

脱脂粉乳中の糖タンパク質・膜脂質複合体の 特徴付けと生理機能の探索

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

脱脂粉乳は、生乳からクリーム（脂肪）を取り除いた後、濃縮して噴霧乾燥したもので、タンパク質（カゼインと乳清タンパク質）と糖質（乳糖）、およびミネラルが主成分である。しかし、工業的に生産した脱脂乳には、乳脂肪の一部が残存すると同時に、乳腺上皮細胞は脂肪滴以外にも細胞膜に由来する脂質成分を分泌していることが示唆されており、いわゆる脂肪滴以外の脂質成分も少量存在する可能性もある。本研究では、脱脂乳中の脂質成分に着目し、これらの脱脂乳中の脂質成分が、加熱濃縮および乾燥処理により、どのような変化を受けるかを調べるために、脱脂粉乳に含まれる膜タンパク質や脂質・タンパク質複合体の特徴付けを行い、生脱脂乳中の脂質成分と比較解析した。さらに、乳の生理機能の一つである消化管での感染防御における、脱脂粉乳中のタンパク質・脂質複合体の寄与についても解析した。

脱脂粉乳を水に溶解した後、ショ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。また、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、低密度画分に分画される脂質・タンパク質複合体が存在し、そこにはラクトフェリン、血清アルブミン、カゼイン、ラクトフォリン（PP3）、ケラチン、などのタンパク質が局在していることが明らかとなった。また、超遠心分離により回収したこれらのタンパク質・脂質複合体をネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察したところ、直径が50-100 nm程度の粒子状の構造が観察された。さらに、これらの低密度画分は、サルの腎臓由来細胞株へのロタウイルス感染に対する阻害効果を示すことも観察された。

これらの結果から、脱脂粉乳中には、乳中の特定のタンパク質と会合した小胞あるいは粒子状のタンパク質・脂質複合体が存在し、それらは、脱脂粉乳を溶解した際の溶液の物理的、化学的性質に影響すること、また、細胞の擬態としてロタウイルス感染を中和する機能を持つ可能性が示唆された。

キーワード

膜小胞、エキソソーム、低密度、プロテオミクス、MALDI-TOF/MS、MFGM、ラクトフォリン

1. 研究の背景

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。

牛乳に含まれる脂質の95%は中性脂肪（トリグリセリド）であるが、これらは乳脂肪球（**milk-fat globule**）として乳汁中に存在している。乳脂肪球は、リン脂質やコレステロールを主成分とする脂質二重膜と種々の膜タンパク質からなる乳脂肪球皮膜（**milk-fat globule membrane; MFGM**）により包まれている。この皮膜に覆われていることにより脂質は乳汁中において安定なエマルジョンとして存在することができる。カゼインや β ラクトグロブリンに代表される乳タンパク質と乳糖は乳腺上皮細胞で合成され、分泌経路を経て頂端側から開口分泌により乳腺胞腔内に放出される。一方、乳脂肪は細胞形質膜が出芽し脂肪滴を包み込んだ状態で離出することで乳腺胞腔へと分泌される。すなわち、細胞小胞体で合成された中性脂肪は小さな脂肪滴として細胞質に産出され、これらの脂肪滴は互いに集まって融合してより大きな脂肪球へと成長しながら細胞の頂端側へと移動していく。そして頂端側へと達すると頂端側の細胞膜に覆われて出芽し、**MFGM**に包まれた乳脂肪球として分泌される。このように細胞膜が細胞外へと離出する現象は離出分泌とよばれ、中性脂肪と膜脂質および膜タンパク質の複合体が細胞外に分泌される。

乳汁に含まれる脂肪球は**MFGM**に覆われた膜小胞で、その直径はヒト、ウシ、ヤギでは平均3-5 μm であることが報告されている [Jensen, 1995]。また乳脂肪球には脂質だけでなくタンパク質も含まれており [Jensen, 1995; Patton and Huston, 1986]、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 [Jensen, 1995; Fortunato et al., 2003; Quaranta et al., 2001]。乳脂肪球から**MFGM**を調製してSDS-PAGEで分離した後Coomassie blue染色を行うことで、mucin1/MUC1、xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO)、CD36/PAS4、butyrophilin (BTN)、PAS6/7/lactoadherin/MFG-

E8などの主要タンパク質を確認することができる [Jensen, 1995; Mather, 2000]。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。乳脂肪は、栄養素としての脂質を摂取するための重要な成分であると考えられているが、乳脂肪トリグリセリドがリパーゼにより分解されて生じる遊離脂肪酸などがバクテリア、原生動物、ウイルスの阻害因子として作用することも報告されている [Hamosh et al., 1999]。また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も関与することを示唆する報告もある [Peterson, et al., 1998; Charlwood et al., 2002; Kvistgaard, 2004]。

脂肪球皮膜で覆われた脂肪滴である乳脂肪球は、細胞からの中性脂肪の細胞外への分泌手段と考えられるが、最近、脂肪の分泌とは無関係に膜小胞が細胞外に分泌される現象が報告され、一部の膜小胞では細胞間相互作用の制御などの重要な生理現象に関与することが報告されている。膜小胞によるタンパク質の輸送は細胞内において頻繁に行われており、これらは小胞輸送 (**vesicular transport**) と呼ばれている。小胞輸送は特定のタンパク質を、輸送小胞 (**transport vesicle**) を介して目的の膜へと輸送する機構のことで、具体例として、小胞体、ゴルジ体やリソソームといった細胞内小器官間で行われている輸送、細胞膜が陥入して生じる小胞を介して細胞が外環境から分子を取り込むエンドサイトーシス (**endocytosis**)、分泌小胞が内部の分子を細胞外へと分泌するエキソサイトーシス (**exocytosis**) などがある。これらの小胞輸送では、特定のタンパク質が膜の受容体に結合すると、クラスリン (**clathrin**) やCOPとよばれる被覆タンパク質の助けを借りて細胞膜や細胞内小器官の膜が出芽して小胞が形成される。膜小胞は細胞質を移動して標的の膜に到達し融合することで特定のタンパク質を送り届ける [Alberts et al., 1998]。前述の乳脂肪球も、乳腺上皮細胞の細胞膜が出芽することで生じる膜小胞ではあるが、膜小胞が細胞内において頻繁に用いられているのに対して、細胞外へと分泌されている例は少ない。近年、細胞外へと分泌される新規の膜小胞が様々な細胞により分泌されていることが報告されるようになりエキソソーム (**exosome**) とよばれている [Thery et al., 2002]。

エキソソームは直径30-100 nmの脂質二重膜で覆われた膜小胞で、細胞培養上清を段階的に遠心分離して死細胞と大きな細胞片を取り除いた後、超遠心分離することで調製される。さらにエキソソームをショ糖密度勾配超遠心分離法で分画すると1.13 g/ml (B細胞由来エキソソーム) ~1.19 g/ml (小腸細胞由来エキソソーム) の密度に分画されることが報告されている [Raposo et al., 1996; Thery et al., 1999; Heijnen et al., 1999; van Neil et al., 2001]。エキソソームがショ糖密度勾配超遠心分離により1.13-1.19 g/mlの密度に分画されるということから、アポトーシス細胞由来の凝集タンパク質やヌクレオソーム断片のような混入物とは分離することができる。エキソソームは網状赤血球においてはじめて発見された [Pan et al., 1985]。この膜小胞は後期エンドソームの内側に存在していることが最初に観察され、これにはエンドサイトーシスマーカーのトランスフェリンレセプターが局在していたことから、エンドサイトーシス由来であることが示唆された。エンドソーム内部

の小胞は、エンドソームの膜 (**limiting membrane**) が内側に出芽することで形成されると考えられ、小胞の内側には細胞質が含まれることが予想された。Panらは、小胞を含んだエンドソーム、つまり **multivesicular body (MVB)** が細胞膜と融合することで、内側の小胞が細胞外へと分泌されていることを電子顕微鏡により観察した。さらに、この小胞は網状赤血球の培養上清を遠心分離することで分離された。当時、後期エンドソームの内容物はリソソームにおいて完全に分解されてしまうため、細胞外へと放出されることはないと考えられていた。そのため、培養上清から分離された小胞は死細胞由来の膜であるとする研究者もいた。しかし最近になり、細胞傷害性T細胞 [Peters et al., 1989]、Epstein-Barr virus感染B細胞 [Raposo et al., 1996]、マスト細胞 [Raposo et al., 1997]、樹状細胞 [Zitvogel et al., 1998; They et al., 1999]、血小板 [Heijnen et al., 1999]のような血球系細胞において、MVBが細胞膜と融合している様子が電子顕微鏡により観察できることが報告されている。さらに、このような血球系細胞 [Raposo et al., 1996, 1997; Zitvogel et al., 1998; They et al., 1999, 2001] やガン化小腸上皮細胞 [van Niel et al., 2001] の培養上清に膜小胞が存在することが報告されている。後期エンドソームはほとんどの細胞が有していることから、エキソソームを分泌する細胞の種類がこれからも増加することが予想される。

エキソソームの構成成分であるタンパク質、脂質についても研究が進んでいる。既知のタンパク質で抗体が手に入るものについては、**Western blotting** [Raposo et al., 1996, 1997; Zitvogel, 1998; van Niel et al., 2001] や**FACS** [They et al., 2001] による同定が試みられている。さらに質量分析 (**mass spectrometry, MS**) を用いた**PMF法 (peptide mass fingerprinting)** やシーケンサによる**アミノ酸配列解析 (peptide sequencing)** によるプロテオミクスのような網羅的な研究が盛んに行われている [They et al., 1999, 2001; van Niel et al., 2001]。これらの網羅的な解析から、エキソソームには特異的なタンパク質が局在していることが示されている。エキソソームに局在しているタンパク質として、**tublin**や**actin**などの細胞骨格タンパク質、**annexin**や**Rab**といった膜融合に関するタンパク質、**peroxidase**、**pyruvate-enolase-1**や**lipid kinase**といった酵素が含まれている。さらには**HSP70**や**HSP90**といったヒートショックタンパク質や**CD63**、**MHC class I**も多くの細胞由来の膜小胞に同定されている。このようなすべての細胞に共通に存在するハウスキーピングタンパク質の一部が存在している一方で、細胞種に特異的なタンパク質がエキソソームに局在している例も報告されている。その例として、樹状細胞などの抗原提示能を持つ細胞が分泌するエキソソームには**MHC class II**が局在していることが報告されている [Zitvogel et al., 1998; Raposo et al., 1996, 1997]。また、興味深いことに、乳脂肪球に局在している皮膜タンパク質**MFG-E8**が樹状細胞や、いくつかのガン細胞株由来のエキソソームにも局在していることが報告されている [They et al., 1999]。エキソソームにおけるこれらのタンパク質の機能は現在のところ不明であるが、これらのプロテオミクスによりエキソソームがアポトーシス細胞由来の膜断片ではなく、生きた細胞による生理的な分泌であることが示唆されている。エキソソームの脂質組成については知見が少ないが、興味深いこととして、血小板から分泌されたエキソソーム表面に、通常は細胞膜の細胞質側に存在

するホスファチジルセリンが少量存在することが報告されている [Heijnen et al., 1999]。近年、アポトーシスの初期段階にある細胞の表面に出現するホスファチジルセリンを活性化マクロファージから分泌されたMFG-E8が認識し結合することが明らかにされた。さらにMFG-E8のRGD配列をマクロファージが細胞表面のインテグリンを介して認識してアポトーシス細胞を貪食することが明らかにされている [Hanayama et al., 2002]。このようにエクソソームは、細胞間での相互作用や情報伝達に何らかの機能を担っていることが考えられる。

前述のようにエクソソームの生物学的機能は明らかにはされていないが、細胞種により異なる機能を担っていることが考えられる。網状赤血球から分離したエクソソームにはトランスフェリンレセプターのように不要になったタンパク質が局在していることから、リソソームにおける分解に抵抗性を持ったタンパク質の除去に有効であると推定される。また、抗原提示細胞由来のエクソソームが免疫反応に関与していることが示唆されている。Epstein-Barr virus感染細胞から分離したエクソソームがヒトCD4⁺T細胞クローンを抗原特異的に刺激することが報告された [Raposo et al., 1996]。またマウスとヒトのMHC class IIを発現させたラットのmast細胞由来のエクソソームがT細胞を刺激することも報告されている [Vincent-Schneider et al., 2002]。これらの研究からエクソソームは免疫系にも関与していることが考えられている。このほかにも特異的なタンパク質が多数含まれていることから、エクソソームが担っている機能はさらに多くなることが予想される。

エクソソームは分泌膜小胞の一種であり、細胞から分泌されるその他の膜小胞として、前述の乳脂肪球、精子細胞が分泌するprostasome [Ronquist et al., 1985; Carlini et al., 1997; Schrimpf et al., 1999, Carlsson et al., 2000; Palmerini et al., 2003; Utleg et al., 2003] などが知られている。しかしながらいずれの分泌膜小胞についても、細胞から分泌される現象の観察や構成成分の同定などに関する報告は多いが、その生物学的意義は未だ明らかにされていない。

大島らは、マウス乳腺上皮細胞株COMMA-1Dの培養上清から超遠心分離により膜小胞を調製し、その特徴を解析した [Oshima et al., 2002]。この膜小胞はMFG-E8を含んでいることがWestern blottingにより確認されている。また、COMMA-1Dの培養上清から分離した膜小胞がショ糖密度勾配超遠心分離法により1.15 g/ml付近の密度に分画されることが確認されており、これが報告されているエクソソーム画分の密度と一致していることから、COMMA-1Dもエクソソーム様の膜小胞を分泌していることが考えられる。

これらの一連の結果を基に、本研究では乳腺上皮細胞が乳脂肪球以外にもエクソソーム様の膜小胞を分泌しており、これが乳汁中に存在しているという作業仮説を立てた。乳腺上皮細胞による乳脂肪球の分泌については詳しく調べられているが、それ以外の膜小胞や脂質成分に関する報告は少ない。そこで、エクソソームの調製方法を参考にして、最初に、ウシ生乳から膜小胞画分を調製し、低密度の脂質・タンパク質複合体を分画して、そこに含まれるタンパク質について、質量分析計を用いたPMF法あるいはMS/MSによるプロテオミクス解析を行い、膜小胞の分子構成を調べた。次に、食品あるいは食品素材として多様用される脱脂粉乳について、水に溶解した際に類似の膜小胞ある

いは低密度の脂質・膜糖タンパク質複合体が存在するか否かを解析した。

次に、このような膜小胞あるいは脂質・タンパク質複合体の生理的な機能の探索を行った。乳汁には細菌やウイルスなどの病原性微生物に対する感染防御能があることが知られているが、その詳しいメカニズムは明らかにされていない。最近の研究において、乳汁中のラクトフェリン [Superit et al., 2001]、Lactoadherin/MFG-E8 [Newburg et al., 1998; Kanamaru et al., 1999]、カゼイン [Wildner et al., 2003] などがロタウイルスに対して感染阻害活性を示すことが報告された。ロタウイルスは幼児の急性下痢症の主要原因であり、幼児の95%が5歳までに感染するといわれている。有効な治療法が確立していないため、ロタウイルス感染症により世界中で年間50万人が死亡していると推定されている。本研究では、膜小胞がリン脂質二重膜で覆われた小胞であるため形態的・物理化学的に細胞を模倣していると想定し、ロタウイルスが膜小胞の表面に接着することで、細胞表面への接着が阻害され、その結果、細胞への感染を抑制しようと考えた。これまでにロタウイルスに対する感染阻害効果が報告されている、いくつかの乳タンパク質も、単分子だけで存在するものよりも、脂質成分や膜小胞と会合して複合体を形成して細胞を模倣することにより、より高い親和性でウイルス粒子に吸着すると推定した。ウイルスが多数の膜小胞や脂質・タンパク質複合体を吸着することで、標的細胞への接着と感染に必須の分子や構造がマスクされ、結果として細胞への感染が阻害されることが期待できる。そこで、本研究で焦点を当てている膜小胞がロタウイルスに対する感染阻害能を有しているのかどうかを調べることで、乳脂肪球とは異なる膜小胞の生理学的意義の探索を試みた。

2. ウシ乳汁からの膜小胞素画分の分離

大島らは、マウス乳腺上皮細胞COMMA-1Dの培養上清を100,000 xgで超遠心分離すると、MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8) を含む膜小胞が沈殿として得られることを明らかにした [Oshima et al., 2002]。本研究では、分泌された膜小胞が乳汁の乳清画分に存在していると考え、乳清を100,000 xgで超遠心分離することで膜小胞画分を調製することを試みた。

乳汁には、膜小胞として乳脂肪球 (milk fat globule) が存在することが知られている [Jensen, 1995]。この乳脂肪球は内側に多量の中性脂肪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、新鮮な生乳からまず乳脂肪を除いた脱脂乳を調製した。次に大量に含まれるカゼインを沈殿として除去して乳清を調製した。この乳清から膜小胞を分離する方法は、近年報告されるようになったエキソソームの調製法を参考にした [Wubbolts et al., 2003]。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 [They et al., 2002]。本研究では乳脂肪球を取り除いた脱脂乳を35,000 xg、70,000 xgで遠心分離することで死細胞、細胞片、カゼインミセルを取り除いて乳清を分離した。得られた乳清を100,000 xgで超遠心分離して沈殿を回収した。ここで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

な膜断片も含まれていると考えられたので、得られた沈殿を「膜小胞粗画分」とした。

35,000 xg、70,000 xg、100,000 xgの各遠心分離で得られた沈殿のタンパク質を銀染色により検出することで、各遠心分離においてどのようなタンパク質が沈殿したのかを調べた。また、MFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blottingにより、MFG-E8が100,000 xgの超遠心分離により沈殿していることを確認した。

(1) 材料と方法

・脱脂乳の調製

清水牧場（愛知県刈谷市小垣江町明門89-1）から恵与されたウシ乳汁（常乳1,500 ml）を5,000 xg、4℃で30分間遠心分離した（RPR12-2ローター；Hitachi Koki）。遠心分離すると上層にクリーム（乳脂肪球）、沈殿にカゼインが分離されるので、これらを取り除いた。上澄みをさらに5,000 xg、12,000 xg、22,000 xg（それぞれ4℃で30分間遠心分離、RPR12-2ローター）で遠心分離してクリームをできるだけ取り除いた。得られた上澄みに終濃度0.05%となるようにNaN₃を加えて、これを脱脂乳として4℃で保存した。

・膜小胞粗画分の分離

脱脂乳3 mlを12,000 xg、4℃で20分間遠心分離することでカゼインを取り除いた。カゼインの沈殿が生じなくなるまでこの操作を繰り返した後（4回程度）、上澄みを12,000 xg、35,000 xg、70,000 xgで段階的に遠心分離して乳清を得た（すべて4℃で1時間遠心分離）。得られた乳清を100,000 xg、4℃で1時間遠心分離することで、沈殿として膜小胞粗画分を得た。35,000 xg、70,000 xg、100,000 xgで得られたそれぞれの沈殿は、Laemmli's sample buffer（125 mM Tris-HCl-pH6.8、20% glycerol、4% SDS、0.25% Bromophenol Blue、2% β-mercaptoethanol）40 μlに溶解して泳動サンプルとした。この泳動サンプルは銀染色とWestern blot解析にそれぞれ20 μlずつ用いた。

・電気泳動とタンパク質の検出

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。

CBB染色については、サンプルのSDS-PAGEを行った後、そのゲルを染色液（0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250、45% methanol、10% acetic acid）に浸して30分間振盪した。染色後、脱色液（40% methanol、10% acetic acid）で適当な染色図が得られるまで脱色した。

・ Western blot解析

SDS-PAGEを行った後、分離した膜小胞タンパク質をPVDF膜（Immobilon-P; Millipore）に転写、NETG（150 mM NaCl、5 mM EDTA、50 mM Tris-HCl、0.05% Triton X-100、0.25% gelatin）でブロッキングした。一次抗体には当研究室黒田により作製されたモノクローナル抗体3F12（mouse anti-bovine MFG-E8: 腹水）を3,000倍希釈で使用した二次抗体には（POD-conjugated anti-mouse IgG、5,000倍希釈で使用）を用いた。バンドの検出はECL検出キット（ECL Western Blotting Detection Reagents; Amersham Pharmacia Biotech）を用いて検出した。

(2) 結果と考察

新鮮な牛乳（常乳）から乳脂肪を取り除いて脱脂乳を分離し、この脱脂乳を35,000 xg、70,000 xgで遠心分離することで乳清を分離した。分離した乳清は100,000 xgで超遠心分離し、この超遠心分離で得られた沈殿を膜小胞粗画分とした。この膜小胞粗画分を調製するために数段階の遠心分離を行ったが、このうち35,000 xg、70,000 xgの遠心分離で生じた沈殿と、100,000 xgの遠心分離で得られた膜小胞粗画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで展開して銀染色で検出し、各沈殿にどのようなタンパク質が含まれているかを調べた（Fig. 1-A）。泳動したタンパク質量が多かったため染色図が乱れたが、各沈殿にカゼインが大量に含まれていたことが確認された（20-40 kDa付近のバンド）。カゼインはウシ乳汁タンパク質の約80%を占めるタンパク質であり、ウシ乳汁には大量に含まれている。そのため35,000 xg、70,000 xgでの遠心分離ではカゼインを完全に取り除くことができず、これが100,000 xgの沈殿にも混入したことが考えられた。また100,000 xgの超遠心分離で得られた膜小胞粗画分には、35,000 xgと70,000 xgの遠心分離で生じた沈殿と同様のバンドが多く見られた。これらはカゼインと同様に、乳汁に大量に存在するタンパク質が乳清に残っており、これが100,000 xgの遠心分離で沈殿したものと思われる。

大島がCOMMA-1Dの培養上清から分離した膜小胞にはMFG-E8が含まれていたことから、本研究では膜小胞のマーカーとしてMFG-E8を用いることにした。このMFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blot解析で、35,000 xg、70,000 xgの遠心分離で生じた沈殿と膜小胞粗画分を調べた（Fig. 1-B）。この結果100,000 xgで超遠心分離して得られた膜小胞粗画分にMFG-E8が含まれていることを確認した。70,000 xgの遠心分離で得られた沈殿にもMFG-E8が含まれていたが、これは凝集したものが沈殿したものと思われる。このことから、100,000 xgで超遠心分離することでMFG-E8を含む膜小胞粗画分を分離できたと考えた。

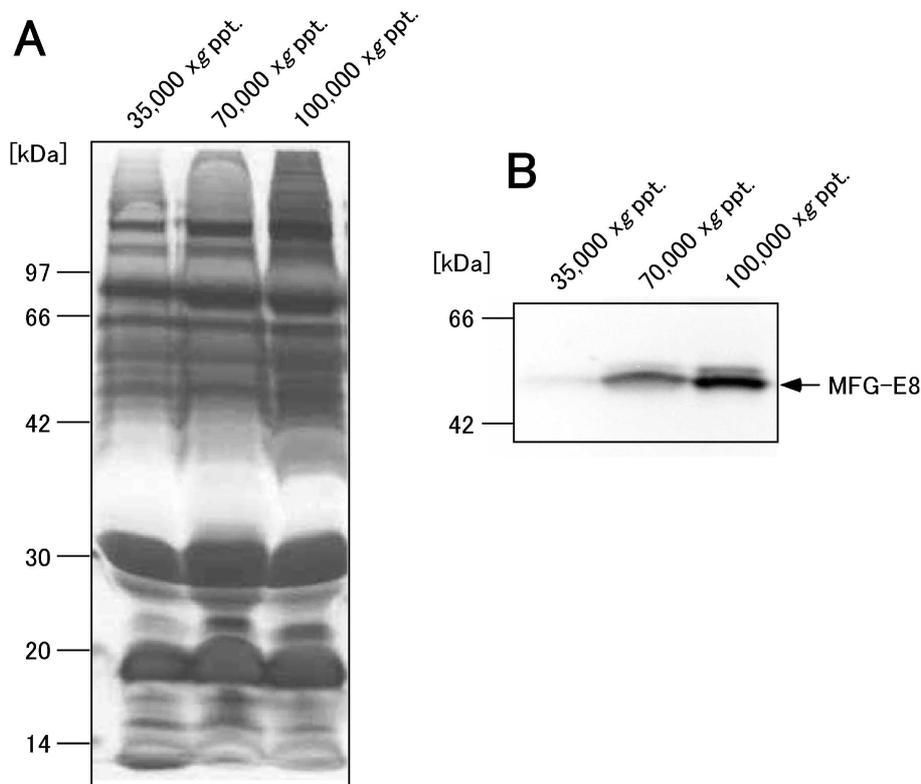


Fig. 1 ウシ常乳からの膜小胞粗画分の調製

常乳から乳脂肪を取り除いて脱脂乳を分離し、この脱脂乳を35,000 xg、70,000 xgで遠心分離することで乳清を分離した。分離した乳清は、100,000 xgで超遠心分離し、この超遠心分離で得られた沈殿を膜小胞粗画分とした。35,000 xg、70,000 xgの遠心分離で生じた沈殿と、100,000 xgで得られた膜小胞画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで展開したのち、銀染色 (A)、あるいはMFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いてWestern blot解析 (B) を行った。

3. ショ糖密度勾配超遠心分離法による膜小胞素画分の細分画

生乳から乳清を分離して、これを100,000 xgで超遠心分離することで、MFG-E8を含む沈殿を得ることができた。この画分には、MFG-E8を含む膜小胞が存在することが推測されたが、SDS-PAGEおよび銀染色によりカゼインなどの乳タンパク質も多く含まれていることが確認された。膜小胞は脂質二重層の膜に包まれているため密度が軽く、ショ糖密度勾配超遠心分離法により密度の差に基づいてさらに分画することができる。神野は、COMMA-1Dの培養上清から調製した膜小胞が1.15 g/ml付近の密度に分画されることを確認している [神野, 2005未発表]。また、エキソソームはショ糖密度勾配超遠心分離法により1.13-1.19 g/mlの密度に分画されることが報告されている [They et al., 2002]。これに対してカゼインなどの乳汁タンパク質はショ糖密度勾配超遠心分離法により高密度画分に分画されるはずである。このことから、ショ糖密度勾配超遠心分離法を用いることで、MFG-E8を含む膜小胞とカゼインなどの乳汁タンパク質を分離することができることが期待された。そこで、膜小胞粗画分を密度勾配ショ糖溶液上に重層して200,000 xgで超遠心分離することで、膜

小胞粗画分に含まれる膜小胞やタンパク質・脂質複合体を密度の差異に基づいて分画することを試みた。分画したサンプルそれぞれについてMFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いてWestern blottingを行い、MFG-E8の含まれる膜小胞が1.15 g/ml付近の密度に分画されることを確認した。またSDS-PAGEのゲルをCBB染色および銀染色を行うことで、MFG-E8以外に低密度に分画されるタンパク質が存在するかどうかを確認した。

(1) 材料と方法

・膜小胞粗画分のシヨ糖密度勾配超遠心分離法による分画

Gradient Mate (BioComp Instruments) で作製した密度勾配シヨ糖溶液 (5-40% in PBS) の上に、PBSに懸濁した膜小胞粗画分を重層して200,000 xg、4℃で18時間遠心分離した (SW41Tiローター; Beckman Coulter Instruments)。遠心分離後、ピペットマンP-1000を用いてtopから1 mlずつ分画した。各フラクションのうち、2 µlあるいは15 µlをLaemmli's sample buffer (※) と混合し、SDS-PAGE/Western blot解析あるいはSDS-PAGE/銀染色に用いた。

(※) Western blottingにおいてMFG-E8を認識する抗体として3F12を用いているが、サンプルをβ-mercaptoethanol (β-ME) を用いていない非還元条件でSDS-PAGEを行ったときに比べて、β-MEを用いた還元条件のときのほうが、抗体のサンプルに対する反応性が非常に低いことが確認された。このことから、Western blottingにおいてMFG-E8を検出するときに限り、β-MEを含まないLaemmli's sample bufferを用いて実験を行った。なお、他の抗体を用いたWestern blottingや銀染色などに用いるサンプル調製には、β-MEを含むLaemmli's sample bufferを用いた。

・分画したシヨ糖溶液に含まれる膜小胞の超遠心分離による濃縮

分画した各フラクション1 mlをPBSで5倍希釈した後、その全量を100,000 xg、4℃で1時間遠心分離して膜小胞画分を再度沈殿させて回収した (70.1Tiローター; Beckman Coulter Instruments)。沈殿はLaemmli's sample bufferに溶解して、以降のSDS-PAGE等に用いた。

(2) 結果と考察

乳清 (常乳) から得られた膜小胞粗画分を、5-40%シヨ糖密度勾配超遠心分離で分画した。分画した各フラクションを、MFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blottingで解析したところ、MFG-E8がフラクション10-12に検出された (Fig. 2-A)。このフラクションの密度は1.15-1.17 g/mlで、エキソソームの密度と類似していた。このことから、乳汁から分離した膜小胞粗画分に含まれるMFG-E8はエキソソーム様の膜小胞と結合して存在しており、この膜小胞はシヨ糖密度勾配超遠心分離法で1.15-1.17 g/mlの密度に分画されることが考えられた。

各画分のタンパク質をSDS-PAGEで分離した後CBB染色にて検出したところ、フラクション11-13 (1.16-1.18 g/ml) では120 kDa、70 kDa、66 kDa、50 kDaの位置にタンパク質が検出された (Fig.

2-B)。これらはMFGMタンパク質と類似の分子量であり、120 kDa: xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO)、70 kDa: CD36、66 kDa: butyrophilin (BTN)、50 kDa: MFG-E8であると推定された [Mather, 2000]。またフラクション5-7 (1.09-1.12 g/ml) の密度において80 kDaに弱いバンドが見られた。このことから、次にCBB染色よりも感度の高い銀染色により各フラクションのタンパク質を検出した。

銀染色で各フラクションに含まれるタンパク質を検出した結果、CBB染色と同様に1.16-1.18 g/mlの密度に数種類のタンパク質が検出されていた。またこれ以外に1.07-1.12 g/mlの密度にもいくつかのタンパク質が検出された (Fig. 2-C)。これらのことから、調製した膜小胞画分には乳脂肪球由来のMFGMと共通のタンパク質が存在することが示唆され、Western blottingで検出されたMFG-E8もMFGMに由来する可能性が考えられた。しかしながら、MFG-E8の検出されたフラクション11-13の

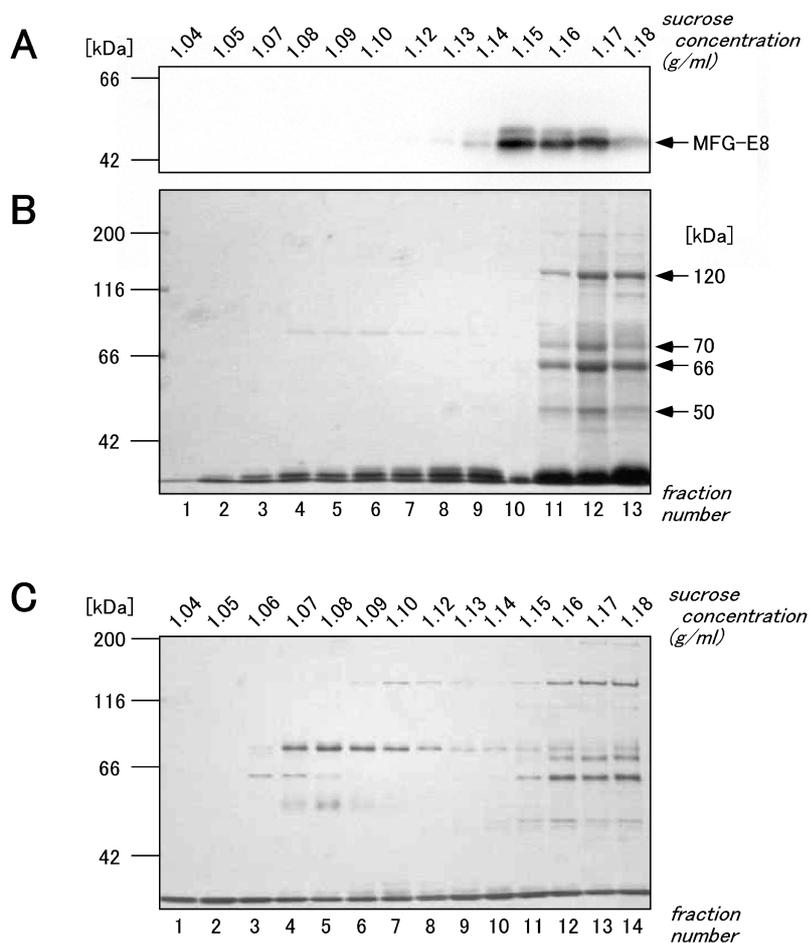


Fig. 2 ショ糖密度勾配超遠心分離法により細分画した膜小胞粗画分に含まれるタンパク質の Western blotting、CBB染色あるいは銀染色による解析

密度勾配ショ糖溶液 (5-40% in PBS) の上に、PBSに懸濁した膜小胞粗画分を重層して200,000 xg、4°Cで18時間遠心分離した。遠心分離後、topから1 mlずつ分画して、各フラクションをMFG-E8に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blotting (A)、CBB染色 (B) あるいは銀染色 (C) にて解析した。

密度は**1.15-1.17 g/ml**であり、これがエキソソームをシヨ糖密度勾配超遠心分離により分画したときの密度と一致することから、**MFGM**とは異なるエキソソーム様の膜小胞が存在していることが推定された。**CBB**染色および銀染色を用いた解析により、フラクション**4-7**にはフラクション**11-13**とは異なる**3種類**のタンパク質が分画されたことが確認された。これらのタンパク質の各フラクションにおける量に相関が見られることから、乳脂肪球とは異なる膜小胞を介して脂質・タンパク質複合体を形成していることが示唆された。各フラクションには、その密度とタンパク質の組成から、異なる種類の膜小胞が存在していることが考えられたため、シヨ糖密度勾配超遠心分離により分画した各フラクションを膜小胞画分と呼ぶことにした。

4. 膜小胞画分に存在するタンパク質の免疫化学分析

生乳（常乳）から乳清を分離、これを**100,000 xg**で超遠心分離することで、膜小胞マーカーである**MFG-E8**を含む膜小胞粗画分を調製した。さらにこの画分を**5-40%**シヨ糖密度勾配超遠心分離法で密度ごとに分画した。各フラクションに含まれるタンパク質を**SDS-PAGE**で分離し**CBB**染色および銀染色で検出したところ、**1.08-1.12 g/ml**および**1.16-1.18 g/ml**の密度にそれぞれ異なる種類のタンパク質が検出された。このことから今回調製した膜小胞粗画分には数種類の膜小胞が存在しており、これがシヨ糖密度勾配超遠心分離法により分画されたことが示唆された。しかし**1.16-1.18 g/ml**の密度に分画されたタンパク質は、**CBB**染色で解析した結果、**MFGM**と共通のタンパク質であることが考えられた。そこで当研究室浦部により作製された**MFGM**タンパク質である**butyrophilin**、および**MFGM**／乳清の両方に確認されるタンパク質である**lactophorin**に対するモノクローナル抗体**4D4**／**1C10**を用いて、これらのタンパク質の存在を確認した。

(1) 材料と方法

・ Western blot解析

一次抗体として、**MFGM**に対して作成され、認識する抗原が同定されているマウスモノクローナル抗体、**3F12** (anti-bovine MFG-E8)、**4D4** (anti-bovine butyrophilin)、および**1C10** (anti-bovine lactophorin) を用いた。それぞれモノクローナル抗体を含む腹水を**3,000**倍に希釈して用いた。また二次抗体には**POD-conjugated anti-mouse IgG**を**5,000**倍に希釈して用いた。

(2) 結果と考察

シヨ糖密度勾配超遠心分離で密度ごとに分画した膜小胞画分について、当研究室で作製した**MFGM**タンパク質 (**butyrophilin**、**lactophorin**) に対するモノクローナル抗体**4D4**、**1C10**を用いた**Western blot**解析によって、膜小胞画分に存在する**MFGM**タンパク質を検出した (**Fig. 3**)。 **MFG-E8**の分布を調べたところ、常乳では**1.15 -1.18 g/ml**の密度に分画されていた。**Butyrophilin**の分布について調べたところ、**1.15-1.18 g/ml**の密度に分画されていた。これらは**CBB**染色によりタンパク質

を検出した際に考えられたバンドと一致しており、1.15-1.18 g/mlにはMFGMタンパク質が存在していることが示された。しかしながらMFG-E8とbutyrophilinとの密度分布が一致しなかったことから、両者の存在する膜小胞は異なることが推定された。またlactophorinについて分布を調べたが検出されなかった。データは示さないが初乳から調製した膜小胞画分においては1.09-1.13 g/mlにおいて明確なバンドとして検出された。このフラクションもCBB染色により何らかのタンパク質が検出されており、lactophorinがこれらのタンパク質と膜小胞を介して結合している可能性が考えられた。

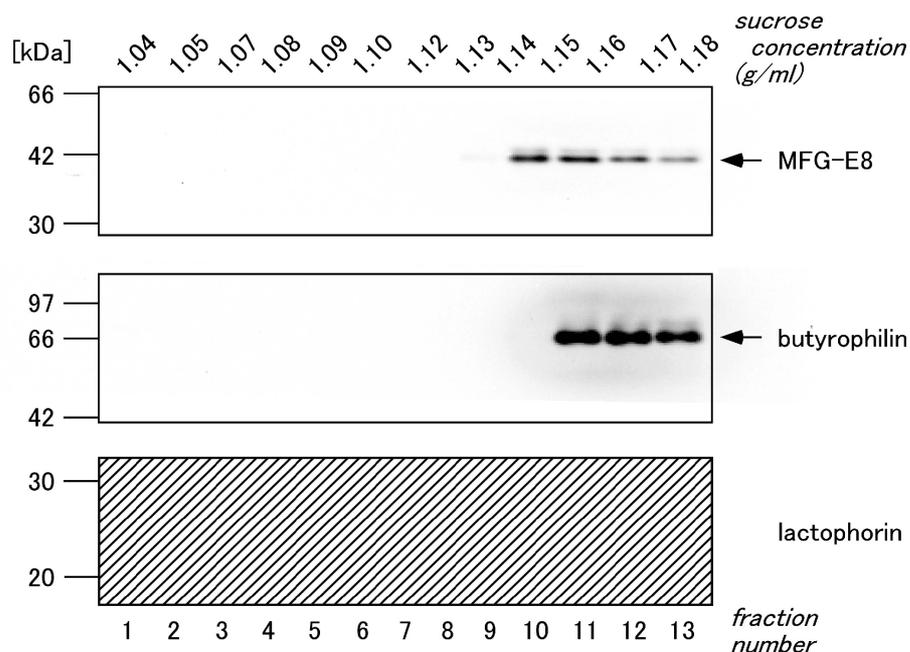


Fig. 3 膜小胞画分に存在するタンパク質のWestern blottingによる解析

5-40%ショ糖密度勾配超遠心分離で密度ごとに分画した膜小胞画分について、当研究室で作製したMFGMタンパク質（butyrophilin、lactophorin）に対するモノクローナル抗体4D4、1C10を用いてWestern blot解析を行った。

5. 脱脂粉乳由来膜小胞画分の調製と構成タンパク質の免疫化学的解析

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粗画分を分離した後、これをショ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、密度勾配ショ糖溶液上に重層し、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、これを直接ショ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、Western blottingで解析を行った。また神野により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 [神野、2003未発表]、これまでに用いてきた5-40%ショ糖密度勾配に加え、10-70%ショ糖密度勾配も用いることで、ショ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) 材料と方法

・脱脂粉乳からの膜小胞画分の調製

脱脂粉乳（財団法人 日本乳業技術協会から恵与いただいた）1 gを蒸留水9 mlに加え、さらに10% NaN₃を100 μl（終濃度0.1%）加えて室温で一晩攪拌して脱脂粉乳溶液を調製した。Gradient Mateで作製した5-40%および10-70%ショ糖密度勾配上に脱脂粉乳溶液300 μlを重層して200,000 xg、4℃で18時間遠心分離した（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topから1 mlずつ分画した。沈殿は1 ml PBSを加えて懸濁した。

(2) 結果と考察

脱脂粉乳を蒸留水に溶解し、これを直接ショ糖密度勾配に重層してこれを超遠心分離することで膜小胞画分を調製した。各フラクションに分画されたタンパク質を銀染色で検出したところ、ほとんどのタンパク質が1.15 g/mlから1.18 g/mlの密度に分画されていた（Fig. 4）。カゼインがすべてのフラクションで検出されていたが、これはタンパク量が多すぎるため、沈降できなかったものが検出されたものであると推測された。生乳の膜小胞画分に検出されたMFG-E8、butyrophilin、lactophorinはどの密度に分画されたのかを確認するため、各タンパク質に対するモノクローナル抗体を用いたWestern blottingにより各フラクションについて解析した。その結果MFGMのマーカースとして用いているbutyrophilinは、銀染色と同様に1.15 g/mlから1.18 g/mlの密度に分画されていたのに対し、MFG-E8はすべてのフラクションにおいて検出されなかった。一方、興味深いことにlactophorinは生乳ではまったく検出されなかったのに対して、脱脂粉乳では低密度画分に明確なバンドとして検出された。さらに、lactophorinが検出されたフラクションの密度は1.10-1.12 g/mlであり、これは初乳から調製した膜小胞画分におけるの密度と一致していた。これらのことから、生乳では膜小胞画分にlactophorinはほとんど存在しないが、脱脂粉乳に加工する際の加熱あるいは乾

燥の過程で、脂質との複合体を形成し、低密度の画分に分画されるようになること予想された。またlactophorinは脱脂粉乳の製造工程で行われる加熱、乾燥を経ても断片化したり高分子化したりしないことが明らかとなった。

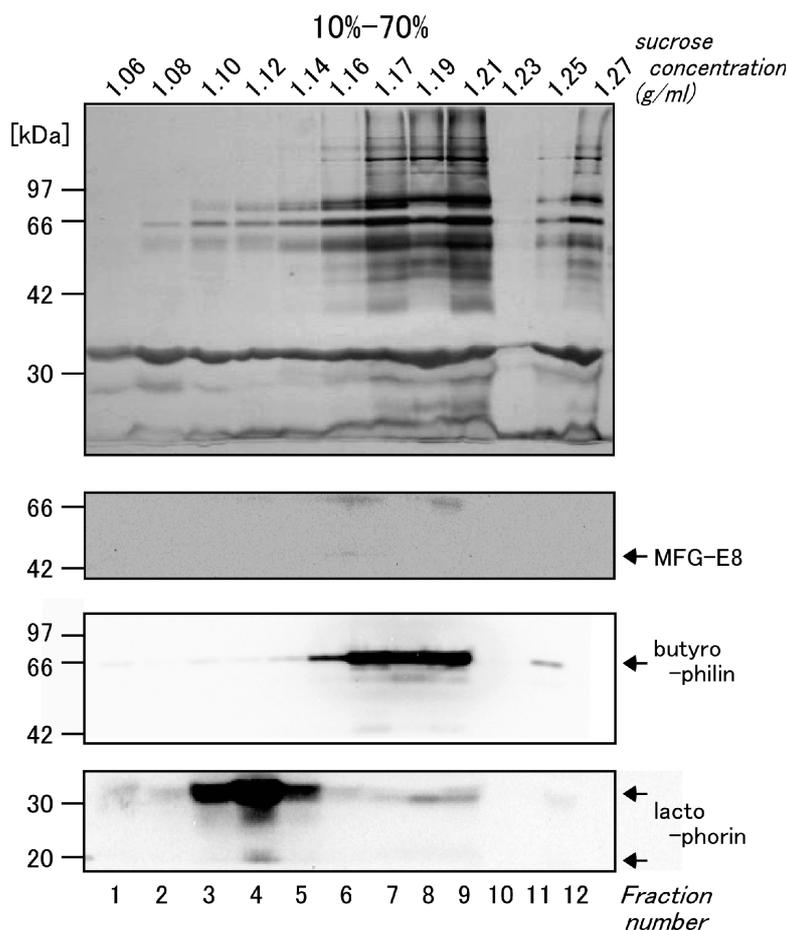


Fig. 4 水に溶解した脱脂粉乳の密度勾配超遠心による分画

最終濃度で1 mg/mlとなるように溶解した脱脂粉乳水溶液を、密度勾配（10-70%）シヨ糖溶液の上に重層し、超遠心分離により密度の異なる成分に分画した。各画分に含まれるタンパク質をSDS-PAGEで展開した後、銀染色（上段）、およびWestern blot解析（下段）により解析した。

6. 脱脂粉乳由来膜小胞の構成タンパク質の質量分析（MALDI-TOF/MS）

脱脂粉乳から調製した膜小胞画分に含まれる膜小胞構成タンパク質をそれらのペプチド断片の質量分析によって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、ゲル内にてタンパク質を消化するゲル内消化（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銀染色法を用いた。

(1) 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 · H₂O 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% acetonitril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100回ピペ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% acetonitril/ 0.1% TFAを10回ピペ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 α -CHCA (cat. C8982; Sigma) in 50% acetonitril/ 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. : ± 0.1 Da、Mass values : MH^+ 。

(2) 結果と考察

脱脂粉乳を溶解したサンプルをショ糖密度勾配超遠心分離により分画した。この各フラクションに含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離して、銀染色で検出した (Fig. 5)。検出された主要なバンド (1 - 12) 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。このペプチド断片の質量をMALDI-TOF/MSにより測定し、データベース検索することで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同定も試みた。

典型的な例として α_{s1} カゼインと血清アルブミンのマススペクトルをFig. 6に示す。また、PMF法およびMS/MS解析の結果の概要をTable 1にまとめた、6、7および11番のバンドは量的にも多く、PMF法によりラクトフェリン、血清アルブミンあるいは α_{s1} カゼインとして同定が可能であった。また、ケラチン (2番)、血清アルブミン (7番)、 α_{s1} カゼイン (1番と11番) および κ カゼイン (12番) はMS/MS分析によるアミノ酸配列から同定された。また、200 kDa以上の極めて大きな分子量のバンド (4番) が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強固な凝集物を形成して脂質と複合体を形成している可能性が考えられた。また、バンド1は α_{s1} カゼインの分解断片と考えられる。一方、バンド2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課題と考えられる。

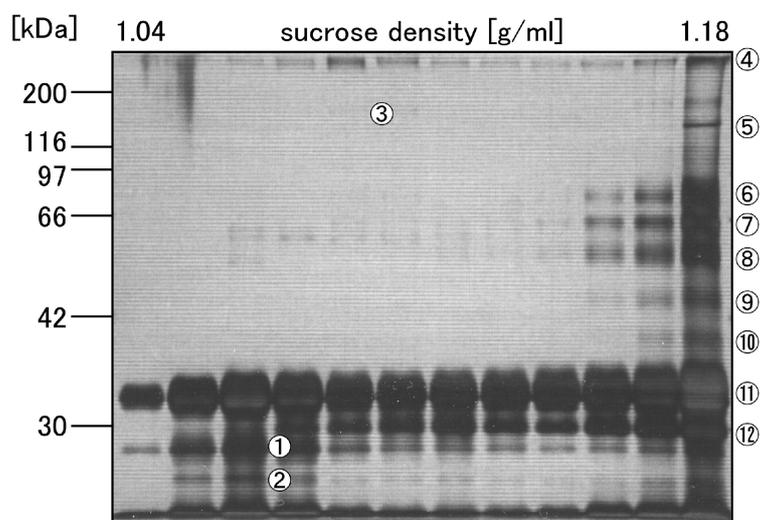


Fig. 5 銀染色による脱脂粉乳由来膜小胞画分タンパク質の検出

脱脂粉乳1 gに蒸留水9 mlを加えて、一晚懸濁した。懸濁液300 mlを5-40%ショ糖密度勾配上に重層し、200,000 xgにて18時間遠心分離した。遠心分離後、ピペットマンを用いて1 mlずつ分画した。各画分10 mlをLaemmli's sample bufferと混合して5分間ボイルした後、30%アクリルアミド溶液を終濃度6%となるように加えて、泳動サンプルとした。SDS-PAGEにて展開後、ゲルを固定液（10% ethanol、50% acetic acid）に浸して一晚振盪した。振盪後、銀染色によりタンパク質を検出した。数字で示したバンドをゲルごと切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化によりペプチド断片を調製した。ペプチド断片の質量をMALDI-TOF/MSにより測定し、PMF法によりタンパク質を同定した。またMS/MSによるアミノ酸配列解析を用いた同定も行った。

Table.1 MALDI-TOF/MSにより同定された脱脂粉乳由来の膜小胞画分タンパク質

No.	Protein	Calculated Matched Coverage			Score	
		mol wt	Peptides		MS	MS/MS
1	α_{S1} -casein	24584				44
2	Keratin	65692				67
3	Unidentified					
4	Lactoglobulin	18711			55	
5	Unidentified					
6	Lactoferrin	80359	10	19%	72	
7	Serum albumin	71712	9	19%	129	183
8	Unidentified					
9	Unidentified					
10	Unidentified					
11	α_{S1} -casein	24584	8	31%	77	263
12	κ -casein	21366				76

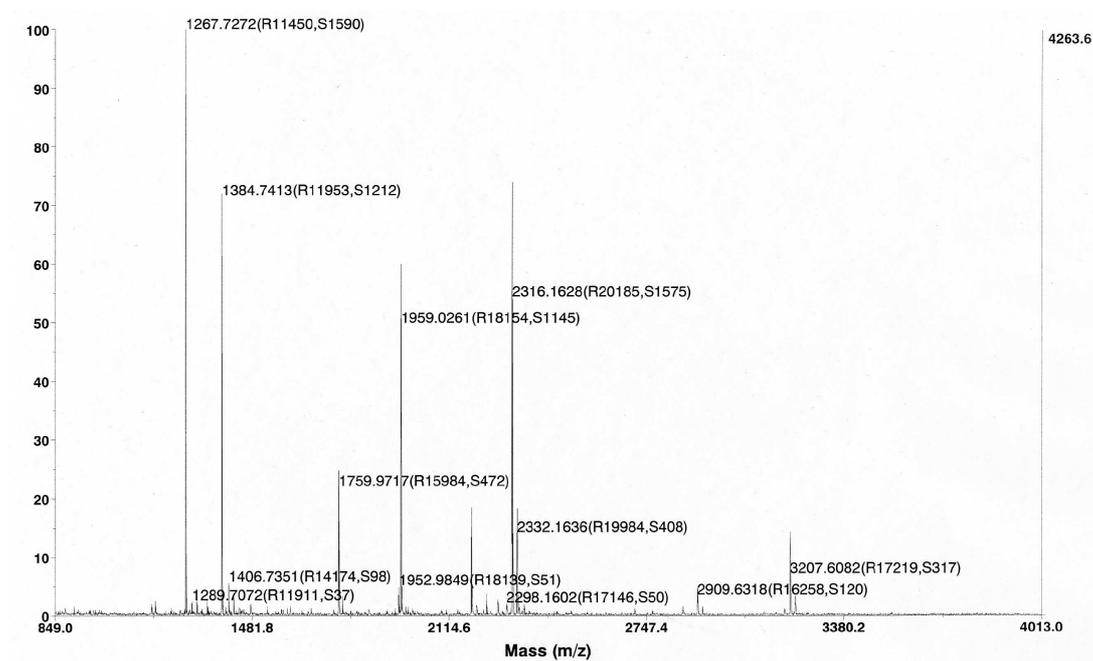
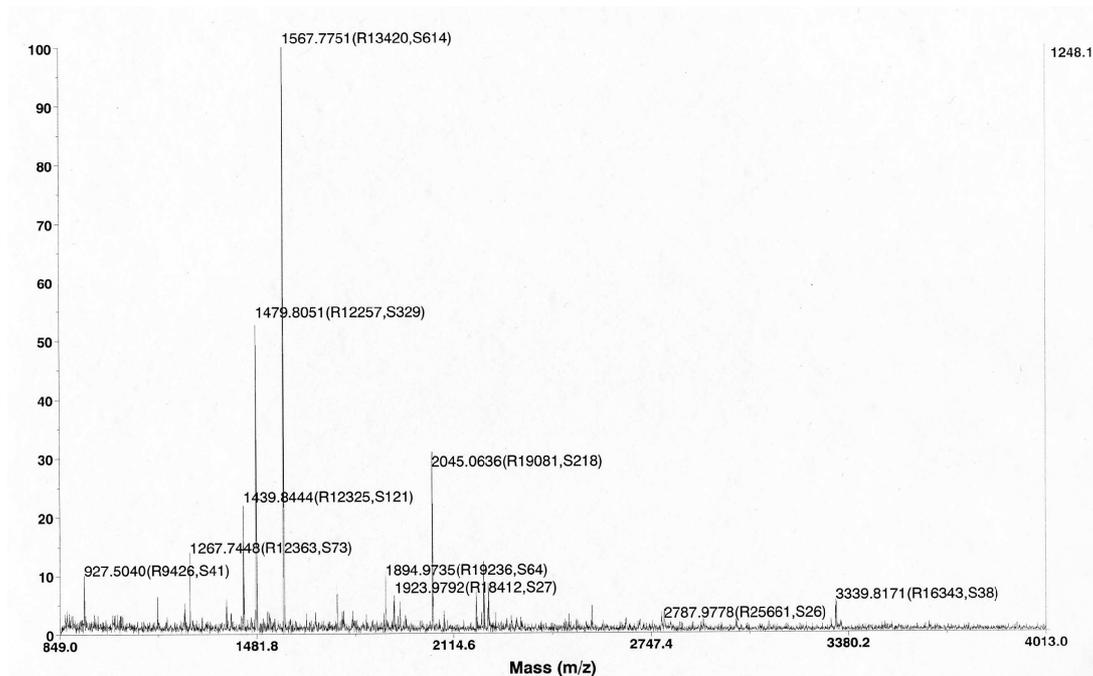


Fig. 6 MALDI-TOF/MSによるペプチド断片の測定結果

脱脂粉乳由来膜小胞画分タンパク質をトリブシンにて消化し、MALDI-TOF/MSにより質量を測定した。
 (上段：serum albumin /no. 7、下段： α_{s1} -casein/no. 11)

7. 電子顕微鏡による膜小胞画分の観察

脱脂粉乳溶解液から膜小胞画分を含む低密度画分を分離してきたが、この画分に膜小胞や脂質・タンパク質複合体が存在しているかどうかは明確ではない。そこで、この膜小胞画分を透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope: TEM) で観察することで、膜構造物や複合体の存在を確認した。この画分にはカゼインミセルが混入していることが考えられたが、大きさと分布する密度を比較することでカゼインミセルと膜小胞を区別できることが期待された。

(1) 材料と方法

・電子顕微鏡観察用のサンプル調製

脱脂粉乳由来の膜小胞画分のうち、密度が**1.18 g/ml**の最もタンパク質が多い画分を用いた。また比較対象にチューブの底の沈殿も同様に観察した。これらのフラクションは**PBS**で**5倍**希釈した後、ウルトラクリアチューブ (cat. **344059**; Beckman Coulter Instruments) を用いて**100,000 xg**、**4°C**で**1時間**遠心分離して膜小胞画分を沈殿として回収した (SW41Tiローター)。得られた沈殿を崩さないようにして、前固定液 (**0.1% cacodylic acid**、**2% glutaraldehyde**) でチューブを満たした。これを気泡の入らないようにパラフィルムで密閉した後、花市電子顕微鏡技術研究所に送り電子顕微鏡での観察を依頼した。ネガティブ染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEM2000EX, JEOL) で**50,000倍**、**100,000倍**で観察した。

(2) 結果と考察

シヨ糖密度勾配超遠心分離法で分画した脱脂粉乳溶解液の各画分について、**PBS**で希釈した後、再度超遠心分離によって膜小胞画分を回収したが、生乳からのサンプルに比べて回収量が極めて少なかった。そこで、最も量が多かった高密度画分 (フラクション**13**) に含まれる膜小胞を固定、ネガティブ染色して、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。比較対照として超遠心分離の際にチューブの底の沈殿物を同様に固定、染色して観察した。Fig. 7に示すように、フラクション**13**には直径**50-100 nm**程度の粒状の構造と**5-10 nm**の細粒状の構造が観察された。一方、沈殿物では、直径**100 nm**程度の粒状の構造が多数観察された。これらの構造物が膜小胞であるか、あるいはタンパク質や脂質の凝集物・複合体であるかは明らかではないが、サイズとしてはエキソソームやマイクロベシクルなどの膜小胞に近いもので、今後の超薄切片を用いた電子顕微鏡観察が期待される。

8. 脱脂粉乳由来膜小胞画分の口タウウイルスに対する感染阻害活性

乳汁が口タウウイルスに対して感染阻害活性を持つことは古くから知られているが、その活性を持った分子は同定されていなかった。しかし近年、乳汁中のラクトフェリン [Superti et. al., 2001]、MFG-E8 [Newburg et. al., 1998, Kanamaru et. al., 1999]、カゼイン [Wildner et. al., 2003] といった分子が口タウウイルスに対して抵抗性を持つことが報告されている。一方、本研究において、生乳

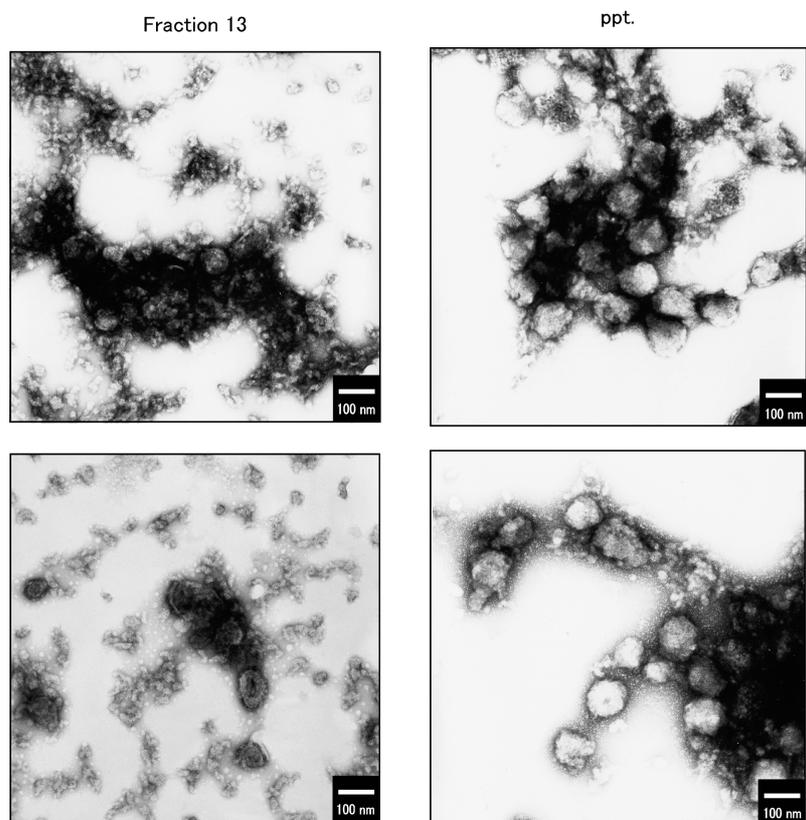


Fig. 7 脱脂粉乳から調製した膜小胞画分の透過型電子顕微鏡による観察

脱脂粉乳1 gに蒸留水9 mlを加えて、一晚懸濁した。懸濁液300 mlを5-40%ショ糖密度勾配上に重層し、200,000 xgにて18時間遠心分離を行った。遠心分離後、ピペットマンを用いて1 mlずつ分画した。4 ml分のフラクション13を34 ml PBSで希釈して、再度100,000 xgにて2時間遠心分離を行い、膜小胞を沈殿として得た。この沈殿に2% glutaraldehydeを加えて固定を行った。また、ショ糖密度勾配超遠心分離の際に生じた沈殿についても同様に2% glutaraldehydeを加えた。固定したサンプルはネガティブ染色にて可視化した後、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。左のパネルはフラクション13、右は沈殿（ppt.）を観察したものを示した（それぞれ倍率は50,000倍）。

および脱脂粉乳から分離した膜小胞・脂質タンパク質複合体画分にラクトフェリン、**MFG-E8**、カゼインなどが含まれていることが確認された。そこで、脱脂粉乳溶解液から調製した膜小胞画分の中で、タンパク質濃度の高い（比重**1.18**）膜小胞画分をロタウイルス培養液に添加し、その後のロタウイルスのサル腎由来細胞への感染に対する阻害活性を評価した。脱脂粉乳からの膜小胞画分の調製は上述の方法で行い、調製したサンプルのロタウイルスへの感染阻害活性の測定は岐阜大学応用生物科学部の金丸義敬先生に依頼した。

(1) 材料と方法

・BCAアッセイ

タンパク質量はキット（**BCA Protein Assay Reagent Kit; PIERCE**）を用いた**BCAアッセイ**で定量した。スタンダードとして**BSA (Albumin Standard; PIERCE)**を用いた。96 wellプレートにスタンダード、サンプルを10 μ lずつ分注し、**Reagent A**と**Reagent B**を**49: 1**の割合で混合した溶液を200 μ l

ずつ加えて、30秒程度シェーカーで攪拌した後、37℃で30分間インキュベートした。これをプレートリーダーでA₅₆₂の波長を用いて吸光度を測定して、標準曲線を作成した。この標準曲線に基づいてサンプルのタンパク質濃度を算出した。

・ロタウイルス感染阻害アッセイ

調製したサンプルのロタウイルス感染阻害活性測定を金丸義敬教授（岐阜大学応用生物科学部）に依頼した。以下にロタウイルス感染阻害アッセイ（培養細胞、ウイルス、感染、測定）の概要を記す。

・培養細胞

37℃で7日間培養した単層のMA104細胞（アカゲザル腎臓由来株化細胞）を用いた。継代後4日間は細胞増殖用培地（Eagle's MEM containing 10% fetal calf serum）で培養し、継代5日目からは細胞維持用培地（Eagle's MEM containing 2% fetal calf serum/ 10% tryptose phosphate broth）を用いた。

・ウイルス

ヒトロタウイルスWa株（serotype I）、MO株（serotype III）を用いた。ストックウイルスにtrypsin（20 μg/ml）を加えて37℃で30分間処理した後、ハンクス液（0.11% bovine serum albumin, dimethyl amino ethanol, dexstran）を用いてMOI（multiplicity of infection; 細胞1個あたりの接種ウイルス数）=1となるように希釈した。これをハンクス液で3回洗浄したMA104細胞に加え、37℃で1時間かけて細胞を培養容器に吸着させた。吸着後にウイルスを除いてハンクス液で洗浄、細胞維持用培地を加えて、37℃で回転培養した。多くの細胞が細胞変性効果により壁面から剥離したところで、細胞を取り除いて上清をウイルス溶液として使用時まで-80℃で保存した。

・感染（同時接種法）

力価（ウイルス1 mlで感染できる細胞数） $10^5 \sim 10^6$ のウイルス溶液を、20 μg/ml trypsinを用いて37℃で30分間消化処理した後、細胞感染用培地（Eagle's MEM containing 10% fetal calf serum/ 10% tryptose phosphate broth）で20~100倍に希釈した（trypsin処理ウイルス溶液）。サンプルを細胞感染用培地で段階希釈して、これにtrypsin処理ウイルス溶液を等量加えて37℃で1時間インキュベートした（サンプル-ウイルス混合液）。サンプルの代わりに細胞感染用培地を加えてtrypsin処理ウイルス溶液とインキュベートしたものをコントロールとした。

7日間培養して単層になったMA104細胞を0.125% trypsin（+0.025% EDTA）溶液で剥離し、遠心分離にて上清を除いた後、 2×10^5 cells/mlとなるように培地を加え、これをサンプル-ウイルス混合液に等量加え、24 wellスライドグラス上に20 μlずつ分注して37℃で45時間インキュベートした。

インキュベート後、培養液を取り除いてから20 µl滅菌水で洗浄してから風乾した。十分に乾いたところで、冷アセトンに20分間浸して固定した後、再度風乾し、測定まで-30℃で保持した。

・測定（間接蛍光免疫法）

感染細胞に一次抗体として5,000倍希釈した抗ロタウイルスモノクローナル抗体（ハトロタウイルスPO-13株のVP6を特異的に認識）を加えて、遮光したインキュベーションチャンバー中において37℃で40分間反応させた後、PBSで振盪して洗浄を行った。二次抗体として100倍希釈した蛍光色素標識ヤギ抗マウスIgG血清を加え、再び37℃で40分間インキュベートしてから、PBSで洗浄した。次にスライドガラス上にグリセリンを数滴加え、カバーガラスで封入してこれを蛍光顕微鏡でフォーカス（focus; 増殖抑制能を失った細胞が形成する高密度の細胞コロニー）を測定した。100-200 focus/ 1 wellをコントロールとして次式*1に代入して阻害率を求め、阻害率が50%となったタンパク質濃度を最小阻害濃度（MIC; minimum inhibitory concentration）として、これをサンプルのウイルス感染阻害活性とした。

$$*1 \quad (\text{阻害率}) = 100 \times \{1 - (\text{Fs} / \text{Fc})\}$$

Fs: サンプルのフォーカス数

Fc: コントロールのフォーカス数

(2) 結果と考察

脱脂粉乳からシヨ糖密度勾配超遠心分離法で膜小胞画分を調製し、このうち1.04 g/ml（フラクション1）、1.12 g/ml（フラクション7）、1.18 g/ml（フラクション13）の3サンプルについて、ロタウイルス感染阻害活性の測定を岐阜大学の金丸義敬先生に依頼した。サンプルの量に含まれるタンパク質濃度をBCA assayにより測定したところ、フラクション1、7、13において0.02 mg/ml、0.200 mg/ml、0.674 mg/mlであった。このように各サンプルのタンパク質濃度が低かったためか、50%の感染阻害活性に達したのはフラクション1の1回目の実験と、フラクション13の2回目の実験のみであった。定量性は不十分であるが、フラクション1と7、13において活性があることは確認された。このことから、生乳由来膜小胞画分に比べると活性は低いものの、加熱、乾燥後もロタウイルス感染阻害活性が残存することが示された。生乳由来の膜小胞画分においてはフラクション1が最も活性が高く、次にフラクション7の活性が高くなっていた。生乳と脱脂粉乳を比較すると、生乳フラクション1 > 脱脂粉乳フラクション1 = 脱脂粉乳フラクション7 > 生乳フラクション7となった。これは乳汁フラクション1に存在すると思われる膜小胞が脱脂粉乳の製造過程で、変性あるいは融合などを起こし、密度が大きくなりフラクション7に含まれるようになったと推定された。フラクション1、7に感染阻害活性が見られるものの、2回の測定結果に大きな差が見られたため、今後追試する必要がある。

引用文献

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (1998). *Essential Cell Biology: an introduction to the molecular biology of the cell*. Garland Publishing.
- Carlini, E., Palmerini, C. A., Cosmi, E. V., and Arienti, G. (1997). Fusion of sperm with prostasomes: effects on membrane fluidity. *Arch Biochem Biophys* 343, 6-12.
- Carlsson, L., Pahlson, C., Bergquist, M., Ronquist, G., and Stridsberg, M. (2000). Antibacterial activity of human prostasomes. *Prostate* 44, 279-286.
- Charlwood, J., Hanrahan, S., Tyldesley, R., Langridge, J., Dwek, M., and Camilleri, P. (2002). Use of proteomic methodology for the characterization of human milk fat globular membrane proteins. *Anal Biochem* 301, 314-324.
- Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Cavaletto, M., Garoffo, L. P., Dellavalle, G., Napolitano, L., Giunta, C., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., and Conti, A. (2003). Structural proteome of human colostrum fat globule membrane proteins. *Proteomics* 3, 897-905.
- Hamosh, M., Peterson, J. A., Henderson, T. R., Scallan, C. D., Kiwan, R., Ceriani, R. L., Armand, M., Mehta, N. R., and Hamosh, P. (1999). Protective function of human milk: the milk fat globule. *Semin Perinatol* 23, 242-249.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187.
- Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., and Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 94, 3791-3799.
- Jensen, R. G., (1995). *Handbook of Milk Composition*. Academic Press.
- Kvistgaard, A. S., Pallesen, L. T., Arias, C. F., Lopez, S., Petersen, T. E., Heegaard, C. W., and Rasmussen, J. T. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J Dairy Sci* 87, 4088-4096.
- Kanamaru, Y., Etoh, M., Song, X. G., Mikogami, T., Hayasawa, H., Ebina, T., and Minamoto, N. (1999). A high-Mr glycoprotein fraction from cow's milk potent in inhibiting replication of human rotavirus in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 246-249.
- McMahon, D. and McManus, W. (1998). Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *J Dairy Sci* 81, 2985-2993.
- Mather, I. H. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J Dairy Sci* 83, 203-247.
- Nagasawa, T., Kiyosawa, I., and Kuwahara, K. (1972). Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci* 55, 1651-1659.

- Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., Guerrero, M. L., Chaturvedi, P., Newburg, S. O., Scallan, C. D., et al. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351, 1160-1164.
- Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K., and Matsuda, T. (2002). Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur J Biochem* 269, 1209-1218.
- Palmerini, C. A., Saccardi, C., Carlini, E., Fabiani, R., and Arienti, G. (2003). Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril* 80, 1181-1184.
- Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101, 942-948.
- Peters, P. J., Geuze, H. J., Van der Donk, H. A., Slot, J. W., Griffith, J. M., Stam, N. J., Clevers, H. C., and Borst, J. (1989). Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 19, 1469-1475.
- Peterson, J. A., Hamosh, M., Scallan, C. D., Ceriani, R. L., Henderson, T. R., Mehta, N. R., Armand, M., and Hamosh, P. (1998). Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatr Res* 44, 499-506.
- Peterson, J. A., Patton, S., and Hamosh, M. (1998). Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate* 74, 143-162.
- Quaranta, S., Giuffrida, M. G., Cavaletto, M., Giunta, C., Godovac-Zimmermann, J., Canas, B., Fabris, C., Bertino, E., Mombro, M., and Conti, A. (2001). Human proteome enhancement: high-recovery method and improved two-dimensional map of colostrum fat globule membrane proteins. *Electrophoresis* 22, 1810-1818.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-1172.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., and Desaynard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8, 2631-2645.
- Ronquist, G., and Brody, I. (1985). The prostasome: its secretion and function in man. *Biochim Biophys Acta* 822, 203-218.
- Schrimpf, S. P., Hellman, U., Carlsson, L., Larsson, A., Ronquist, G., and Nilsson, B. O. (1999). Identification of dipeptidyl peptidase IV as the antigen of a monoclonal anti-prostasome

antibody. *Prostate* 38, 35-39.

Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P., and Antonini, G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim Biophys Acta* 1528, 107-115.

Thery, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 147, 599-610.

Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166, 7309-7318.

Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.

Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., Hood, L., and Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 56, 150-161.

van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121, 337-349.

Wildner, G., and Diedrichs-Mohring, M. (2003). Autoimmune uveitis induced by molecular mimicry of peptides from rotavirus, bovine casein and retinal S-antigen. *Eur J Immunol* 33, 2577-2587.

Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278, 10963-10972.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4, 594-600.

谷口寿章、菊池美紀 (2002)。最新プロテオーム解析プロトコル③；プロテアーゼによるゲル内消化。
細胞工学 21, 524-534.