

ウシ乳熱に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 受容体の関与

1 $\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor influences to parturient hypocalcemia in cattle

和田恭則¹, 印牧信行¹, 恩田賢²

¹麻布大学大学院獣医学研究科, ²麻布大学獣医学部

Yasunori Wada¹, Nobuyuki Kanemaki¹ and Ken Onda²

¹ Graduate School of Veterinary Science, Azabu University, ² School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. The purpose of this study was to identify the importance of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its receptor (VDR) in periparturient mammary gland of cattle. Blood samples were collected from a periparturient Jersey cattle regularly. Concentrations of serum calcium and plasma $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in abdominal aorta and suscutaneous veins of abdomen were not obvious differences from 25 days before to 115 days after parturition. Partial cDNA cloning of Holstein VDR defined that deduced amino acid sequences in Holstein cattle have several differences that of in Jersey cattle at estimated hormone binding site in humans. VDR gene expressions in the mammary gland of a periparturient cattle were very low and the rapid increase of VDR gene expression which related to pregnant and lactation could not observe in this study. Furthermore, PMA stimulation increased VDR gene expressions in MDBK and CKT-1, both cell lines were derived from the bovine kidney.

1. 目的

乳牛の分娩前後に生じる低カルシウム血症は、乳熱だけではなく胎盤停滞や第四胃変位など、さまざまな周産期疾患の誘引となるとされ [1], 特に乳熱の原因としては、消化管に発現する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 受容体 (VDR) の減少が最も重要と考えられている [2]。また、妊娠と泌乳が消化管や乳腺組織における VDR の発現を増加させると報告されているが [3], その真偽と生物学的な意味は明らかではない。私たちは乳熱の原因として、カルシウムの吸収部位である消化管とともに重要であり、牛乳の合成と分泌部位である乳腺組織に注目し、VDR とリガンドである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ について解析を行った。

2. 方法

【乳腺組織前後の動静脈からの採血】初産のジャー

ジー種乳牛1頭から経時的に、すなわち分娩前より定期的に腹大動脈と乳静脈より採血をした。血液は採取時に毎回酸素分圧などを測定し、それぞれ動脈血と静脈血であることを確認した。血清カルシウム濃度は原子吸光光度法、血漿 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は RIA [4] で、それぞれ測定した。

【ウシ VDR の cDNA クローニング】ホルスタイン種乳牛の乳腺組織より mRNA を抽出し、5'および3'RACE 法にて、ウシ VDR の cDNA 塩基配列の一部を決定した。

【周産期乳腺組織および株化細胞での VDR 遺伝子発現】周産期のホルスタイン種乳牛から、定期的に乳腺組織を採取し、RT-PCR 法で遺伝子発現の推移を観察した。また、ウシ組織由来の株化細胞4種類でも、VDR 遺伝子の発現を検討した。

3. 結果と考察

分娩直後に血清カルシウム濃度が減少すると、すばやく血漿 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度が上昇するなど、腹大動脈と乳静脈で同様な変動が観察されたが、乳腺組織前後の動静脈間でそれぞれの濃度に、大きな差を認めなかった (図1)。今回はホルスタイン種乳牛の VDR のうち、ヒト VDR の 17 から 290 アミノ酸に相当する部分のクローニングのみ終了した。ヒトで DNA 結合部位と考えられている部分では、ホルスタイン種と既に報告されているジャージー種の間で、高い相同性を示したが、ホルモン結合部位と考えられる部位では、2つの品種の間でアミノ酸配列に比較的大きな差異を認めた (図2)。この2品種間には乳熱の罹患率に差があることが知られており [5]、同一リガンドに対する VDR の1次構造自体の違いが、何らかの影響を与えている可能性もある。今回実験に用いたホルスタイン種乳牛の乳腺組織では、分娩3週間後と5週間後でわずかに VDR 遺伝子の発現を認めたが、それ以外では PCR 増幅は観察できなかった (図3)。すなわち、分娩3週間前から、分娩9週間後まで、VDR 遺伝子の発現はきわめて低いものと考えられ、妊娠と分娩による発現量の著しい増加を観察することは出来なかった。ウシ組織由来の

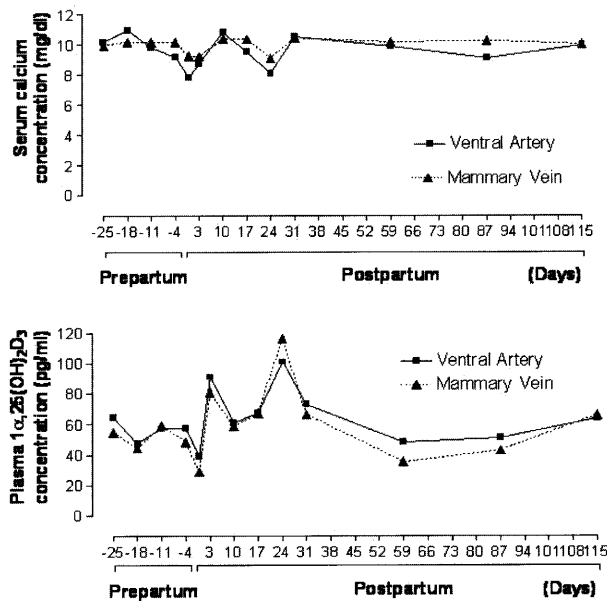


Fig. 1 Serum calcium and plasma $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentrations in a periparturient cattle. ■:ventral artery, ▲:mammary vein

株化細胞4種類を PMA や 8-Bromo-cAMP で刺激して、VDR 遺伝子の発現の有無を観察したところ (図4)、乳腺組織由来の株化細胞である BMGE-H と BMGE+H [6] ではその発現を検出することは出来なかった。しかしながら、腎臓由来の株化細胞である、MDBK [7] と CKT-1 [8] では、PMA の刺激で VDR 遺伝子の発現が増加することが分かり、*in vitro* での機能解析に利用可能と予想された。

4. 要約

周産期のウシ乳腺組織に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とその受容体 (VDR) の関与について検討した。初産のジャージー種乳牛から分娩前後、定期的に腹大動脈と乳静脈より採血し、血清カルシウム濃度と血漿

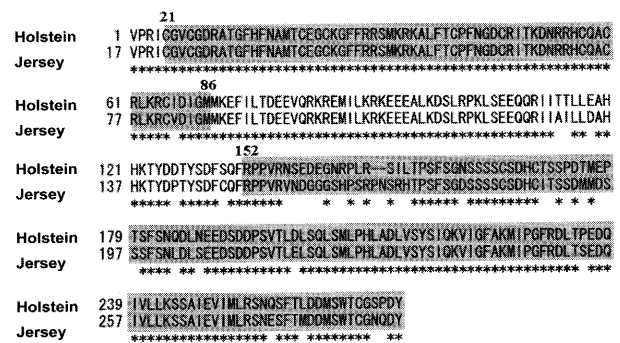


Fig. 2 Comparison of partial amino acid sequences of $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor between Holstein and Jersey. [21-86]: DNA binding site in humans, [152-]: hormone binding site in humans

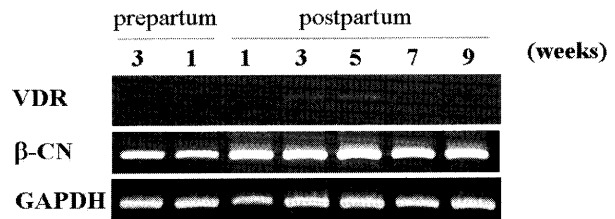


Fig. 3 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor gene expressions in periparturient mammary gland of cattle. VDR: $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor, β -CN: beta-casein, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

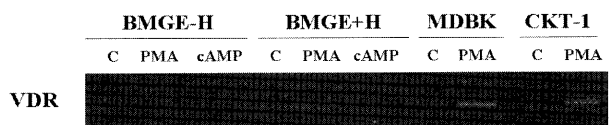


Fig. 4 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor gene expressions in bovine cell lines. PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate, 10 nM, 1 hr, cAMP: 8-Bromo-cAMP, 1 mM, 1 hr, C: control

1 α , 25(OH)₂D₃濃度をそれぞれ測定したところ、乳腺組織前後の動静脈間でそれぞれの濃度に、大きな差を認めなかった。VDRのcDNA部分クローニングから推測されるホルスタイン種のアミノ酸配列は、ホルモン結合部位と考えられる部位でジャージー種と違いが大きかった。また、妊娠および泌乳期でも乳腺組織でのVDR遺伝子の発現は低く、著しい増加は観察できなかった。さらに、ウシ腎臓由来の株化細胞である、MDBKとCKT-1では、PMAの刺激でVDR遺伝子の発現が増加することが分かった。

文 献

- 1) Curtis CR, Erb HN, Sniffen CJ, Smith RD, Powers PA, Smith MC, White ME, Hillman RB, Pearson EJ. *J Am Vet Med Assoc.* 183(5): 559-61. 1983
- 2) Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. *J Dairy Sci.* 78(11): 2388-94. 1995
- 3) Reinhardt TA, Conrad HR. *Arch Biochem Biophys.* 203(1): 108-16. 1980
- 4) Fraser WD, Durham BH, Berry JL, Mawer EB. *Ann Clin Biochem.* 34(Pt 6): 632-7. 1997
- 5) Hibbs, JW. Studies on milk fever in dairy cows I. The possible role of vitamin D in milk fever. 29: 617-623, 1946
- 6) Schmid E, Schiller DL, Grund C, Stadler J, Franke WW. *J Cell Biol.* 96(1): 37-50. 1983
- 7) MADIN SH, DARBY NB Jr. *Proc Soc Exp Biol Med.* 98(3): 574-6. 1958
- 8) Kimura S, Fukui K, Yoshida N, Matsubara Y. *Jpn J Microbiol.* 12(3): 293-8. 1968