

牛周産期代謝障害発症予測マーカー確立に関する基盤研究 －血中アポリポ蛋白質の生化学的解析－

高橋雄治

A base study about cow perinatal period metabolism disorder onset
prediction marker establishment.
- Biochemical analysis of blood apolipoprotein -

Yuji TAKAHASHI

第1章 緒言

現在の家畜生産は、高度に進展した家畜の基礎科学と家畜飼養技術の発展に伴って大きく改善されてきた。しかし、高度な生産性追求や消費者の畜産物に対する高品質化志向に対応するために、過度あるいは不適切な濃厚飼料給与などといった家畜の生理的限界に近い状態で飼養される場面が多く見られる現状にある。その結果として、生体の栄養代謝調節機構に失調をもたらす、いわゆる代謝障害が多発しており、乳牛も例外ではない。乳牛における代謝障害の発生はそのほとんどが分娩前後に集中し、その主な原因は周産期における飼料摂取と乳汁生産に基づく「負のエネルギーバランス」にあると考えられている。脂肪組織からの大量の遊離脂肪酸の放出は、肝臓での処理能力を超え、余剰脂肪酸をトリグリセリドの形で蓄積することになる。分娩後、肝臓に脂肪が貯留すること自体はある程度生理的なものと考えられているが、分娩前の過肥や分娩のストレスなどによって脂肪の蓄積は増大し、ついには脂肪肝となり肝機能低下を引き起こす。さらに、脂肪肝を呈した牛は出産前後に発生する多くの疾病に罹りやすくなることが知られている。

乳牛の周産期疾病の予防には、生体内の代謝状態を端的に示す生化学的診断マーカーが必須である。特に周産期疾病には、前述のように脂質代謝が大きくかかわっていることから、血中のリポ蛋白質の代謝変動をモニタリングすることが周産期疾病の診断に有効であることが報告されている。すなわち、高密度リポ蛋白（HDL）の主要アポリポ蛋白質であるアポA-Iや、低密度リポ蛋白（LDL）

のアポB100は肝臓の脂肪蓄積に伴いその血中濃度が低下すること、したがって、脂肪肝を引き金とした周産期疾病の診断に有効である可能性が報告されている。しかし、アポA-I、アポBは、共に測定値と疾病罹患率の相関が低く、現場レベルでの応用には適切ではない。また、これらの因子の動態測定は、周産期疾病の診断には有効であるものの、疾病発症予測のマーカーとしての有効性は低い。すなわち、現場レベルで応用可能な、乳牛の周産期疾病発症を予察できる血中代謝マーカーの確立が、酪農現場で切望されている。

本研究では、乳牛の代謝障害予測マーカー、特に周産期疾病を予測するマーカーを開発するため、未だその存在が報告されていない乳牛の血中に存在する微量アポリポ蛋白質に着目して、蛋白質の同定とその代謝変動を解析し、周産期代謝障害発症予測マーカーとしての有用性を検討した。

第2章 牛の脂質代謝の特徴と周産期代謝障害発症予測マーカーの検索

本章では、乳牛の乳期別における血中脂質代謝の変動とアポリポ蛋白質のSDS-PAGE解析を行い、ヒトとは異なる特異的栄養代謝を持つ乳牛の周産期代謝障害発症予測マーカーを検索するための基礎情報を得ることを試みた。さらに、周産期疾病の主な原因は、摂取栄養・エネルギーの不足に起因する肝臓への脂肪蓄積であることが知られているので、牛における臨床上の脂肪肝のモデル実験系としてよく使用される絶食処理を用いて、アポ

リポ蛋白質のSDS-PAGE解析を行い、周産期代謝障害発症予測マーカーの候補蛋白質の検索を行った。

乳牛の乳期別に血中脂質成分の推移を調べた結果、乾乳期に比べてコレステロール、リン脂質は2倍と有意に増加するのに対して、トリグリセリドは逆に約半分に有意に減少 ($P < 0.05$) した。この現象をさらに詳細に検討するため、血清をゲルろ過で分画し、コレステロールおよびトリグリセリド濃度を測定した。その結果、泌乳期では乾乳期に比べ、VLDLトリグリセリドが大きく減少し、LDLコレステロールには大きな影響は認められないものの、HDLコレステロールは泌乳期で増加した。すなわち、乾乳期と泌乳期ではVLDLとHDLの血中濃度、そしてVLDLとHDLの比率が大きく変動していることが明らかとなった。よって、本研究の目的である乳牛の周産期代謝障害発症予測マーカーを、VLDLおよびHDLの代謝系から抽出できる可能性が示唆された。

そこで、牛アポリポ蛋白質のSDS-PAGE解析を行った。牛リポ蛋白中にはアポB100とアポA-Iとが圧倒的に多い。このため、アポB100とアポA-Iに関する検討が進められてきた一方で、他の微量アポリポ蛋白質についての研究は、これまで着手されていなかった。各リポ蛋白画分の微量アポリポ蛋白質について観察すると、VLDLおよびLDL中には微量蛋白質のバンドは検出されなかったが、HDL中に42kDa、43kDaの未知の分子を検出することができた。さらに、絶食処理により誘導した脂肪肝のモデル牛を用いてアポリポ蛋白質のSDS-PAGE解析を行ったところ、VLDL中に絶食により顕著に増加する蛋白質のバンドが検出された。よって、以下の章では、本実験で検出された未知のアポリポ蛋白質の詳細な解析を進めることにした。

第3章 牛アポリポ蛋白質A-IVの同定とその動態

前章で検出されたアポリポ蛋白質のうち、まずHDL中に存在する42 kDa、43 kDaの蛋白質を同定することを試みた。アミノ酸シーケンサーによりN末端アミノ酸配列を分析した。その結果、42 kDaはアポA-IV、43 kDaはParaoxonase/Arylesteraseであることが明らかとなった。43 kDaのParaoxonase/Arylesteraseに関しては、その存在がすでに報告されており、脂質代謝とは関係のない蛋白質であることから、本研究では、未だ報告されていないアポA-IVに関しての解析と、その定量化に取り組んだ。

まず、牛血中アポA-IV定量法の確立のため、SDS-PAGEのゲルからアポA-IVを抽出した。次にウサギ抗血清を作成し、ブロッキングによりその特異性を確認した。

その後、作製した抗体とビオチンラベルした精製牛アポA-IV抗体を用いたサンドイッチELISAによる定量法を確立した。また、尿素を用いることにより定量の感度を高めることに成功した。

次に、本研究で確立したELISAにより、牛血中アポA-IV濃度の代謝変動とリポ蛋白分布を検討した。乳牛の乳期別における血中アポA-IV濃度の変動を検討したところ、乾乳期に比べて泌乳初期、中期、後期で有意に上昇した ($p < 0.05$)。絶食条件では、絶食開始3日、および4日目まで血中アポA-IV濃度が有意に低下した ($p < 0.05$)。アポA-IVのリポ蛋白分布は、ゲルろ過ではHDLと非リポ蛋白画分の両者に溶出されたが、超遠心では、非リポ蛋白画分に90%が回収された。よって、牛アポA-IVは超遠心により容易にリポ蛋白から外れると考えられた。

以上の結果より、牛血中にアポA-IVを初めて同定し、その血中動態が周産期における代謝変動に応答していることから、牛アポA-IVが、周産期代謝障害発症予測マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

第4章 牛アポリポ蛋白質Eの同定とその動態

第2章で検出された、絶食によりVLDL中に増加した未知の蛋白質を、アポA-IVと同様にN末アミノ酸配列分析により同定した。その結果、すでにその遺伝子配列が同定されている牛アポEのアミノ酸配列と完全に一致した。これまでの牛アポEの報告では、血中では検出できないとする報告が多く、遺伝子が存在しても生体内では機能していない蛋白質であると考えられていた。しかし、本研究で初めて牛血中での存在を同定することができた。

次に、牛アポEを分離・精製した。精製した牛アポEを抗原として、ウサギ抗血清を作成し、アポA-IVと同様にサンドイッチELISAによる牛アポE定量法を確立した。血中アポE濃度は絶食により有意に増加した ($P < 0.05$)。次に、乳牛の乳期別の変動を検討したところ、アポA-IVと同様に、血中アポE濃度は乾乳期に較べて泌乳初期、中期、後期で有意に上昇した ($p < 0.05$)。

ゲルろ過で分離した各リポ蛋白画分におけるアポEの分布を検討したところ、HDL領域に溶出されるアポEが、泌乳期では顕著に増加した。一方、超遠心により各リポ蛋白画分を分離すると、HDL画分に存在するアポE量は乾乳期に比べ泌乳期で有意に増加するものの、泌乳期におけるアポEが存在する画分は、そのほとんどがLDL画分と非リポ蛋白画分であった。この結果をさらに詳細に検討するために、アガロース電気泳動により血中リポ蛋白を分離し、抗体によりアポEの局在性を検討した結果、

牛アポEはHDL領域である α 位に存在せず、LDL領域である β 位と非リポ蛋白領域にシグナルが認められた。これは、ラットの血液で同様の試験を行った結果とは、まったく異なるものであった。さらに、非リポ蛋白画分に存在するアポEの粒子の形状を検討するために、ゲルろ過と、アポEと親和性のあるHeparinカラムを用いて、非リポ蛋白画分のアポEを分離した。そのコレステロール量を測定したところ、非リポ蛋白画分のアポEは脂質をほとんど保有していない形状で存在することが明らかとなった。

以上の結果より、本研究で、牛アポEを血中で初めて同定することに成功し、絶食・泌乳などの代謝変動にตอบสนองして血中濃度の変動することが明らかとなった。さらに、牛アポEは、ヒトやラットなどとは異なり、HDL粒子上に局在するものは少なく、脂質をほとんど含有しない形状で存在することが明らかとなった。

第5章 培養肝細胞における牛アポリポ蛋白質Eの分泌

アポEは体内の様々な組織で合成されるが、血中の主要な供給源は肝臓であることがラットやヒトで確認されている。前章で、牛アポEは脂質をほとんど保有しない形状で血中に存在することが明らかとなった。そこで、本章では牛の肝実質細胞からのアポE分泌形態を検討し、牛アポEの分泌特性をさらに明らかにすることを試みた。

まず、牛の初代培養肝細胞からアポEが分泌されることをウェスタンブロッティングにより確認した。また、アポEの培地中への分泌量は培養2日目まで直線的に増加した。次に、肝細胞からのアポE分泌形態を調べるため、ゲルろ過と超遠心を用いてリポ蛋白に分離した。ゲルろ過ではHDLの位置に溶出した。しかし、超遠心では*in vivo*と同様、大半のアポEが非リポ蛋白画分に回収された。そこで、培養液中に分泌されたアポE含有粒子を、超遠心を使わずにHeparinカラムとゲルろ過により分離した。精製した粒子にはアポE以外のアポ蛋白がなく、脂質はほとんど含まれていなかった。これらの結果より、牛アポEは肝細胞から単独の脂質 poor の形で分泌される事が示唆された。

さらに、*in vivo*における絶食状態を肝細胞培養系で再現するため、培地に脂肪酸を添加して、実験的に脂肪蓄積を増加させた肝細胞を作出した。その結果、培養上清中のアポE分泌量は添加1mMまで脂肪酸濃度依存的に増加した。また、培地中への脂肪酸の添加により、VLDL領域のアポE量の増加を確認した。

以上の結果から、牛アポEは、肝実質細胞から単独の脂質 poor の形で分泌され、血中脂肪酸濃度の上昇に伴

う肝細胞への脂質蓄積を直接反映して、その分泌が制御されていることが明らかとなり、牛における肝臓の状態を良く反映する代謝障害発症予測マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

第6章 乳牛の分娩前後における血中成分とマーカー蛋白質の変動解析

—周産期代謝障害発症予測マーカーとしての応用—

これまでの章において、2種類の代謝障害発症予測マーカーの候補を選出することができた。そこで、本章では、実際に選出したマーカーを用いて周産期疾病に罹患しやすい個体を分娩前に識別することが可能か否かを検討した。

試験には、泌乳牛18頭を供試し、2週間間隔で分娩前後の2ヶ月間採血を行い、脂質成分と選出したアポ蛋白濃度（アポA-IVおよびアポE）を測定した。急性乳房炎および産熱を発症し廃用となった1個体で分娩後における血中総コレステロールおよびリン脂質濃度の上昇が見られなかった。また、同じく急性乳房炎で廃用となった1個体にも血中総コレステロールおよびリン脂質濃度が低い傾向が認められた。この結果は、血中コレステロールとリン脂質濃度が、廃用牛で分娩後に低くなるこのこれまでの報告を再現していた。しかし、コレステロール・リン脂質の分娩前の値はいずれの個体においても、正常個体と大きな差異は見出せず、コレステロール・リン脂質濃度は周産期代謝障害発症予測マーカーとしては適していないことが示された。

血中アポA-IV濃度は、廃用牛2頭で分娩前後のすべての期間を通じて低値の傾向が見られた。特に分娩前6週から分娩後2週まで他の牛に比較して低い値を示した。一方、廃用牛2頭の血中アポE濃度は、他の牛に比べて特徴的な変動を示し、分娩前2週間以内の時点で一過性の上昇と分娩直後の急低下が見られた。したがって、実用レベルで分娩前に周産期代謝障害発生を予測する観点から考えると、アポA-IVは分娩前6週から分娩まで、アポEは分娩前2週間以内に測定することが有効であることが示唆された。

第7章 総括

本研究は、現在の酪農現場において大きな問題となっている周産期の代謝障害の発生を予測するマーカーを開発するための基盤研究である。まず、これまで報告されていない牛の微量アポリポ蛋白質A-IVおよびEについて、蛋白質の同定と抗血清の作出、ELISAによる測定

系を確立した。この測定系を用いてリポ蛋白画分における分布を調べ、アポEは肝臓からアポE単独の脂質 poor の形で分泌されている牛独自の代謝特性が存在することを明らかにした。両アポリポ蛋白共に血中濃度は栄養状態の影響を受け、泌乳では共に増加、絶食ではアポA-IVが低下、アポEが増加する変動を示した。最後に、分娩前後の血中成分推移において、廃用となった牛のアポEが分娩前に一過性に上昇したこと、アポA-IVが分娩前から低値を示したことは、両アポリポ蛋白が分娩後の周産期疾病発生予察の新規マーカーとなりえることを示している。

家畜や畜産食品の生産性と安全性の向上が切望されているにもかかわらず、ほとんどの家畜が様々な代謝障害発生の危険にさらされている状況にある。本研究で明らかにした乳牛の周産期代謝障害発生予測マーカーとしてのアポ蛋白の有用性に関する知見は、牛のみならず、豚、鶏といった家畜の代謝障害の診断と予防対策の進展にも寄与できるものと考えられる。

東北大学大学院農学研究科 農学博士
平成19年3月1日授与