



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

牛初乳中のシステインプロテイナーゼインヒビターに関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 桐原, 修 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2393

氏 名 (本籍)	桐 原 修 (東京都)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第52号
学 位 授 与 年 月 日	平成8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 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	牛初乳中のシステインプロテイナーゼインヒビターに関する研究
審 査 委 員	主査 信州大学教授 細野明 義 副査 信州大学教授 大谷元 副査 岐阜大学教授 渡邊乾 二 副査 静岡大学教授 碓氷泰 市 副査 信州大学教授 茅原 紘

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は牛初乳中のシステインプロテイナーゼインヒビター (CPI) の中でこれまで明らかにされてきたものとは異なる新たな CPI を見出し、その性質を明らかにしたものである。本研究はその意味で極めて困難を伴い、研究成果が現れ、完結するまで4年間の長い期間を要した。論文は下記するように3つの章から成っている。

(第一章) 牛初乳由来低分子量CPIの分離と性状について

ババインセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により、高分子量 (150KDa) と低分子量 (15KDa) の CPI を得たが、いずれもその分子量において差が認められ既知のものとは異なることが示唆されたので、それぞれの画分について検討がなされた。阻害スペクトルにおいてはババインやカテプシンCおよびHに強い阻害活性を有していたが、カテプシンBについては活性を示さなかった。初乳由来のものとは異なり牛血清由来の低分子量インヒビターは分子量が15.5KDaでカテプシンBに対して弱い活性しか持たないことから、分離した低分子量インヒビターはこれと類似するものであると考えられたが、糖分析およびSDS-PAGE後の膜転

写したものについての検討から糖鎖を有することが明らかとなり、新規のインヒビターであることが確認された。

(第二章) 牛初乳由来高分子量および低分子量 CPI の性状について

高分子量インヒビターはゲル濾過においては 150KDa の位置に溶出されたが、SDS-PAGE において約 55,30 および 15KDa にバンドを有し不均一性を示した。このものをさらに Mono-Q によるイオン交換クロマトグラフィーにより分画を行い 3 つの画分を得たが、低イオン強度で溶出される 2 つの画分にはババインに対する阻害活性が認められた。しかし、1MNaCl にて溶出される画分は活性を持たなかった。それぞれの画分の SDS-PAGE においては活性を有する画分には低分子量インヒビターに由来すると考えられる 15KDa のバンドが認められたが、最後の画分にはこのバンドが認められず高分子量インヒビターの活性は何らかの形で結合した低分子量インヒビターがその活性の本体であることを確認している。

(第 3 章) *Listeria monocytogenes* および *Escherichia coli* に対する CPI の影響について 4 種のリステリア菌及び 1 種の大腸菌に対する CPI の増殖抑制について試験した。リステリア菌についてはどの菌株においても CPI の濃度に依存した増殖の遅れが認められ、1 mg/ml 濃度において 37℃、24 時間培養後には生菌数で約 1 桁低い結果となった。しかしながら、大腸菌においては同様の増殖抑制は認められたものの、リステリア菌に比較して増殖の速度が速く、37℃培養後 7 時間目で定常状態に達した。

以上の結果から、本研究は文献未知の新しい CPI を見出し、その特徴づけをした点ももっとも高く評価でき、学術的にも価値のある成果であると言える。

審 査 結 果 の 要 旨

平成 8 年 2 月 7 日、信州大学農学部において審査委員全員出席のもとに公開発表会が開かれ、約 40 分間にわたる発表と、約 20 分間の質疑応答が行われた。研究成果の内容はまとまりがよく、各審査委員からの質問にもよく応えた。

先ず、桐原 修氏の研究概要について説明したい。同氏の研究は牛初乳中のシステインプロテイナーゼインヒビター(CPI)の中でこれまでに明

らかにされてきたものとは分子量が異なる新たなCPIを見い出すことを目的として行った。パパインセファロースによるアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過により高分子量 (150kDa)と低分子量 (15 kDa)のCPIを得た。本研究ではこれら2種類の新しいCPIの諸性質についても検討が加えられ、多くの知見を明らかにした。これらの研究成果は下記の2つの論文にまとめられ、既に掲載済みである。

- (1) Characterization of the high and low molecular mass cysteine proteinase inhibitors from bovine colostrum.
Lebensm.-Wiss.u.-Technol., 28, 462-466 (1995).
- (2) Purification and characterization of a low molecular mass cysteine proteinase inhibitor from bovine colostrum.
Lebensm.-Wiss.u.-Technol., 28, 495-500 (1995).

本研究は文献未知のCPIを見付け出した点で極めて困難な研究であった。そのため、本研究が完結するまで長期間を費やし、博士課程での在学期間が4年間となった。本人の根気と努力を高く評価したい。審査に際しては異議は出されず、最終試験の結果も併せ、審査委員全員一致ももともとに合格とした。なお、発表当日指摘された論文の記載上の誤りは直ちに正し、最終提出の論文に備えることにした。