

牛乳ムチンの生理機能評価

岐阜大学農学部生物資源利用学科 教授 金丸 義 敬

I. 研究目的

研究の背景 牛乳は、市乳や加工乳、及び種々の乳飲料の製造に不可欠である一方、チーズやバター、ヨーグルトをはじめとする畜産食品ばかりでなく、製パンや製菓など多方面の食品製造にも利用されている最も重要な畜産資源の一つである。牛乳に含まれるタンパク質成分もまた、それらの乳化性、起泡性、ゲル形成などの物理的機能を中心とする食品加工上の有用性に基づいて多方面に利用されている。同時に、そのような食品加工上の牛乳タンパク質の利用性についての研究がこれまで数多く行われてきた結果、数々の利点が明らかにされ、牛乳の需要の広がり役立ってきている。しかしながら、乳牛の泌乳量が極めて高いレベルを維持することが出来るようになってきている一方で、わが国の牛乳の消費はあまり拡大されていないのが現状である。これは、米や大豆、あるいは魚介類を中心とするわが国の食文化の伝統から、動物性食品材料としての牛乳を食生活の中心に据えるようなかたちで消費拡大を図ることが困難であるという理由による。このようなわが国の食生活上の特徴を考慮しながら、なおかつ牛乳の需要を拡大するための方策の一つとしては、カゼインのみならず、乳清タンパク質などの分離可能な牛乳タンパク質について、食品加工とは異なる新しい視点からの有用性を明らかにすることで、牛乳の価値をより一層明確にしていくことであろう。そのような牛乳の消費拡大を目指すための新しい視点として大きな可能性を秘めているのは、近年注目されるようになってきている食品の生体調節機能における牛乳タンパク質の有用性である。すなわち、乳における本来の生理機能に立脚した生体調節機能に基づく機能性食品素材としての牛乳の有用性を明らかにすることであり、すでに多数の研究がこのような視点から精力的に行われ、いくつかの牛乳タンパク質の生理機能が評価されている。しかしながら、これまでに見出された生理機能の多くは実際に体内で発揮されるかどうかという最も重要な点で疑問視されるものが多く、機能性食品素材としての牛乳の再評価につながったものは多くない。

ところで、これまでほとんど知られていない牛乳タンパク質に高分子量ムチン様糖タンパク質（ミルクムチン）がある。ミルクムチンは、乳に含まれるムチン型糖鎖を結合した巨大な糖タンパク質会合体であり、歴史的な人乳で早くからその存在が知られ、これまでPEM、NPGP、episialin、HMGP等のさまざまな名称で呼ばれてきたものである。人乳ムチンは乳ガン関連抗原構造を発現するから、主として医学分野の研究者達から注目され、乳腺細胞やがん化に伴うミルクムチンの抗原構造の変化を明らかにしようとする研究や、乳がん検診のためのがん特異的モノクローナル抗体の作製を目的とする多数の研究が行われてきている。一方で、この人乳ムチンは病原ウイルスや細菌の増殖を強力に阻害する作用を持つことや、動物細胞の増殖を制御する機能を持つことも報告され

ている多様性糖タンパク質であり、母乳の固有な生体防御機能と密接に関連していることが指摘されている。われわれは、この人乳ムチンと類似の性質を示す成分が牛乳中にも存在していることを初めて明らかにし、また、病原微生物作用や抗がん作用などの生体防御機能の面でも類似した多機能的な性質を示すことを明らかにしつつある。そのような多機能性の生体防御作用を持つタンパク質としてはよく知られているラクトフェリン (Lf) があるが、牛乳ムチンは結合糖鎖を介して種々の生理機能を発揮すると考えられる点で、Lfとはまったく異なる新しい可能性を持つ牛乳タンパク質であると云える。このような牛乳ムチンが示す潜在的な生理機能の有用性を明らかにすることは、牛乳の利用拡大につながる重要な研究課題の一つであると考えた。

研究目的 本研究は、培養細胞系と動物実験系とを用いて、牛乳ムチンの生理機能の有効性をさまざまな観点から検討することを目的としているが、本年度は特に次のような点について詳細に評価することを直接の目的とした。

- 1) ウィルス感染阻害作用：ヒトロタウイルス感染に対する阻害作用について、他の感染阻害剤と比較することを通して、動物培養細胞を用いて感染阻害作用のメカニズムをin vitroで解析するとともに、ウィルス感染予防剤としての能力をin vivoで評価する。
- 2) 細菌感染阻害作用：ピロリ菌感染に対する阻害作用について、他の感染阻害剤と比較することを通して、感染阻害作用のメカニズムをin vitroで解析するとともに、細菌感染予防剤としての能力をin vivoで評価する。
- 3) 牛乳ムチンのタンパク質化学的特徴：モノクローナル抗体の作製を通して、多様な生理機能を示す牛乳ムチンのタンパク質化学的特徴を明らかにする。

II. 研究結果

1. ウィルス感染阻害作用

1) 腸培養細胞を用いた牛乳ムチンとヒトロタウイルス感染阻害作用機作の解析

計画の概要：ウィルスの宿主用としてサルの腎臓由来の細胞株であるMA-104を培養し、牛乳ムチンとそれをさらに分画した標品が血清型1のヒトロタウイルスWaの感染を阻害する活性（中和活性）について測定し、牛乳ムチンのヒトロタウイルス感染阻害作用のメカニズムを考察する。

結果：ヒトロタウイルスのin vitroの増殖阻害活性の測定法を図1に模式的に示した。今回の実験ではヒトロタウイルスWa株（血清型1）を用いた。トリプシンで30分間処理してウィルスを活性化した後、適当な濃度に希釈してマイクロプレートに移し、そこで用意しておいた種々の濃度の試料と混合し、30℃で一時間インキュベートした。これを宿主であるサルの腎臓細胞のMA-104と混

合して、さらにスライドガラス上に移した。37℃で65時間インキュベートした後、アセトンで固定し、感染細胞を蛍光抗体で検出し、その数を蛍光顕微鏡でカウントした。

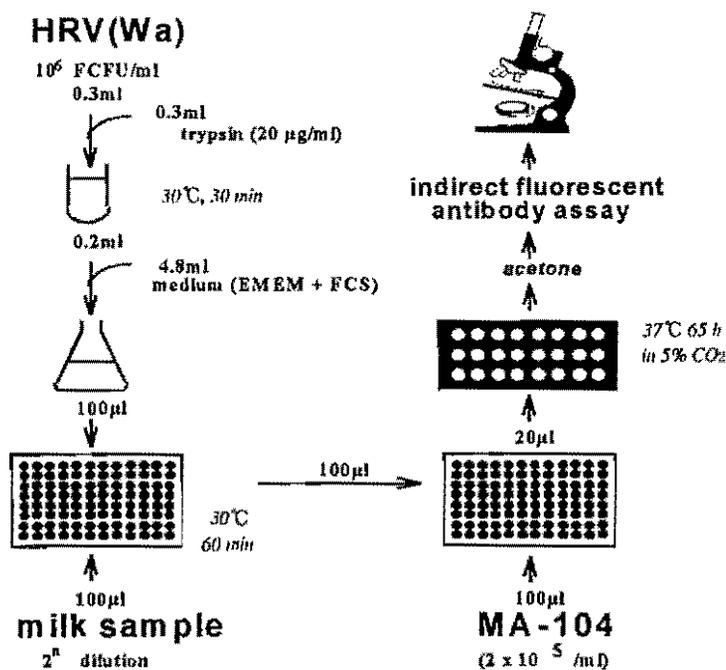


図1. ヒトロタウイルス感染阻害試験（中和試験）の概略

なお、活性は最少阻害濃度（minimum inhibitory concentration、MIC）で表した。これは試料とインキュベートしたウイルスが示す感染細胞数と未処理のコントロールウイルスの感染細胞数を比較し、感染細胞数がコントロールの50%以下に減少した場合を中和活性ありと判断し、そのような中和活性を示す最も低い試料濃度を示している。この濃度が低ければ低いほど活性は高いことになる。

昨年度の結果から、牛乳ムチンであるウシのF1（調整法は3、牛乳ムチンのタンパク質化学的特徴を参照）が人乳由来のF1とともに、ヒトロタウイルスに対して強力な感染阻害作用を持つ事が示されている。この活性は動物ロタウイルスに対して強い活性を持つとされるウシ顎下腺ムチンやオボムチンなどと比べてはるかに強力なものである。

こういった牛乳ムチンの活性がどのような成分に起因しているかを調べるために、昨年と同様、SDS含有バッファーを用いたゲルろ過で分画したF1分画の活性について詳しく検討した。

図2は、SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300のゲルろ過でF1を分画した結果を示している。通常のバッファー系では解離せずに、巨大な複合体を形成している牛乳ムチンの成分がSDSの作用によって一部解離を起こし、いくつかの画分を生じることがわかった。

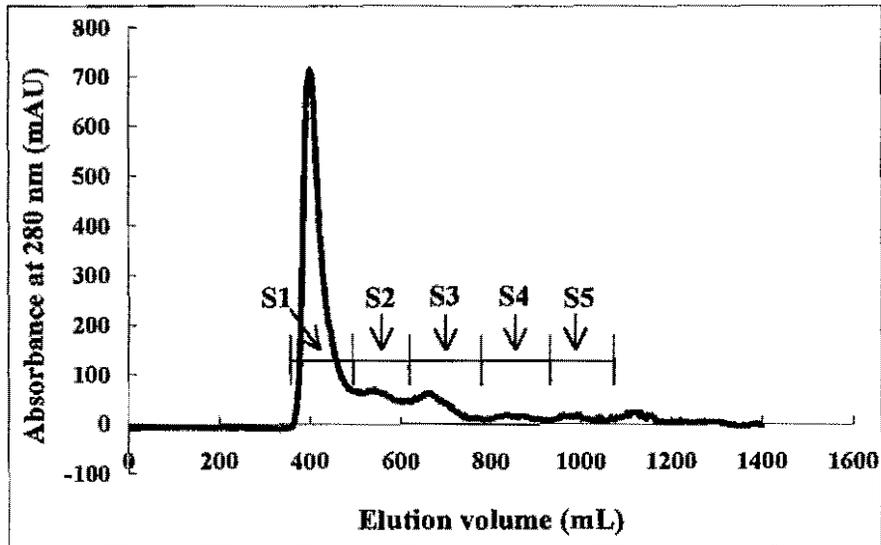


図2. SDS含有バッファーを用いたSephacryl S-300ゲルろ過によるF1の分画

0.1% SDSを含む0.1M Tris-HClバッファー (pH8.0) に溶解したF1をカラム (5×6 cm) にアプライした。流速は9 mL/minとして溶出した。

得られたS1～S5の画分について、透析によってSDSを除き、凍結乾燥後、ヒトロタウイルスWa株に対する中和活性を調べた。その結果が図3である。

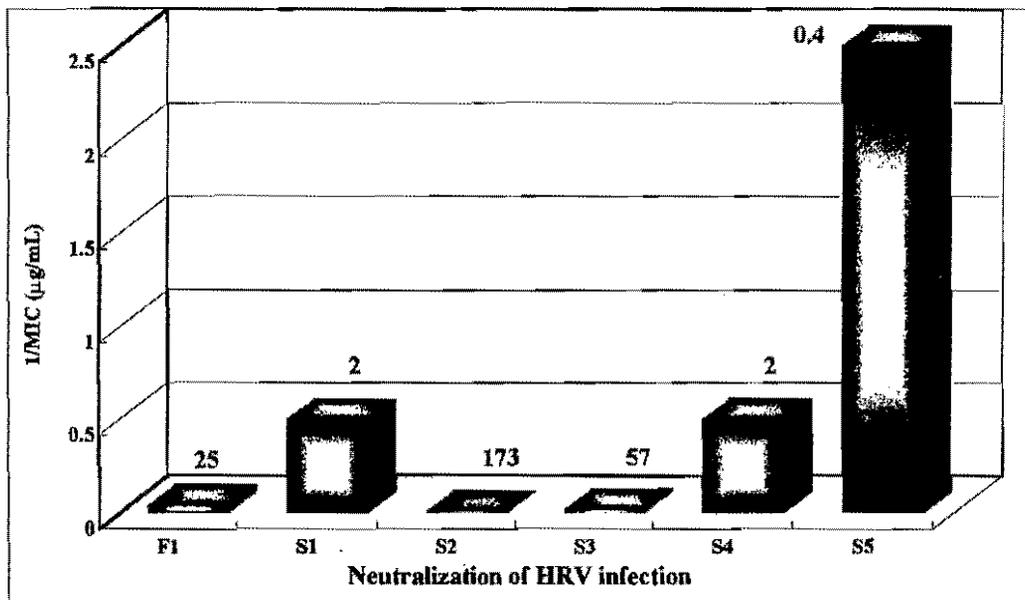


図3. Sephacryl S-300分画物のヒトロタウイルス感染阻害活性の比較

中和活性試験では、ヒトロタウイルスWa株とサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、MA-104細胞に接種し、さらに65時間インキュベートした。アセトン固定後、間接蛍光抗体法によって感染細胞数を測定した。コントロールと比較して感染細胞数の50%低下を示すサンプル濃度を最少阻害濃度 (MIC) とした。

図3では最少阻害濃度 (MIC) の逆数を表示しているの、棒が高いほど活性も高いことになる。実際のMIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) は棒の上に数字で示した。F1に比べて10倍強の活性がS1で得られ、S4にも同様の強い活性が認められた。S2やS3ではF1に比べ活性が低下したが、最も強力な活性は最も遅く

溶出したS5に認められ、F1の活性のおよそ60倍という強力なものであった。

こういった強い活性を示すS1、S4、S5について、F1と比較した中和活性の濃度依存性を図4に示した。図3の活性は、この図の50%感染阻害を示す濃度をとって、棒グラフとして示したものである。F1の中和活性がサンプル濃度の上昇に伴って直線的に現れるのに対して、F1を分画して得られた画分の活性発現は低濃度できわめて急激に現れるのが明らかにされた。特に最も強力な活性発現が認められたS5では、50%阻害を基準としたF1のMICである2 μ g/mLという濃度で、ほぼ100%の阻害を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、強力な阻害作用を示す活性成分がSDS作用によってF1から解離すること、図4の濃度依存性は図3とともに、活性成分が他から分離された程度を表すものと考えられる。

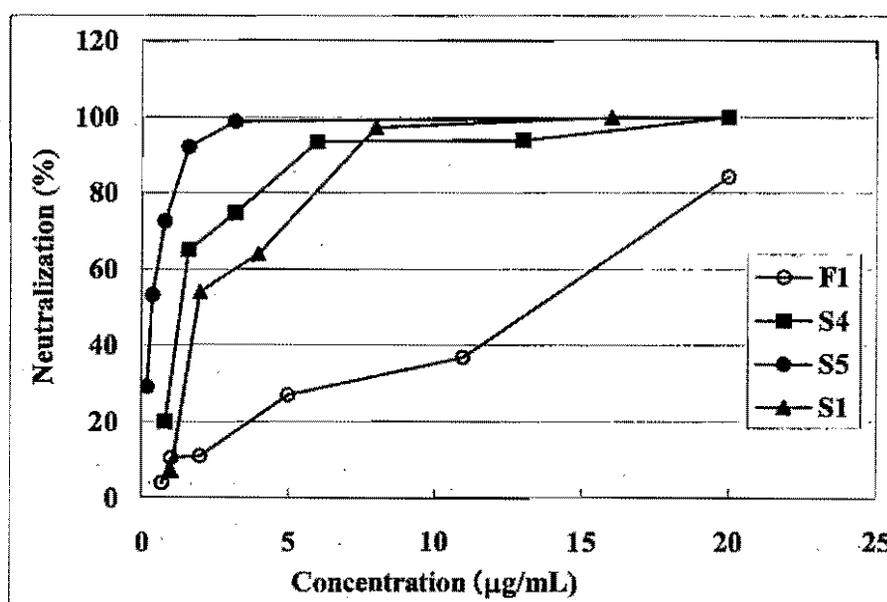


図4. F1とその分画物の中和活性の濃度依存性

図5にF1分画物のSDS-PAGEの結果を示した。CBB染色によるタンパク質成分分析では、いずれの分画物にも多数のバンドが認められた。特にS1からS3までの分画物には低分子量領域からゲル上部の高分子量域にわたって、きわめて多数の成分が含まれることが明らかとなった。図3で示しているように、S1を別とすると、S2やS3の活性はきわめて低かったことから、これらの分画物中の主要染色バンドである75kDa (S2) や42kDa (S3) は活性に関与しないものと考えられる。

一方、PAS染色による糖タンパク質分析でも、この方法で染色される主要成分はS1からS3といったゲルろ過分離において速く溶出する分画物にもっぱら認められることが明らかとなった。これらの分画物中のPAS染色性成分はPAS-1やPAS-4、それに80Kや120Kといったものであり、これらF1中の主要な糖タンパク質も活性には関与しないと結論付けられる。

最も高い活性が見られたS5はPAS染色を受けず、CBBによって染色されるタンパク質は72、63、58、18、14kDaに認められた。別に実験から、72kDaの成分は活性に関与する可能性は低いものと考

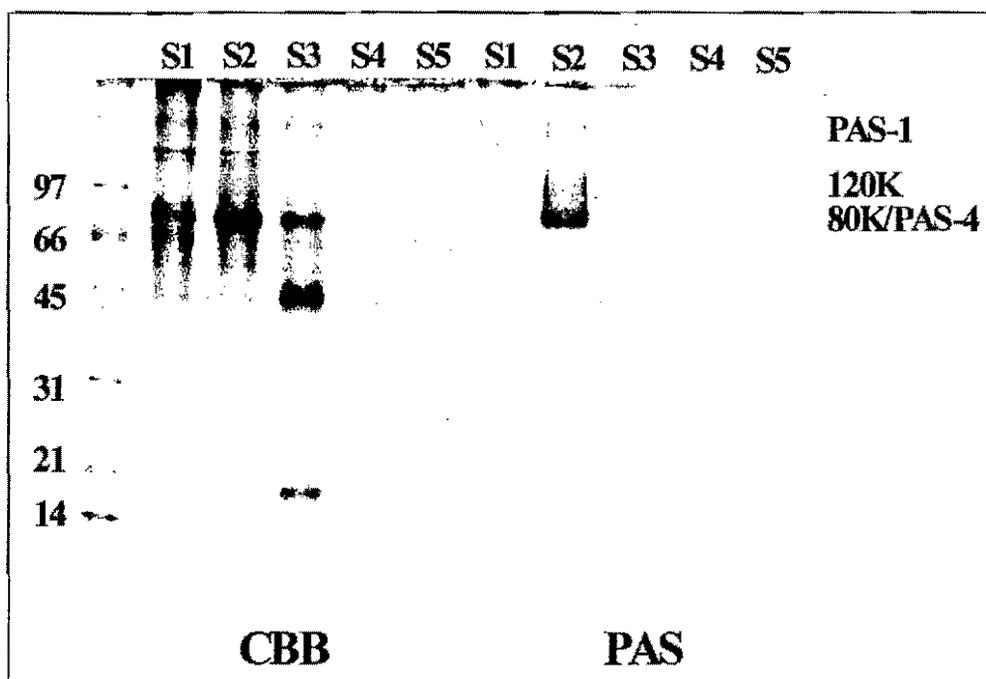


図5. F1分画物の10-20%ゲルを用いたSDS-PAGE

えられることから（データは示していない）、F1中のヒトロタウイルス感染阻害活性成分は63kDaや58kDaの成分とともに、20kDaより小さな二つのタンパク質が共同して、作用を発揮する可能性が考えられた。これらの成分は、通常のバッファー条件下では非共有結合によって会合し、巨大成分として存在しているらしい。

今後、同様な手法によってさらに精製し、特性を詳細に調べることによって、活性成分の完全な同定が可能になるものと考えている。一方、昨年度の研究においてF1では認められなかったin vivoの下痢発症予防機能について、これら活性分画物を用いて現在検討中である。F1よりはるかに強力な活性を示すことから、in vivoの実験結果が期待される。

2. 抗菌作用

1) 牛乳ムチンのピロリ菌定着阻害作用の解析

計画の概要：胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼの吸着がピロリ菌の定着に不可欠であることを利用して、牛乳ムチンを共存させることによって胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼへの吸着がどのような影響を受けるかを調べ、定着阻害における有効性を解析する。

結果：ピロリ菌ウレアーゼの胃ムチンへの吸着阻害活性のin vitroの測定法は以下の通りである。

- (1) ブタ胃から調整したムチンにビオチン標識する。
- (2) ピロリ菌から調整したウレアーゼをマイクロプレートのウェルに塗布する。
- (3) ビオチン標識した胃ムチンを倍々希釈したサンプルとインキュベートした後、ウレアーゼ塗布したマイクロプレートウェルに加える。

- (4) 吸着したムチンにペルオキシダーゼ標識アビジンを反応させ、基質を加えて発色させる。
- (5) プレートリーダーによって吸光度を測定する。

牛乳ムチン分画物はSDS含有バッファーを用いた Sepharose 6Bゲルろ過によってF1を分画して得たものである。その際の溶出パターンを図6に示した。SDS存在下でも解離を受けない成分を含むvoid容画分のF6B-1と、解離した結果分画されたF6B-2とF6B-3の三つの分画物を得た。

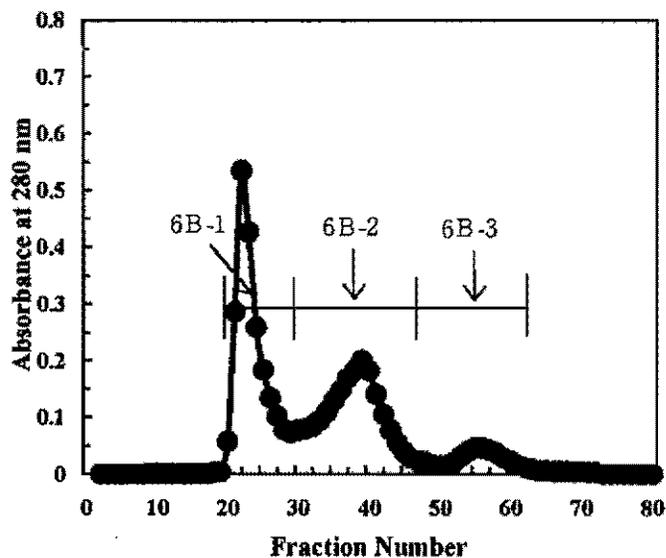


図6. SDS含有バッファーを用いたSepharose 6Bゲルろ過によるF1の分画

この分画物を用いて胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼの吸着阻害作用を調べた。

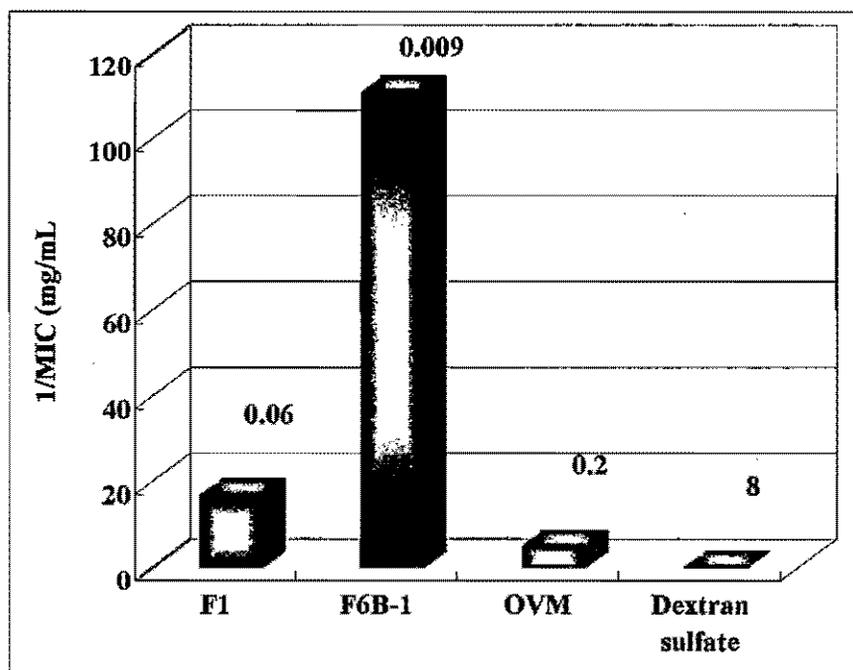


図7. 胃ムチンへのピロリ菌ウレアーゼ吸着阻害試験

実験では、ビオチン標識した胃ムチンとサンプルを37℃で30分間インキュベートした後、あらかじめピロリ菌ウレアーゼを塗布したマイクロプレートウェルに加え、3時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビジンと反応させた後、基質を加えて発色させ、プレートリーダーによって490nmの吸光度を測定した。コントロールと比較して吸光度が50%低下したサンプル濃度を最少阻害濃度 (MIC、mg/mL) とした。図7では最少阻害濃度 (MIC) の逆数を表しているため、棒が高いほど活性も高いことになる。実際のMIC ($\mu\text{g/mL}$) は棒の上の数字で示した。F1に比べて10倍強の活性がF6B-1で得られた。F6B-2やF6B-3ではF1に比べ活性が低下した (結果は示していない)。以上から、ピロリ菌定着を阻害する作用を持つと考えられるF1中の成分は、SDS存在下でも解離が認められない巨大成分である可能性が示唆される。後述するように、そのような成分は確かにF1中に存在していると考えられることから、同様な手法によって今後さらに作用成分をF1から精製し、活性成分の完全な同定を行おうと考えている。一方、*in vivo*のピロリ菌定着予防機能について、これら活性分画物を用いて現在検討中である。

3. 牛乳ムチンの調整とそのタンパク質化学的特徴

計画の概要：分画分子量100万の膜を装着した限外ろ過により乳清タンパク質を分画・濃縮後、

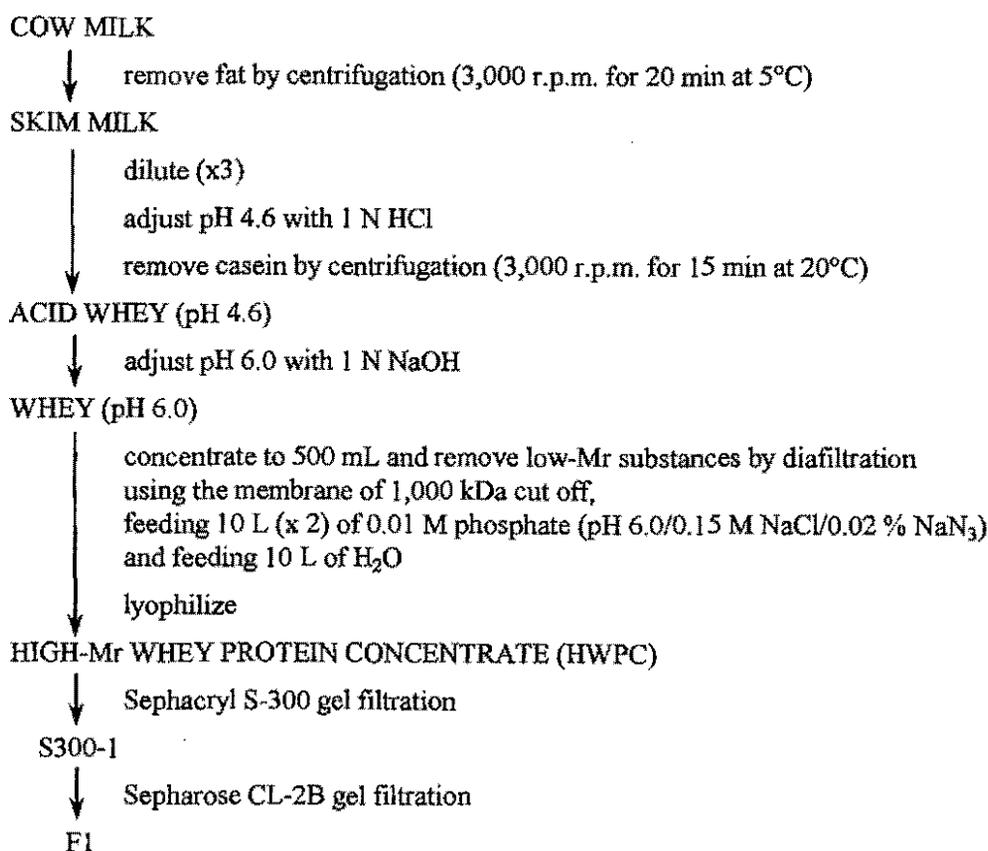


図8. 牛乳からの高分子量タンパク質複合体 (牛乳ムチン、F1) 調整

Sephacryl S-300カラムを用いたゲルろ過を繰り返し、void容に溶出する高分子量タンパク質複合体 (F1) として、多様な生理活性を示す牛乳ムチンを調整する。また、F1に対するモノクローナル抗体を作製し、F1のタンパク質化学的な特徴付けを行う。

結果：図8に牛乳から高分子量タンパク質複合体 (F1) 調整の概略を示した。

本研究で用いた牛乳ムチンは牛乳乳清中の巨大タンパク質複合体として定義されるものである。図8に示しているように、この複合体はSephacryl S-300でも Sepharose CL-2Bでも、いずれのゲルろ過においてもvoid容に溶出される。牛乳中の含量を求めることは難しいが、図8の分離過程を経て、牛乳1kgから、およその目安として50~100mgのF1を得ることが出来る。

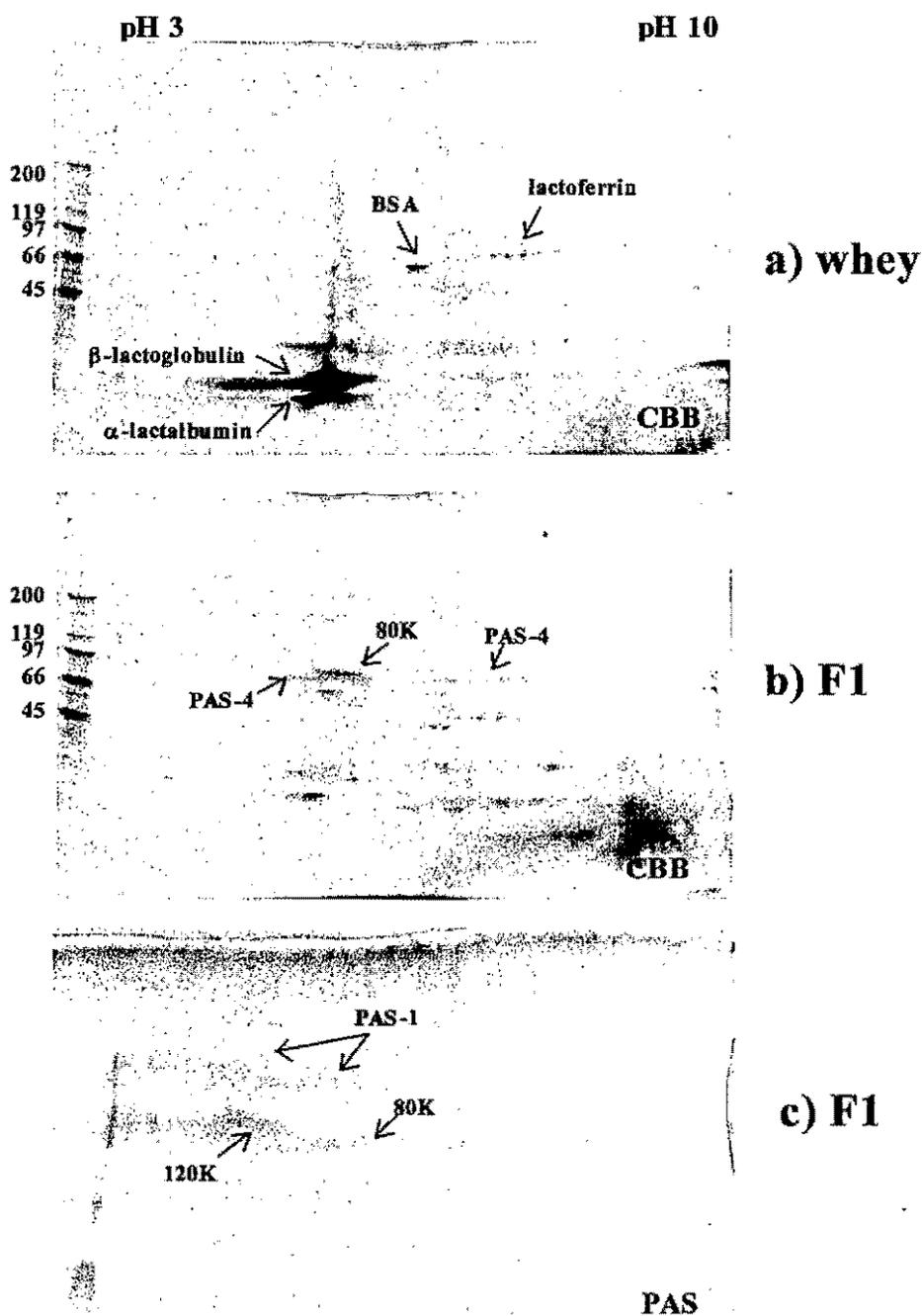


図9. 牛乳乳清とF1タンパク質の二次元電気泳動プロフィール

図9に乳清とF1の二次元電気泳動分析の結果を示した。この実験では、一次元目にpH3-10の等電点電気泳動、二次元目に3~20%のゲルを用いたSDS-PAGEを行っている。通常のバッファー条件下では巨大複合体を形成しているF1中の成分がSDSの作用によって解離し、多数のスポットとして現れることが示された。未処理乳清の泳動プロフィール（図9、a）との比較から、F1中には主要な乳清タンパク質は含まれず、81kDa付近、50kDa付近、及び20から30kDa付近にも主要なスポットが複数認められた（図9、b）。一方、強いPAS染色を受けるF1成分は限られており、150~200kDaのPAS-1、120kDa、及び、80kDaの糖タンパク質が酸性pH領域に検出された（図9、c）。

既に示してきているように、多様なF1の生理機能発現にはF1中の特定の成分が関与するはずであるが、それぞれの機能発現において中心的な役割を果たす成分を特定することが容易ではない。我々はF1中の成分に対するモノクローナル抗体作製を通して、F1成分の同定を試みている。これまでにいくつかの抗体が得られているが、そのうちの代表的なものの反応特異性を二次元電気泳動とイムノブロットティングによって分析した。結果を図10にまとめた。

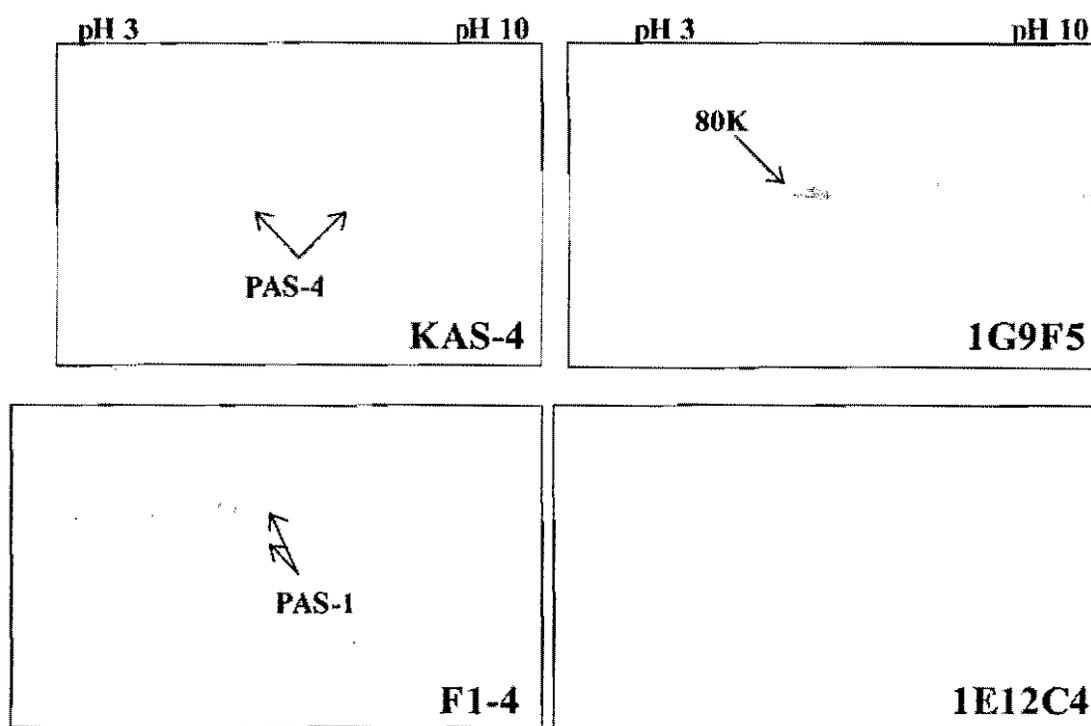


図10. モノクローナル抗体によるF1タンパク質のイムノブロットティング

我々の作製したモノクローナル抗体はいずれもF1中の主要成分を認識するものと考えられるが、図10では牛乳脂肪球膜の主要糖タンパク質の一つであるPAS-4に対するモノクローナル抗体KAS-4（宇都宮大学菅野教授から提供を受けた）の反応特異性と比較した。1G9F5は、分子量的にはPAS-4に類似しているものの、染色プロフィールの全く異なるスポットを浮き彫りにし、我々はこの抗体によって認識される成分を80Kと呼ぶことにした。この成分はF1中の主要糖タンパク質の一つであると考えられる（図9参照）。また、F1-4によって浮き彫りにされたタンパク質のプロフィールは牛乳脂肪球

膜糖タンパク質の一つであると報告されているPAS-1と一致した (図9参照)。作製したモノクローナル抗体の多くがF1-4と同じ反応特異性を示したことは、PAS-1がF1中の主要糖タンパク質であるという観察 (図9参照) と一致している。これまでに作製されたモノクローナル抗体の中には、図10の1E12C4のように、イムノブロッティングではスポットの認められないものもある。次に、F1中の抗原量をELISAによって検討してみた。その結果が図11である。

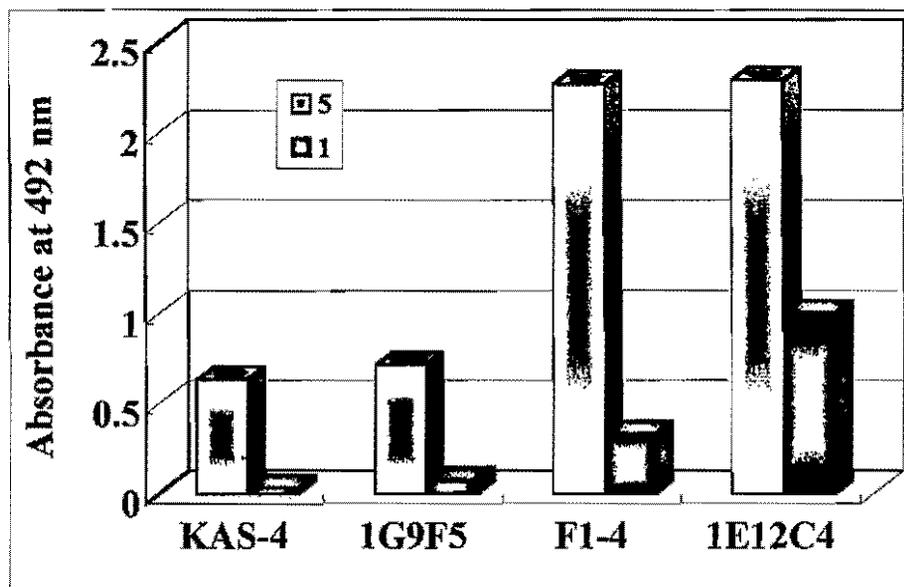


図11. F1に対するモノクローナル抗体のELISA反応性

図11には濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ と $1 \mu\text{g/mL}$ のF1を抗原として用いた場合の各抗体のELISA反応性を示している。いずれの抗原濃度でも、KAS-4と1G9F5の反応性はほぼ等しく、それぞれが認識するPAS-4と80Kの抗原量はF1中ではほぼ等しいことが示唆された。一方、F1-4と1E12C4の反応性は非常に高く、 $5 \mu\text{g/mL}$ のF1濃度ではいずれも最大値を示し、それらの間の違いは明らかではなかった。しかし、 $1 \mu\text{g/mL}$ の抗原濃度での分析は、1E12C4の反応性がF1-4よりはるかに高いことが示された。これは予期しなかった結果である。というのは、F1-4が認識するPAS-1はF1中で最も主要な糖タンパク質であるという事が図9のPAS染色から明らかであり、F1中ではF1-4抗原量が多いという図11の結果はそのことと一致している。にもかかわらず、イムノブロットでは検出できない1E12C4抗原が量的にPAS-1よりはるかに多いことが示されたわけである。この結果は、ゲルに侵入することの出来ない大きなサイズを持つタンパク質が、抗原量としてはPAS-1よりはるかに多くF1中に存在することを意味している。我々は以前、牛乳乳清に巨大タンパク質が存在することを報告しているが、もしかするとその成分が1E12C4によって認識される成分なのかもしれない。

以上の分析結果を総合すると、牛乳ムチンであるF1のプロフィールとして現在のところ次のようにまとめることが出来る。

- ① F1には多様なタンパク質や糖タンパク質成分が含まれるが、SDSの作用によってそれらは互い

に解離される。

- ② F1ではPAS-1、120K、それに80Kが極めて顕著な糖タンパク質成分である。
- ③ F1の主要タンパク質の一つ80Kは脂肪球皮膜の糖タンパク質であるPAS-4とは異なる成分である。
- ④ F1には電気泳動では見ることの出来ない大きな分子サイズを持つタンパク質が量的に最も主要な成分として含まれる。