

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 野々部 領子

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。「乳房炎に罹らない乳牛」を育種することが求められ、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する L-アミノ酸オキシダーゼ(LAO)を発見した。LAO は特定のアミノ酸を分解して H_2O_2 を発生する。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。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した。全体は三章からなり、第一章では LAO であることを証明し、ミルク中の LAO の実

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た。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、LAO が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、殆ど存在しなかった。またミルクに基質となるアミノ酸を加えたところ、 H_2O_2 が発生し、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。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、その性状を明らかにした。

第二章では、乳房炎の病原菌に対する LAO と LP-system の影響を調べることを目的とし、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 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 の位置に存在することを明らかにした。ミルク中に存在する H_2O_2 濃度を調べたところ約 230 μM 存在し、LPO 非存在下の場合では約 600 μM 存在したことから、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た。

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、*Staph.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。*Strep.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 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を明らかにした。

第三章では、牛乳中にもマウスミルクと同様に LAO が存在するのか、アミノ酸の存在・非存在下で LAO 活性を調べたところ、アミノ酸の有無に関係なく H_2O_2 が発生し、LAO に相当する物質は存在しなかった。しかし約 20 kDa の位置に活性が認められ、 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。4°C では H_2O_2 の産生が殆ど見られなかったが 15°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。これは牛乳中の LPO 活性と SCN^- 濃度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た。

牛乳においても H_2O_2 産生物質が存在し、その特性を明らかにした。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こらない。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基質となる物質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。

本研究の結果は、乳房炎を防御するための理想的な育種選抜の指標となる H_2O_2 能の存在を明らかにした研究になっていて、学術上応用上で重要な研究になっている。よって審査員一同は博士(農学)に相応しいと判断した。