

ウシ乳蛋白質の免疫化学的定量条件の検討

渡邊 竜也・平山 博樹*・横濱 道成

東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-2422

*㈱新薬開発研究所, 恵庭市 061-1405

Examination of quantitative analysis for determining cow milk proteins by immunochemical method

Tatsuya WATANABE, *Hiroki HIRAYAMA and Michinari YOKOHAMA

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture,
196 Yasaka, Abashiri-shi 099-2422*New Drug Development Reserch Center Inc.
452-1 Toiso, Eniwa-shi 061-1405キーワード: モノクローナル抗体, カゼイン, β -ラクトグロブリン, ELISAKey words: monoclonal antibody, casein, β -lactoglobulin, ELISA

要 約

ウシ主要乳蛋白質には遺伝的多型が存在することが知られている。この遺伝的多型と生産形質との関連性が報告され、蛋白質の遺伝的多型をマーカーとした育種選抜が有用であると考えられる。そこで著者らは、遺伝的多型と乳蛋白質成分量との関連をさらに検索するため、乳蛋白質に対するモノクローナル抗体(mAb)を26種類 [α_{s1} -カゼイン(Cn) 2株, β -Cn 7株, κ -Cn 7株および β -ラクトグロブリン(Lg) 10株] 作製した。ついで、これらを用いたELISA法により高感度の免疫化学的定量法を確立することを目的として、定量時のpH条件の違いによる測定値の変化を調べた。その結果、 α_{s1} -Cn 1株, β -Cn 3株, κ -Cn 2株および β -Lg 4株で産生されたmAbでそれぞれpH 8.2, 8.2-8.6, 6.6および8.2の条件下で最も反応性が高くなり、これらのmAbは免疫化学的定量に用いるのに有用であった。また同一乳蛋白質を認識したmAbでも、その産生細胞株の違いによって最適反応を示すpHが異なるものも認められた。一方、抗 β -Lg抗体産生株においては β -LgAの遺伝的形質を認識するmAbが得られた。

緒 言

牛乳中には良質な蛋白供給源となるカゼイン(Cn)および乳清蛋白質が含まれており、これらの利用はチーズやヨーグルトのような食品分野のみならず工業

用など多岐にわたっている。さらに乳蛋白質の生理活性など潜在的機能に関する研究も進められており、今後利用の拡大が予想される(中江, 1988; 上野川ら, 1994)。

一方、牛乳中の主要蛋白質成分である α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cnおよび β -ラクトグロブリン(Lg)には、遺伝的多型が存在することが知られており、これまでの研究でこの多型と乳量もしくは乳蛋白率などとの関連が報告され(GIBSON, 1990; MARZIALI and NG-KWAI-HANG, 1986; NG-KWAI-HANG *et al.*, 1984)、生産性の向上のための一手段としての育種選抜に、乳蛋白質遺伝子をマーカーとした方法が有用であると考えられる。著者らは各乳蛋白質間の遺伝的多型とその成分量との関係を明らかにするため、ウシ乳蛋白質に対するモノクローナル抗体(mAb)を作製し(横濱ら, 1966)、これらを用いて免疫化学的定量を行ったが(平山と横濱, 1997)、測定条件を改善する事でさらに高感度に検出できると思われた。そこで本論文では、免疫化学的定量条件を確立するため、ELISA法(酵素標識第2抗体を用いた固相法)でのpH条件による抗原抗体反応への影響を調べた。

材料および方法

供試乳は、前報(平山と横濱, 1997)と同じく網走管内卯原内地区の酪農家17戸より採集して処理した脱脂乳を用いた。これらはあらかじめ尿素加等電点電気泳動法(横濱と平山, 1996)により α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cnおよび β -Lgについてそれらの遺伝的多型の判別を行った。また、用いたmAbは、抗 α_{s1} -Cn 2株、

抗 β -Cn7株, 抗 κ -Cn7株および抗 β -Lg10株の培養上清を用いた。また培養上清中のmAbの活性は, SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を併用したウエスタンブロットングアッセイで確認した。なお, 各mAbはそれぞれの力価によって4-8倍に希釈して用いた。

ELISA法および標準曲線の作成は, 基本的に平山と横濱(1997)の方法に従った。mAbの抗原抗体反応のpH依存性を検索する試験には, 抗体希釈と洗浄に用いたTBS-TのpHを5.0-9.8の間で13段階に調整して用いた。また, 乳サンプルは上記の供試乳の中から7例[No.1; α_{S1} -CnB/C, β -CnA²/A³, κ -CnA/Aおよび β -LgB/B, No.2; それぞれB/B, A¹/A¹, A/BおよびA/B, No.3; B/C, A³/B, A/BおよびB/B, No.4; B/B, A²/A², A/BおよびA/B, No.5; B/B, A²/A², A/AおよびB/B, No.6; B/B, A¹/B, A/BおよびA/A, No.7; B/B, A¹/A², A/AおよびA/B], および任意に個別別脱脂乳を混合したサンプル(混合脱脂乳)を用いた。

定量に供する事ができると思われた10種のmAb

を使用して, 倍数希釈された標品を用いて反応性を調べ, 回帰式を算出し, 標準曲線を作成した。この標準曲線を用いて任意に選択した個別別脱脂乳20例の乳蛋白質含量を算出し, その平均値を求めた。

結果および考察

はじめに, 4-8倍に希釈した培養上清中の抗体と拮抗的に結合することのできる抗原希釈率を検索するため, 倍数希釈した混合脱脂乳を抗原として, 反応性を測定した。その結果, 明確な発色が認められた18種のmAbで, それぞれ16-32,000倍希釈の間で吸光度が最高となった。図1はB β -Lgs2株の培養上清を用い, 倍数希釈した脱脂乳との反応性を示したものである。このmAbの場合, 16,000倍希釈において反応性のピークが認められた。このように反応ピークが認められた脱脂乳希釈率を各mAbに対する最適脱脂乳希釈率とした(表1)。

ウエスタンブロットングアッセイではいずれのmAbでも各抗原成分に反応を示していたが, ELISA法では反応を示さなかったmAbが4種認められた。

表1 各mAbに対する最適脱脂乳希釈倍率と最適pH

mAb産生細胞株	mAb希釈倍率	発色時間(分)*1	最適脱脂乳希釈倍率	最適pH	備考
B α -Cn1	×4	30	×2,000	—	*3
C α -Cn2	×8	15	×16,000	8.2	
B β -Cn1	×8	30	×200	—	*3
B β -Cn2	×8	—	—	—	*2
B β -Cns3	×8	30	×1,600	8.6	
C β -Cn1	×8	30	×32,000	—	*3
C β -Cn3	×8	30	×32,000	—	*3
C β -Cn4	×8	30	×16,000	8.2	
C β -Cns5	×8	30	×32,000	8.2	
B κ -Cn1	×8	30	×16	—	*3
B κ -Cns3	×8	30	×32,000	6.6	
C κ -Cn1	×8	—	—	—	*2
C κ -Cn2	×8	—	—	—	*2
C κ -Cn3	×8	30	×32,000	—	*3
C κ -Cns4	×8	30	×32,000	—	*3
C κ -Cns5	×8	15	×32,000	6.6	
B β -Lgs1	×8	—	—	—	*2
B β -Lgs2	×8	30	×16,000	8.2	
B β -Lgs3	×8	30	×16,000	—	*3
B β -Lgs5	×8	30	×16,000	8.2	
B β -Lgs7	×8	30	×16,000	8.2	
B β -Lgs8	×8	30	×16,000	—	*3
C β -Lg1	×4	30	×16	—	*3
C β -Lgs2	×8	30	×16,000	8.2	
C β -Lgs3	×8	30	×32,000	—	*3
C β -Lgs4	×8	30	×16	—	*3

*1 AP基質溶液を入れてから十分な発色が見られるまでの時間

*2 脱脂乳希釈倍率決定時に十分な発色が得られなかったもの

*3 最適pHが認められなかったもの

これらは以下の実験には用いなかった。

次に、抗原抗体反応に及ぼす pH の影響を調べた結果、抗 α_{S1} -Cn mAb では 1 種、抗 β -Cn mAb では 3 種、抗 κ -Cn mAb では 2 種および抗 β -Lg mAb では 4 種で抗原サンプル No.1-7 および混合脱脂乳ともに特定 pH で反応がピークを示した（それぞれ pH 8.2, pH 8.2-8.6, pH 6.6 および pH 8.2）。このような mAb は免疫化学的手法を用いた定量に有用であると思われた。図 2 は $B\beta$ -Lgs 2 株の産生 mAb の反応を示したものであるが、供試抗原サンプルの全てにおいて pH 8.2 で反応がピークを示した。このピーク時の pH を各 mAb の最適 pH とした。一方、mAb によっては抗原により反応性が異なっていたために、最適 pH が決定されなかったものが認められた。

表 2 に各 mAb の回帰式と相関係数および検出値を示した。今回算出された検出値は、pH を考慮しない場合（平山と横濱，1997）と比較すると、 α_{S1} -Cn を除き 2.3-1,600 倍の感度の上昇が認められた。

pH の影響を調べる試験において、mAb 間で反応性が極めて類似したものが認められた。図 3 および図 4 は $C\kappa$ -Cn 3 および $C\kappa$ -Cns 4 株の産生 mAb 反応性の pH 依存性を示したものである。また $B\beta$ -Lgs 2, $B\beta$ -Lgs 7 および $C\beta$ -Lgs 2 株産生 mAb 間においても同

様の反応性が認められた。

抗原によって最大反応ピークを示す pH が異なっていた mAb の中には、 $C\kappa$ -Cn 3, $C\kappa$ -Cns 4 および $B\beta$ -Lgs 3 のように供試乳サンプルを反応性の違いから 2-3 種類に分類できたものが認められた。例えば $B\beta$ -Lgs 3 産生 mAb では、3 種類の抗原サンプル群に分類できた（図 5）。この mAb では pH 8.2 において吸

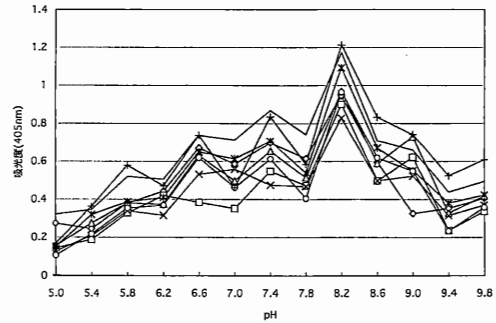


図 2 $B\beta$ -Lgs 2 株培養上清による反応の pH 依存性
発色時間；30 分

◇ 混合脱脂乳 □ No.1 ▲ No.2 × No.3
* No.4 ○ No.5 + No.6 — No.7

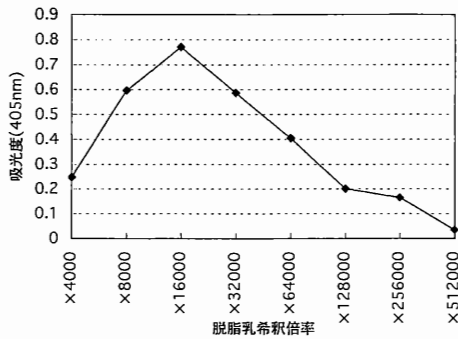


図 1 $B\beta$ -Lgs 2 株培養上清と倍数希釈された
脱脂乳との反応性
発色時間；30 分

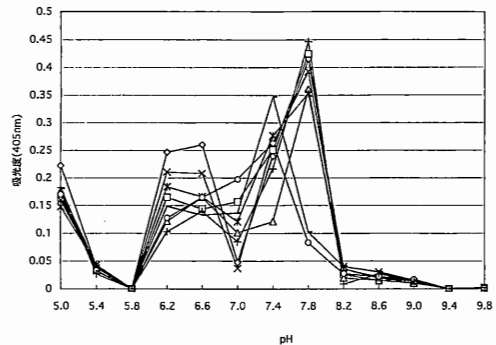


図 3 $C\kappa$ -Cn 3 株培養上清による反応の pH 依存性
発色時間；30 分

◇ 混合脱脂乳 □ No.1 ▲ No.2 × No.3
* No.4 ○ No.5 + No.6 — No.7

表 2 最適 pH による乳蛋白質の回帰式とその mAb の検出値

抗体産生株 (発色時間) 最適 pH	回帰式	相関係数	検出値 (mg/ml) \pm S.E.
$C\alpha$ -Cn2 (15min) pH8.2	$Y=0.2229+24.1076X$	$r=0.9803$	$(0.7234\pm 7.34)\times 10^{-3}$
$B\beta$ -Cns3 (30min) pH8.6	$Y=0.1559+10.1372X$	$r=0.9797$	$(0.0439\pm 2.32)\times 10^{-3}$
$C\beta$ -Cn4 (30min) pH8.2	$Y=0.1089+33.2138X$	$r=0.9793$	$(0.4061\pm 1.15)\times 10^{-2}$
$C\beta$ -Cns5 (30min) pH8.2	$Y=0.1414+36.1450X$	$r=0.9748$	$(0.9476\pm 2.23)\times 10^{-2}$
$B\kappa$ -Cns3 (30min) pH6.6	$Y=0.1901+7.3531X$	$r=0.9481$	$(4.6271\pm 7.40)\times 10^{-2}$
$C\kappa$ -Cns5 (15min) pH6.6	$Y=0.2409+29.7931X$	$r=0.9567$	$(0.1926\pm 1.45)\times 10^{-2}$
$B\beta$ -Lgs2 (30min) pH8.2	$Y=0.2107+28.3553X$	$r=0.9629$	$(0.1383\pm 1.13)\times 10^{-2}$
$B\beta$ -Lgs5 (30min) pH8.2	$Y=0.1028+22.6439X$	$r=0.9761$	$(0.0920\pm 9.69)\times 10^{-3}$
$B\beta$ -Lgs7 (30min) pH8.2	$Y=0.0529+19.2044X$	$r=0.9864$	$(0.1322\pm 1.90)\times 10^{-2}$
$C\beta$ -Lgs2 (30min) pH8.2	$Y=0.0692+18.3322X$	$r=0.9819$	$(0.1902\pm 1.43)\times 10^{-2}$

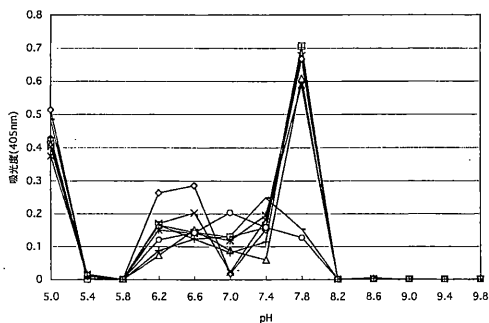


図4 C κ -Cns 4株培養上清による反応のpH依存性
発色時間；30分

◇混合脱脂乳 □No.1 △No.2 ×No.3
*No.4 ○No.5 +No.6 —No.7

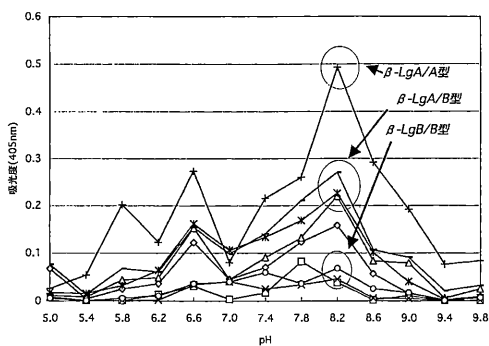


図5 B β -Lgs 3株培養上清による反応のpH依存性
発色時間；30分

◇混合脱脂乳 □No.1 △No.2 ×No.3
*No.4 ○No.5 +No.6 —No.7

光度の高い群から β -LgA/A型、次いで A/B型の群、
B/B型の群となっていたため、 β -LgAの遺伝的形質
を認識している mAb と確認できた。

文 献

GIBSON, J, P (1990) Is there profit in a protein gene.
Holstein Journal, 12: 29.

平山博樹・横濱道成 (1997) ウシ乳蛋白質の免疫化学
的定量. 北畜会報, 39: 11-14.

上野川修一・菅野長右エ門・細野明義 編 (1994) ミ
ルクのサイエンス. 第1版. 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 polymor-
phism on coagulation properties of milk. J. Dairy
Sci., 69: 1793-1798.

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. K. 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.

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) 尿素化等電点電気泳動法
による牛乳蛋白質多型の検出. 北畜会報. 38: 19-22.