

## 論文内容の要旨

応用動物科学 専攻  
平成 14 年度博士課程 進学  
氏名 野々部 領子  
指導教員名 酒井 仙吉

## 論文題目

Studies on Antibacterial Effect of Hydrogen Peroxide Generating System in Milk  
(ミルク中の過酸化水素産生機構による抗菌効果に関する研究)

乳房炎は乳牛において世界中で最も多発する疾病であり、主に乳房内での細菌の異常増殖により発症する。乳量の低下、乳製品の品質低下、廃用牛としての損失など、乳房炎による酪農家の負担は計りしれず、また抗生物質など薬剤の投与以外に有効な治療法は確立されていない。細菌による食中毒や、治療による抗生物質使用により将来的に抗生物質の効かない細菌を生み出すことから投薬での治療法よりもむしろ根本的な解決策として「乳房炎に罹らない乳牛」を育種することが求められている。乳房炎は細菌とウシの防御機構のバランスにより感染の成立が決まるため、育種選抜の指標としては、ウシ自身の持つ防御機構に働く生理物質が有力なターゲットとなり得ると考えられる。

ウシのミルク中には多量の lactoperoxidase (LPO) が存在し、LPO は過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) と thiocyanate ( $SCN^-$ ) と反応し、強力な抗菌作用を示す hypothiocyanite ( $OSCN^-$ ) を生成する。この一連の反応系は LP-system と呼ばれ、ウシの乳房およびミルク中における有用な生体防御機構として注目されてきた。しかし LPO の基質のうち、 $SCN^-$  はミルク中に産生されることが確認されているが、 $H_2O_2$  のミルク中への安定した供給源は不明である。

近年、マウスにおいて、泌乳期特異的に乳腺で発現し、ヘビの毒腺に存在するアポキシンの塩基配列と相同

性の高い新規遺伝子が単離された。アポキシンは L-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) の一種であり、LAO は特定のアミノ酸を分解して細菌毒性をもつ  $H_2O_2$  を発生することが知られていることから、マウスミルク中に LAO が存在することで、LP-system に重要な  $H_2O_2$  を供給し、乳房炎の原因である細菌の異常増殖を防ぐ可能性が考えられる。このため本研究では、これまで明らかとされていない LP-system に必要なミルク中への  $H_2O_2$  の供給源の存在と、その生理的存在意義を明らかにすることを目的に、第一章ではこの遺伝子が LAO であることを証明し、ミルク中の LAO の実在と性状について解析を行った。第二章では乳房炎の原因菌に対する LAO と LP-system の影響について調べ、第三章ではウシのミルク中における  $H_2O_2$  産生物質の探索を行った。

第一章では、まず、この遺伝子が LAO でミルク中に分泌されているならば、ミルク中の遊離アミノ酸に偏りがあると考え、マウスミルクの遊離アミノ酸の濃度とその分解について調べたところ、LAO の基質となりにくいアミノ酸は高濃度で存在し、基質となりやすいアミノ酸はミルク中で分解され、殆ど存在しないことがわかった。またミルクに LAO の基質となるアミノ酸を加えたところ、LAO の反応に特徴的な  $H_2O_2$  が発生した。さらにこれを指標として LAO を精製し、分子量約 113 kDa、二量体で存在することが明らかとなった。さらに精製した LAO のアミノ酸シーケンスを行ったところ、これまでに単離された遺伝子と完全に一致し、シグナルペプチド、基質特異性を決定することにも成功した。

以上より、マウスミルク中に哺乳類では新規の酵素である LAO が存在し、その性状が明らかとなった。LAO は、その触媒反応において細菌毒性を有する  $H_2O_2$  を発生することから、乳房乳の細菌増殖を防ぐという生理的存在意義が考えられる。また LAO は LP-system に必要な  $H_2O_2$  の供給源になると考えられるが、これまでマウスミルクにおける LPO の存在は報告されていない。

乳房内には若干細菌が存在し、さらに乳房内は細菌の増殖に適した環境であるにもかかわらず細菌の増殖が起らない。一方、搾乳後では低温保存しないと細菌が異常増殖する。これは搾乳後のミルクには LAO の基質となるアミノ酸がすでに分解されて存在せず、外部からも供給されないため、細菌増殖を抑制する機構が働かないと考えられる。また、アミノ酸が血中からほとんど等しくミルクに移行することが報告されているにもかかわらず、これまで古くからミルク中の遊離アミノ酸に偏りがあることが知られていた。その正確な理由については不明であったが、LAO の発見により初めてそれを合理的に説明することができた。

第二章では、乳房炎の病原菌と LAO と LP-system の影響を調べることを目的として、まず、これまで報告されていないマウスミルク中の LPO の探索を行った。whey をゲル濾過し、ヨウ化カリウム法により各フラクションの LPO 活性を調べたところ、活性はウシの LPO とほぼ同じ分子量である約 65 kDa の位置で検出され、さらにウシの LPO に特徴的な 412 nm の吸収をもっていることからマウスミルクにおける LPO の存在が明らかとなった。また、ミルク中に存在する  $H_2O_2$  濃度を調べたところ約 230  $\mu M$  存在し、LPO 非存在下の場合では約 600  $\mu M$  存在したことから、この濃度差は LPO が  $H_2O_2$  を分解することによって生じたと考えられる。次に、世界中で最も高頻出に分離される乳房炎の原因菌: *Staphylococcus aureus*、*Streptococcus agalactiae*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae* の増殖が LAO と LPO によってどのような影響を受けるかを調べたところ、*Sta. aureus* は LAO により増殖が最も抑制されるが LPO を加えるとその抑制の度合いは減少した。

*E. coli*、*K. pneumoniae*はLAOにより増殖抑制され、さらにLPOを加えても抑制の度合いは変化しなかった。*Str. agalactiae*はLAOの影響を全く受けなかったが、LPOを加えると増殖は抑制された。以上の結果からマウスミルクにはこれまで報告されていないLPOが存在し、LAOと共に、乳房炎の原因菌の増殖を幅広く、効率よく抑制していることが明らかとなった。

このことから実際に乳房炎が多発するウシの乳腺においても $H_2O_2$ の産生メカニズムが存在し、 $H_2O_2$ 自身の毒性およびLP-systemへの $H_2O_2$ の供給によって、広範な細菌を対象とした抗菌作用を担っている可能性が考えられる。

そこで、第三章では、ウシミルク中に存在する $H_2O_2$ 産生物質を探索し、それがどのような特性を有するかについて研究を行い、以下の結果が得られた。まず、ウシミルク中にもマウスと同様にLAOが存在するのか、アミノ酸存在・非存在下でwheyにおけるLAO活性を化学発光法によって調べたところ、アミノ酸の有無に関係なく $H_2O_2$ が検出され、その濃度は約 $0.3 \mu\text{M}$ であった。さらにwheyをゲル濾過し、各フラクションの $H_2O_2$ 産生活性を調べたところ、約20 kDaの位置に明確なピークが存在し、この分子量はマウスLAOと異なることから、ウシミルク中にはLAOではないが $H_2O_2$ の産生に関与する物質が存在することが示された。またキシレノールオレンジ、ヨウ化カリウムを用いた2つの $H_2O_2$ 検出系においても $H_2O_2$ は検出され、さらにLPOを加えることにより、検出されなくなることからウシミルク中における $H_2O_2$ 産生物質の存在が明らかとなった。次に、このフラクションにおけるタンパク質の特性について調べた。このフラクションをサンプルとし、様々な温度で反応を行ったところ、 $4^\circ\text{C}$ では $H_2O_2$ の産生が殆ど見られなかったが、 $15^\circ\text{C}$ 以上では温度と時間に依存して $H_2O_2$ が発生した。また $H_2O_2$ 産生活性は全泌乳期を通じて存在し、泌乳初期から中期にかけて増大し、中期でピークとなり中期から後期にかけて減少した。これはミルク中のLPO活性と $\text{SCN}^-$ の量の変化と同様の変化であり、この物質がLP-systemにおいて重要な役割を担うと考えられる。また、乳房炎乳の $H_2O_2$ 産生活性は健常乳に比べて著しく低く、乳房炎罹患の指標となるミルク中の体細胞数に対して負の相関を示したことから、 $H_2O_2$ 産生物質が乳房炎の罹患に大きく影響していると考えられる。さらに、このフラクションにおけるタンパク質をイオン交換によって精製したところ、各フラクションの $H_2O_2$ 産生活性は検出されなかったが、各フラクションにゲル濾過で得られた20 kDaフラクションを加えると2つの明確なピーク：fraction I、IIが存在し、また、各フラクションにfraction IIを加えるとfraction Iの位置に活性が検出された。この結果は、20 kDaフラクションに $H_2O_2$ 産生酵素とその基質が含まれていることを示唆しており、これまでの一連の実験で20 kDaフラクションのみをサンプルとし、他の物質を一切添加しなくても $H_2O_2$ が検出されたのはこのためだと考えられる。

以上より、ウシのミルク中の $H_2O_2$ 産生物質の存在とその特性を明らかにした。マウスミルクにはLAOが存在し、またLPOは、哺乳類のミルク、唾液、類液中に存在することが知られていることから、細菌の侵入しやすい外分泌腺において $H_2O_2$ に関連したLP-systemなどの生体防御システムの重要性が高いことが示唆される。さらに泌乳期全般で存在し泌乳最盛期で活性が高いという時期特性から、この物質は乳房炎防御機構として $H_2O_2$ 産生物質は育種選抜の指標として理想的であるといえる。しかしウシミルク中における $H_2O_2$ 量はマウス

に比べて著しく低い。したがって、今後はこの物質のさらなる性状解明とその育種選抜への応用といった研究の発展が欠かせないが、本研究は「乳房炎に罹らない乳牛の育種」という乳房炎への根本的な解決に向けた、最初の重要な1歩となる発見を行ったといえる。