

## 自作抗体による魚類の骨ならびにコラーゲンの 代謝分解挙動の解析法の開発

道原 成和、河村 幸雄

(利用・安全グループ)

近畿大学大学院農学研究科

魚類のコラーゲンは、哺乳動物と同じく基本的にはI型コラーゲンであるが、硬骨魚類のI型コラーゲンは哺乳動物にはない3本の $\alpha$ 鎖を有する。骨、皮、鱗、鰓などコラーゲンを主成分とする硬組織の代謝状況は、魚体の健全性を反映し、魚の品質評価指標になる可能性がある。そこで、魚類のコラーゲンの分解産物の評価系の確立を検討した。

骨の主成分であるコラーゲンは、その末端部分の一次構造が種を超えてよく保存されているため、ヒトあるいはマウスの抗原エпитープに対する抗体が、魚類のコラーゲンを認識する可能性が高い。そこで、マウスI型コラーゲンのC末端部分(CTX)に対する抗体を作製し、競合ELISA(抗CTX法)による定量について検討した。また、構築した抗CTX法がマウスの骨代謝を反映しているのかを検討するために、抗CTX法による卵巣摘出擬似手術マウスと卵巣摘出マウス(骨粗鬆症モデルマウス)の尿中CTX量の比較を行った。

### 材料と方法

酵素免疫測定法(ELISA) 本研究では、マウスC末端ロペプチドCTP18(DFSFLPQPPQEKAHDGGR)に対して作られた抗血清をアフィニティー精製した抗体を用い

た。抗CTX抗体を固相化したELISAプレートに、サンプルを添加し、HRP標識した二次抗体を添加して抗原抗体複合体を形成させた。固相に結合しなかった酵素標識抗原を洗い流した後、発色基質を添加し、生成した発色物質の吸光度をプレートリーダーで測定した(Fig.1)。

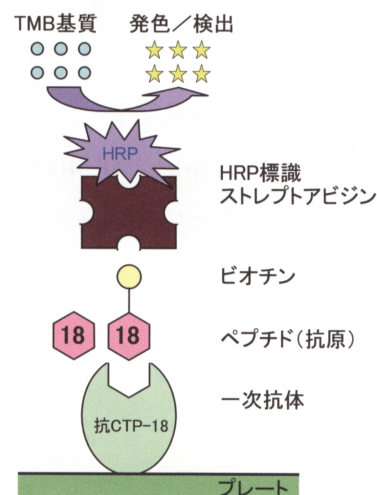


Fig.1. 抗CTX法

### 骨粗鬆症モデルマウスの作製

実験動物 4週齢のddY系統の雌マウスは、日本SLC株式会社より購入した。1週間予備飼育後、OVX群(n=6)には卵巣摘出手術、Sham群(n=6)には卵巣摘出擬似手術を施した。手術前および手術3週間後の尿と血液を採取した。すべて動物は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、12

Urine			
Additional CTP-18 (nM)	CTP-18		
	測定値 (nM)	理論値 (nM)	回収率(%)
0.00	0.81	0.81	100.0
0.10	1.12	0.91	123.1
0.25	1.21	1.06	113.3
0.50	1.66	1.31	126.2
1.00	2.18	1.81	120.3

Serum			
Additional CTP-18 (nM)	CTP-18 (nM)		
	測定値 (nM)	理論値 (nM)	回収率(%)
0.00	1.31	1.31	100.0
0.10	1.32	1.41	94.0
0.25	1.87	1.56	119.9
0.50	2.40	1.81	132.5

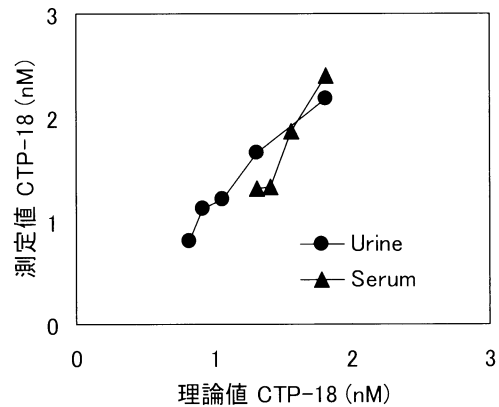


Fig.2. 標準添加試験

時間の明暗サイクルで飼育した。実験期間中動物は自由に摂水、摂餌させた。

市販骨吸収マーカー測定キットでの定量 抗 CTX 法による定量は、市販 CTX 定量キットである RatLaps ELISA (Nordic Bioscience Diagnostics)、尿中デオキシピリジリン定量キットであるオステオリンクス DPD (DS ファーマバイオメディカル)を用いた。

### 結果

抗 CTX 法の構築 抗 CTX 抗体を用いた競合 ELISA 法 (抗 CTX 法) の感度は、 $< 0.2\text{nM}$  であった。希釈依存性は高くなく、比較定量のためにはサンプルの希釈を一定にして測定する必要があることが示された。標準添加試験においては、スタンダードを加えた分だけ測定値が増加しており、測定系として成立していることが示された (図2)。

抗 CTX 法の確認 抗 CTX 法による Sham マウスと OVX マウスの CTX の比較定した結果、OVX マウスにおける CTX 量が有意に増加していた。このことは、CT 解析による骨密度の結果

と一致した。また、抗 CTX 法による定量は、RatLaps ELISA やオステオリンクス DPD 法による定量値と良い相関性がみられた。したがって、本研究で構築した自作抗体を用いた競合 ELISA は、魚類のコラーゲンペプチド測定に応用可能であることが示唆された。

### 考察

本研究は、水産養殖における魚類の品質評価指標の構築を目的とし、競合 ELISA である抗 CTX 法を構築した。抗原としては、C テロペプチドの多くの分子種を認識するためマウスコラーゲン C テロペプチドの中心配列と考えられる EKSQDGGR を含む、ペプチド (Cys-DFSFLPQPPQEKSQDGGR) を合成し、ウサギにて抗体を調製した。抗 CTX 法の有用性が確認されたため、本研究で構築した自作抗体を用いた競合 ELISA は、魚類コラーゲン分解物の定量に応用可能であることが示唆された。

今後、魚血清等の体液 (特に水産養殖において皮が弱いことが報告されているクロマグロ) を用いて、そのコラーゲンの分解挙動を解析する予定である。