

脱脂粉乳中の糖タンパク質・膜脂質複合体の 構成成分の同定と機能解析

名古屋大学大学院生命農学研究科

応用生命化学講座 教授 松田 幹

大学院生 村上 耕介

要 約

昨年度の研究により、脱脂粉乳に、種々の糖タンパク質と脂質の複合体が存在し、シヨ糖密度勾配超遠心分離法により、遊離のタンパク質や脂質よりも大きく、また、タンパク質の凝集物よりも小さい比重の画分に分画されることが明らかとなった。このような結果を基に、脱脂粉乳中に残存する脂質とタンパク質の複合体の実体を明らかにし、消化管内での感染防御における機能を解析することを目指して研究を進めた。

これまでの研究により、5-40%（比重1.04-1.18）のシヨ糖密度勾配よりも10-70%（比重1.06-1.27）の密度勾配の方が、成分の分離が良好であることが示唆されたため、本研究においては、後者のより幅広い密度分布での糖タンパク質・膜脂質複合体を分離・分画を行った。脱脂粉乳を水に溶解した後、シヨ糖密度勾配超遠心分離法によって種々の密度（1.04-1.27 g/ml）の画分に分離し、そこに含まれるタンパク質を電気泳動／免疫ブロット法を用いて解析した。その結果、生乳中では糖タンパク質・膜脂質複合体の構成成分としては検出されないラクトフォリン／PP3が、やや低密度（1.10-1.12）の画分に明確に検出された。一方、生乳ではやや高密度画分に検出されたMFG-E8/PAS6-7は、脱脂粉乳からはまったく検出されなかった。さらに、MFGMタンパク質である、ブチロフィリンと120 kDa糖タンパク質が検出されたが、局在する画分が異なっており、複数種の糖タンパク質・膜脂質複合体の存在が示唆された。

次に、電気泳動で分離したタンパク質をゲルから回収してMALDI-TOF/MSを用いた質量分析によって脂質と会合するタンパク質を網羅的に解析、同定した。その結果、脱脂粉乳の溶解液には、低密度画分（比重1.06-1.08）に分画される脂質・タンパク質複合体に、II型サイトケラチンの断片と思われるタンパク質が存在し、さらに、やや高密度（比重1.19-1.21）に、ラクトフェリン、血清アルブミン、免疫グロブリン、キサンチンオキシダーゼ／デヒドロゲナーゼ、 α_{s1} および κ -カゼインなどを主要構成成分とする糖タンパク質・膜脂質複合体が存在することが明らかになった。

さらに、脱脂粉乳中に残存する脂質成分を薄層クロマトグラフィーにより解析した。各種標準リン脂質との比較から、相対的な含量では、コレステロールが最も多く、次にホスファチジルコリンであり、ホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールは少量で、また、スフィンゴミエリンはほとんど含まれないことが明らかとなった。これは乳脂肪での比率とは大きく異なっており、

特定の成分が脱脂乳中に残存しやすいと推定された。

これらの結果から、膜糖タンパク質を含む種々の糖タンパク質とリン脂質からなる膜小胞が、大きな複合体を形成して脱脂粉乳中に存在することが示唆された。この複合体を構成する糖タンパク質は、生乳中に存在する複合体とは異なる組成であり、脱脂（粉）乳に特異的な複合体と思われる。昨年度の電子顕微鏡観察の結果から、これらの成分は大きな粒子状の複合体を形成していると推定され、細胞の擬態としてウイルスや細菌が腸管上皮細胞に感染するのを阻害・中和する機能を持つ可能性が期待される。

キーワード：膜小胞、低密度、プロテオミクス、MALDI-TOF/MS、MFGM、ラクトフォリン (PP3)、サイトケラチン、リン脂質

緒 言

脱脂乳は言うまでもなく、牛乳から脂肪を除いたものであるが、実際に産業的に工場生産される脱脂乳やそれを乾燥した脱脂粉乳は、必ずしも完全に脂肪分を除去しているわけではなく、少量ではあるが脂質成分を含んでいる。また、以前から、乳中の脂質成分としていわゆるクリームとして分離されるある程度の大きさを持つ乳脂肪球以外に微小な脂肪滴や膜状あるいはミセル状のリン脂質の存在が知られている。これらの微量脂質成分では、相対的に中性脂肪（トリグリセリド）の含量は低く、リン脂質や膜タンパク質の含量が高いことが推定される。本研究で着目したのは、このような乳脂肪球以外の脂質成分で、脱脂乳および脱脂粉乳中に残存するミセル状、膜状あるいは膜小胞状の脂質・タンパク質複合体である。このような脂質成分に会合あるいは結合しているタンパク質は、乳脂肪球皮膜タンパク質と同様に乳腺上皮細胞の細胞膜由来の膜糖タンパク質が主要成分と推定される。これまでの脱脂乳に関する研究は、タンパク質、乳糖、ミネラルなどを対象とするものが多く、脱脂後に残存する脂質成分はあまり注目されておらず、構成成分や機能はほとんど知られていない。クリームの主成分である脂肪球とは異なる第二の脂質成分となる可能性も秘めている。

脱脂粉乳は、乳及び乳製品の成分規格などに関する省令により、「生乳、牛乳又は特別牛乳の乳脂肪分を除去したものから、ほとんどすべての水分を除去し、粉末状にしたもの」というように定義されている。この脱脂粉乳にはカルシウム、ビタミンA、B1、B2といった比較的不足している栄養成分が豊富に含まれており、栄養補足食品として理想的な食品である。その製造には加熱処理、乾燥といった工程が含まれているが、この工程を経た後で膜小胞はどのようなになっているのかということは、これまでに調べられたことがない。牛乳成分の機能を考える際には、食品として摂取することが大前提であり、当然、加熱殺菌や乾燥などの加工処理操作が施される。したがって、これらの食品加工上の処理を経た乳成分について検証する必要がある。脱脂粉乳は広範に使用される食品素材・原材料であるが、これに何らかの機能を持った膜小胞や脂質・タンパク質複合体が存在するこ

とを示すことができれば、食品素材としての価値がさらに高くなることが期待できる。

これまでの研究では、乳汁から乳清を分離し、一度100,000 xgの超遠心分離で膜小胞素画分を分離した後、これをシヨ糖密度勾配超遠心分離法で膜小胞画分を調製していた。しかし、この方法では膜小胞画分を調製するまでの操作が多く、特に粉乳を溶解したサンプルでは、多量の沈殿が生じるため、膜成分の損失が生じていることが考えられた。そこで、乳清を直接、密度勾配シヨ糖溶液上に重層し、これを超遠心分離により分画して膜小胞画分を調製することを考えた。まず、脱脂粉乳を水に十分に溶解し、これを直接シヨ糖密度勾配上に重層した後、超遠心分離により分画して膜小胞画分を調製することを試みた。調製した膜小胞画分は同様にSDS-PAGE、銀染色、免疫プロット法で解析を行った。また乳腺上皮細胞株であるCOMMA-1D由来の膜小胞の密度が1.15 g/ml程度であったことから、これまでに用いてきた5-40%シヨ糖密度勾配に加え、10-70%シヨ糖密度勾配も用いることで、シヨ糖密度勾配の中ほどに膜小胞が分画されることを確認した。

1. 脱脂粉乳からのタンパク質・脂質複合体の調製と構成タンパク質の解析

1-1 目的

乳汁には、乳脂肪球 (milk fat globule) が存在し、乳脂肪球皮膜に覆われた脂肪滴として、比較的安定に溶液中に存在している。この乳脂肪球は内側に多量の中性脂肪 (トリグリセリド) を含んでいるため密度が低く、低速で遠心分離するとクリーム画分として上層に分離される。このことを利用して、新鮮な生乳から乳脂肪を除いた脱脂乳が製造される。その後、濃縮、噴霧乾燥を経て、脱脂粉乳が製造されるが、この過程において高濃度で高温にさらされるため、タンパク質の部分的変性や乳糖、脂質などの他の成分との化学的反応が進み、タンパク質と他の成分との共有結合や非共有結合を介した複合体が形成されることが予想される。これらの複合体は脱脂粉乳に特異的な成分であり、食品としての種々の機能に影響を及ぼすと考えられる。本実験では、脱脂粉乳を蒸留水に溶解し、大量に含まれるカゼインを沈殿として除去した後、乳清に相当する画分を調製した。この乳清様画分から膜小胞を分離するにあたって、近年報告されるようになったエキソソームの調製法を応用した。エキソソームは培養上清を異なる遠心加速度で遠心分離して死細胞や細胞片を取り除いた後、最終的に100,000 xgで超遠心分離することで沈殿として回収される。これまでは、脱脂粉乳由来の乳清様画分を35,000 xg、70,000 xgで遠心分離することで、残存するカゼインミセルやタンパク質凝集物などを取り除き、得られた半透明の溶液を100,000 xgで超遠心分離して沈殿を回収してきた。しかし、100,000 xgでの遠心分離で得られた沈殿には、細胞由来の様々な膜断片も濃縮されていると推定されたので、本研究では、カゼイン等を除去した後の乳清様サンプルを、直接シヨ糖密度勾配での超遠心分離に用いた。これにより、低密度のタンパク質・脂質複合体を高密度のタンパク質複合体から効率よく分画することが可能となった。このような密度の差異で分画される低密度のタンパク質・脂質複合体画分に含まれるタンパク質を電気泳動により分析した。

1-2 材料と方法

(1) 密度勾配超遠心分離のための脱脂粉乳の水溶液の調製

脱脂粉乳は財団法人日本乳業技術協会から恵与いただいた。脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加え、さらに防腐剤として10% NaN_3 を100 μl （終濃度0.1%）加えて室温で48時間攪拌して、タンパク質を充分溶解し、脱脂粉乳溶液を調製した。

(2) ショ糖密度勾配超遠心分離によるタンパク質・脂質複合体の分画

密度勾配作成装置（Gradient Mate）で超遠心分離用の遠心管内に10~70%のショ糖密度勾配水溶液（10 ml）を調製した。その上に、上記のように調製した脱脂粉乳溶液200 μl を重層して200,000 $\times g$ で4℃、18時間、超遠心分離した（SW41Tiローター；Beckman Coulter Instruments）。超遠心分離後、ピペットマンP-1000を用いて遠心管の最上部から900 μl ずつ回収して異なる密度のサンプル（12画分）を得た。遠心管の底部に沈殿したペレットに1 ml 生理食塩水を加えて懸濁し、沈殿画分として回収した。

(3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色法

上記のショ糖密度勾配超遠心分離により調製した、密度の異なる各画分から、7.5 μl をLaemmliのサンプルバッファー（還元剤添加あるいは無添加）と混合し、加熱後、SDS-ポリアクリルアミドゲル（7.5%、12.5%あるいは15%）電気泳動により分離した。タンパク質のバンドは、以下に示す銀染色法により高感度に検出した。銀染色はキット（Silver Stain II Kit Wako; Wako Pure Chemical Industries）を用いて行った。サンプルのSDS-PAGEを行った後、ゲルを固定液1（methanol 20 ml, acetic acid 4 ml, Milli Q 16 ml）に浸して10分間振盪した。次に固定液2（methanol 19 ml, acetic acid 3.8 ml, 固定原液 2 ml, Milli Q 15.2 ml）で10分間振盪して、さらに増感液（methanol 19 ml, Milli Q 19 ml, 増感原液 2 ml）で10分間振盪した。ゲルを70 ml Milli Qで5分間振盪した後、染色液（染色液A 2 ml, 染色液B 2 ml, Milli Q 36 ml）で15分間振盪した。染色後、70 ml Milli Qで振盪することを3回繰り返してゲルを洗浄した。現像液（現像原液 2 ml, Milli Q 38 ml）をゲルに加えて適度な染色図が得られるまで振盪し、適度な染色図が得られたところで停止液 2 mlを加えて発色を停止した。最後に70 ml Milli Qで2分間振盪することを3回繰り返してゲルの洗浄を行った。

1-3 結果

ショ糖密度勾配超遠心分離によって得られた12の画分について、各画分に存在するタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。微量成分まで検出するためにゲルを銀染色した。結果の一例をFig. 1に示す。低密度の画分1と2には32 kDaのバンドが、また、画分2には18 kDaのバンドが主要成分として検出された。同様に、画分7から10にも18 kDaの顕著に濃いバンドが検出された。さらに、このやや高密度（比重1.17から1.21）の画分7から10には、銀染色では染色されにくいと推定される28 kDaのバンド、50-60 kDaの3本のバンドと120 kDaのバンドを含む多

様な分子サイズのタンパク質が検出された。牛乳に含まれる既知のタンパク質の同条件でのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の染色像から、画分1と2に存在する32 kDaのバンドはカゼインと推定される。また、画分2と画分7から10に局在する18 kDaのタンパク質は β -ラクトグロブリン、画分7から10に局在し銀染色では検出されにくい28 kDaのバンドは κ -カゼインと、推定された。

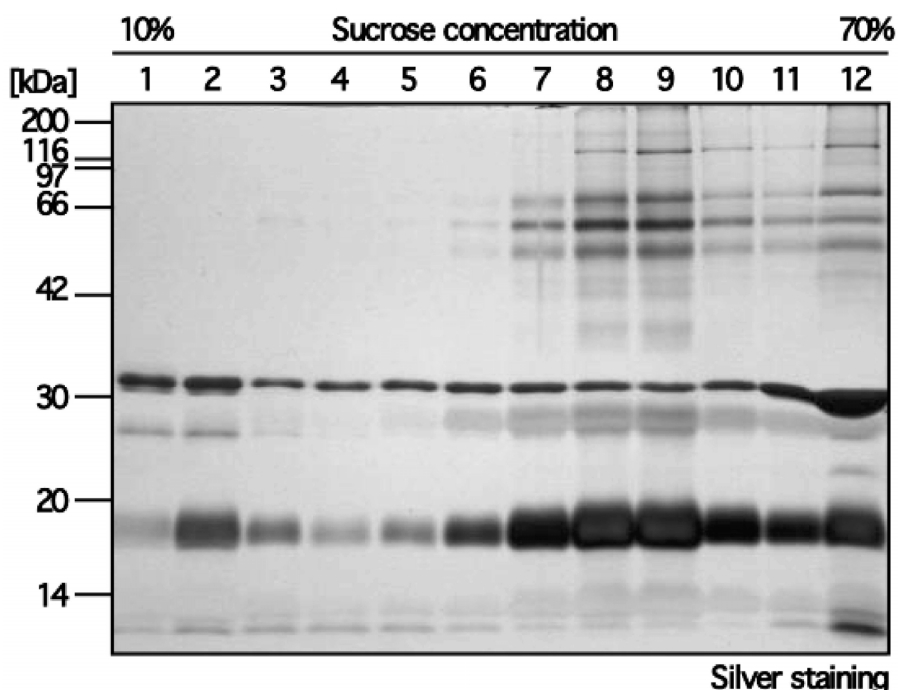


Fig. 1 脱脂粉乳由来の脂質・タンパク質複合体のSDS-PAGE解析

脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%ショ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 xg、4 $^{\circ}$ Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合、加熱しSDS-PAGE (12.5%ゲル)により展開した後、銀染色法を用いて各フラクションに含まれるタンパク質を検出した。

1-4 考察

前回実施したポリアクリルアミドゲル電気泳動の染色像と比較して、添加するサンプルの量を少なくし、また、ゲルのアクリルアミド濃度を15%に上げたことにより、鮮明なタンパク質染色像が得られ、密度に依存したタンパク質成分の分布・局在が明確に示された。

画分1-2は比重が1.06-1.08であり、遊離の水溶性タンパク質がこの画分に分画される。したがって32 kDaと28 kDaのタンパク質は溶解した状態で、おそらくモノマーかオリゴマーとして存在するものと考えられるが、32 kDaのタンパク質は画分2に局在することから、この両者は異種複合体(ヘテロコンプレックス)は形成していないと推定される。

一方、同じ28 kDaのタンパク質は、やや高密度(比重1.17から1.21)の画分7から10に高度に濃縮されている。また、最も高密度(比重1.27)の画分12にも濃縮されている。この最も高密度の画分には、主にタンパク質の重合体や凝集物が存在する。これよりも比重の小さい画分(7-10)に分布

のピークが存在することは、この18 kDaのタンパク質は、脂質（おそらくリン脂質）との複合体を形成し、そのために比重がやや小さくなっているものと推定される。

やや高密度（比重1.17から1.21）の画分7から10には、この18 kDaタンパク質に加え、28 kDa、50-60 kDaの3種のタンパク質と120 kDaのタンパク質が存在し、各タンパク質の構成比率は画分7、8、9および10においてほぼ等しい。このことは、これらの7種のタンパク質は一定の比率で会合体を形成していることを示唆している。これらの他にも会合体の構成成分と推定される35-42 kDa付近のタンパク質も存在することから、このやや高密度の画分には大きなタンパク質会合体が存在すると考えられる。このような大きなタンパク質会合体であるにもかかわらず、最も高密度の画分12まで沈降しないことから、この画分7から10に含まれるタンパク質ヘテロコンプレックスには脂質成分が含まれると考えられる。比重1.17から1.21は、細胞から分泌される膜小胞（リン脂質膜と膜タンパク質の会合体）が分画される比重と一致しており、このことからリン脂質が存在するという推定が支持される。

2. 脱脂粉乳のタンパク質・脂質複合体を構成するタンパク質の免疫化学的解析

2-1 目的

シヨ糖密度勾配超遠心分離により比重のやや低い画分にタンパク質が分画されることから、水溶性のタンパク質と不溶性のタンパク質凝集物の中間的な比重を持つ複合体の存在が推定され、それらは、比重の低い脂質成分とタンパク質の複合体であると予想される。牛乳中に含まれるタンパク質の中で脂質やリン脂質との会合・結合が想定されるものとしては、第一に脂肪球被膜（MFGM）タンパク質があげられる。乳汁中に含まれる脂肪球はMFGMに覆われた膜小胞である。乳脂肪球被膜にはリン脂質やコレステロールだけでなく膜貫通型あるいは膜表在型タンパク質も含まれており、ヒトでは乳汁全タンパク質の2-4%が乳脂肪球に存在している。乳脂肪球からMFGMを調製してSDS-PAGEで分析するとムチン（mucin1/MUC1）、キサントシンオキシダーゼ／デヒドロゲナーゼ（xanthine dehydrogenase/oxydase: XDH/XO）、CD36/PAS4、ブチロフィリン（butyrophilin: BTN）、PAS6-7 /lactoadherin/MFG-E8などの主要MFGMタンパク質を確認することができる。これらは乳腺上皮細胞の細胞質および形質膜に由来するものであるが、必ずしも無作為に移行したものではなく、なんらかの生理的、生化学的意義を持つものと推定される。MFGMのタンパク質は、乳幼児の消化管での微生物に対する感染防御に関与することを示唆する報告がある。脱脂粉乳の水溶液には上述したように、シヨ糖密度勾配超遠心分離の実験結果から、タンパク質と脂質の複合体が存在することが示唆された。このタンパク質・脂質複合体にMFGM構成タンパク質が存在することが予想される。そこで、これまでに調製したMFGMタンパク質に対する特異抗体を用いて、免疫プロット法を用いて脱脂粉乳のタンパク質・脂質複合体に含まれるタンパク質の同定を試みた。

2-2 材料と方法

上述したように、シヨ糖密度勾配超遠心分離法により分画した脱脂粉乳由来のサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、タンパク質をPVDF膜 (Immobilon-P; Millipore) に転写し、ブロッキング溶液NETG (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.05% Triton X-100, 0.25% gelatin) に浸して室温で1時間静置した。洗浄後、MFGM全体を抗原としてスクリーニングして得られた以下の各種モノクローナル抗体と反応させた。マウスモノクローナル抗体3F12 (MFG-E8/PAS6-7を認識する)、4D4 (ブチロフィリン、butyrophilinを認識する)、5D4 (120 kDa糖タンパク質を認識する)、および1C10 (ラクトフォリン/PP3, lactophorin) をNETGで3,000倍に希釈で使用した。二次抗体には酵素標識抗マウスIgG (POD-conjugated anti-mouse IgG, 5,000倍希釈で使用) を用いた。バンドの検出はPODの活性染色により行い、ECL検出キット (ECL Western Blotting Detection Reagents; Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。

2-3 結果

各画分に含まれるタンパク質を電気泳動で分離した後、PVDF膜に転写し、各種のモノクローナル抗体を用いた免疫プロット法によって抗原タンパク質の分布を解析した。モノクローナル抗体、4D4を用いて、MFGMの主要構成成分で、一箇所の膜貫通領域を持つ一型膜タンパク質であるブチロフィリンの分布を解析した結果をFig. 2に示す。画分8 (比重1.19) にブチロフィリンのピークが観察された。また、画分9および10にも弱いバンドが検出された。

次に、モノクローナル抗体、3F12を用いて、MFG-E8/PAS6-7の分布を解析した。ウェスタンブロットティングの結果をFig. 3に示す。この抗体では特異的なバンドはいずれの画分からも検出できなかった。比較対照として、生乳を同様に超遠心分離したサンプルについて、同様に解析すると、比重1.15-1.17付近に明確に検出されるが、脱脂乳のサンプルでは、検出感度を上げて解析しても特異的なバンドは検出できなかった。

また、MFGMに対するモノクローナル抗体の中で、120 kDaのタンパク質を認識することがわかっているが、その抗原タンパク質が同定されていないモノクローナル抗体 (5D4)、を用いて免疫プロット法を行った。その結果、Fig. 4に示すようにこれまでのものとは大きく異なり、画分2から10という幅広い比重の画分に検出された。多数の画分に均一に分布するわけではなく、画分4と7の2つのピークを示した。

さらに、ラクトフォリン (PP3) に対するモノクローナル抗体、1C10を用いて染色すると、密度の低い画分、画分4および5に28 kDaのラクトフォリンのバンドが明確に検出された (Fig. 5)。さらに最も高密度の画分12にも70 kDaのバンドが強く染色された。比較対照として、生乳を同様に超遠心分離したサンプルについて、同様に解析したが、ラクトフォリンの存在は確認できなかった。

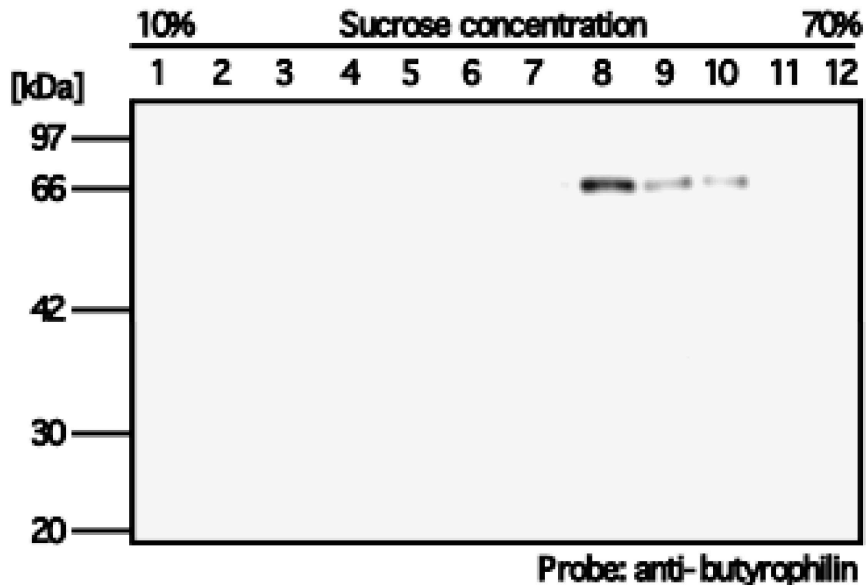


Fig. 2 脱脂粉乳由来の脂質・タンパク質複合体の免疫ブロット解析：Butyrophilin

脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%ショ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 xg、4 $^{\circ}$ Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合、加熱しSDS-PAGEにより展開した後、各フラクションに含まれるタンパク質を免疫ブロットにより検出した。一次抗体として4D4 (mouse anti-bovine butyrophilin)、3F12 (mouse anti-bovine MFG-E8)、を用いた。また二次抗体としてPOD-conjugated anti-mouse IgGを用いた。

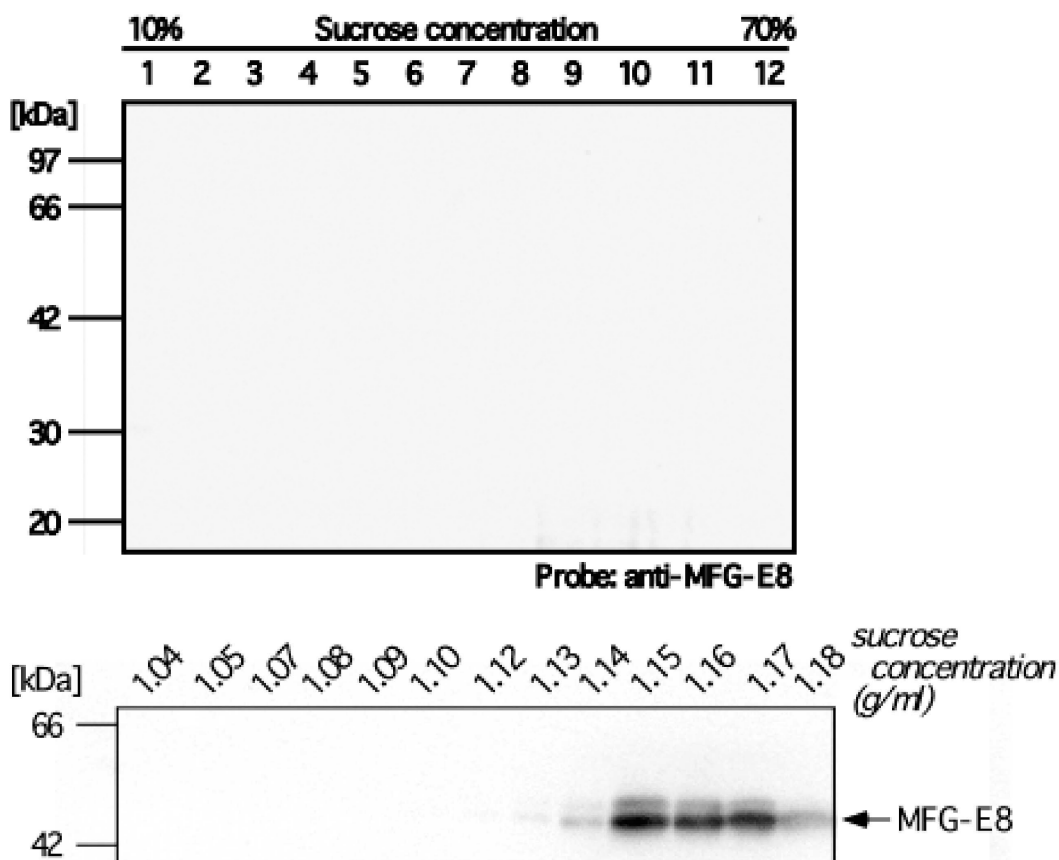


Fig. 3 脱脂粉乳由来の脂質・タンパク質複合体の免疫ブロット解析：MFG-E8

上段のパネル：脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%シヨ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 xg、4°Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合、加熱しSDS-PAGEにより展開した後、各フラクションに含まれるタンパク質を免疫ブロットにより検出した。一次抗体として3F12 (mouse anti-bovine MFG-E8)、を用いた。また二次抗体としてPOD-conjugated anti-mouse IgGを用いた。

下段のパネル：比較対照として、生乳サンプルを溶解脱脂粉乳と同様にシヨ糖密度勾配超遠心分離法により分画し、免疫ブロットによりMFG-E8を検出した。脱脂粉乳サンプルでは検出されないMFG-E8が生乳サンプルからは明確に検出される。

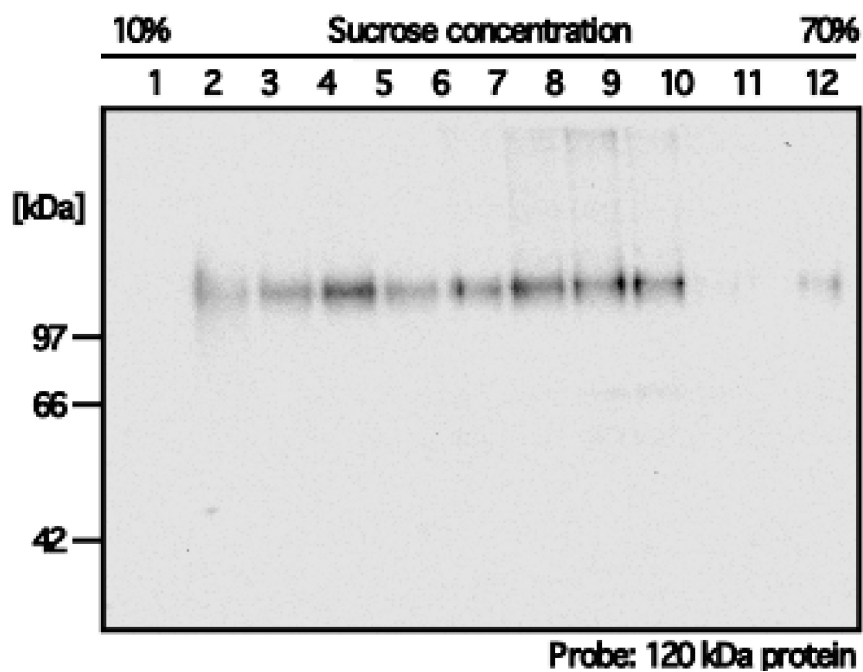


Fig. 4 脱脂粉乳由来の脂質・タンパク質複合体の免疫ブロット解析：120 kDa 糖タンパク質

脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%ショ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 xg、4°Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合、加熱しSDS-PAGEにより展開した後、各フラクションに含まれるタンパク質を免疫ブロットにより検出した。一次抗体として5D4 (mouse anti-bovine 120 kDa glycoprotein)を用いた。また二次抗体としてPOD-conjugated anti-mouse IgGを用いた。

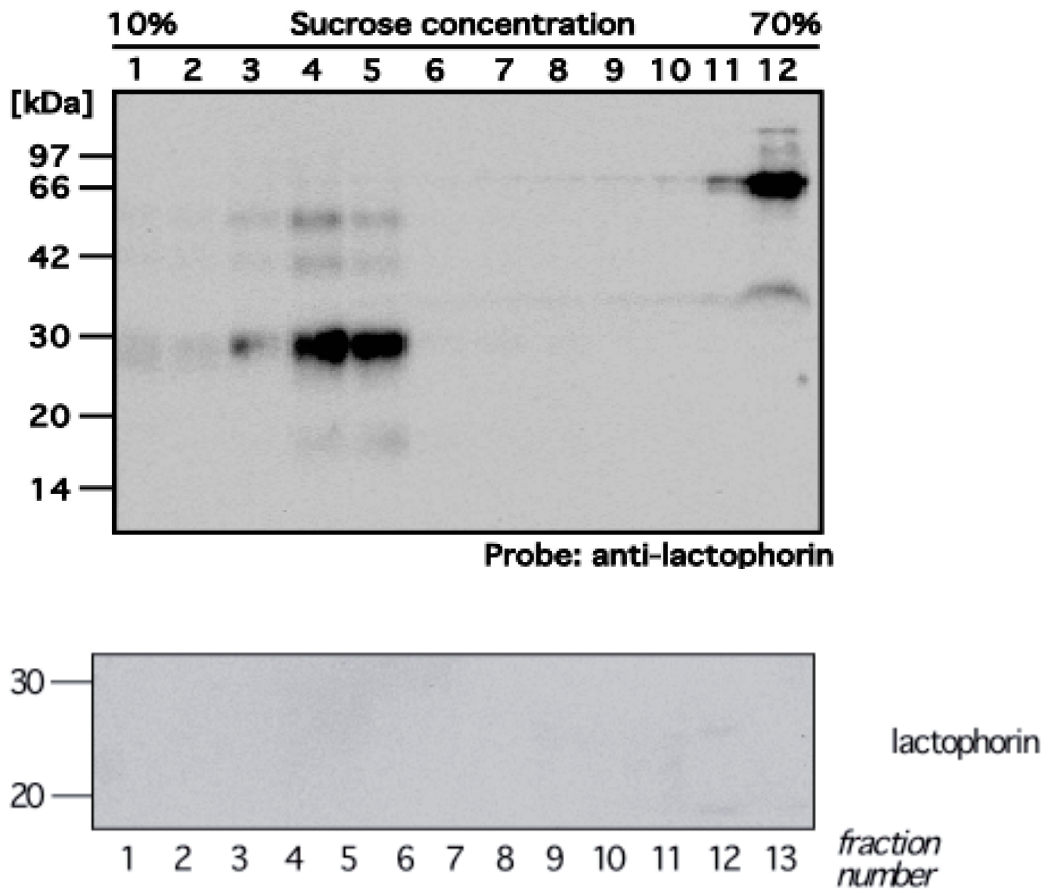


Fig. 5 脱脂粉乳由来の脂質・タンパク質複合体の免疫ブロット解析：Lactophorin

上段のパネル：脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%シヨ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 xg、4℃で18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合、加熱しSDS-PAGEにより展開した後、各フラクションに含まれるタンパク質を免疫ブロットにより検出した。一次抗体として1C10 (mouse anti-lactophorin)、を用いた。また二次抗体としてPOD-conjugated anti-mouse IgGを用いた。

下段のパネル：比較対照として、生乳サンプルを溶解脱脂粉乳と同様にシヨ糖密度勾配超遠心分離法により分画し、免疫ブロットにより120 kDa糖タンパク質を検出した。生乳サンプルでは検出されないMFG-E8が脱脂粉乳サンプルからは明確に検出される。

2-4 考察

シヨ糖密度勾配超遠心分離法により脱脂粉乳溶液を密度ごとに分画し、各フラクションに含まれるタンパク質を銀染色法および免疫ブロット法により解析した。銀染色により検出したところ、30 kDa付近に見られるカゼインと推定されるバンドは、どのフラクションにも見られたが、これは脱脂粉乳中に大量に存在するカゼインが遠心分離の時間内には完全に最適の比重の画分まで移動できなかったものが検出されたものと思われる。

乳汁タンパク質に対する抗体を用いた免疫ブロット解析を行ったところ、乳脂肪球タンパク質の butyrophilin は検出されたのに対して、MFG-E8 はまったく検出されなかった。このことは昨年度の予備実験で行った実験結果と一致しており、最も比重が大きい画分12にも検出されないことから、乳脂肪球に結合していたMFG-E8のモノクローナル抗体3F12に認識されるエピトープは、脱脂粉乳への加工中に脱落あるいは分解してしまっていることが予想された。

脱脂乳中の butyrophilin は生乳（昨年度の成果）に比べると、検出ピークが若干高密度画分へシフトとしているが、これは加熱処理されたことで他のタンパク質などと結合していることが考えられた。乳清タンパク質である lactoferrin は脱脂粉乳中に残存するはずであるが、これも検出されなかったことから、加工中に変性あるいは分解してしまったことが考えられた。Lactophorin は生乳（初乳）の場合と同様にフラクション4付近に分画されていたが、28 kDaのバンドがもっとも多く含まれていた。生乳（常乳）ではまったく検出されないことから、加熱や乾燥の処理の過程で、脂質との複合体が形成された可能性もある。Lactophorin は昨年度に予備的に行った実験と同様の結果となったが、butyrophilin と同様に加熱処理を行っても脂質成分から遊離するよりも、むしろ脂質との結合が促進されることが考えられた。未同定である120 kDa 糖タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いた免疫ブロット解析では、広い範囲の密度に検出されていた。他の乳汁と比較すると、幅広く分布していることから、独自のタンパク質・脂質複合体を形成していることが予想される。今後、この120 kDa糖タンパク質を同定し、幅広い密度分布を示す理由と乳中での機能を明らかにしていく必要がある。

3. 脱脂粉乳のタンパク質・脂質複合体を構成するタンパク質の質量分析（MALDI-TOF MS）による解析

3-1 目的

脱脂粉乳から調製した脂質・タンパク質複合体（膜小胞画分）に含まれる構成タンパク質を、いくつかのモノクローナル抗体を用いて同定し、それらの分布を明らかにすることができた。次に、さらに多くの種類の構成タンパク質を同定し、それらの役割や機能を明らかにしていくために、各

タンパク質のペプチド断片を調製し、その質量を質量分析機によって正確に測定し、データベースを検索することによりタンパク質を同定することを試みた。

PMF法 (peptide mass fingerprinting) においてMALDI-TOF/MSで測定するペプチド断片は、タンパク質を消化酵素により限定消化して調製する。この方法としてSDS-PAGEで分離したタンパク質をゲルから切り出し、ゲル中に消化酵素を取り込ませて、ゲル内でタンパク質を消化するゲル内消化法 (in gel digestion) を用いた。ゲル内消化を行うにあたり、タンパク質の検出には、微量成分も検出できるように、銀染色法を用いた。高感度質量分析法により脱脂乳中に存在する脂質・タンパク質複合体を構成するタンパク質を網羅的に同定・解析することを目指した。

3-2 材料と方法

・SDS-PAGEゲルの銀染色によるタンパク質の検出と脱色

泳動サンプル3 μ lに30% acrylamideを加え (1/5 v/v)、SDS-PAGEにてタンパク質を展開したのち、銀染色にてタンパク質を検出した。銀染色はキット (Silver Staining Kit Protein; Amersham Biosciences) を使用した。泳動後、ゲルを50 ml 固定液1 (acetic acid 5 ml, methanol 25 ml, Milli Q 20 ml) で一晩振盪してSDSなどの担体を洗浄した。続いて50 ml固定液2 (acetic acid 5 ml, methanol 20 ml, Milli Q 25 ml) で15分間振盪することを2回繰り返した。続いて50 ml増感液 (5% sodium carbonate 2 ml, sodium acetate 3.4 g, methanol 15 ml, Milli Q 33 ml) で30分間振盪して、50 ml Milli Qで5分間振盪することを3回繰り返した。つぎに50 ml染色液 (2.5% silver nitrate solution 5 ml, Milli Q 45 ml) を加えて20分間振盪してから、50 ml Milli Qで1分間振盪を2回繰り返してゲルを十分に洗浄した。現像液 (sodium carbonate 1.25 g, 37% formaldehyde 20 μ l, Milli Q 50 ml) を加えて適度な染色図が得られるまで振盪し、適度な染色が得られたら直ちに停止液 (EDTA-Na₂·2H₂O 0.73 g, Milli Q 50 ml) を加えて10分間振盪した。最後に50 ml Milli Qで5分間振盪することを3回繰り返し、十分にゲルを洗った。

銀染色で検出したバンドはスパーテルを用いて切り出し、1 mm角に刻んでからエッペンに移した。エッペンに100 μ l脱色液 (15 mM potassium ferricyanide, 50 mM sodium thiosulfate) を加えて10分間振盪してから、脱色液を完全に除き、500 μ l Milli Qを加えて15分間振盪した。この操作を完全に脱色されるまで繰り返したのち、Speed-Vacで30分間ゲルを乾燥させた。

・Trypsinによるゲル内消化

氷上で、乾燥したゲルに3 μ l trypsin 溶液 (80 ng trypsin in digestion buffer ; Trypsin Gold Mass Spec Grade; Promega) をゲルに染み込ませ、続いて12 μ l digestion bufferを加え、さらに10 μ l digestion bufferを加えた後、ゲルがエッペンチューブの底にかたまらないようにタッピングして30分間静置した。余分な溶液を除き、25 μ l digestion bufferを加えてゲル表面に付着した余分な trypsinを取り除いた後、37°C (気相) で一晩消化した。50 μ l抽出液 (60% acetonitril, 0.1%

trifluoroacetic acid (TFA)) を加えて、室温で振とうしながら40分間抽出した。抽出液をエッペンチューブ (サンプリングチューブ3810X; eppendorf) に回収し、さらにゲルに抽出液50 μ lを加えて40分間抽出した。2回の抽出液を合わせた後、Speed-Vacで5 μ l程度にまで濃縮し、10 μ l 0.1% TFAを加えた。

・ ZipTipを用いたサンプルの脱塩と濃縮

P10もしくはP20ピペットマンの目盛を10 μ lに合わせた後、ZipTip μ -C18 (Millipore) を取り付け、10 μ l 100% acetonitrileを5回ピペッティングしてZipTipの樹脂を前処理した。なおZipTipを用いてのピペッティングはできるだけゆっくり行うようにした。0.1% TFAを5回ピペッティングすることで平衡化した後、サンプル溶液をゆっくりと10回ピペッティングして樹脂に添着させた。0.1% TFAを吸い上げ、廃液用のチューブに捨てることを5回繰り返すことで塩などの樹脂に吸着しなかったものを洗ったのち、新しいチューブに分注した10 μ l 50% acetonitrile/ 0.1% TFAを10回ピペッティングしてサンプルを溶出した。このサンプルのうち1 μ lを、0.5 μ lずつ2回に分けてサンプルプレートにスポットし、その上からマトリクス (5 mg/ml-CHCA (cat. C8982; Sigma) in 50% acetonitrile/ 0.1% TFA) 1 μ lを0.5 μ lずつ2回にわけてスポットして、MALDI-TOF-TOF/MS (4700 Proteomic Analyzer; Applied Biosystems) で測定した。

・ MALDI-TOF/MSによる測定とPMF法によるタンパク質同定

4700 Proteomic Analyzerを用いたゲル内消化ペプチド混合物の測定は、Positive ion reflector modeで、800-4,000 Daの範囲で行った。またスタンダードとして4700 Proteomics Analyzer Mass Standards Kit (Applied Biosystems) を用いた。測定後、Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) を用いてデータベース検索を行い、各バンドのタンパク質の同定を行った。なお検索条件は次のように行った。Database : MSDB、Taxonomy : All entries、Enzyme : Trypsin、Allow up to 1 missed cleavages、Fixed modifications : Propionamide (C)、Variable modifications : Oxidation (M)、Peptide tol. : \pm 0.1 Da、Mass values : MH+。

3-3 結果

脱脂粉乳を溶解したサンプルを10%から70%のショ糖密度勾配超遠心分離法により分画した。この各フラクションに含まれるタンパク質を異なるアクリルアミド濃度 (7.5%および15%) のSDS-PAGEで分離し、銀染色法によりタンパク質を検出した。高分子量のタンパク質を7.5%のゲルで分析した結果をFig. 6に示す。画分8および9をピークに分子量50 kDaから70 kDaの数種のタンパク質と150kのバンドが明確に検出された。検出された主要なバンド (1-18) をゲルから切り出してゲル内消化によりペプチド断片を調製した。

さらに、低分子量のタンパク質を12.5%のゲルで分析した結果をFig. 7に示す。分子量30 kDa付近

のカゼインと推定されるバンドが幅広い比重の画分に分散して存在することが示されたが、画分1-2と画分7-9付近に2つの弱いピークが存在することも明らかである。一方、分子量18 kDaのバンドは β ラクトグロブリンと推定されるが、画分2および画分8、9に明確なピークを持つ局在分布を示した。また、分子量12 kDaのバンドも同様な局在分布を示したが、乳汁中にはこの分子量に一致する主要なタンパク質は無い。

これらのタンパク質の中から、番号をつけた染色バンドについて、ゲルから切り出し、in gelでトリプシン消化を行い、生成するペプチド断片をゲルから抽出した。得られたペプチドサンプルをMALDI-TOF/MSにより測定、解析し、各ペプチドの質量を正確に決定した。タンパク質データベースを用いて質量が適合するペプチドを持つタンパク質を検索することで各染色バンドに相当するタンパク質の同定を行った。さらにMS/MS分析を行い、アミノ酸配列の決定によるタンパク質の確認も試みた。

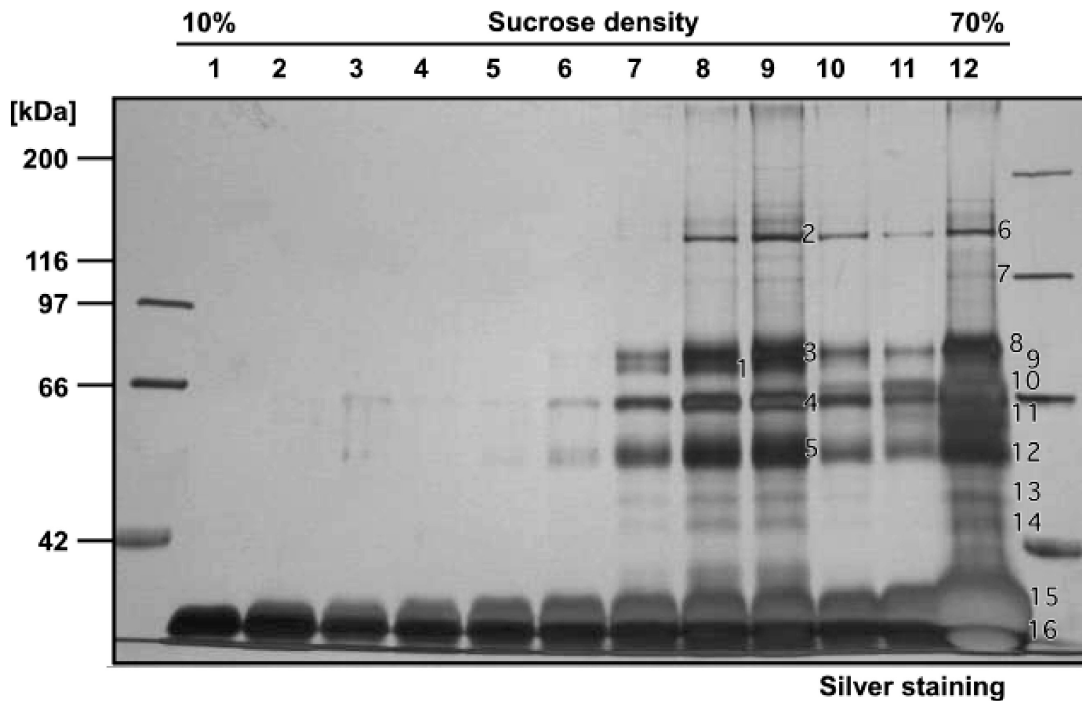


Fig. 6 脱脂粉乳中のタンパク質・脂質複合体を構成するタンパク質の同定：質量分析のための電気泳動と銀染色

脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%ショ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合して加熱した後、30%アクリルアミド1.2 μ lを加え、7.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにてタンパク質を展開した。泳動後、各フラクションに含まれるタンパク質を銀染色法により検出した。

染色バンドの右側に番号(-16)を付けたタンパク質について、ゲル内酵素消化法によりペプチドを調製して質量分析のサンプルとした。

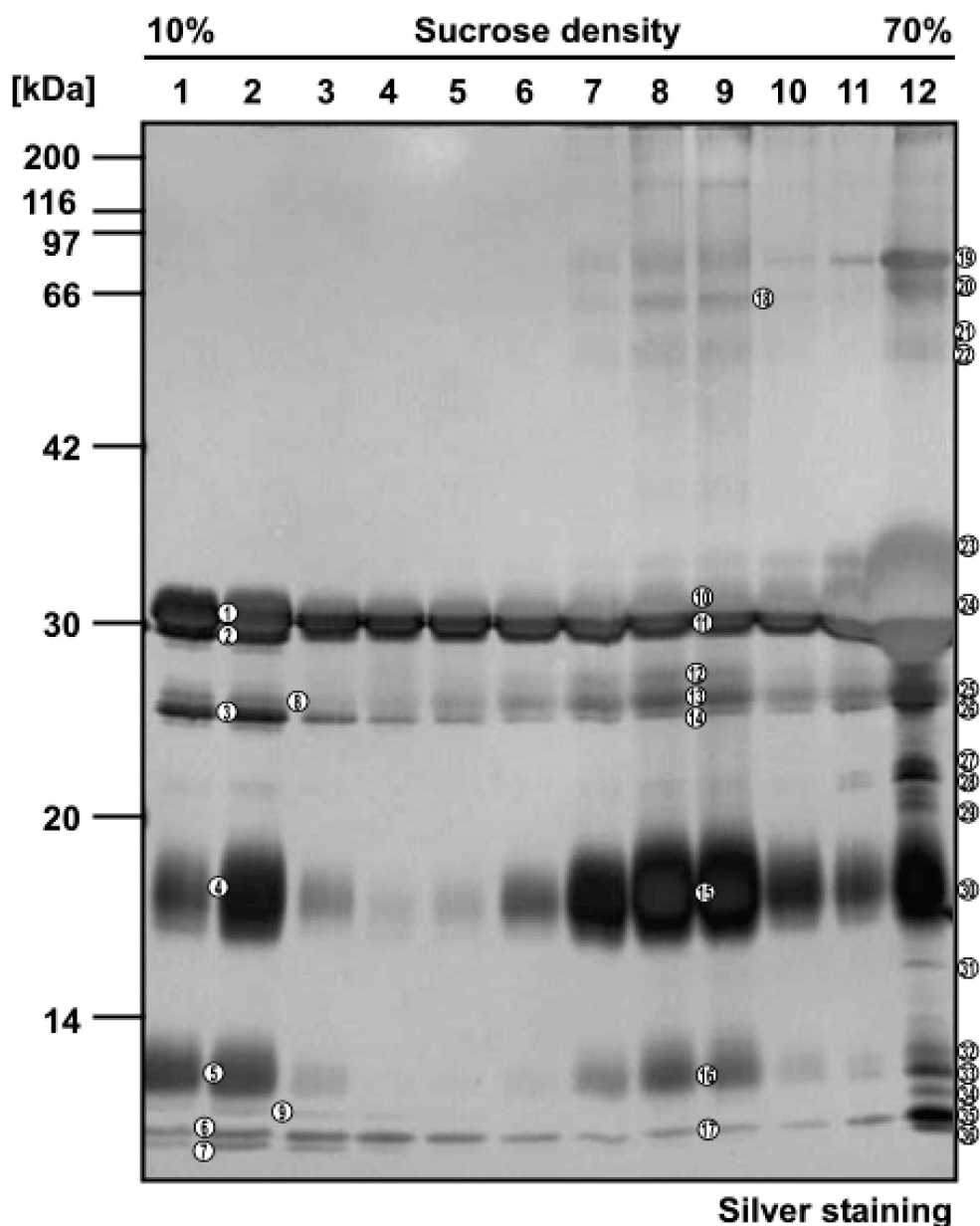


Fig. 7 脱脂粉乳中のタンパク質・脂質複合体を構成するタンパク質の同定：質量分析のための電気泳動と銀染色

脱脂粉乳1 gに蒸留水10 mlを加えて48時間攪拌した後、このうち200 μ lを10%-70%ショ糖密度勾配溶液上に重層し、200,000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで18時間、超遠心分離を行った。遠心分離後、チューブの上層から順に900 μ lずつ分画して12フラクションを得た。各フラクション7.5 μ lをLaemmli's sample bufferと混合して加熱した後、30%アクリルアミド1.2 μ lを加え、7.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにてタンパク質を展開した。泳動後、各フラクションに含まれるタンパク質を銀染色法により検出した。

染色バンドの右側に番号(-16)を付けたタンパク質について、ゲル内酵素消化法によりペプチドを調製して質量分析のサンプルとした。

PMF法およびMS/MS解析の結果の概要をTable 1および2にまとめた。Table 1に示すように、高分子量のタンパク質群 (Fig. 6) では、No. 3, 4および5のバンドは比較的独立しており、量的にも多いため、PMF法によりラクトフェリン、血清アルブミン、および免疫グロブリン重鎖、と同定さ

れ、電気泳動から推定される分子量とも一致した。しかし、No. 4のバンドからは、血清アルブミンと同時に α_{S1} カゼインも同定された。また、信頼度はやや低いが、No. 2のバンドは、MFGM構成タンパク質であるキサントゲンデヒドロゲナーゼ/オキシダーゼと同定された。また、No. 13のバンドはMFG-E8（ラクトアドヘリン）と同定された。

一方、Table 2に示したように、低分子量のタンパク質群では、画分2、No. 3の約25 kDaのバンドおよび画分8のNo. 15の約18 kDaのバンドが β -ラクトグロブリンと同定された。画分2に局在するNo. 5のバンドはII型ケラチン（サイトケラチン）と同定されたが、本来の分子量である66 kDaよりは小さい。画分8のNo. 10-14には α_{S1} -カゼインと κ -カゼインが同定された。 κ -カゼインは、画分7-9にピークを持つ局在を示した。最も密度が大きい画分12からは、多くのバンドからカゼインが同定された。全体で、 α_{S1} -カゼインと κ -カゼインは多く検出・同定されているが、もう一つの主要カゼイン成分である β -カゼインは、いずれの画分からも同定されなかった。同じカゼインであっても脂質複合体を形成し易い成分があると思われる。

Table 1 質量分析によるタンパク質の同定：高分子量タンパク質

No.	Protein	Accession number	Calculated mol. wt.	Matched Peptides	Score
1	N.D.				
2	Xanthine dehydrogenase/oxidase (?)	XDH_BOVIN	149287	1	15
3	lactotransferrin	TFBOL	80492	2	35
4	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	3	163
	serum albumin	ABBOS	69225	2	123
5	Ig heavy chain	S22080	51588	1	68
6	N.D.				
7	N.D.				
8	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	55
	lactotransferrin	TFBOL	80492	2	54
9	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	104
10	serum albumin	ABBOS	71712	2	121
11	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	131
12	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	94
	kappa-casein (?)	KKBOB	21398	1	28
13	Lactoadherin (MFG-E8)	MFGM_BOVIN	48801	3	94
	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	54
14	alpha-s1-casein (?)	KABOSB	24584	1	22
15	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	4	251
16	beta-casein	KBBOA2	25162	2	47
17	beta-galactosidase	GBEC	117546	2	63
18	serum albumin	ABBOS	71712	3	157

N.D. : not determined

"Fig. 6に示したように、SDS-PAGE/銀染色法により検出したバンドのうち、右側に番号を付けたものを切り出し、ZipTip (Millipore) を用いたトリプシンによるゲル内消化を行った。各ペプチド断片はMALDI-TOF/MS装置によりMSおよびMS/MS解析を行い、両方のデータを併せ、Mascotを用いたデータベース検索によりタンパク質を同定した。ランダムヒットの可能性のあるバンドにはタンパク質名の後に(?)示した。

検索条件は次のように行った；Database：MSDB、Taxonomy：All entries、Enzyme：Trypsin、Allow up to 1 missed cleavages、Fixed modifications：Carbamidomethyl (C)、Variable modifications：Oxidation (M)、Peptide tol.： ± 0.25 Da、MS/MS tol.：0.25、Mass values：MH+

Table 2 質量分析によるタンパク質の同定：低分子量タンパク質

No.	Protein	Accession number	Calculated mol. wt.	Matched Peptides	Score
1	N.D.				
2	alpha-s1-casein (?)	KABOSB	24584	1	17
3	beta-lactoglobulin	LGBO	20368	5	80
4	N.D.				
5	keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_human	66060	6	150
6	N.D.				
7	N.D.				
8	N.D.				
9	kappa casein (?)	KKBOB	21398	2	23
10	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	3	167
11	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	115
12	kappa casein	KKBOB	21398	2	50
13	kappa casein	KKBOB	21398	2	52
14	kappa casein (?)	KKBOB	21398	1	28
15	beta-lactoglobulin (?)	LGBO	20368	2	36
16	N.D.				
17	N.D.				
18	serum albumin	ABBOS	71712	5	197
	BTBUTGEN	CAB07533	60060	2	63
19	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	3	166
20	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	3	179
	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	1	66
21	keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_human	66060	2	197
	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	1	62
22	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	2	90
	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	2	72
23	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	3	181
	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	3	174
24	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	4	291
25	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	1	87
	kappa casein	KKBOB	21398	2	66
26	kappa casein	KKBOB	21398	2	44
27	N.D.				
28	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	4	220
29	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	3	143
30	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	4	97
	beta-lactoglobulin	LGBO	20368	2	47
31	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	7	160
32	N.D.				
33	alpha-s1-casein	KABOSB	24584	3	181
	alpha-s2-casein	KABOS2	26215	3	172
34	N.D.				
35	N.D.				

N.D. : not determined

Fig. 7に示したように、SDS-PAGE/銀染色法により検出したバンドのうち、右側に番号を付けたものを切り出し、ZipTip (Millipore) を用いたトリプシンによるゲル内消化を行った。各ペプチド断片はMALDI-TOF/MS装置によりMSおよびMS/MS解析を行い、両方のデータを併せ、Mascotを用いたデータベース検索によりタンパク質を同定した。ランダムヒットの可能性のあるバンドにはタンパク質名の後に(?)示した。

検索条件は次のように行った ; Database : MSDB、Taxonomy : All entries、Enzyme : Trypsin、Allow up to 1 missed cleavages、Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)、Variable modifications : Oxidation (M)、Peptide tol. : ± 0.25 Da、MS/MS tol. : 0.25、Mass values : MH+

染色バンドの移動度からは予想されない分子量のタンパク質が同定された典型的な例として、高分子量のタンパク質群 (Fig. 6) のNo. 4およびNo. 9のバンドのマススペクトルをFig. 8に示す。Fig. 6のバンドNo. 4およびNo.9は、いずれも α_{s1} カゼインと同定されたが、分子量は60-70 kDaである。また、Fig. 7のNo. 19も分子量は70 kDa程度であるが、 α_{s2} カゼインと同定されている (Table 1,と2を参照)。

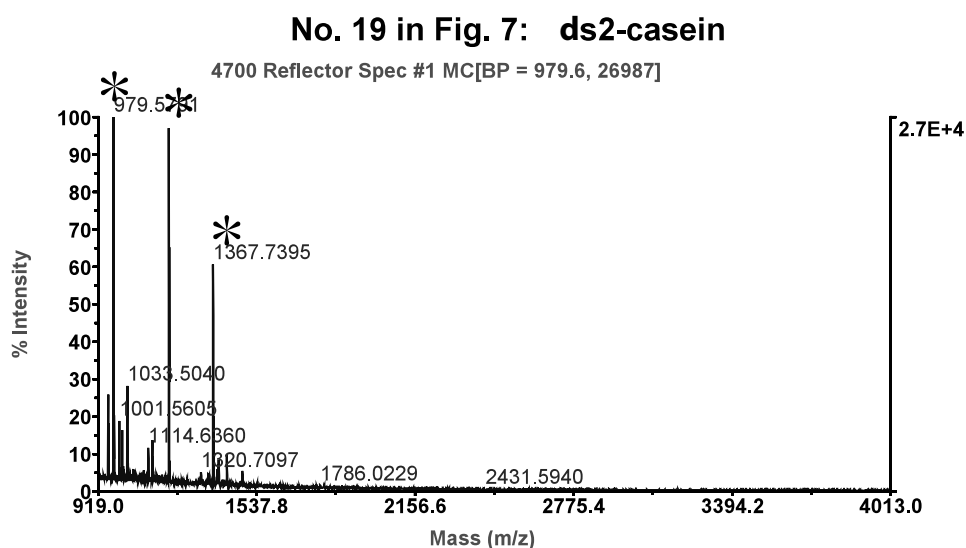
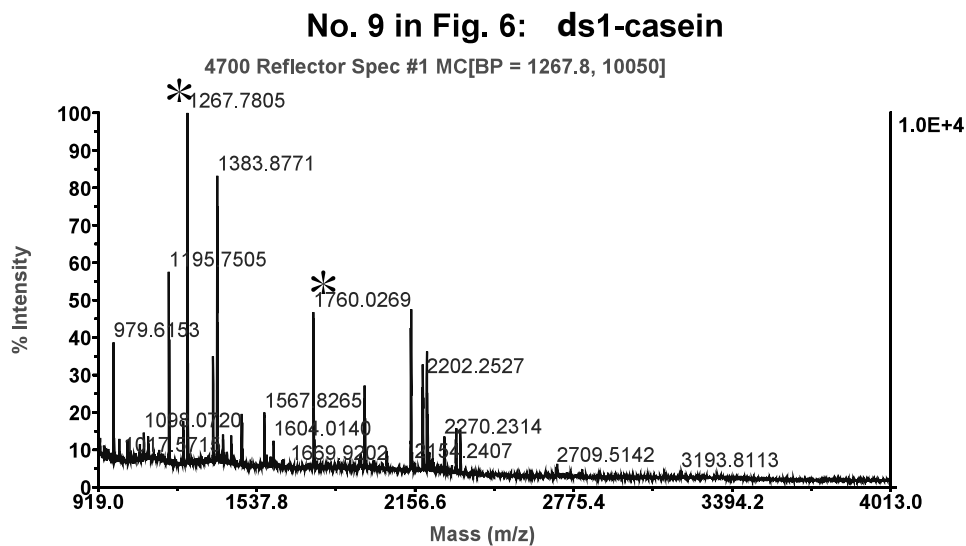
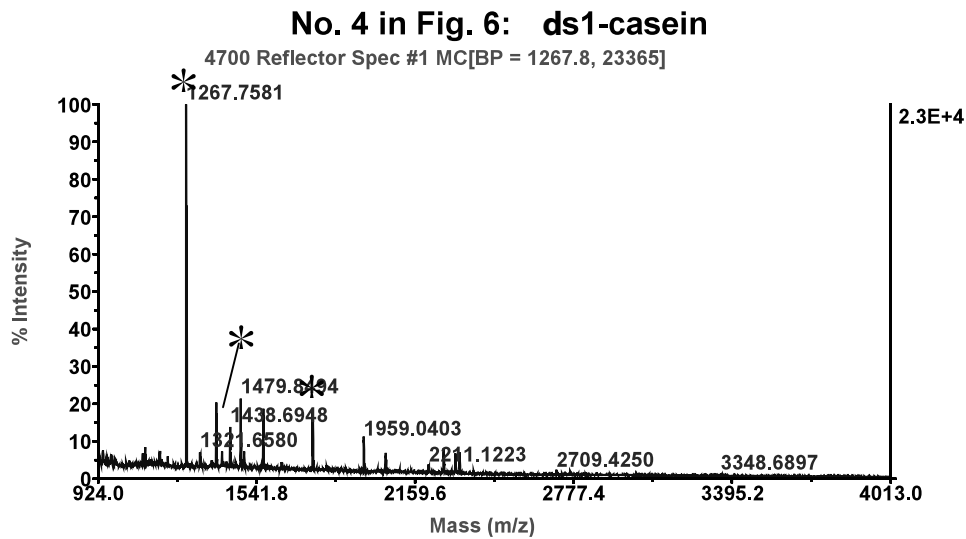


Fig. 8 タンパク質を同定したマススペクトルの例： α_{s1} および α_{s2} カゼイン
*は質量が一致したペプチドのピーク

3-4 考察

SDS電気泳動による分離と、ゲル内酵素消化、およびペプチドの質量分析により、脱脂粉乳中のタンパク質・脂質複合体と考えられる画分に局在するタンパク質を網羅的に解析することができた。脱脂粉乳を製造する過程で、乳成分は殺菌と濃縮・乾燥のために加熱処理を受けるため、その間にタンパク質の側鎖が化学的修飾を受ける可能性が考えられた。タンパク質の側鎖への化合物の付加や、側鎖の一部が脱離すると、ペプチドの質量が変化するため質量分析により元のタンパク質を同定することは困難になる。乳中ではタンパク質のアミノ基と乳糖の還元末端のカルボニル基が化学的に反応する、いわゆる「アミノカルボニル反応」が起きることが知られている。この反応は、ゲル内消化の際の酵素消化残基であるリジンを修飾するため、質量の増加とともに、トリプシンでの消化に抵抗性を持つようになる。これらのことから、脱脂粉乳のような加工食品中のタンパク質を質量分析で解析することは難しいと予想されたが、実際に分析してみると、大部分のタンパク質が質量分析により解析可能であった。これは、一部は化学修飾を受けないで無傷のままのタンパク質が残存していることと、質量分析の感度が非常に高いことによるものと思われる。

Fig. 7とTable 2に示した結果から、タンパク質・脂質複合体の思われる画分（画分8, 9）には、 κ -カゼインが選択的に濃縮されていることが明らかとなった。 κ -カゼインはカゼインミセルの表面の存在してミセル構造の安定化に寄与しているが、このような脂質とタンパク質の凝集物のような複合体においても、それを安定化する機能を示している可能性がある。また、26 kDaのバンド（Fig. 7のNo.3）が β -ラクトグロブリンと同定されたことから、脱脂粉乳中の β -ラクトグロブリンはSDSでは解離しないような共有結合を形成して存在し、その成分は脂質との複合体には存在しないことが明らかとなった。一方、バンドNo. 5（Fig. 7）として同定されたケラチンは乳成分としてはあまり報告がなく、低密度画分に特異的に検出されることから今後の興味深い研究対象と考えられる。

4. 脱脂粉乳中のリン脂質成分の解析

4-1 目的

シヨ糖密度勾配超遠心分離を用いた比重の差異によるタンパク質複合体の分画から、脱脂乳中にリン脂質などの脂質成分が残存することが推定された。そこで、脱脂粉乳から溶媒で全脂質を抽出し、構成リン脂質の組成を薄層クロマトグラフィーにより解析し、同定するとともに、各成分の構成比を明らかにすることを目的として研究を進めた。

4-2 材料と方法

(1) 脂質の抽出

脱脂粉乳300 mgに、抽出溶媒A；Ch-Me（2：1）1 mlを加えてボルテックスで1分間攪拌した後、3,000 xgにて15分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を新しいチューブに回収し、続けて沈殿に抽出溶媒B；Ch-Me（1：1）1 mlを加えて同様の操作を行った。同様の抽出操作を抽出溶媒C；Ch-Me（1：2）、抽出溶媒D；Ch-Me-Ammonia Water（30：60：0.8）で行った。各抽出操作で回収した上清はすべて合わせて、窒素ガスを吹き付けることで乾燥させた後、抽出溶媒A 100 μ lを加えて抽出サンプルとした。

(2) 脂質の展開および検出

抽出サンプル15 μ lあるいは50 μ lをHPTLC（Merck）にスポットした後、Ch-Me-Ammonia Water（65：35：8）により展開した。展開後、プレートを完全に乾燥させてから検出液（3%酢酸銅、8%リン酸）にプレートを2分間浸した。再度プレートを完全に乾燥させた後、ホットプレートを用いて加熱することで脂質を検出した。脂質スタンダードとしてコレステロール（cholesterol: Ch）、ホスファチジルエタノールアミン（phosphatidylethanolamine: PE）、ホスファチジルコリン（phosphatidylcholine: PC）、スフィンゴミエリン（sphingomyelin: SM）、ホスファチジルセリン（phosphatidylserine: PS）およびホスファチジルイノシトール（phosphatidylinositol: PI）をそれぞれ6 μ gずつスポットした。

4-3 結果

Fig. 9に示すように、薄層クロマトグラフィー（TLC）によって脱脂粉乳中に残存する脂質を分析したところ、多数のスポットが検出された。各種脂質スタンダードと比較すると、コレステロール（Ch）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）およびホスファチジルコリン（PC）がはっきりと観察されていた。ホスファチジルセリン（PS）およびホスファチジルイノシトール（PI）は比較的近い位置に重なって検出されているように見えたが、いずれも検出されたと考えられる。相対的な含量では、コレステロールが最も多く、次にホスファチジルコリンであり、ホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールは少量であった。また、スフィンゴミエリンはほとんど検出されなかった。また、TLCプレートのスポット下位置からわずかにしか移動していない成分が比較的多量に存在した。

4-4 考察

ウシ全乳では全脂質のうち、69.2%が中性脂質（トリグリセリド）、26.7%がリン脂質、3.6%がコレステロール（cholesterol）と報告されている。さらにリン脂質の成分の内訳は、ホスファチジルコリンPC（32.9%）、ホスファチジルエタノールアミンPE（30.7%）、ホスファチジルセリンPS（7.8%）、ホスファチジルイノシトールPI（6.7%）およびスフィンゴミエリンSM（33.8%）と報告されている。この値に基づくと、最も多量の成分はホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンおよびスフィンゴミエリンになり、コレステロールは少量成分となる。今回の分析により、脱脂粉乳

に残存する脂質の主要成分はコレステロールで、スフィンゴミエリンはほとんど検出されないことが示された。したがって、全乳の脂質組成と脱脂乳に残存する脂質組成は大きく異なることが明らかとなった。今回の分析では、これ以外にも数種類の脂質が検出されたが、全乳中の脂質と比較してみる必要がある。脱脂粉乳は脱脂されて乳脂肪球が取り除かれているにもかかわらず、このように生体膜由来と思われる脂質が含まれていることは非常に興味深いことである。また全乳ではSMが多く含まれているにもかかわらず、脱脂粉乳では検出されなかったのは、検出液による特異性が考えられたため、異なる種類の検出液を用いることが必要である。今後は二次元にて展開するか、あるいは質量分析（MS）を用いることで、今回未同定であった脂質の同定を目指す。

5. 脱脂粉乳のタンパク質・脂質複合体による食品由来ウイルスに対する感染阻害機能の評価

昨年度の研究により、脱脂粉乳中の糖タンパク質・脂質複合体にヒトロタウイルスの培養細胞への感染を阻害する活性が存在する可能性を示唆した。その阻害機構は、膜タンパク質と脂質、特に膜小胞の複合体は、細胞表面を模倣しており、ウイルスの細胞表面への接着や細胞膜との融合を競合的に阻害するものと推定される。このような感染阻害機能を評価するには、現時点では、感染力（増殖能）を持つウイルスを培養細胞や鶏卵などに感染させて、その増殖度を測定する方法でのみ可能である。しかし、感染力のあるウイルスを用いるには安全性や設備などの問題で簡便に行うことは難しい。また、食品由来ウイルスの中には、生体に感染した場合でのみ増殖し、培養細胞では感染・増殖しない種類のものもあり、この場合には、実験室レベルでの評価は困難である。

一方、ウイルスのコートタンパク質などのウイルスの粒子を形成するタンパク質をコードする遺伝子を動物細胞に導入して強制発現させると、各組換えタンパク質が自己会合してウイルス様の粒子を形成して宿主細胞から放出されることが知られている。このようなタンパク質会合体は、ウイルス様粒子（viral-like particle, VLP）と呼ばれ、DNAやRNAなどの遺伝情報物質を持たないが、電子顕微鏡観察によりウイルスと類似の形態を示すことが報告されている。

本研究では、食品関連のウイルスについてウイルス様粒子（viral-like particle, VLP）を作成して、腸上皮細胞への吸着・結合能を評価するモデル系の確立を目指して、実験を進めている。現在は、ウイルスタンパク質の発現用遺伝子コンストラクトを作成し、動物細胞に導入してタンパク質を発現させる実験まで進んでいる。今後、ウイルス様粒子の生産を確認し、脱脂粉乳中の糖タンパク質・脂質複合体のウイルス感染中和・阻害効果を解析していく計画である。

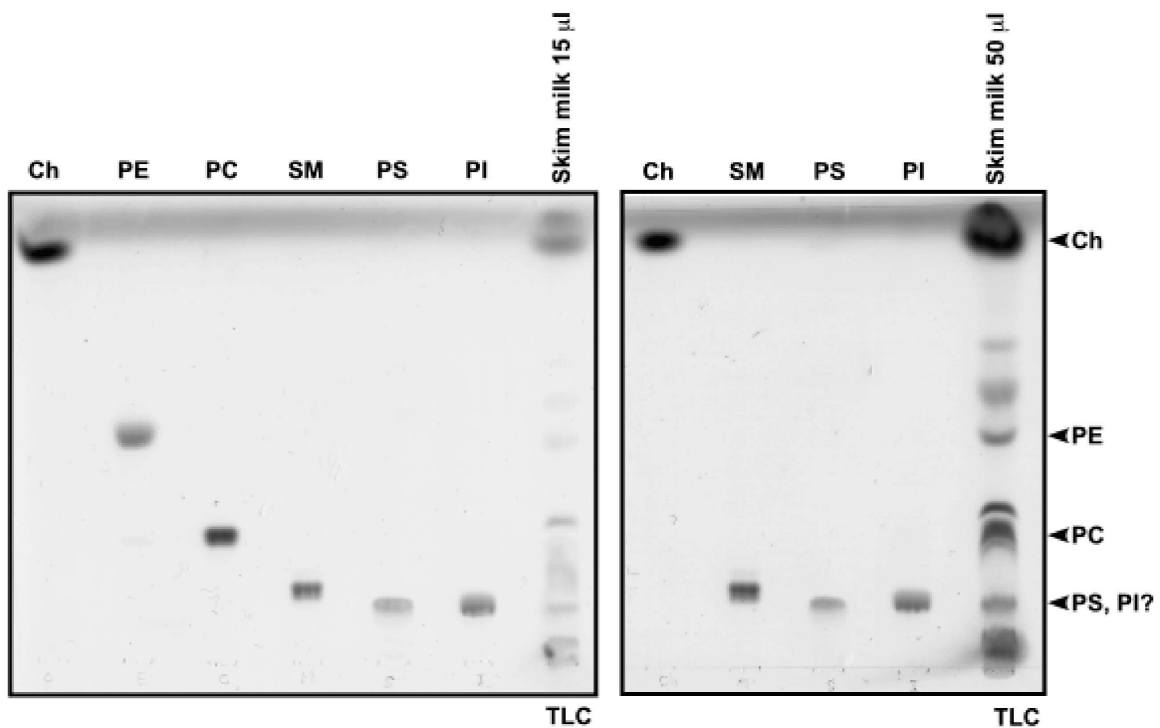


Fig. 9 脱脂粉乳中に残存するリン脂質の薄層クロマトグラフィー (TLC)

脱脂粉乳300 mgに、抽出溶媒 A ; Ch-Me (2 : 1) 1 mlを加えてボルテックスで1分間攪拌した後、3,000 xgで15分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を新しいチューブに回収し、続けて沈殿に抽出溶媒 B ; Ch-Me (1 : 1) 1 mlを加えて同様の操作を行った。同様の抽出操作を抽出溶媒 C ; Ch-Me (1 : 2)、抽出溶媒 D ; Ch-Me-Ammonia Water (30 : 60 : 0.8)で行った。各抽出操作で回収した上清はすべて合わせて、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた後に抽出溶媒 A 100 μlを加えて抽出脂質サンプルとした。サンプルはHPTLC (Merck) にスポットした後、展開溶媒Ch-Me-Ammonia Water (65 : 35 : 8)を用いて展開した後、検出液 (3%酢酸銅、8%リン酸) をプレートに吹き付け、これをホットプレートで加熱することで脂質を検出した。スタンダードとしてcholesterol (Ch)、phosphatidylethanolamine (PE)、phosphatidylcholine (PC)、sphingomyelin (SM)、phosphatidylserine (PS)およびphosphatidylinositol (PI)をそれぞれ6 μgずつスポットした。