

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	山本 登志子
調査研究課題	乳腺炎の早期診断マーカーの検討と乳腺炎の予防ならびに軽減のための基礎的研究					
調査研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	山本 登志子	栄養学科・准教授		生化学	研究総括, 実施全般
	分担者	岡崎 愉加	看護学科・准教授		助産学	助産診断, 統計処理
調査研究実績の概要	<p>私達は、乳房炎に罹患した乳牛の乳汁中に、プロスタグランジン (PG) D₂とそれを作る酵素 (PGD合成酵素) が多量に存在し、高い酵素活性が保持されていることを見出した。そこで、以下の手順に従い、PGD合成酵素の精製を試みた。ウシ生乳からホエイタンパク質を調製し、60-80%硫酸沈殿画分を採取した。その後、DEAE-Sepharoseと phenyl-Sepharoseのカラムクロマトグラフィにより、約1600倍精製されたほぼ均一な酵素タンパク質を得た。精製酵素の部分アミノ酸分析より、本酵素は、シグナルペプチド28残基が切断されたウシのリポカリン型PGD合成酵素 (L-PGDS) であると同定された。さらに、その反応速度を解析したところ、PGH₂に対するK_m値は37・・M、最大酵素活性は1.4・mol・min⁻¹・mg⁻¹で、至適pH9.0であることがわかった。また、本酵素は、60-80°C、10分間の加熱において、80%以上の活性が維持されていた。加えて、24時間のペプシンやトリプシンの処理でも活性が維持されており、プロテアーゼ抵抗性を示した。このことから、生乳中L-PGDSは酵素として機能し、牛乳として摂取した後の生体内でもPGD₂産生に寄与する可能性が示された。このことは、乳房炎の牛乳摂取は、アレルギー炎症促進因子であるPGD₂を多く生体内に取り込む恐れがあり、今後生乳中L-PGDS/PGD₂とアレルギーとの関連についても検討しなければならない。</p> <p>さらに、本酵素が特に乳房炎の生乳中で高い活性を示したことから、乳房炎のバイオマーカーとしての有用性について、検討を行った。精製酵素を標準品として、ウエスタンブロット法から生乳中のL-PGDS含有量を定量することが可能となった。その方法で27検体の生乳に含有されるL-PGDS量を定量し、一般的な乳房炎の指標とされる体細胞数を比較したところ、一定の相関性を示し、L-PGDSが新規な乳房炎のバイオマーカーとなり得ることが推定された。さらに、生乳中の各種脂質メディエーターを液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS/MS)によって定量し、比較したところ、炎症惹起に関わるPGE₂やPGD₂とは、体細胞数よりもむしろL-PGDS含有量の方が高い相関性を示し、ウシ生乳L-PGDSはより早期で直接的な乳房炎のバイオマーカーになり得ることが示唆された。</p>					

<p>調査研究実績 の概要</p>	<p>PGD₂は、炎症性生理活性脂質の一つで、炎症惹起に関わる物質であり、合成酵素のL-PGDSはその構造上の性質から細胞外へ分泌される。これまでに、L-PGDSはヒトやラットの脳脊髄液や精液、卵白中などに分泌することが報告されている。私達の研究から、ウシ乳房炎でも、生乳中のL-PGDSの分泌上昇が認められた。ヒト乳腺炎は、ウシ乳房炎と同様の発症機序と症状をもつ疾患である。ヒト乳腺炎の悪化は、乳汁分泌量の低下のみならず、質の低下も懸念され、胎児におよぼす影響も重大である。ヒト乳腺におけるL-PGDSならびに乳汁中脂質メディエーターのバランスの低下などを検討するために、L-PGDS検出法ならびに脂質抽出法の構築を行った。今後さらにサンプルを採取しヒト乳腺炎とL-PGDSならびに脂質メディエーターの関係について検討する予定である。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 川井恵理佳, 田中充樹, 瀬来由衣, 戸田圭祐, 目賀拓斗, 川上祐生, 高橋吉孝, 木本眞順美, 山本圭, 村上誠, 山本登志子. ウシ生乳由来リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の精製と酵素学的性質. <i>第70回 日本栄養・食糧学会大会要旨集, 2016.</i> 2. Suzuki-Yamamoto, T., Tanaka, M., Kawai E., Toda, K.¹ Mega, T., Kawakami, Y., Takahashi, Y., Yamamoto, K., Murakami, M. Purification and characterization of bovine lipocalin-type prostaglandin D synthase from cow's raw milk. 57th International Conference on the Bioscience of Lipids. Abstract 97, 2016. 3. 川井恵理佳, 田中充樹, 戸田圭祐, 目賀拓斗, 川上祐生, 高橋吉孝, 木本眞順美, 山本登志子. ウシ生乳中リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素の精製と酵素学的性質ならびに乳房炎のバイオマーカーとしての検討. <i>日本農芸化学会 2017 要旨集, 2017.</i>