

【研究報告】

ウシラクトフェリンに対する数種のモノクローナル抗体

新本洋士^{1,2}・西川友貴¹・笹川なつ実²・長縄康範^{1,2}

要 約

インタクトなウシラクトフェリンおよび還元カルボキシメチル化したウシラクトフェリンをマウスに免疫し、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを16クローン樹立した。固相合成ペプチドを用いたエピトープ解析の結果、4種のモノクローナル抗体はラクトフェリンのC-lobe側のそれぞれ異なる6~10アミノ酸長の配列に結合することが明らかになった。エピトープアミノ酸配列が明らかになった4種のモノクローナル抗体を用い、トリプシン消化したラクトフェリンのC末端側の断片を、ウェスタンブロット解析で検出することが可能であった。

キーワード：ラクトフェリン、モノクローナル抗体、アミノ酸配列

緒言

抗体を用いたタンパク質の検出法は、医学、薬学、生物学、農学などのさまざまな分野で用いられている (Rosner et al., 1991, Van Emon, 2001, Nagai et al., 2016, Gao et al., 2018)。組織内のタンパク質の局在を明らかにするための免疫染色、細胞表面マーカーを蛍光抗体で染色して定量するフローサイトメトリー、サイトカインなどの生理活性物質やアレルゲンタンパク質の定量における酵素免疫測定法、電気泳動と免疫反応を組み合わせたウェスタンブロット法、タンパク質の簡易検出に用いられるイムノクロマトグラフィー法などがある。

このような検出法には、ポリクローナル抗体が用いられる場合と、モノクローナル抗体が用いられる場合がある。ポリクローナル抗体は、抗原タンパク質をウサギやヤギのような動物に免疫し、血清から抗体を精製して用いる。ポリクローナル抗体は抗原タンパク質上の複数の抗体結合部位 (エピトープ) に結合する抗体の混合物である。これに対し、モノクローナル抗体は単一のエピトープのみに結合する (Kohler and Milstein, 1975)。

モノクローナル抗体は抗原タンパク質で免疫したマウスやラット、あるいはウサギのB細胞を骨髄腫細胞 (ミエローマ) と細胞融合することによって樹立したハイブリドーマと呼ばれる細胞が分泌する抗体である。ハイブリ

ドーマは無限増殖できるので、いったん樹立すれば、安定的にモノクローナル抗体を得ることができる。

本研究では、ウシラクトフェリンの構造を詳しく解析することを可能とするマウスモノクローナル抗体の作製を目的とした。インタクトなラクトフェリン、加熱や還元試薬、あるいはタンパク質分解酵素などによって変性したラクトフェリンを検出することを可能にするモノクローナル抗体である。このようなモノクローナル抗体のセットを揃えることによって、ウシラクトフェリンの検出がより正確で容易になることが期待される。

材料及び方法

1. 還元カルボキシメチル化ラクトフェリン (CMbLF) の調製

ウシラクトフェリン (bLF) はタツア・ジャパン社から恵与された。ふた付き試験管中で10 mgのbLFを1.4 mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 1 mLに溶解し、5% EDTA-2Na 100 μ L、尿素 1.2 g、2-メルカプトエタノール 33 μ Lを加え、さらに超純水で2.5 mLに定容した。試験管を窒素置換して密閉し、室温で1時間bLFを還元した。反応液にモノヨード酢酸89 mgを1 mol/L NaOH 300 μ Lに溶解して添加し、窒素置換後、遮光して室温で1時間カルボキシメチル化を行った。0.2 mol/L アンモニア水

¹ 玉川大学大学院農学研究科資源生物学専攻 東京都町田市玉川学園6-1-1

² 玉川大学農学部生命化学科 東京都町田市玉川学園6-1-1

責任著者：新本洋士 shnmt920@agr.tamagawa.ac.jp

溶液を移動相として、Sephadex G-50カラム (1.5x18 cm, GEヘルスケア・ジャパン) で脱塩し、約8 mgのカルボキシメチル化ウシラクトフェリンを得た (CMbLF)。

2. モノクローナル抗体分泌マウスハイブリドーマの作製

bLF溶液あるいはCMbLF溶液 (1 mg/mL) と等量のフロイント完全アジュバント (DIFCO, U.S.A.) を連結シリンジ中で乳化し、マウス (Balb/c, 雌性, 日本クレア) 腹腔内に免疫した。1週間後にアジュバントを含まないタンパク質溶液のみを追加免疫した。マウスを数日飼育後、ガス麻酔下で頸椎脱臼により屠殺し、無菌的に脾臓細胞を調製した。全脾臓細胞と 2×10^7 個のマウスミエローマSP2/Oをポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、10%牛胎児血清 (FCS, MERCK, ドイツ) を含むERDF培地 (極東製薬) に懸濁して96穴マイクロカルチャープレート4枚に播種した。播種翌日から10%FCS、ヒポキサンチン0.1 mmol/L、アミノプテリン0.0004 mmol/L、およびチミジン0.016 mmol/Lを含むHAT培地を添加、あるいは培地を半量交換してハイブリドーマのみを増殖させた。

3. 酵素免疫測定法

ハイブリドーマが分泌する抗bLF抗体は酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて検出した (Shinmoto et al., 1997)。0.05 mol/Lの炭酸水素ナトリウム溶液に溶解したbLFあるいはCMbLF溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$) 60 μL を96穴ELISAプレート (住友ベークライト) に分注し、4°Cで一晩吸着させた。抗原溶液を捨て、4倍希釈したブロックエース (雪印メグミルク、ケー・エー・シー) で1時間ブロッキングした後、0.05% Tween20を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-Tween) でプレートを洗浄した。次にウェルにハイブリドーマ培養上清50 μL を分注して1時間反応させた。さらにプレートを洗浄後、1/2,000に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (Invitrogen-Thermo Fisher, U.S.A.) 50 μL を1時間反応させた。プレートを洗浄後、ウェルに結合したペルオキシダーゼ活性を測定した。基質には2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) 二アンモニウム (ABTS, 3 mg/mL, 0.1 mol/Lクエン酸緩衝液pH 4.0, 0.01% 過酸化水素を含む) を用いた。発色は405 nmの吸光度をModel550マイクロプレートリーダー (バイオラッド, U.S.A.) で測定した。

抗体陽性穴のハイブリドーマはHATを含まない10% FCS添加ERDF培地を用いて限界希釈法でクローニングし、bLFあるいはCMbLFに結合する抗体分泌ハイブリドーマクローンを得た。樹立したクローンは液体窒素中に保存した。

4. ピンペプチドELISAによるエピトープ検出

bLFの一次構造 (アミノ酸配列, UniProt: P24627, Schanbacher et al., 1993) をもとに、まず固相法で20アミノ酸長のイコサペプチドを合成した。ペプチドは1-20, 11-30, 21-40……と10アミノ酸ずつ配列をシフトさせた。合成はMimotope社 (オーストラリア) に依頼し、樹脂製ギヤ上にリンカーを介してペプチドのC末端から合成した。N末端はアセチル化した。96穴プレートに適合するピン上のギヤにペプチドが結合しており、このギヤに、モノクローナル抗体および二次抗体を結合させた。基質 (ABTS) を満たした96穴プレートにギヤを挿入して、結合したペルオキシダーゼ活性を測定し、抗体結合部位 (エピトープ) のアミノ酸配列を決定した。モノクローナル抗体が結合する20アミノ酸長の配列を決定後、より短いアミノ酸長のペプチドを合成し、同様にエピトープ配列を決定した (Chiba et al., 2017)。

5. bLFのトリプシン消化とウェスタンブロッティング

bLF対トリプシンの重量比を30:1としてトリプシン消化を行った。0.02 mol/Lの塩化カルシウムを含む0.05 mol/LのMES緩衝液 (pH 6.8) 1 mLに20 mgのbLFを溶解し、同緩衝液に溶解したトリプシン (20 mg/mL) を30 μL 加え、37°C、15分間トリプシン消化を行った。

トリプシン消化されたペプチドは還元条件下、10-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲル (オリエンタルインスツルメンツ) を用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した (Leammli, 1970, Brunelle and Green, 2014)。ゲルからポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (アトー) にタンパク質を電氣的に転写後、PVDF膜上で免疫染色を行った。モノクローナル抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させた。化学発光基質 (イムノスターゼータ、富士フイルム和光純薬) を検出に用い CCDカメラ (ルミキューブ、リポニクス) で発光するタンパク質バンドを撮影した。ゲルの一部はクーマシーブリアントブルー (CBB) 染色してタンパク質を検出した。

6. 市販乳飲料中のbLF検出

市販乳飲料を純水で2倍希釈し、還元条件下でSDS-PAGEを行った後、PVDF膜に転写した。膜上のbLFは12-28抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。

7. 動物実験倫理

動物実験は玉川大学動物実験に関する規程に従い、承認された実験計画通りに実施した。

実験結果

1. 樹立したハイブリドーマが分泌するモノクローナル抗体のインタクトウシラクトフェリンおよび還元カルボキシメチル化ウシラクトフェリンに対する結合性

抗CMbLFモノクローナル抗体の未修飾のインタクトなbLF (ibLF) およびCMbLFに対する結合性を表1に示す。抗体の特異性は3つに分類される。ibLFにのみ結合するモノクローナル抗体はibLFを免疫源として作製したものである。CMbLFを免疫源として作製したモノクローナル抗体はCMbLFにのみ結合するものと、ibLFおよびCMbLFの両方に結合するものに分かれた。これ

表1 インタクトおよびカルボキシメチル化ウシラクトフェリンを免疫して作製したモノクローナル抗体の反応性

	clone#	ELISA		Western (ibLF)	
		ibLF	CMbLF	2ME-	2ME+
ibLF	yy1	+	-	+	-
ibLF	yy6	+	-	NT*	NT
ibLF	yy7	+	-	+	-
ibLF	yy20	+	-	NT	NT
CMbLF	2-22	+	+	+	+
CMbLF	12-28	+	+	+	+
CMbLF	14-1	+	+	-	+
CMbLF	19-18	+	+	NT	NT
CMbLF	22-14	+	+	+	+
CMbLF	16-3	-	+	NT	NT
CMbLF	26-58	-	+	NT	NT
CMbLF	29-5	-	+	NT	NT
CMbLF	30-7	-	+	-	-
CMbLF	31-9	-	+	NT	NT
CMbLF	33-15	-	+	NT	NT
CMbLF	34-25	+w	+	+	+

*NT: 検出試験行わず、+w弱く反応

らのうち、ibLFおよびCMbLFの両方に結合するモノクローナル抗体は、インタクトなbLFと変性したbLFのいずれにも結合することが期待される。

2. 4種類のモノクローナル抗体の合成ペプチドを用いたリニアエピトープ解析

ibLFおよびCMbLFの両方に結合するモノクローナル抗体はbLFの一次構造上のエピトープ (リニアエピトープ) に結合すると考えられる。エピトープとなるペプチド長は、4アミノ酸から10アミノ酸程度の長さであることが多い。bLFの一次構造をもとに多数のペプチドを合成してモノクローナル抗体の結合を調べることによって、エピトープとなるアミノ酸配列を知ることが可能である。

まず20アミノ酸ペプチドを固相合成し、モノクローナル抗体の結合を調べた。1番のペプチドはN末端から20番目までのアミノ酸配列、2番のペプチドは11から30番目までのアミノ酸配列、3番のペプチドは21から40番目までのアミノ酸配列となるように70種類の20アミノ酸ペプチドを合成した。それぞれのモノクローナル抗体が結合する配列を決定し、その配列をもとにアミノ酸長の短いペプチドを合成して、モノクローナル抗体が結合するエピトープのアミノ酸配列を決定した。

4種のモノクローナル抗体が結合するアミノ酸配列を決定した経過を表2に示す。2-22抗体は20アミノ酸ペプ

表2 7種類の抗bLFモノクローナル抗体のリニアエピトープ解析

Clone#	sequence obtained
yy1	no signal obtained
yy7	no signal obtained
2-22	#37YTRVVWCAVG PEEQKKCQQW #38PEEQKKCQQW SQQSGQNVTC QKKCQQ
12-28	#67NDNTECLAKL GGRPTYEEYL #68GGRPTYEEYL GTEYVTAIAN GRPTYE
22-14	#54LDKCVPSKE KYYGYTGAFR #55KYYGYTGAFR CLAEDVGDVA KYYGYTGAFR
30-7	no signal obtained
34-25	#55KYYGYTGAFR CLAEDVGDVA #56CLAEDVGDVA FVKNDTVWEN LAEDVG

チドの37および38番に結合した。結合した配列をもとに8アミノ酸ペプチドを合成したところEEQKKCQQ、EQKKCQQW、QKKCQQWSの配列に結合した。これら3ペプチドの共通配列は³⁷⁴QKKCQQ³⁷⁹であることから、この6アミノ酸ペプチド配列がエピトープであると推定された。配列内にシステインを含むが、システインが酸化(ジスルフィド結合)状態でも還元状態でも抗体が結合すると考えられる。

12-28抗体は6アミノ酸ペプチド⁶⁷²GRPTYE⁶⁷⁷に結合したことから、この配列がエピトープと推定された。22-14抗体は2つの20アミノ酸ペプチドの重なる部分に相当する10アミノ酸ペプチド⁵⁴¹KYYGYTGAFR⁵⁵⁰に結合したが、10アミノ酸より短いペプチドには結合しなかった。

34-25抗体はCMbLFにより強く結合するモノクローナル抗体である。ウェスタンブロッティングにおいて2-メルカプトエタノール処理したibLFに結合する(図2、後述)。エピトープ解析の結果、22-14抗体の結合部位に近接した6アミノ酸ペプチド⁵⁵²LAEDVG⁵⁵⁷に結合することが判明した。隣接する⁵⁵¹Cが還元されて開裂することによって抗体の結合が強められると推定した。

<u>MKLFVPALLS</u>	<u>LGALGLCLAA</u>	PRKNVRWCTI	SQPEWFKCRR	WQWRMKKLGA	50
PSITCVRRAF	ALECIPIGIAE	KKADAVTLDG	GMVFEAGRDP	YKLRPVAAEI	100
YGTKESPQTH	YYAVAVVKKG	SNFQLDQLQG	RKSCHTGLGR	SAGWIIPMGI	150
LRPYLSWTES	LEPLQGAVAK	FFSASCVPICI	DRQAYPNLCQ	LCKGEGENQC	200
ACSSREPYFG	YSGAFKCLQD	GAGDVAFVKE	TTVFENLPEK	ADRDQYELLC	250
LNSRAPVDA	FKECHLAQVP	SHAVVARSVD	GKEDLIWKLL	SKAQEKSGKN	300
KRSRFLFGS	PPQRDLLFK	DSALGFRLIP	SKVDSALYLG	SRYLTLKLN	350
RETAEEVKAR	YTRVVWCAVG	<u>PEEQKKCQQW</u>	SQQSGQNVTC	ATASTDDCI	400
		2-22			
VLVLKGEADA	LNLGGYIYT	AGKCVLPVPL	AENRKSXKHS	SLDCLVRPTE	450
GYLAVAVVKK	ANEGLTWNLS	KDKKSCHTAV	DRTAGWNIPM	GLIVNQTGSC	500
AFDEFFSQSC	APGADPKSRL	CALCAGDDQG	LDKCVNSKE	<u>KYYGYTGAFR</u>	550
				22-14	
<u>CLAEDVGDVA</u>	<u>FVKNDTVWEN</u>	TNGESTADWA	KNLNREDFRL	LCLDGRKPV	600
				34-25	
TEAQSCHLAV	APNHAVVSRS	DRAAHVKQVL	LHQALFGKN	GKNCPDKFCL	650
FKSETKNLLF	NDNTECLAKL	<u>GGRPTYEYEL</u>	GTEYVTAIAN	LKCSSTPLL	700
		12-28			
EACAFLTR					708

図1 ウシラクトフェリンのアミノ酸配列とエピトープ
下線部1-19はシグナル配列
二重下線部モノクローナル抗体が結合するエピトープ

図1にbLFの一次構造(アミノ酸配列)を示す。牛乳中に分泌される成熟タンパク質はアミノ酸20から708番の一本鎖ポリペプチドである。本研究得られた4種のモノクローナル抗体が結合する一次構造上のエピトープは、いずれもbLFの中央からC末端側(C-lobe)に存在した。

3. モノクローナル抗体を用いたbLFトリプシン分解ペプチドの検出

インタクトなウシラクトフェリンをトリプシンで15分間加水分解し、還元条件下でSDS-PAGEを行った。PVDF膜にタンパク質を転写後、2-22モノクローナル抗体、あるいは34-25モノクローナル抗体と反応するタンパク質バンドを化学発光法で検出した。

SDS-PAGEの結果を図2(左)に示す。消化時間15分において、未消化のbLFに加えて、50kDa、39kDa、31kDaのバンドがみられた。30分の消化では全体に低分子化し、染色バンドは薄くなった。

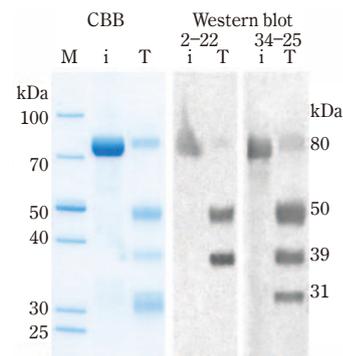


図2 モノクローナル抗体2-22および35-25を用いたウシラクトフェリントリプシン分解物のウェスタンブロット解析

M:分子量マーカー, i:インタクトbLF, T:トリプシン処理bLF

bLFのトリプシン消化物の還元条件下でのウェスタンブロッティングの結果(図2、右)、2-22抗体は未消化のbLF、トリプシン消化した50kDaおよび39kDa断片に結合した。50kDa断片は302あるいは304からC末端708までのペプチド、39kDa断片は360からC末端708までのペプチドと考えられる。いずれの断片も³⁷⁴QKKCQQ³⁷⁹配列を含んでいる。

これに対して34-25抗体は50kDa、39kDa、31kDaいずれにも結合した。いずれも⁵⁵²LAEDVG⁵⁵⁷配列を含むC末端側のペプチドであると考えられる。しかしこれではCBB染で検出されたすべてのバンドにはN末端側が存

在しないことになる。

31kDaフラグメントはよく観察すると、2本のCBB染色バンドからなり、ウェスタンブロッティングでは34-25抗体は高分子側のバンドに結合している。トリプシンはリジンKおよびアルギニンRの隣を切断すること、および³⁷⁴QKKCQQ³⁷⁹配列と結合する2-22抗体とは結合しないことから、34-25抗体が結合する31kDaの高分子側ペプチドは439あるいは448からC結合するまでのペプチドであると推定した。CBB染色される31kDa低分子側のバンドはN-lobeの一部、N末端の20から300あるいは303までのペプチドと推定した。

4. 市販乳飲料中のbLF検出

ウェスタンブロッティングによって市販乳飲料中のbLFの検出を試みた。試料はbLF添加ヨーグルト、市販低温殺菌乳等である（添加用量は試料原液相当量）。bLF分子中の最もC末端側に近いエピトープに結合する12-28抗体を用いた。図3に示すように、コーヒー飲料を除いて、約80kDaの分子量の位置にbLFを検出することができた。



図3 モノクローナル抗体12-28を用いたウェスタンブロッティングによる市販乳飲料中のbLFの検出

1: bLF添加ヨーグルト0.25 μ L, 2: 低温殺菌乳0.25 μ L,
3: 低脂肪乳1 μ L, 4: 無脂肪乳1 μ L, 5: 無調整乳1 μ L,
6: コーヒーミルク1 μ L, 7: bLF (10 ng/レーン)

考察

ラクトフェリンは乳などの分泌液中に含まれる分子量約80kDaの塩基性タンパク質である（川上, 1992, 2013）。さまざまな生理作用が報告されている（Sato et al., 1990, 新本, 1992, Kawasaki et al., 2000）。元々は分子量も同等のトランスフェリンに類似した鉄結合性タンパク質として進化したと推測される。分子内に2つのドメインを持ち、N末端側をN-lobe、C末端側をC-lobeと呼ぶ（Sharma et al., 2013）。それぞれに一分子の鉄イオンを結合する部位が存在する。イオン交換クロマトグラフィーなどで精製したヒトやウシのラクトフェリンbLFは鉄飽和度が10~30%程度であると報告されている。ラクトフェリンは鉄結合性タンパク質であることから、当初は鉄イオンの輸送、貯蔵、供給などに役立っている

のではないかと推定された。しかしラクトフェリンと鉄イオンとの結合は強く、生理的条件下で鉄イオンを解離しないことから、むしろ環境から鉄を奪う作用が強いと考えられている（山口, 2000, 堂迫, 2010）。

ラクトフェリンの分泌液中の重要な役割は微生物の増殖抑制である（Goldman et al., 1990, Visca et al., 1990, Chen et al., 2016）。微生物の増殖に必要な遊離鉄イオンを増殖環境から除去することによって微生物の増殖を抑制する。乳中にはタンパク質や脂質、ラクトースのような糖質が含まれており、容易に微生物が増殖する。これを防ぐことがラクトフェリンの役割であると考えられる。実際、乳房炎の乳牛から搾乳した牛乳中のラクトフェリン濃度は通常の牛乳に比べて上昇している。

ラクトフェリンのペプシン分解によってN-lobeから抗菌性の強いペプチドが発見され、ラクトフェリシンと命名された（Yin et al., 2014）。ウシ由来のラクトフェリシンは25アミノ酸長のペプチドでラクトフェリシンB（LFcinB）と呼ばれる。ラクトフェリンの鉄キレート作用による抗菌作用とともに、消化酵素によって分解されて生成するラクトフェリシン分子に強い抗菌作用があることは興味深い。乳そのものを微生物汚染から守るとともに、乳を摂取した後の動物（仔牛）にも新たな抗菌物質を与えていると考えられる。

ウシラクトフェリンに対するモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを最初に樹立したのは川上らであった（Kawakami et al., 1987）。川上らはハイブリドーマHB8852が分泌するモノクローナル抗体を固定化した抗体アフィニティーカラムを用い、牛乳から高純度のウシラクトフェリンを精製することに成功した。さらに西洋わさびペルオキシダーゼに対するモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマとの細胞融合によって、ウシラクトフェリンとペルオキシダーゼの双方に特異性のある2特異性抗体が作出された（Shinmoto et al., 1997）。しかし、このHB8852モノクローナル抗体は市販されていない。

島崎ら（Shimazaki et al., 1996）は川上らと別にウシラクトフェリンの分解ペプチド（ラクトフェリシン）に対するモノクローナル抗体を作製した。ウシラクトフェリンの限定分解によって生成したペプチドとの結合性を調べた結果、ラクトフェリンN-lobeの⁴²QWR⁴⁴配列に結合する。またbLFのC-lobeをマウスに免疫してモノクローナル抗体を作製し、ウシ、ヒト、ヤギ、ブタ、マウスのラクトフェリンに共通なアミノ酸配列⁴⁸⁶WNIPMGL⁴⁹²をエピトープとして報告している（Shimazaki et al., 1998）。このエピトープはトランスフェ

リンにも類似配列が見られることから、鉄結合性タンパク質に共通するアミノ酸配列と考えられる。

市販されているウシラクトフェリンに対するモノクローナル抗体はウシラクトフェリンC-lobeに結合するものが多い。これらの抗体はELISAやウェスタンブロットティングに応用できるとされている。

筆者らはインタクトなウシラクトフェリンを免疫源として数種のマウスモノクローナル抗体を作製した。ところが得られたモノクローナル抗体はインタクトなウシラクトフェリンには結合するものの、SDS-PAGEで分離したウシラクトフェリンには結合しなかった(表1、yy1、yy7など)。

このようなモノクローナル抗体は、ウシラクトフェリンの高次構造上の抗体結合部位(エピトープ)に結合すると考えられる。SDS-PAGE試料調製においては、タンパク質分子へのSDSの結合や、還元条件下でのジスルフィド結合が開裂することによってウシラクトフェリンの高次構造が変化する。このことによってモノクローナル抗体の結合できる構造が失われたと推定した。

そこで、ウシラクトフェリンをインタクトな状態でも変性した状態であっても検出できるモノクローナル抗体の作製を計画した。還元カルボシキメチル化によってタンパク質内のジスルフィド結合を開裂させたラクトフェリン(CM_bLF)を調製し、これを免疫源としていくつかのマウスモノクローナル抗体を作製した。ジスルフィド結合の開裂によってラクトフェリンが紐状に伸びた状態になることが期待された。得られたモノクローナル抗体のいくつかは、ibLFにもCM_bLFにも結合した。さらに合成ペプチドを用いたELISAにより、bLF一次構造上のエピトープ配列が明らかになった。これらのモノクローナル抗体はさまざまな条件下でのbLFの検出に応用可能であると期待される。

ラクトフェリンを乳から濃縮精製した組成物は「ラクトフェリン濃縮物」として食品添加物の「既存添加物」として記載されている。さまざまな食品に生物学的に有効な濃度で添加されるようになった。(織田ら, 2012)。筆者らが行った予備的なウェスタンブロット解析の結果、市販牛乳やbLF添加ヨーグルト飲料中のbLFの検出に成功した(図3)。

ただし、本研究で得られたモノクローナル抗体はC-lobeに対するもののみであり、N-lobeに結合するモノクローナル抗体は得られていない。今後、N-lobeに特異的に結合する抗体の作製が期待される。

謝辞

本研究は9年間をかけて多くの学部学生の卒業研究として行われた。柳田由美、中村智代、渡辺剛士、黒丸由美子、内田翔子、北川千波、鈴木玲子、薩川貴光、花岡紗良の卒業生諸氏に深い感謝の意を表する。

引用文献

- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Kohler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.
- Kawakami, H., Shinmoto, H., and Dosako, S. (1978) One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *Journal of Dairy Science*, 70: 752-759.
- Goldman, A. S., Goldblum, R. M., and Hanson, L. A. (1990) Anti-inflammatory systems in human milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 262: 69-76.
- Sato, K., Shinmoto, H., Tanimoto, M., Dosako S., and Nakajima, I. (1990) Uptake and Re-secretion of Human Lactoferrin by B Lymphocytes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1275-1279.
- Visca, P., Dalmastrì, C., Verzili, D., Antonini, G., Chiancone, E., and Valenti, P. (1990) Interaction of lactoferrin with *Escherichia coli* cells and correlation with antibacterial activity. *Medical Microbiology and Immunology*, 179: 323-333.
- Rosner, M. H., Grassman, J. A., and Haas, R. A. (1991) Immunochemical techniques in biological monitoring. *Environmental Health Perspectives*, 94: 131-134.
- 川上浩. (1992) ラクトフェリンの生物活性と受容体. *化学と生物*, 30: 807-812
- 新本洋士. (1992) 食品中の抗酸化成分とその特性 I 牛乳ラクトフェリンの抗酸化機能. *食品工業*, 35(6): 39-45.
- Schanbacher, F. L., Goodman, R. E., and Talhouk, R. S. (1993) Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 76: 3812-3831.
- Shimazaki, K., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., Kumura, H., Mikawa, K., Igrashi, I., and Suzuki, H. (1996) Monoclonal antibody against

- bovine Lactoferricin and its epitopic site. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 1227–1229.
- Shinmoto, H., Kobori, M., Tsushida, T., and Shinohara, K. (1997) Competitive ELISA of bovine lactoferrin with bispecific monoclonal antibodies. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61: 1044–1046.
- Shimazaki, K., Kamio, M., Nam, M. S., Harakawa, S., Tanaka, T., Omata, Y., Saito, A., Kumura, H., Mikawa, K., Igarashi, I., Suzuki, N. (1998) Structural and immunochemical studies on bovine lactoferrin fragments. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 443: 41–48.
- Kawasaki, Y., Sato, K., Shinmoto, H., and Dosako S. (2000) Role of basic residues of human lactoferrin in the interaction with B lymphocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 314–318.
- 山口英世. (2000) 多機能タンパク質ラクトフェリンの抗真菌作用と医療への応用. *化学と生物*, 38: 594–600.
- Van Emon, J. M. (2001). Immunochemical applications in environmental science. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 84: 125–133.
- 堂迫俊一. (2010) 牛乳中の機能性タンパク質. *Milk Science*, 59: 283–294.
- 織田浩嗣・中野学・若林裕之・山内恒治・樋田知宏・岩附慧二・松本哲哉. (2012) ラクトフェリン含有食品の背sh巢による風邪, 胃腸炎への影響—アンケート調査. *日本補完代替医療学会誌*, 9: 121–128.
- Sharma, S., Sinha, M., Kaushik, S., Kaur, P., and Singh, T. P. (2013) C-Lobe of Lactoferrin : The Whole Stor of the Half-Molecule. *Biochemistry Research International*, 2013: Article ID 271641
- 川上浩. (2013) 乳中の塩基性タンパク質の物理化学的および生化学的特性に関する研究. *Milk Science*, 62: 85–104.
- Brunelle, J., L., and Green, R. (2014) One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology*, 541: 151–159.
- Rastogi, N., Nagpal, N., Alam, H., Pandey, S., Gautam, L., Sinha, M., Shin, K., Manzoor, N., Viridi, J. S., Kaur, P., Sharma, S., and Singh, T. P. (2014) Preparation and antimicrobial action of three tryptic digested functional molecules of bovine lactoferrin. *PLoS One*, 9: e90011.
- Yin, C., Wong, J. H., and Ng, T. B. (2014) Recent Studies on the Antimicrobial Peptides Lactoferricin and Lactoferrampin. *Current Molecular Medicine*, 14: 1139–1154.
- Chen, R., Cole, N., Dutta, D., Kumar, N., Willcox, M. D. P. (2016) Antimicrobial activity of immobilized lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials*, 105: 2612–2617.
- Nagai, R., Shirakawa, J., Ohno, R., Hatano, K., Sugawa, H., Arakawa, S., Ichimaru, K., Kinoshita, S., Sakata, N., and Nagai, M. (2016) Antibody-based detection of advanced glycation end-products: promises vs. limitations. *Glycoconjugate Journal*, 33: 545–652.
- Chiba, S., Yokoyama, H., Kumazawa, A., Shimamoto, M., Naganawa, Y., and Shinmoto, H. (2017) Epitope analysis of Japanese cedar pollen allergen Cry j2 with a human IgM class monoclonal antibody 404–117. *Human Antibodies*, 25: 17–21.
- Gao, Y., Huang, X., Zhu, Y., and Lv Z.A (2018) A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 39: 351–364.

Preparation of Several Monoclonal Antibodies to Bovine Lactoferrin

Hiroshi Shinmoto^{1,2}, Yuki Nishikawa¹, Natsumi Sasagawa², Yasunori Naganawa^{1,2}

Abstract

Several monoclonal antibody-producing murine hybridoma clones were established from mice immunized with intact and reduced and carboxy-methylated bovine lactoferrin. Epitope analysis with solid-phase synthesized peptides showed four monoclonal antibodies recognized linear epitopes located on C-terminus lobe of bovine lactoferrin. Those monoclonal antibodies were shown to be useful of detecting protease digested fragments of bovine lactoferrin.

Keywords: bovine lactoferrin, monoclonal antibody, detection, epitope

¹ Biological Resources Major, Graduate School of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan

² Department of Life Science, College of Agriculture, Tamagawa University, 6-1-1 Tamagawa-gakuen, Machida, Tokyo 194-8610, Japan