等電点電気泳動法および免疫ブロット法による 羊 β -lactoglobulin の型判定

角田健司・高橋德行*・黒沢弥悦**

昭和大学医学部・東京都 142

* 小岩井農牧株式会社小岩井農場・雫石町 020-05

** 東京農業大学家畜血清学研究所・東京都 156

(1993年9月21日受理)

緒 言

羊乳における β -lactoglobulin (β -Lg) の遺伝的多型は澱粉ゲル電気泳動法を用い BELL and MCKENZIE¹⁾ によって発見されたが、その構成成分の β -LgA と β -LgB の物理化学的および免疫学的性質に研究の主眼が置かれた²⁾。後に β -Lg の多型は KING³⁾ によって改めて彼らと同じ分析方法により A, AB および B の3つの遺伝的変異型として分類確認され、英国種でその出現頻度が調査された。さらにロシア⁴⁾、チェコスロバキア⁴⁾、ドイツ⁴⁾ およびイタリア系⁵⁾ などの羊においても同様の多型が確認され、いずれも澱粉ゲル電気泳動法によって分析された。近年では等電点電気泳動法の開発によって ERHARDT⁶⁾ はポリアクリルアミドゲルを支持体としてドイツやブルガリア系の羊の β -Lg の分析を試み、従来の変異成分の他に新たに β -LgC を発見し、A, AB, B, AC, BC および C の6種類の表現型を報告している。

β -Lg を始め乳蛋白変異は遺伝標識として集団の遺伝的分化⁷⁾ や乳製品、特にチーズの製造効率⁸⁾ との関係においてその有用性が注目されている。著者らはアジア系在来羊の遺伝的分化を調査しており^{9,10)}、従来の血液蛋白の他に新たに乳蛋白を対象に検討を行う予定であるが、わが国では羊の乳蛋白変異に対する分析方法が未だ確立して

いない。

本研究はその最初の試みとして羊乳中の β -Lg を薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法で分析し、免疫ブロット法を用いてその同定を試み、小岩井農場の Corriedale 系集団における β -Lg 型の出現頻度並びに遺伝子頻度を調査し若干の成績を得たので報告する。

材料および方法

羊乳：岩手県雫石町の小岩井農場で飼育されている Corriedale 系の雌羊 59 頭から乳試料を採取した。採乳時に防腐剤としてアジ化ナトリウムを添加し、終濃度を 0.05% にした。採取後、遠心分離して脱脂を行い、使用時まで -20°C に保存した。 β -Lg の泳動分析には乳清または脱脂乳を用いた。乳清の調製は脱脂乳 100 μl に酢酸を一滴加え、攪拌後、室温に 10 分放置し、遠心分離 (12000 $\times$ G, 10 分) して行った¹¹⁾。

抗牛 β -Lg 抗体の作製：牛 β -Lg (Sigma 社製) を抗原として Freund complete adjuvant (Yatoron 社製) で 5% (w/v) 乳濁液を作り、それを 1 mL, 3 週間間隔で 3 回家兎 (2.5 kg) に皮下注射した。

等電点電気泳動法 (IEF)：ポリアクリルアミドゲルを支持体として用い、その作製にはガラス板 (130 $\times$ 250 $\times$ 3 mm) にゲルサポート (アトー社製)

Jpn. J. Sheep Sci., 30 : 25~29, 1993

Phenotyping of Ovine β -Lactoglobulin by Isoelectric Focusing and Immunoblotting

Kenji TSUNODA, Noriyuki TAKAHASHI* and Yaetsu KUROSAWA**

Showa University School of Medicine, Tokyo 142

* Koiwai Noboku Kaisha, Ltd., Division of Koiwai Farm, Shizukuishi-cho 020-05

** Institute of Animal Serology, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156

を密着させ、その板の長辺の2箇所と短辺1箇所をコ字状にゲルサポートの上から絶縁テープ（厚さ0.2mm）を貼りゲル枠とした。その枠内に辻と梅村¹¹⁾の処方によるゲル調製溶液を注ぎ、その上をガラス板（130×250×2mm）で気泡が入らないように被せ、四方をクリップで止め、37℃に15分間放置してゲル化させた。被覆用のガラス板はゲルとの密着を防ぐため予めシラン処理（Repel-Silane, Pharmacia 社製）を施しておいた。泳動条件として陽極に0.2M酢酸、陰極に0.2M L-lysine を用い、150Vで30分予備通電を行った後、陽極から1cmの位置に試料添加した濾紙を置き、同じ定電圧で10分通電、濾紙を取り除き、さらに300-1000Vで80分通電させた。

β -Lgの検出：通常の蛋白染色法では、com-massie brilliant blue R250 (CBB) を用いて行った。免疫ブロット法では、泳動法のゲルの表面にディラポア膜（Millipore 社製、#GVHP 304 FO、孔径0.22 μ m）を密着させ、室温に30分放置して乳蛋白を転写させた。次いで膜をブロッキング溶液（0.1%ゼラチン、0.05% Tween 20）に15分間放置し、0.1% Tween 20を含む等張リン酸緩衝食塩水（pH 6.7, T-PBS）で3回洗浄した。さらに抗牛 β -Lg抗体を一次抗体とした溶液に膜を浸し一晩4℃に放置した。翌日、膜をT-PBSで3

回洗浄、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗家兎IgG抗体（Bio Rad 社製）の溶液に膜を浸し室温に2時間放置し、再度T-PBSで3回洗浄した。その後、3, 3'-diaminobenzine tetra-hydrochloride 液（3mg/6ml PBS）に3% H₂O₂ 60 μ lを加えた溶液に浸し β -Lgを検出した。

結果および考察

羊の乳清をIEF分析すると、図1(1)に示すような泳動像が得られた。易動度の全く異なる2本の濃染のmajor bandとそれに付随するような淡染のminor bandが観察された。Major bandについて、原点から陰極へ向かって易動度の遅いものをA、それよりも易動度の速いものを β と称した。そのband構成の違いにより、A、ABおよびB型の3種類の変異型が認められた。すなわち、A bandあるいはB bandのみから成るものをA型およびB型、その両方のbandから成るものをAB型とした。

これらの蛋白bandの種類に関して、BELL and MCKENZIE²⁾による抗牛 β -Lg抗体を用いた羊 β -Lgの血清学的同定法を参考に免疫ブロット法でその同定を試みた。その結果は図1(2)に示すとおりである。図1(1)で示された3種類の変異型とその主要な構成bandは免疫ブロット法によ

図1. 羊乳清中の β -lactoglobulinのポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動像

1: 蛋白染色法による場合

2: 免疫ブロット法による場合

る泳動像と極めて類似していた。従って、これらの乳清蛋白 band は牛の β -Lg と共通性抗原を持つものであり、その変異型も従来から指摘されている羊の β -Lg 型に相当するものと考えられた。他に CBB による蛋白染色法では検出されない band が数本観察された。しかし、これらが β -Lg であるのかあるいは非特異的に検出されたものかどうかについては明らかでなかった。なお ERHARDT⁵⁾ が発見した β -LgC に相当するような band は検出されなかった。

羊の脱脂乳を直接 IEF 分析に供試したところ、図 2 (1) に示すように casein を含む多数の band が検出された。その中で β -Lg に相当するものは、図 2 (2) の免疫プロット法による泳動法でも示されるように陰極側に向かって比較的易動度の速い位置に認められた。しかも変異型の band パターンともよく一致していた。

乳清を用いた β -Lg の IEF 分析において、本法と ERHARDT⁶⁾ の方法とでは蛋白の分離像に違いが認められた。本法では図 1 (1) に示すように β -Lg が明瞭に分離されたが、後者の方法では band が多数分離され、 β -Lg と β -lactoalbumin の分子形が混成状態を示していた。そのため

β -Lg 型の判定が容易でないように思われた。これは恐らくゲル中の 4 種類の carrier ampholyte のうち、両方法で共通して使われた 3 種類、ampholyte (pH 4.2-4.9), servalyte (pH3-5) および servalyte (pH 4-6) の使用量が互いに異なり、そのため分離能に違いが生じたのではないかと推測される。従って、 β -Lg 型の判定には本法の方がより優れているものと思われる。

羊品種集団における β -Lg 型の出現状況に関して、今回は小岩井農場の Corriedale 系集団を対象に調べた。その結果、59 例中 A 型 30 例 (51%)、AB 型 25 例 (42%)、B 型 4 例 (7%) であり、A 型および AB 型の出現頻度が圧倒的に高かった。この集団の表現型の分布について、2 つの共優性対立遺伝子、 β -Lg^A および β -Lg^B を仮定した場合、その表現型頻度の観察値と期待値 (A 型 30.6, AB 型 23.8, B 型 4.6) を比較するため χ^2 検定を行ったところ、 $\chi^2=0.1505$ (df=1), $0.5 < p < 0.7$ で、差が認められなかった。よってこの集団における β -Lg の多型頻度の場合には HARDY - WEINBERG の法則によく適合していた。またその遺伝子頻度は表 1 に示すような値となり、 β -Lg^A 遺伝子が β -Lg^B 遺伝子より約 2.6 倍も高頻度で

図 2. 羊の脱脂乳を用いた時の β -lactoglobulin のポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動像
1: 蛋白染色法による場合
2: 免疫プロット法による場合

表 1. 各種綿羊における β -lactoglobulin 座位の遺伝子頻度

品 種	調 査 国	調査頭数	β -Lg ^A	β -Lg ^B	β -Lg ^C	
Corriedale	ニ ホ シ	59	0.720	0.280	0	本研究
Clun Forest	イ ギ リ ス	174	0.802	0.198	—	KING ³⁾
Welsh	”	110	0.614	0.386	—	”
Stavropol Merino	チェコスロバキア	304	0.758	0.242	—	MACHA & NOVACKOVA ⁴⁾
Mutton Merino	”	126	0.905	0.095	—	”
Tsigai	”	129	0.585	0.415	—	”
Improved Wallachian	”	61	0.836	0.164	—	”
Massa	イ タ リ ア	54	0.528	0.472	—	RUSO <i>et al.</i> ⁵⁾
Sardinian	”	72	0.465	0.535	—	”
Merinoland	ド イ ツ	189	0.579	0.246	0.175	ERHARDT ⁶⁾
Black Faced Mutton sheep	”	145	0.848	0.152	0	”
East Friesian Milk sheep	”	89	0.770	0.230	0	”
Rhon	”	34	0.324	0.676	0	”
Pleven	”	36	0.528	0.472	0	”

— 記載なし

あった。

これまでに報告されたヨーロッパの各国における主な品種の β -Lg 座位の遺伝子頻度を参考までに表 1 に一括して示したが、Corriedale のデータはどこからも報告されておらず、今回のものと比較できなかった。各国の主な品種の β -Lg 座位の遺伝子頻度構成をみると β -Lg^A 遺伝子への偏り傾向が目立ち、本調査の Corriedale 系もそれに類似していた。今回調査した羊の品種集団は極めて僅かで、国内での他品種との相互比較ができなかった。今後の課題として品種集団を増やすと同時に各種 casein 蛋白の多型分析を行い、羊の品種分化の解析における乳蛋白変異の有効性を追究する予定である。

要 約

羊乳中の β -Lg の遺伝的多型を検索するため薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法および免疫ブロット法を用いて乳清および脱脂乳の蛋白分析を行った。いずれの乳試料を用いても 3 種類の変異型 (A, AB, B) が認められ、その構成成分は抗牛 β -Lg 抗体による免疫ブロット法で β -Lg であることが判明した。小岩井農場の Corriedale 系集団において β -Lg 型の表現型頻度は A 型 51%, AB 型 42% および B 型 7% であり、遺伝子頻度は β -Lg^A 遺伝子が 0.720, そして β -Lg^B 遺伝子が 0.280 であった。

文 献

- 1) BELL, K. and H.A. MCKENZIE, β -Lactoglobulins. *Nature*, **204** : 1275-1279. 1964.
- 2) BELL, K. and H.A. MCKENZIE, The whey proteins of ovine milk : β -lactoglobulins A and B. *Biochim. Biophys. Acta.* **147** : 123-134. 1967.
- 3) KING, J.W.B., The distribution of sheep β -lactoglobulins. *Anim. Prod.*, **11** : 53-57. 1969.
- 4) MACHA, J. and I. NOVACKOVA, Genetic polymorphism of beta-lactoglobulin in sheep. *Zivocisna Vyroba.*, **19** : 883-888. 1974.
- 5) RUSSO, V., R. DAVOLI and L. MIGLIORI, Genetic polymorphism of milk proteins in Massa and Sardinian ewes. *Zoot. Nutr. Anim.*, **7** : 421-428. 1981.
- 6) ERHARDT, G., Evidence for a third allele at the β -lactoglobulin (β -Lg) locus of sheep milk and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*, **20** : 197-204. 1989.
- 7) KAWAMOTO, Y., T. NAMIKAWA, A. ADACHI, T. AMANO, T. SHOTAKE, T. NISHIDA, Y. HAYASHI, B. KATTEL and H.B. RAJUBANDARY, A population genetic study on yaks, cattle and their hybrids in Nepal using milk protein variations. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **63** : 563-575. 1992.
- 8) MARZIALI, A.S. and K.F. NG-KWAI-HANG, Effects of milk composition and genetic polymorphism on coagulation properties of milk. *J.*

- Dairy Sci.*, **69** : 1793-1798. 1986.
- 9) TSUNODA, K., T. AMANO, K. NOZAWA and M.A. HASNATH, Genetic characteristics of Bangladeshi sheep as based on biochemical variations. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **61** : 54-66. 1990.
- 10) TSUNODA, K., K. DOGE, Y. YAMAMOTO, T. NAMIKAWA, T. AMANO, Y. KUROSAWA, T. SHOTAKE, T. NISHIDA and H.B. RAJBHANDARY, Biochemical polymorphisms of Nepalese native sheep breeds. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **64** : 1051-1059. 1993.
- 11) 辻莊一・榎村宙子, 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. 1987.