Lg では *A* 遺伝子を含む型がそれぞれの成分蛋白質を多く含んでいた。これまでの報告の中で、このような各乳蛋白質成分量と遺伝的変異の関係を調査したものはあまりみられないが、総蛋白量および蛋白率などへの影響については多くの研究がなされており (GIBSON; 1990, MARZIALI and NG-KWAI-HANG; 1986, NG-KWAI-HANG *et al.*; 1984), 今回の結果はこれらと一致するものであった。またこれらの報告では遺伝子頻度についても述べられているが、著者らも道東地域のホルスタイン種について遺伝子頻度を調査しており、 $\alpha_{s1}$ -Cn  $\cdot B$ 、 $\beta$ -Cn  $\cdot A^2$ 、 $\kappa$ -Cn  $\cdot B$  および  $\beta$ -Lg  $\cdot A$  遺伝子は、それぞれ 0.982, 0.620, 0.138 および 0.341 となっていた (横濱および平山; 1996)。したがって、特に遺伝子頻度の低い  $\kappa$ -Cn  $\cdot B$  型および  $\beta$ -Lg  $\cdot A$  型については今後高い選抜効果が期待でき、 $\beta$ -Cn  $\cdot A^2$  型についてもその可能性があるものと思われた。

次に、ELISA 法により得た吸光度を、作成した回帰式により蛋白量に変換した値と、参考値として既報の値 (祐川; 1981) を示した (表 2)。これらを比較すると、参考値に対する ELISA による値は、約 1/2,000 ~ 1/10 程であった。これは、定量の手法が異なるため単純に比較することはできないが、mAb を用いることで抗原中の一部を特異的にとらえたということや、立体障害などにより完全な定量が行われていないことも考えられた。したがって今後は、サンドイッチ法や抗体の Fab'部分を用いて定量を行った場合の検出感度について検討する必要があると思われた。また、4 乳

蛋白質の構成比では、どちらの値とも  $\alpha_{s1}$ -Cn が最も多く、次いで  $\beta$ -Cn となり、 $\kappa$ -Cn もしくは  $\beta$ -Lg が最も少なくなったが、ELISA 法による値は  $\alpha_{s1}$ -Cn 量が顕著に高くなった。これについても、定量法もしくは mAb 株による影響などについて今後試験する必要があると思われた。

今回報告した抗乳蛋白質 mAb による免疫化学的定量値は、標識遺伝子による選抜と併用することによって、乳牛改良への有効な情報となり得るものと考えられた。すなわち、総蛋白質生産量としてだけでなく個々の成分蛋白質としての利用を考えた場合、それぞれの生産量情報を把握することが重要になり、乳蛋白質の精製や多型判定などとも合わせ、抗乳蛋白質 mAb は有効なプローブとなるものと思われる。

## 謝 辞

本研究は平成 7 年度東京農業大学一般プロジェクト研究 (課題番号 79) の助成を受けて実施したものである。記して謝意を表す。また、本研究遂行にあたり貴重な試料を提供していただいた、網走市乳牛検定組合の根本恒夫氏および江口政憲氏ならびに網走市卯原内地区の酪農家各位に心から深謝いたします。

## 文 献

- 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*, **23**: 12-16.
- 上野川修一・菅野長右エ門・細野明義 (1994) ミルクのサイエンス. 第 1 版. 61-138. 全国農協乳業プラント協会. 東京.
- 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.

Table 2 Concentration of cow milk protein (mg/ml)

Milk protein	ELISA $\pm$ S.E.	Reference *
$\alpha_{s1}$ -Cn	$1.5732 \pm 8.45 \times 10^{-2}$ (98.56)	15.75~19.25 (57.80)
$\beta$ -Cn	$0.0189 \pm 3.54 \times 10^{-4}$ (1.18)	6.65~9.80 (24.40)
$\kappa$ -Cn	$0.0029 \pm 7.80 \times 10^{-5}$ (0.18)	2.40~4.50 (8.81)
$\beta$ -Lg	$0.0011 \pm 3.83 \times 10^{-5}$ (0.07)	2.45~4.20 (8.99)

※: Sukegawa (1981)

( ): each content percentage to total milk protein.

中江利孝 (1988) 牛乳・乳製品. 第 10 版. 241-244.  
養賢堂. 東京.

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.

祐川金次郎 (1979) 乳タンパク質. 第 3 版. 1-118. 酪  
農技術普及学会. 東京.

横濱道成・近藤民章・中川 中・平山博樹 (1996) ウ  
シ乳蛋白質成分に対するモノクローナル抗体の作  
成. 北畜会報, **38**: 43-45.

横濱道成・平山博樹 (1996) 尿素加等電点電気泳動法  
による牛乳蛋白質多型の検出. 北畜会報, **38**: 19-22.