

16. プロテオーム解析による初乳中有用蛋白質の探索

畜産衛生学専攻 食肉乳衛生学講座 福田健二

メールアドレス fuku@obihiro.ac.jp

研究の概要

【目的】

ホエイ（乳清）の利用は食品領域に限定されており、新規機能性蛋白質に関する研究やその応用例はまだ始まったばかりである。本研究は、初乳、特にホエイに含まれる蛋白質成分のプロテオーム変動解析により、生理活性を持つ新規機能性蛋白質の取得を目的とする。ホエイに含まれる蛋白質成分の経時的变化を解析した例はこれまでになく、また、ホエイに含まれる有用成分に着目し余剰初乳の産業的な有効利用の実現を目指した研究は、ほとんど行われていない。

初乳中には、子牛の免疫や成長に必須とされる成分以外にも、多種ミルクオリゴ糖、酵素、プロテアーゼ阻害蛋白質など、生理的意義の明らかでない要素が数多く含まれている。従来用いられてきた各種クロマトグラフィーを用いた蛋白質の分離法では一度に処理できる量が限られており、また、生理活性を持つ可能性の高い微量蛋白質は見落とされている。これに対し、プロテオミクスの手法を用いれば一度に多くの蛋白質成分を比較することができ、かつ極微量の蛋白質でも検出可能である。また、経時的に集めたサンプルを解析することで、泌乳期において時期特異的に発現している蛋白質の同定も可能となる。

本研究は、プロテオーム変動解析により推定された機能性蛋白質を初乳から分離し、ディフェンシン様活性、レクチン様糖結合能、抗微生物活性、腫瘍細胞増殖抑制作用などを調べ、新規機能性蛋白質を探索する。生理活性の確認されたものはクローニングによる大量生産系を構築し、飼料添加剤、医薬品ならびに機能性食品に応用する。

【方法】

サンプルは、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて飼育されている乳牛 5 頭から、分娩後 0-1 時間、5 時間、10 時間、24 時間、2 日、5 日、10 日、1 ヶ月、5 ヶ月、10 ヶ月目に採取した乳を用いた。酢酸により pH を 6.4 に調整後、遠心分離によりカゼインを除去しホエイを得た。蛋白質可溶化バッファー（5 M urea, 2 M thiourea, 0.25% (w/v) CHAPS, 0.25% Tween20, 0.25% SB 3-10, Biolite 3-10, 2 mM TBP, 10% (v/v) isopropanol, 12.5% (v/v) water-saturated isobutanol, 5% (v/v) glycerol, 1 mM sodium vanadate, protease inhibitor cocktail for mammal (SIGMA), 0.002% (w/v) BPB）に浸して一晩再膨潤した IPG ゲルストリップ（pH 3-10, 7 cm）に、試料ホエイ（蛋白質量 50・g）を添加し、150 V 1 h, 250 V 1 h, 400 V 1 h, 400-4000 V（8000 Vhrs）の条件で等電点電気泳動を行なった。泳動終了後、還元アルキル化を行ない、200 V 定電圧の条件で SDS-PAGE に供した。得られたゲルを銀染色し、泳動像の比較を行なった。

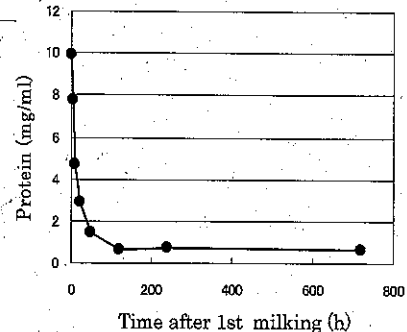


図 1. ホエイ中の蛋白質量

【結果】

分娩直後に行なった初回搾乳から調製したホエイには、Bradford 法による定量的結果、10 ~ 20

mg/ml の蛋白質が含まれていた。今回用いた方法では、初乳 1 L からホエイ蛋白質 3.5 ~ 7 g の回収が可能であった。ホエイ蛋白質は時間の経過に伴い急激に減少し、初回搾乳から半日で半分程度、5 日で約 10 分の 1 にまで低下し、その後、一定の値を示した (図 1)。ここには示していないが、試料を採取した 5 頭ではほぼ同様の結果を得た。また、黄橙色から乳白色への色調変化、pH の上昇、脂肪分の減少など、一般的に知られる初乳から常乳への移行に伴う性状変化を観察した。経時的に採取した乳試料からホエイを調製し、それぞれ二次元電気泳動に供した結果、初乳から常乳への移行に伴うホエイ蛋白質のパターン変動を明らかにした (図 2)。初回搾乳後 1 日から 2 日目の乳から調製したホエイは、初乳と常乳の間期的なパターンを示す移行期であり、5 日目以降では、常乳のものと同様のパターンを示した。初乳から調製したホエイと比較して、常乳からのものでは 15 kDa および 20 kDa の分子量を持つ蛋白質群の相対量が増加し、また、分子量 50 kDa 以上の蛋白質群ならびに 35 kDa 付近の蛋白質群が顕著に減少した。また、ここには示していないが、採取した 5 頭についてほぼ同様の結果を得た。

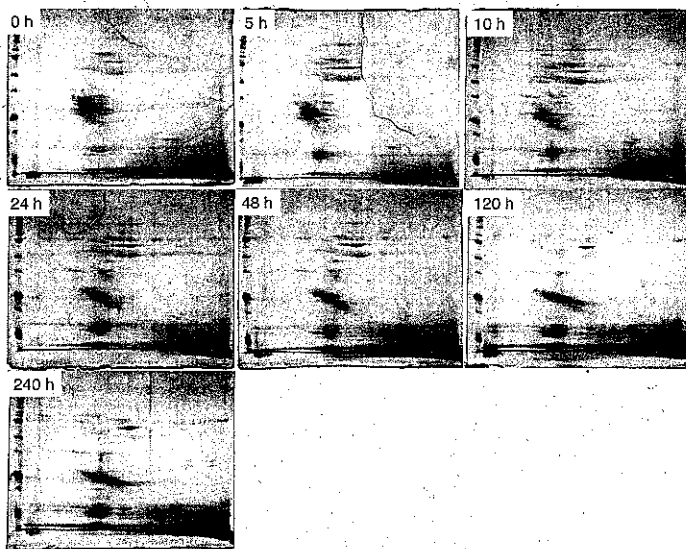


図 2. ホエイ蛋白質のパターン変動

ならびに pH 4.5 から 7.5、分子量 75 kDa 以上の高分子領域に見出される蛋白質群の存在が特徴的であった。これに対し、常乳では pH 6、分子量 25 kDa 付近に見出される蛋白質群がならびに pH 8.5

全ての試料について、得られた二次元電気泳動像を比較した結果、スポットの形状が不明瞭であるため定量には至っていないが、初乳に検出される蛋白質を 100 個程度特定した (図 3)。図中の赤丸は、初乳にのみ見られる、あるいは常乳になるに従い著しく減少する蛋白質スポットを示す。黄丸は初乳と常乳共に見られる蛋白質スポットを示す。青丸は常乳にのみ見られる蛋白質スポットを示す。主要なスポット群は pH 3 から 7.5 の範囲に集中しており、pH 7 から 10、分子量 17 から 37 kDa の範囲にわたり、初乳期に特異的な蛋白質群のみが存在する領域の存在を確認した。初乳では pH 5、分子量 35 kDa 付近に見出される蛋白質群

から 9.5、分子量 16 kDa 付近の低分子領域に特徴的な蛋白質群を認めた。

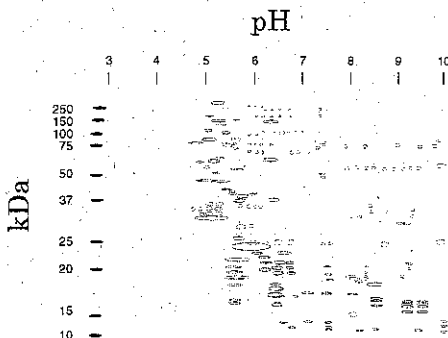


図 3. ホエイプロテオーム変動解析

現在、狭域 IPG ゲルストリップならびにラージゲルを用いたさらに詳細な解析を行なうと共に、質量分析器あるいはマイクロシーケンシング等を利用した蛋白質の同定作業を進めている。今後、初乳由来成分の中に新規生理活性をもつ候補蛋白質を見出し、初乳からの粗精製ならびにディフェンシン様活性、レクチン様糖結合能、抗微生物活性、腫瘍細胞増殖抑制作用など種々のアッセイにより新規機能性蛋白質の取得を目指す。