



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Regulation of Intestinal Cell Growth by Bovine Milk α -Lactalbumin

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 許, 美玉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2717

氏 名 (本 國 籍)	許 美 玉 (中華人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 376 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Regulation of Intestinal Cell Growth by Bovine Milk α -Lactalbumin (牛乳 α -ラクトアルブミンによる腸細胞の成長調節)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 金 丸 義 敬 副査 岐阜大学 助教授 長 岡 利 副査 信州大学 教授 大 谷 元 副査 静岡大学 教授 森 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究の目的は、腸細胞の成長に及ぼす牛乳 α -ラクトアルブミン(α -LA)影響を調べ、生理意義の一端を考察することであった。

まず、ラット腸由来 IEC-6 細胞の増殖に及ぼす影響を WST-1 法によって調べたところ、市販の精製牛乳 α -LA 標品に強い細胞増殖阻害作用が認められた。阻害作用は非常に速やかに、また、不可逆的に生じ、30 分間という短時間の暴露後、細胞増殖は観察されなかった。この暴露によって、IEC-6 細胞の ^3H -標識チミジン取り込みがほぼ完全にブロックされ、二日間の培養後、生細胞はほとんど見られなかったことから、牛乳 α -LA が腸細胞に細胞死を誘導することが指摘された。アポトーシス検出 ELISA により、細胞には DNA の断片化が顕著に観察されたことから、アポトーシスが誘導されたことも示唆された。以上の結果より、市販牛乳 α -LA 標品はアポトーシスを通じて IEC-6 細胞死を誘導すると考えられた。

ゲルろ過によって得られる牛乳 α -LA の二つの画分のうち、フラクション (F_1) 中には V_0 、30-、22-kDa に相当するピークが、遅れて溶出するフラクション (F_2) 中には 14-kDa のモノマー型 α -LA の溶出のみが認められた。SDS-PAGE では、 F_1 に 30-、20-、及び 14-kDa のバンドが見られ、そのすべてが抗 α -LA 抗体によって認識された。さらに、これらのバンドの N-末端 10 残基のアミノ酸配列は既報の α -LA のものと同一であった。細胞増殖測定では、 F_1 が強い細胞毒性を示し、 F_2 は不活性であった。不活性なモノマーの牛乳 α -LA を 30%トリフルオロエタノール/酢酸バッファー (pH 5.5) に溶解し、37°C で 5 日間インキュベートしたところ、強い細胞傷害性を示す状態 (SRTe5d- α -LA) を得ることが出来た。SRTe5d- α -LA からゲルろ過で得た

オリゴマーフラクション (F1) が強い細胞毒性を示し、モノマーフラクション (F2) は不活性だった。従って、牛乳 α -LA の特定のオリゴマーが IEC-6 細胞死を誘導することが指摘された。

Holstein 牛の常乳から抗 α -LA 抗体カラムのアフィニティークロマトグラフィーで牛乳乳清タンパク質濃縮物から一段階精製した α -LA は、SDS-PAGE/イムノプロット上いくつかの SDS 抵抗性オリゴマーバンドを含んでいたが、IEC-6 細胞に対してきわめて強力な細胞傷害性を示し、IEC-6 腸細胞に細胞死を誘導するオリゴマー α -LA の生成が通常の条件下でも起こり得るものであることを示唆した。このような牛乳 α -LA の細胞傷害活性は 60℃以上の加熱によって失われ、また、NaCl 濃度勾配溶出による陰イオン交換クロマトグラフィーで得られる二つの peak のうち遅れて溶出する peak II にのみ細胞傷害活性が認められたことから、 α -LA の細胞傷害性は強い負の電荷を伴う特定のコンフォメーションを持つオリゴマーに起因すると考えられた。

最後に、ヒトロタウイルスに感染させた後の乳飲みマウスに牛乳 α -LA を経口投与した結果、下痢の期間が顕著に短縮されることが見出された。

以上の結果は、乳糖合成における必須因子及び Ca^{2+} 結合性といったこれまでに明らかにされている生理作用に加えて、牛乳 α -LA が腸細胞死を誘導するという重要な生理作用を有すること、その作用が特定の分子構造を持つ α -LA のオリゴマーに起因すること、また、その作用がヒトの健康に有益なものである可能性があることをはじめて明らかにしている。

審 査 結 果 の 要 旨

乳は乳幼動物の成長に重要な意味を持つ。本論文の目的は、腸細胞の成長に及ぼす牛乳 α -ラクトアルブミン(α -LA) 影響を調べ、生理意義の一端を考察することである。

本論文では、まず、ラット腸由来 IEC-6 細胞の増殖に及ぼす影響を WST-1 法によって調べ、市販の精製牛乳 α -LA 標品に強い細胞増殖阻害作用を認めた。阻害作用は非常に速やかで、また、不可逆的に生じ、30 分間という短時間の暴露後、細胞増殖は観察されなかった。この暴露によって、IEC-6 細胞の ^3H -標識チミジン取り込みがほぼ完全にブロックされ、二日間の培養後、生細胞はほとんど見られなかったことから、牛乳 α -LA が腸細胞に細胞死を誘導することを指摘した。アポトーシス検出 ELISA により、細胞には DNA の断片化が顕著に観察されたことから、アポトーシスが誘導されたことも示唆した。以上より、市販牛乳 α -LA 標品がアポトーシスを通じて IEC-6 細胞死を誘導するものと考えた。

次に、ゲルろ過によって得られる牛乳 α -LA の二つの画分のうち、フラクション (F1) 中には V_0 、30・、22-kDa に相当するピークが、遅れて溶出するフラクション (F2) 中には 14-kDa のモノマー型 α -LA の溶出のみを認めた。SDS-PAGE では、F1 に 30・、20・、及び 14-kDa のバンドを認め、そのすべてが抗 α -LA 抗体によって認識されることを明らかにした。これらのバンドの N-末端 10 残基のアミノ酸配列は既報の α -LA のものと同一であった。細胞増殖測定では、F1 が強い細胞毒性を示し、F2 は不活性であった。不活性なモノマーの牛乳 α -LA を 30%トリフルオロエタノール/酢酸バッファー (pH 5.5) に溶解し、37℃で 5 日間インキュベートし、強い細胞傷害性を示す状態 (SRTe5d- α -LA) を得た。SRTe5d- α -LA からゲルろ過で得たオリゴマーフラクション (F1) が強い細胞毒性を示し、モノマーフラクション (F2) は不活性だった。

従って、牛乳 α -LA の特定のオリゴマーが IEC-6 細胞死を誘導することを指摘した。

次に、Holstein 牛の常乳から抗 α -LA 抗体カラムのアフィニティークロマトグラフィーで牛乳乳清タンパク質濃縮物から一段階精製した α -LA が、SDS-PAGE/イムノブロット上いくつかの SDS 抵抗性オリゴマーバンドを含むこと、また、IEC-6 細胞に対してきわめて強力な細胞傷害性を示し、IEC-6 腸細胞に細胞死を誘導するオリゴマー α -LA の生成が通常の条件下でも起こり得るものであることを示唆した。

さらに、本論文では、このような牛乳 α -LA の細胞傷害活性が 60°C 以上の加熱によって失われること、また、NaCl 濃度勾配溶出による陰イオン交換クロマトグラフィーで得られる二つの peak のうち遅れて溶出する peak II にのみ細胞傷害活性が認められたことを指摘し、牛乳 α -LA の細胞傷害性が、強い負の電荷を伴う特定のコンフォメーションを持つオリゴマーに起因するものと考えた。

最後に、ヒトロタウイルスに感染させた後の乳飲みマウスに牛乳 α -LA を経口投与した結果、下痢の期間が顕著に短縮されることも見出した。

以上の結果は、乳糖合成における必須因子及び Ca^{2+} 結合性といったこれまでに明らかにされている生理作用に加えて、牛乳 α -LA が腸細胞死を誘導するという重要な生理作用を有すること、その作用が特定の分子構造を持つ α -LA のオリゴマーに起因すること、また、その作用がヒトの健康に有益なものである可能性があることをはじめて明らかにしたものである。よって審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

以上の結果の一部は、1. Meiyu Xu, Sugiura, Y., Nagaoka, S. & Kanamaru, Y.: IEC-6 Intestinal Cell Death Induced by Bovine Milk α -Lactalbumin 及び 2. Meiyu Xu, Sugiura, Y., Nagaoka, S. & Kanamaru, Y.: Involvement of SDS-Stable Higher Mr Forms of Bovine Milk α -Lactalbumin in Inducing Intestinal IEC-6 Cell Death という二つの論文としてまとめられ、Biosci. Biotechnol. Biochem.誌に受理されている。