牛乳のラクトフォリン：その発見、特性および機能

菅野長右門

宇都宮大学農学部，宇都宮市 321

Lactophorin from Bovine Milk Whey : Its Finding, Characterization and Function

Choemon KANNO

Department of Animal Science, Utsunomiya University,
Utsunomiya-shi 321

Key words : lactophorin, milk fat globule membrane, proteose-peptone, milk

ラクトフォリン (Lactophorin, LP) は、牛乳の乳脂肪球皮膜 (MFGM) の可溶性糖蛋白質 (SGP) の抗体と反応し、かつホエーのプロテオースペプトン (PP) 画分に存在する耐熱性のタンパク質で、多形性の構造をもつ糖蛋白質に、著者によって付けられた名称である⁴⁰⁾。ここでは、LP と密接に関係している MFGM、その一構成成分である SGP、SGP と同一の抗原性をもつ LP を含む PP、そして LP の発見、特性、起源、機能について概説する。

1. 乳脂肪球皮膜

BARGMANN and KNOOP⁵⁾ によって、乳腺細胞で合成された脂肪滴は成長しつつ頂端細胞膜側まで運ばれ、そこで頂端細胞膜で被覆され、細胞外に分泌されることが電顕で最初に観察されている。この乳脂肪球を被覆し、脂肪と水の界面を形成している膜物質を MFGM と呼んでいる。細胞膜の細胞外への離出現象は生物界でも乳腺のみにみられる現象で、ホルスタイン種の牛乳の乳脂

肪 1 g 当たりの表面積は 2 m^2 であり、乳牛が乳脂肪率 3.5% の牛乳を 1 日当り 25 kg 泌乳しているとする、1 日に $1,750 \text{ m}^2$ の細胞膜を離出していることになり、その補修機構が備わっているとも言えども、乳分泌による母体へのエネルギー要求は莫大なものである。MFGM の生成機構や構造の詳細については、PATTON and KEENAN⁷⁸⁾、菅野⁵⁵⁾、McPHERSON and KITCHEN⁶⁹⁾、KEENAN ら^{59, 61)}、KANNO⁴³⁾ の総説を参照して頂きたい。

MFGM は、基本的には細胞内で脂肪滴を被覆していた 2 分子構造をもたない膜に由来する内膜^{14, 15)} と細胞膜に由来する外膜の二層から構成されている⁹⁴⁾。MFGM 生成における一つの特徴は、分泌直後の脂肪球は完全に細胞膜で被覆されているが、分泌後の時間の経過とともに脂肪滴を被覆した細胞膜 (= MFGM) の大半は脂質二重層の構造を維持しつつも、一部は無構造となり、乳脂肪球から離脱してしまうことである。これは、分泌後、細胞内の脂肪滴の表層にあるりん脂質層と細胞膜の内側のりん脂質層とが融合し、膜を構成する成分が再配列さ

略号：LP，ラクトフォリン；MFGM，乳脂肪球皮膜；SGP，可溶性糖タンパク質；PP，プロテオースペプトン；PPC-3，-5，-8，それぞれ PP のコンポネント-3，-5，-8 画分；Glc，グルコース；Gal，ガラクトース；Man，マンノース；Fuc，フコース；GlcNAc，N-アセチルグルコサミン；SA，シアル酸；GalNAc，N-アセチルガラクトサミン；TG，トリアシルグリセロール；PAGE，ポリアクリルアミド電気泳動；SDS-PAGE，ドデシル硫酸ナトリウム存在下での PAGE；LPL，リボプロティンリパーゼ；Mr，分子量

れる結果、過剰となった被覆細胞膜が小胞化あるいは断片化して乳脂肪球から脱離され、脂肪球は安定化される⁴³⁾。離脱した膜画分は、超遠心分離によってスキムミルク膜画分として分画することができる。このような分布割合はクリームとスキムミルク膜画分の細胞膜標識酵素活性⁵⁶⁾ およびりん脂質^{64, 77)} や糖脂質⁹¹⁾ の含量の分布から推測でき、スキムミルク膜画分における細胞膜の標識酵素の活性は全乳の30-40%、りん脂質は30-50%、糖脂質は41%を占めている。

生成機序におけるもう一つの問題点は、ウシ MFGM で一部の主要な糖蛋白質（特に PAS-1~7 のうちの PAS-1, -5, -6, -7）がウシ乳腺の細胞膜画分に検出できないことである⁴⁴⁻⁴⁶⁾。このことはラットの乳腺の細胞膜とその MFGM でも報告されている^{30, 31, 62)}。しかし、キサンチンオキシダーゼや PAS-5（ブチロフィリン）の標識抗体は乳腺細胞の頂端部に観察されており^{21, 25, 35, 37)}、またブチロフィリンの抗体と反応するタンパク質が細胞内脂肪滴のコート物質に見出されており^{14, 16)}、MFGM を構成するタンパク質の複雑さを示している。MFGM の形成には細胞内脂肪滴のコート物質、分泌小胞膜、頂端細胞膜、細胞内コート物質等が関与していると考えられるようになってきているので⁴³⁾、MFGM と乳腺細胞膜における主要ポリペプチド組成の差異の原因もまもなく明らかになるであろう。

単離された牛乳の MFGM は約45%のタンパク質と55%の脂質から構成されている。MFGM におけるタンパク質と脂質の割合は、調製法、特に、破壊されなかった微小脂肪球の除去の有無あるいは乳脂肪球を物理的に破壊した時に MFGM に随伴してくる高融点の TG の量によって変動する⁴⁷⁾。従って、チャーニングによって調製した MFGM の TG は全脂質の約69%（50-85%）を占めており、27%（24-40%）がりん脂質、3%がコレステロール、残りが糖脂質等である。りん脂質の組成はホスファチジルコリン（27%）、ホスファチジルエタノールアミン（33%）、スフィンゴミエリン（23%）、ホスファチジルセリン（8%）、ホスファチジルイノシトール（7%）である⁵⁵⁾。糖脂質のうち、SA α 2 $\rightarrow$ 8 SA α 2 $\rightarrow$ 3 Gal β 1 $\rightarrow$ Ceramide の構造をもつ GD3 が67%を占めている。また（Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 6）（SA α 2 $\rightarrow$ 6 Gal β 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3）Gal β 1 $\rightarrow$ 4 Glc β 1 $\rightarrow$ Ceramide の分岐した構造をもつラクトマンナ系列ガングリオシドが新しく見出されている⁹⁰⁾。

牛乳の MFGM のタンパク質部には、4-30% アクリルアミド濃度勾配のついた SDS-PAGE で、Mr 13 K ~ 210 K の約42本のポリペプチドが検出される⁵⁵⁾。そ

の内の主要なポリペプチドには、タンパク質染色で検出されるバンドが16本（CB-1~CB-16）、糖染色で検出されるバンドが7本（PAS-1~PAS-7）ある。これまでこれらのバンドに統一された名称がなく、研究者によって検出されたバンドの移動度の小さい順に番号が付されており、これらの番号が菅野⁵⁵⁾および McPherson and Kitchen⁶⁹⁾ によってまとめられている。PAS-1 (Mr 100 K)、PAS-2 (Mr 96 K)、PAS-3 (Mr 90 K) のバンドは Coomassie brilliant blue R-250 では検出できない。PAS-6 (Mr 53 K~59 K) と PAS-7 (Mr 48 K~55 K) は非常に近似した分子量をもつが、前者はコンカナバリン A に対して親和性を示すが、後者は示さないで区別することが出来る³⁹⁾。また乳腺細胞の細胞膜およびその他のサブオルガネラ由来の標識酵素等が多数存在している^{59, 69, 78)}。これまでに単離され、その性質が明らかにされている牛乳の MFGM のポリペプチドは、CB-1 (Mr 155 K、キサンチンオキシダーゼ)⁹⁾、PAS-4 (Mr 80 K~85 K)²⁵⁾ と PAS-5 (Mr 67 K~75 K)^{22, 60)} のみである。PAS-5 はブチロフィリン (butyrophilin) と命名されている^{21, 29)}。人乳では、高分子量糖タンパク質^{85, 86)}、EPG-70（牛乳の PAS-5 に相当、Mr 70 K)³²⁾、EPG-155 (Mr 155 K)、EPG-39 (Mr 39 K)³³⁾ が単離・精製されている。MFGM は糖タンパク質に富むが、その糖鎖の構造については報告がない。

2. 可溶性糖蛋白質

可溶性糖蛋白質 (SGP) は MFGM の構成タンパク質の一つで、MFGM タンパク質の約5%を占める。MFGM の低密度画分をクロロホルム/メタノール混液（2:1, v/v）で脱脂後に0.02 M NaCl 溶液に可溶なタンパク質画分を Bio Gel A-5 m でのゲル濾過によって、PAGE で単一なバンドおよび沈降分析で対称な一つのピークを示すタンパク質として単離・精製されている⁵¹⁾。このタンパク質は約31%の糖を含み、その内の14%がヘキソース、8.1%がヘキソサミン、8.0%が SA、0.8%が Fuc である。SGP の物理化学的パラメーターを Table 1 に示す。SGP は SDS-PAGE では Mr 10 K から 88 K の8本のポリペプチドに解離される⁸³⁾。その内、7本は過ヨウ素酸シッフ試薬 (PAS) で染色される (PAS-I ~-VII)。PAS-II ~-VII は移動度において MFGM の主要糖ペプチド (PAS-1~7) とは異なるが、PAS-I (Mr 88 K) は PAS-1 と相似している。主要なペプチドは PAS-IV と V で、その分子量は 20 K と 17 K である。トリプシンによって PAS-II と -III 以外は消化されやすく、PAS-VII (Mr 10 K)

Table 1. Physical-chemical Properties of Soluble Glycoprotein (SGP) Isolated from Bovine Milk Fat Globule Membrane

Molecular weight (Mr)	K dalton	139
Sugar content	%	31
Isoelectric point	pI	4.4-5.7
Sedimentation velocity	$S_{20,w}^*$	6, 10
Diffusion constant	$D_{20,w}^*$	3, 79
Partial specific volume	$\bar{v}$, ml/g	0.715
Frictional ratio	f/f_0	2.16
Absorption coefficient	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$, 280 nm	1.84
Constituent polypeptide		
Number		8
Mr	K dalton	10-88
Mr of major polypeptide	K dalton	17, 20

は消化物の移動度とも一致している。

ここで得られた SGP の性質は JACKSON ら³⁴⁾ および SWOPE ら⁸⁹⁾ によって報告されている糖タンパク質の糖含量、沈降係数、分子量が異なり、その差は脱脂法と抽出法に起因している⁹⁵⁾。すなわち、硫酸塩析物をエタノール/エーテル (35:65, v/v) で脱脂したり³⁴⁾、あるいはメタノール/クロロホルムで脱脂しても、高塩溶液 (1 M KCl) で抽出すると⁸⁹⁾、MFGM の主要糖ペプチド (PAS-4, -6, -7) が混入し、糖含量も低下している。特にエタノール/エーテルで脱脂した場合には脂質結合性りん含量が高く、約 9% のりん脂質が含まれており⁹⁵⁾、分子間結合を複雑にし、大きな沈降係数 ($S_{20,w}$ 9.0) を与える要因になっている。

SGP の pI は pH 4.4 から 5.7 の広いバンドを形成するが、このバンドを 5 等分してタンパク質を抽出して SDS-PAGE を行なうと、構成ポリペプチドの量的差異が認められる⁵²⁾。SGP の Mr は 139 K と算出されているが、SDS-PAGE で解離されたポリペプチドの総和はこれを越えてしまうことから推察されるように、SGP 分子は多分散性である。さらに、SGP に対する多価抗体に対して免疫拡散法では各 1 本の主沈降線とマイナーな沈降線が観察され、免疫電気泳動法ではほぼ移動度の同じ 4 本の沈降線が観察される⁵²⁾。これらのことから、SGP は免疫学的には不均一であり¹³⁾、多分散性の糖タンパク質の性質を持っている。

3. プロテオースペプトン

プロテオースペプトン (PP) は、熱に安定で、酸性 (pH 4.6) で可溶だが、12% トリクロール酢酸^{23, 82, 92)} に不溶な、りんを含む糖タンパク質の混合物であると定義されている⁹³⁾。脱脂乳を 95°C で 20-30 分加熱後 30°C

まで冷却し、pH 4.6 で沈殿するカゼインや熱変性タンパク質を除去後の上清の非透析性物質が PP である。PP 含量はホエータンパク質の 18-25% および全タンパク質の約 4% である⁸¹⁾。この画分の主要成分は、ホエータンパク質の自由界面電気泳動 (ペロナール緩衝液, pH 8.6, イオン強度 0.1) での移動度の増す順に、コンポネント-3 (PPC-3), -5 (PPC-5), -8 (PPC-8) と LARSON and ROLLER⁶⁸⁾ によって名付けられている。同様な移動度の順位はアルカリ性澱粉-尿素電気泳動や PAGE でも報告されているが、もっと不均一である⁶⁶⁾。PP は加熱処理によって生成されるものでないことは ROWLAND⁸²⁾ を初めとして多くの研究者によって確認されている^{4, 10, 36, 65, 67, 70, 72)}。

PPC-5 は 0.96% のりん含量と 10.5% のプロリン含量から β -カゼインとの類似性が当初から指摘されていた⁶⁷⁾。PPC-8 は Bio Gel P-10 でのゲル濾過によって 2 画分に分画することができ、それらの PAGE での移動度から PPC-8-fast (F) と PPC-8-slow (S) と名付けられた⁶⁷⁾。両者はりん含量が高く (それぞれ 2.8% と 2.1%), Mr もそれぞれ 4.1 K と 9.9 K と概算されていた⁶⁷⁾。その後、 β -カゼインの一次構造の解明にもなって^{26, 80)}、 γ -カゼイン (29-209, 105-209, 107-209) は β -カゼインのプラスミンによる蛋白分解によって生じる^{19, 39)} C-末端側のフラグメントであるのに対して^{24, 27, 28)}、PPC-5 と PPC-8 F は β -カゼインの N-末端側のフラグメントであることが明らかにされている (Fig. 1)。すなわち、PPC-8 F は β -カゼインの 1-28 残基³⁾、PPC-5 は 1-105 および 1-107 残基であり^{2, 17)}、PPC-8 S は 29-105 および 29-107 残基のフラグメントである²⁰⁾。PPC-8 F は pH 6.6 で高い荷電をもち、低分子量で、4 残基の Ser-P を有し、芳香族アミノ酸を含まない (Table 2)。

PPC-5 と -8 はホエーとカゼインの両画分に存在して

Fig. 1. Relationship of protease-peptone component-5 (PPC-5), -8-fast (PPC-8 F) and -8-slow (PPC-8 S) and the primary structure of β -casein A² in bovine milk.

Table 2. Physical-chemical Characteristics of Proteose-peptone Components (PPC) Calculated from the Composition

β -Casein and Proteose-peptone	Fragment	Charge at pH 6.6	Ionic pH	Partial specific volume	Absoptivity at 280 nm	Molecular weight
β -Casein A ²	1-209	-12.3	5.19	0.742	0.46	23,980
PPC-5	1-105	-14.4	4.55	0.729	0.11	12,176 (12,441)*
PPC-8F	1- 28	-10.5	3.0	0.697	0	3,473
PPC-8S	29-105	- 4.1	5.2	0.742	0.16	8,716 (8,981)*

* , Values for genetic variant and see the legend of Fig. 1.

いるが、PPC-3 はホエー画分にのみ存在し、当初は血液由来であるとされていた⁶⁶⁾。Ng ら⁷²⁾ は、PPC-3 は約 17% の糖を含み、Mr 163 K で、5 M グアニジン塩酸で解離したペプチドの Mr は 22-44 K の不均一なタンパク質であると報告している。PPC-3 の主要糖タンパク質が LP である。

人乳にも牛乳とほぼ同量の PP が含まれており、その糖含量は平均 45% で、牛乳のその 11% よりも高い。PP 全体の主要なポリペプチドは、牛乳では Mr 30 K、18 K、12 K であるのに対して、人乳では Mr 100 K、70 K、13 K が検出されている。人乳の 13 K ポリペプチドは α -ラクトアルブミンで、30 K は温度感受性タンパク質、100 K と 70 K は糖ペプチドである⁸⁾。

なお、アメリカ酪農科学会の牛乳タンパク質の命名では、PP は 1976 年の第 4 版⁹³⁾ までは 1 項目として設けられていた。しかし、PPC-5 と-8 は β -カゼインにおよび PPC-3 は MFGM に⁵³⁾ 由来していることが明らかになったことから、1984 年の第 5 版では¹⁸⁾ 継続してこれらの名称を使用するとしながらも、PPC-5 には β -CN-5 P、PPC-8 F には β -CN-4 P、PPC-8 S には β -CN-1 P の推薦名称を設け、PP の項目は削除されてい

る。PPC-3 の詳細については後述する。また PP の総説を参照して頂きたい⁷⁴⁾。

4. ラクトフォリンの発見

ラクトフォリン発見の端緒は、MFGM から調製した SGP の免疫学的性質を調べるために作製した抗-SGP 血清とホエー蛋白質を二重免疫拡散法で反応したところ、1 本の沈降線の出現が観察されたことである⁵³⁾。しかもホエーの沈降線は SGP の主沈降線と融合し、ホエータンパク質で吸収した抗体ではいずれの沈降線も消失した (Fig. 2)。この一つの寒天プレート上での実験がラクトフォリン研究の発端である。

抗-SGP 抗体と抗原的に同一であると考えられるホエータンパク質を同定するために、まずホエータンパク質を各種のクロマトグラフィーで分画した。Sephadex G-150 では 5 画分の内の画分 1 と 2 に、Bio Gel A-1.5 m では 4 画分のうちの画分 2 に、DEAE-cellulose (pH 8.6) では 10 画分のうちの画分 5-10 に二重免疫拡散法、免疫電気泳動法で抗 SGP 抗体との反応が認められた。Sephadex G-150 で得られた画分 1 と 2 の比較的分子量の大きい画分を PAGE で分析すると、少なくとも 2

Fig. 2. Comparison of double immunodiffusion assays of whey protein (2) and the soluble glycoprotein (1) to anti-soluble glycoprotein antibody. A, Polyclonal antibody to the soluble glycoprotein. B, Polyclonal antibody to the soluble glycoprotein adsorbed with whey protein.

つのバンドが検出され、そのいずれかが抗-SGP 抗体と反応していると考えられた。2つのタンパク質のうちの移動度の小さいバンドは免疫グロブリンに依存しているらしいが、もう一つのバンドはこれまでに確認されているホエーの主要タンパク質である β -ラクトグロブリン、 α -ラクトアルブミン、血清アルブミンとは関連ないことが PAGE や免疫学的手法で示されている。

これらのことから、抗-SGP 抗体と反応する蛋白質を加熱変性するものと耐熱性のものとに分配できるのではないかと考え、ホエータンパク質を加熱し (95°C, 5~60 分)、酸性にして、遠心分離し、加熱変性したタンパク質を除去した。その結果、加熱に安全な上清のタンパク質含量は 95°C 10 分以上の加熱で全タンパク質の 20% で一定に達した。これに対して、単一放射免疫拡散法で定量される抗-SGP 抗体と反応するタンパク質 (Anti-SGP Reacting Protein) 含量は加熱前の 15% から 20 分以上の加熱で 60% に増加し、一定に達した。抗-SGP 抗体と反応するホエー中のタンパク質は耐熱性のタンパク質であり、その含量は全ホエータンパク質の 10-15% である。抗-SGP 抗体と反応するタンパク質を、当初は LP でなく、Anti-SGP Reacting Protein と呼んでいた⁵³⁾。

さらに、ホエータンパク質を 95°C で 30 分間加熱して調製した耐熱性タンパク質画分の PAGE のパターンは主に 3 つのバンドから成り、ホエータンパク質のそれとは異なっていたが、これまでに BRUNNER のグループ^{66, 67, 72)}によって報告されている PP のパターンと類似していた。

この耐熱性蛋白質を、Ng ら⁷²⁾の方法に準じた硫酸塩析により、PPC-3、-5 および -8 の 3 画分に分画し、単一放射免疫拡散法で測定された Anti-SGP Reacting Protein の含量は、PPC-3 画分に 65% 含まれており、全 PP の 67% が濃縮されていた⁵⁴⁾。PPC-3 と SGP の性質を比較した結果、両者のアミノ酸組成、糖組成、PAGE での性質は異なるが、SDS-PAGE パターンから、両者に共通な移動度をもつ少なくとも一つの糖ペプチド (Mr 17 K) の存在が見出され、両者に共通な抗原性の存在が示唆された。その後、PP と MFGM との免疫学的反応性は他の研究者によっても確認されているが、反応成分については言及されていない^{63, 71)}。

さらに、PPC-3 の他に、PPC-5 や PPC-8 にも Anti-SGP Reacting Protein が含まれていることから、これらの PPC は Bio Gel A-0.5 m および DEAE-cellulose (pH 8.6) でそれぞれ分画され、これらの免疫学的関連が研究されている⁵⁰⁾。各 PPC から得られた

Anti-SGP Reacting Protein を含む画分の抗-SGP 抗体に対する沈降線は二重免疫拡散法においていずれも完全に融合している。特に、DEAE-cellulose で分画された各 PPC の Anti-SGP Reacting Protein を含む画分は免疫電気泳動での沈降線の移動度がいずれも溶出順に増大していることから、多様な形態をとる Anti-SGP Reacting Protein が各 PPC 画分に完全に分画されずに分布しているのであって、特異な Anti-SGP Reacting Protein が各 PPC に存在しているのではない。更に、DEAE-cellulose で分画された Anti-SGP Reacting Protein に富む画分の SDS-PAGE での分析の結果は、先に示された SGP と共通な Mr 17 K のポリペプチドの他に、Mr 27 K の糖ペプチドが主要であることが判明した。また Anti-SGP Reacting Protein は血液由来でないことが免疫学的に証明されている⁵⁰⁾。

5. ラクトフォリンの精製と特性

1) プロテオースペプトンからの精製

ラクトフォリンは、PPC-3 から pH 7.7 における DEAE-cellulose で LP に近接した分子量のタンパク質を除き、次いで Sephadex G-100 で LP より小さい分子量のタンパク質を除去し、さらに Bio Gel A-15 m でのゲル濾過によって LP よりも高分子量のタンパク質を除くことによって、単離・精製される⁴⁰⁾。精製された標品は PAGE でやや幅は広いが単一のバンドであり、抗-SGP 抗体に対する免疫電気泳動でも長い 1 本の沈降線を示している。また LP に相当するタンパク質の精製は他の研究者によっても試みられている。PPC-3 を出発材料として、KESTER and BRUNNER⁵³⁾は Concanavalin A-Sepharose で、PAQUET and ALAIS⁷⁵⁾は Phenyl-Sepharose と Sephacryl S-200 で精製しているが、PAGE で前者は LP バンドの他に高分子量のタンパク質が、後者ではさらに低分子量のタンパク質の混入が観察されている。

2) 未加熱乳からの精製

未加熱乳からの LP の精製は、ホエータンパク質を硫酸塩析で分画し、2-メルカプトエタノールで還元後、Sephacryl S-200 でのゲル濾過、pH 7.6 における DEAE-cellulose クロマトグラフィー、最後に HPLC を用いた Protein A-affinity クロマトグラフィーで混入している IgG-免疫グロブリンを除去することにより行われている⁷³⁾。得られた標品は PAGE で単一のバンドを示すばかりでなく、抗-ウシ血清、抗-MFGM、抗-

菅 野

ホエータンパク質抗体に対する免疫電気泳動でも1本の沈降線を示した。NEJJAR⁷⁰⁾は未加熱脱脂乳からのホエーを硫酸塩析後、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーでLPに相当するタンパク質の精製を試みている。しかし、標品にはSDS-PAGEで多数のLPより高分子量のタンパク質が検出されている。

3) ラクトフォリンの特性

PPC-3から精製したLPは18%の糖を含む糖タンパク質で^{41, 63)}、糖鎖とタンパク質の結合はN-結合とO-結合をもっている⁴¹⁾。アミノ酸はAsp, Thr, Ser, Glu, Leuに富み、芳香属アミノ酸含量が少ない(Table 3)^{41, 63, 76)}。疎水性アミノ酸残基が約60%を占めており、これはLPの一つの特徴である。LPはMr 17 K~67

Kの7本のポリペプチド(I~VII)から構成されている。その内のMr 27 KのVIと17 KのVIIが主要な糖ペプチドであり、他の5本(I~V)はマイナーである。KESTER and BRUNNER⁶³⁾は主要な2本の糖ペプチド(18-21 K, 25-33 K)と3本のマイナーなペプチド(47 K, 56 K, 75 K)を報告しているが、75 Kのペプチドはわれわれの標品には検出されていない。またPAQUET⁷⁶⁾は17 Kが主要で、7 Kと57 Kの2本のマイナーペプチドの存在を報告しているが、27 Kのバンドが検出されていない。

未加熱脱脂乳から精製したLP標品のSDS-PAGEパターンは、マイナーなポリペプチドに若干の差異は認められるが、PAGE, 焦点電気泳動, 免疫学的性質, アミノ酸組成, 糖組成などはPPから精製したLPの

Table 3. Amino Acid (mole %) and Carbohydrate (weight %) Compositions of Lactophorin (LP), Glycoprotein Corresponding to LP, Proteose-peptone Component-3 (PPC-3) and Soluble Glycoprotein (SGP) of Milk Fat Globule Membrane

Amino acid and monosaccharide	LP Kanno ⁴¹⁾	Glycoprotein corresponding to LP Kester Brunner ⁶³⁾ Paquet et al. ⁷⁶⁾		SGP ⁵¹⁾	PPC-3 ⁵⁴⁾
Asp	8.7	9.4	9.0	7.1	9.9
Thr	9.5	10.6	8.7	12.3	7.3
Ser	10.2	12.9	10.2	8.9	9.6
Glu	16.0	15.3	14.6	13.2	19.3
Pro	2.7	5.2	4.9	3.8	6.8
Gly	3.3	3.2	3.9	4.6	2.7
Ala	4.7	4.7	4.8	5.0	4.6
Cys (1/2)	0.3	0.6	1.4	0.5	tr
Val	3.7	4.4	3.3	3.7	4.2
Met	2.3	1.8	3.4	3.0	1.3
Ile	6.4	6.4	5.6	3.9	6.7
Leu	11.7	11.3	10.3	12.0	9.5
Tyr	1.5	1.1	tr	1.5	1.3
Phe	2.7	2.4	3.2	2.7	2.5
Lys	8.8	5.6	8.6	9.9	7.7
His	4.9	2.4	3.8	4.4	2.9
Arg	4.1	2.5	4.0	2.6	3.9
Trp	nd	0.3	nd	0.4	nd
HyP [#]	58.4	56.6	58.2	60.9	55.8
PCG ^{##}	42.5	35.2	40.0	37.2	43.7
Fucose	0.3	0.8	nd	0.8	0.4
Mannose	2.2	6.8*	nd	13.9*	4.2*
Galactose	3.4				
GalNAc	2.2	7.1**	nd	8.1**	1.7*
GlcNAc	3.9				
Sialic acid	6.5	4.0	nd	8.0	2.7
Total	18.5	18.7	—	30.8	8.9

nd, Not determined; tr, trace in amount. #, Hydrophobic amino acids including Thr, Pro, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, and Arg. ##, Polar amino acids with charged group (Asp, Glu, Lys, His, and Arg). *and **, determined as hexoses and hexosamines, respectively.

Fig. 3. Double immunodiffusion (A) immunoelectrophoretic (B) patterns of seven components (1-7) of lactophorin (LP). Troughs contains anti-SGP antibody. SGP, soluble glycoprotein isolated from bovine milk fat globule membrane.

それらと非常に良く類似していた⁷³⁾。これらのことは、LP の存在およびその多様な分子会合は加熱に依存しないことを証明している。

4) ラクトフォリンコンポーネントの特性

精製した LP は pH 8.6 における DEAE-cellulose でのクロマトグラフィーで 7 種の LP コンポーネント (LPC) に分離される⁴⁰⁾。溶出順に 1-7 の番号を付し、後述するように、LP は構成ポリペプチドの組成を異にする会合体であることから、これらをコンポーネントと呼称することにした。分離された 7 画分は PAGE でわずかなず移動度の異なるほぼ単一なバンドである。7 種の LPC は分析用超遠心での沈降パターンはいずれも均一であるが、沈降係数はわずかなず異なっており、LPC-1 ~7 ではそれぞれ 3.8, 4.8, 5.2, 5.5, 4.5, 5.2, 5.6 S である⁴¹⁾。更に興味深いことに、7 種の LPC は免疫二重拡散での沈降線は互に完全に融合しているにもかかわらず、免疫電気泳動での沈降線の移動度が DEAE-cellulose (pH 8.6) での溶出順に大きくなっており、全体の長さは精製 LP のそれに匹敵している (Fig. 3)⁴⁰⁾。これはこの蛋白質分子の多形性を示唆しており、これまでも粗 LP 試料で観察されている^{50,54)}。分離された 7 種の LPC のアミノ酸組成は、7 種の LPC 間で少しずつ異なっているが、いずれも Asp, Thr, Ser, Glu, Leu, Lys が多く、特に Thr, Gly, Lys 含量は LPC-1 から LPC-7 にかけて増えているのに対して、Ile と Arg は減少している傾向が認められる。芳香属アミノ酸含量は LPC-1 で Tyr が検出されない他は、ほぼ一定である。疎水性アミノ酸含量は LPC-1~3 の方が LPC-5~6 よりも高いのに対して、荷電極性アミノ酸含量は逆である。

LP は 18% の糖を含み、SGP のその約 3/5 で、い

ずれも Fuc, Man, Gal, GalNAc, GlcNAc, SA からなり、アミノ酸組成の場合と同じ様に、7 種の LPC 間に少しずつの差異が認められる。特に、SA は LPC-1 (144 nmole) から -7 (232 nmole) にかけて増加している傾向が認められ、このことも DEAE-cellulose での溶出順に影響している。

LP は全体では Mr 17 K~67 K の 7 本のポリペプチド (I~VII) から構成されている (Table 4)。しかし、7 種の LPC のポリペプチド組成は、LPC 間で著しい差異が認められる。例えば、LPC-1 はポリペプチド VII のみで、-2 は VI と VII、-3 は V, VI, VII、そして -6 は I ~VI から構成されている。LPC-6 と -7 では糖ペプチド VII が欠如している。各 LPC に共通に存在する主要な 2 種の糖ペプチド (VI=Mr 27 K, VII=17 K) のうち、これらの 2 つあるはいずれかと 5 つの微量のポリペプチドのいくつかが疎水的に分子間結合して多形性の LP 複合体を形成していると考えられる。このことが、7 種の LPC が同一の抗原性を持つにもかかわらず、多様な分子形態をとることの所以であると解釈される。

6. ラクトフォリンの起源

SGP と SGP の抗体と反応する LP がそれぞれ MFGM とホエーの両画分に分布していることの起因を探るための検討が行なわれている。まず加熱脱脂乳と未加熱脱脂乳を 37℃ で 14 日間に渡ってインキュベーション後、PP を分画して、その間の牛乳固有のプロティナーゼによる PPC 含量の変化を調べている⁴⁶⁾。対照である加熱脱脂乳では PPC 含量にはほとんど変化が見られないのに対して、未加熱脱脂乳では、 β -カゼイン由来の PPC-5 と -8 画分は増加している。しかし、LP が含まれている PPC-3 の含量はそれほど増加しない。PAGE では未加熱脱脂乳からの LP のバンドは 6 日目

Table 4. Composition of Polypeptides Constituting the Seven Components of Lactophorin (LP) and Their Apparent Molecular Weight

#, presence (major); +, present; $\pm$, probably present; -, absent.

Poly-peptide	LP Component							SGP	Molecular weights
	1	2	3	4	5	6	7		
I (GP)	-	-	-	-	+	+	+	+	67,000
II (GP)	-	-	-	-	$\pm$	+	+	-	63,000
III	-	-	-	+	+	+	$\pm$	-	58,000
IV	-	-	-	+	+	+	+	-	50,000
V	-	-	+	+	+	$\pm$	$\pm$	-	42,000
*VI (GP)	-	+	+	+	+	+	+	+	27,000
*VII (GP)	+	+	+	+	+	-	-	+	17,000

GP, Glycoprotein positive to carbohydrate stain; *, Major glycopeptide; SGP, Soluble glycoprotein.

には消失している。そこで LP の変動を単一放射免疫拡散法で定量した結果、加熱脱脂乳の LP の抗原性は完全に保持されているのに対して、未加熱脱脂乳のそれは次第に減少し、14 日目には 0 日の 20% である。また免疫電気泳動でも未加熱脱脂乳からの LP の沈降線は消失はしないが、沈降線の長さや移動度は経日的に変化している。これらの結果は、LP は脱脂乳の他の高分子タンパク質の蛋白分解によって生成されるところか、分解されていることを示している。

さらに、LP 標品を 1/1100 量のプラスミンあるいは 1/1000 量のトリプシンによって温和な条件化でインキュベート (37°C) すると、LP の主要なポリペプチド (Mr 27 K) は中間体 (Mr 17 K) を経て経日的に分解されていることから、LP の主ポリペプチド (27 K) の限定加水分解物が SGP の主ポリペプチド (17 K) であると示唆される⁴⁹⁾。このように、LP は牛乳固有のプロテアーゼであるプラスミンによって分解されやすい。

また、MFGM およびその構成糖タンパク質に富んだ画分のプラスミン分解によって、SDS-PAGE で LP の移動度に相当する顕著なバンドが検出されないことなどから、LP は生来のタンパク質であると結論できる⁵⁷⁾。

以上の結果から、ホエーに存在する LP がプラスミンによって限定的に加水分解され、その限定分解物 (17 K) が MFGM に吸着したものが SGP の主要ポリペプチドであると推測される。

7. ラクトフォリンの機能

1) 乳化機能

PP とその分画した画分の乳化機能が KANNO⁴²⁾ の方法により比較されている⁸⁸⁾。同条件下で (タンパク質 40 mg/1 g 乳脂肪、攪拌速度 19,500 rpm、攪拌時間 2 分、乳化温度 45°C、pH 7.0、全量 5 ml)、LP を含む PPC-3 画分はいずれの画分よりも高い乳化活性⁷⁹⁾をもち、これは MFGM (1430) の約 2.2 倍である⁴²⁾。乳化安定性も他の画分 (0.4~0.5) より著しく優れている (1.0)。この LP 画分の高い乳化能力は、LP に富む画分を含むエマルジョンの脂肪球のサイズが中間平均直径 2 μ m で、いずれの画分 (5.5~8.0 μ m) よりも小さく、しかも 1 cm³ 当りの比表面積は PPC-3 画分を添加したエマルジョンでは 31,000 cm² で、他の画分 (10,000~12,000 cm²) の約 3 倍であることから裏付けられる。SHIMIZU ら⁸⁷⁾ は PP のうち、LP の主要ポリペプチドが脂肪球表面に特異的に吸着することを報告している。PPC-3 画分の主要成分は LP であり、LP のもつ高い疎水性率が乳化に寄与していると考えられる。

2) リポリシスの抑制作用

牛乳に存在するリパーゼは人乳と共通のリポプロテインリパーゼ (LPL) だけである¹⁵⁾。LPL は、リポタンパク質のアポ C II によって活性化されるのが特徴であり、基質としての TG を分解できるが、乳脂肪球のコア脂質の TG を分解することができない。未処理の、乳脂肪球の破壊されていない牛乳では、リポリシスは全然起こらないが、牛乳を 2 分間超音波処理して乳脂肪球を破壊したもので、直ちに内因性の LPL によってリポリシスが生じる^{6,7)}。

牛乳を超音波により破壊すると、リポリシスは時間の経過と共に直線的に進行する。この超音波処理した牛乳に PPC-3 あるいは LP を添加すると (40 mg/ml of milk)、リポリシスをそれぞれ 90 分後で 43% および 67% 抑制することが出来る⁵⁸⁾。リポリシスを抑制するのに要求された LP 量が高いのは超音波処理により脂肪球の比表面積が増大したことに起因している。LP による LPL やリパーゼに対する阻害作用は、LP の優れた乳化機能により、基質である脂肪球を被覆・修復する高い能力に依るものと推定される。

SHIMIZU ら⁸⁴⁾ は、MFGM や SGP が臍リパーゼや *Rhizopus delemere* 由来のリパーゼによる乳脂肪のリポリシスを抑制することを認めている。ANDERSON¹⁾ は PPC-3 が牛乳のリポリシスを抑制することを、また CARTIER ら^{11,12)} は PPC-3 およびそれから部分的に精製したタンパク質は、基質として intralipid と牛乳から精製した LPL に対して、濃度の増加と共にリポリシスを抑制することを報告している。このリポリシスを 50% 抑制するに必要な PPC-3 の量は 0.4 mg である¹¹⁾。この抑制作用は、抑制剤の濃度とともに高くなるが、基質量の増大に対しては減少する。したがって、MFGM、SGP、PPC-3 および LP の抑制効果は LPL の基質への結合を阻害している結果によるものと考えられる。

LPL が乳脂肪球のコアにある TG を加水分解できないのは、LPL が乳脂肪球に結合することを防止している物質、すなわち MFGM が乳脂肪球を被覆している物理的防御機構の他に、MFGM の構成タンパク質である SGP およびこれの抗体と反応する LP が脂肪球を修復する効果の結果であり、牛乳は LPL に対する二重の防御機構を備えている。

8. ま と め

Fig. 4 に LP と SGP との関連を仮説的に図示してある。まずホエーには LP の基本構造である 27 K と幾つかのマイナーなポリペプチドから構成されている

Fig. 4. Relationship between lactophorin (LP) in whey and the soluble glycoprotein (SGP) in milk fat globule membrane (MFGM).

LPC-5, -6, -7が存在する。これらがプラスミンにより加水分解されると、17K ポリペプチド、すなわち、LPC-1に相当するものが生成され、これと27KのLPが結合して、LPC-2, -3, -4を構成するようになる。この17Kポリペプチドは27Kポリペプチドを中心に構成されているLPよりも脂肪球皮膜に吸着しやすい性質を持ち、MFGMを修復することができる。その結果として、LPあるいはSGPはLPLに対する抑制作用をもつようになる。他方、MFGMに吸着した17Kポリペプチドは、脱脂されたりすると、LPの構成ポリペプチドとは異なる微量のポリペプチドを結合してMFGMから離脱し、可溶性のSGPとなる。

以上、ホエー中の抗-SGP抗体と反応する蛋白質をLPと命名し、このLPを精製し、更に7成分にまで分離し、それらの理化学的特性を明らかにし、LPと他の乳蛋白質のプラスミン分解との関連の研究を行ない、かつLPの機能の一端について要約した。まだLPの主要ポリペプチドの一次構造、糖鎖構造、LPの限定加水分解物とSGPの主要ポリペプチドとの関連、乳腺での生合成などの研究が残されている。またLPは比較的小分子で、高い疎水性を持っていることから多くの機能が期待され、その開発が待たれる。

謝 辞

御薫陶頂きました東京大学名誉教授津郷友吉先生、本研究の端緒を拓いていただき、多大な御指導・御鞭撻を賜りました東京大学名誉教授山内邦男先生、並びに宇都宮大学名誉教授大武由之先生、SGPの共同研究者であった現静岡県立大学助教授清水 誠先生に深甚の謝意を表します。また、御協力頂いた東京大学農学部および宇都宮大学農学部の畜産物利用学研究室の皆さんに心か

ら御礼申し上げます。多くの犠牲を払ってくれている妻と二人の子供に感謝する。

文 献

- 1) ANDERSON, M., Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose-peptone. *J. Dairy Res.*, **48**: 247-252. 1981.
- 2) ANDREWS, A.T., The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90**: 59-65. 1978.
- 3) ANDREWS, A.T., The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8 F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.*, **90**: 67-71. 1978.
- 4) ASCHAFFENBURG, R. and J. DREWARY, New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. *Int. Dairy Congr. 15th*, London, **3**: 1631-1637. 1959.
- 5) BARGMANN, W. and A. KNOOP, On the morphology of milk secretion. Light and electron microscopic studies on the mammary gland of the rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **49**: 344-388. 1959.
- 6) BENGTTSSON, G. and T. OLIVECRONA, Lipoprotein lipase: Some effects of activator proteins. *Eur. J. Biochem.*, **106**: 549-555. 1980.
- 7) BENGTTSSON, G. and T. OLIVECRONA, Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein C II. Demonstration of an effect of the activator on the binding of the enzyme to milk-fat globules. *FEBS Lett.*, **147**: 183-187. 1982.
- 8) BEZKOROVAINY, A., J.H. NICHOLS and D.A. SLY, Proteose-peptone fractions of human and bovine milk. *Int. J. Biochem.*, **7**: 639-645. 1976.
- 9) BRUDER, G., H. HEID, E.-D. JARASCH, T.W. KEENAN and I.H. MATHER, Characteristics of membrane-bound and soluble forms of xanthine oxidase from milk and endothelial cells of capillaries. *Biochim. Biophys. Acta*, **701**: 357-369. 1982.
- 10) BRUNNER, J.R. and M.P. THOMPSON, Characteristics of several minor-protein fractions isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **44**: 1224-1237. 1961.
- 11) CARTIER, P. and Y. CHILLIARD, Effects of different skim milk fraction on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *J. Dairy Sci.*, **69**: 951-955. 1986.
- 12) CARTIER, P., Y. CHILLIARD and D. PAQUET, Inhibiting and activating effects of skim milks and proteose-peptone fraction on spontaneous lipolysis and purified lipoprotein lipase activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **73**: 1173-1177. 1990.
- 13) COULSON, E.J. and R.H. JACKSON, The mucoprotein of the fat/plasma interface of cow's milk. II. Immunochemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**: 378-382. 1962.
- 14) DEENEY, J.T., H.M. VALIVULLAH, C.H. DAPPER, D.P. DYLEWSKI and T.W. KEENAN, Microlipid droplets in milk secreting mammary epithelial cells: Evidence that they originate from endoplasmic reticulum and are precursors of milk lipid globules. *Eur.*

- J. Cell Biol., **38** : 16-26. 1985.
- 15) DEETH, H.C. and C.H. FITZ-GERALD, Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. Development of Dairy Chemistry, Vol. 2. (Fox, P.F. ed.) 195-239. Applied Science Publishers. London. 1983.
 - 16) DYLEWSKI, D.P., C.H. DAPPER, H.M. VALIVULLAH, J.T. DEENEY and T.W. KEENAN, Morphological and biochemical characterization of possible intracellular precursors of milk lipid globules. Eur. J. Cell Biol., **35** : 99-111. 1984.
 - 17) EIGEL, W.N., Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine β -casein. Int. J. Biochem., **13** : 1081-1086. 1981.
 - 18) EIGEL, W.N., J.E. BUTLER, C.A. ERNSTROM, H.M. FARRELL, Jr., V.R. HALWALKAR, R. JENNESS and R.M. WHITNEY, Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. J. Dairy Sci., **67** : 1599-1631. 1984.
 - 19) EIGEL, W.N., C.J. HOFMANN, B.A.K. CHIBBER, J.M. TOMICHI, T.W. KEENAN and E.T. MERTZ, Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. Proc. Natl. Acad. Sci., **76** : 2244-2248. 1979.
 - 20) EIGEL, W.N. and T.W. KEENAN, Identification of proteose-peptone component 8 slow as a plasmin-derived fragment of bovine β -casein. Int. J. Biochem., **10** : 529-535. 1979.
 - 21) FRANKE, W.W., H.W. HEIDE, C. GRUND, S. WINTER, C. FREUDENSTEIN, E. SCHMID, E.-D. JARASCH and T.W. KEENAN, Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: Specific location in apical regions of lactating epithelial cells. J. Cell Biol., **89** : 485-494. 1981.
 - 22) FREUDENSTEIN, C., T.W. KEENAN, W.N. EIGEL, M. SASAKI, J. STADLER and W.W. FRANKE, Preparation and characterization of the inner coat material associated with fat globule membranes from bovine and human milk. Exp. Cell Res., **118** : 277-294. 1979.
 - 23) GANGULI, N.C., B.S. GUPTA, O.N. AGARWALA and V.R. BHALERAO, The proteose-peptone fraction of milk: Isolation and properties of proteose-peptone and proteose from cow and buffalo. Indian J. Biochem., **2** : 189-192. 1965.
 - 24) GORDON, W.G., M.L. GROVES, R. GREENBERG, S.B. JONES, E.B. KALAN, R.F. PETERSON and R.E. TOWNEND, Probable identification of γ -, TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. J. Dairy Sci., **55** : 261-263. 1972.
 - 25) GREENWALT, D.E. and I.H. MATHER, Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues. J. Cell. Biol., **100** : 397-408. 1985.
 - 26) GROSCHLAUDE, F., M.-F. MACHE, J.-C. MERCIER and B. RIBADEAU-DUMAS, Primary structure of α_{s1} -casein and β -casein of bovine milk. Correction. Eur. J. Biochem., **40** : 323-324. 1973. (French)
 - 27) GROVES, M.L., W.G. GORDON, E.B. KALAN and S.B. JONES, Composition of bovine γ -caseins A¹ and A³ and further evidence for a relationship in biosynthesis of γ - and β -caseins. J. Dairy Sci., **55** : 1041-1049. 1972.
 - 28) GROVES, M.L., W.G. GORDON, E.B. KALAN and S.B. JONES, TS-A², TS-, B, R- and S-caseins: Their isolation, composition and relationship to β - and γ -casein polymorphs A² and B. J. Dairy Sci., **56** : 558-568. 1973.
 - 29) HEIDE, H.W., S. WINTER, G. BRUDER, T.W. KEENAN and E.-D. JARASCH, Butyrophilin, an apical plasma membrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species. Biochim. Biophys. Acta, **728** : 228-238. 1983.
 - 30) HUGGINS, J.W. and K.L. CARRAWAY, Purification of plasma membranes from rat mammary gland by a density perturbation procedure. J. Supramol. Struct., **5** : 59-63. 1976.
 - 31) HUGGINS, J.W., T.P. TRENBEATH, R.W. CHESNUT, C.A.C. CARRAWAY, and K.L. CARRAWAY, Purification of plasma membranes from rat mammary gland: Composition of subfractions with rat milk fat globule membrane. Exp. Cell Res., **126** : 279-288. 1980.
 - 32) IMAM, A., D.J.R. LAURENCE and A.M. NEVILLE, Isolation and characterization of a major glycoprotein from milk-fat-globule membrane of human breast milk. Biochem. J., **193** : 47-54. 1981.
 - 33) IMAM, A., D.J.R. LAURENCE and A.M. NEVILLE, Isolation and characterization of two individual glycoprotein components from human milk-fat-globule membranes. Biochem. J., **207** : 37-41. 1982.
 - 34) JACKSON, R.H. E.J. COULSON and W.R. CLARK, The mucoprotein of the fat/plasma interface of cow's milk. I. Chemical and physical characterization. Arch. Biochem. Biophys., **97** : 373-377. 1962.
 - 35) JARASCH, E.-D., C. GRUND, G. BRUDER, H.W. HEID and T.W. KEENAN, Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. Cell, **25** : 67-82. 1981.
 - 36) JENNESS, R., Characterization of milk serum protein component 5. J. Dairy Sci., **42** : 895. 1959. (Abstract)
 - 37) JOHNSON, V.G. and I.H. MATHER, Monoclonal antibodies prepared against PAS-I, butyrophilin and GP-55 from guinea-pig milk-fat-globule membrane bind specifically to the apical pole of secretory-epithelial cells in lactating mammary tissue. Exp. Cell Res., **156** : 144-158. 1985.
 - 38) KAMINOGAWA, S., H. MIZOBUCHI and K. YAMAUCHI, Comparison of bovine milk protease with plasmin. Agric. Biol. Chem., **36** : 2163-2167. 1972.
 - 39) KANNO, C., Receptor proteins for Concanavalin A and wheat germ agglutinin of bovine milk fat globule membrane probed by affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulfate. Agric. Biol. Chem., **50** : 2997-3003. 1986.
 - 40) KANNO, C., Purification and separation of multiple forms of lactophorin from bovine milk whey and their immunological and electrophoretic properties. J. Dairy

- Sci., 72: 883-891. 1989.
- 41) KANNO, C., Characterization of multiple forms of lactophorin isolated from bovine milk whey. *J. Dairy Sci.*, 72: 1732-1739. 1989.
 - 42) KANNO, C., Emulsifying properties of bovine milk fat globule membrane in milk fat emulsion: Conditions for the reconstitution of milk fat globules. *J. Food. Sci.*, 54: 1534-1539. 1989.
 - 43) KANNO, C., Secretory membranes in the lactating mammary gland. *Protoplasma*, 154: in press. 1990.
 - 44) KANNO, C., H. HATTORI and K. YAMAUCHI, Isolation and characterization of plasma membrane from lactating bovine mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta*, 689: 121-134. 1982.
 - 45) KANNO, C., H. HATTORI and K. YAMAUCHI, Characterization of plasma membrane proteins from lactating bovine mammary gland. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 1325-1332. 1987.
 - 46) KANNO, C., H. HATTORI and K. YAMAUCHI, Lipid composition of plasma membranes isolated from lactating bovine mammary gland. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2995-3001. 1987.
 - 47) KANNO, C. and D.-H. KIM, A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition, enzymatic activities and electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 2845-2854. 1990.
 - 48) KANNO, C. and H. OGAWA, Proteolysis of lactophorin in skim milk by bovine milk indigenous proteases. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 60: 797-806. 1989.
 - 49) KANNO, C. and H. OGAWA, Proteolytic degradation of lactophorin from bovine milk by plasmin and trypsin. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 60: 865-873. 1989.
 - 50) KANNO, C. and Y. OHTAKE, Immunological and electrophoretic characteristics of anti-SGP reacting protein among component-3, -5 and -8 fractions of proteose-peptone of bovine milk: Evidence for the multiple forms. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 52: 282-296. 1981.
 - 51) KANNO, C., M. SHIMIZU and K. YAMAUCHI, Isolation and physico-chemical properties of a soluble glycoprotein fraction of milk fat globule membrane. *Agric. Biol. Chem.*, 39: 1835-1842. 1975.
 - 52) KANNO, C., M. SHIMIZU and K. YAMAUCHI, Polydispersity and heterogeneity of the soluble glycoprotein isolated from bovine milk fat globule membrane. *Agric. Biol. Chem.*, 41: 83-87. 1977.
 - 53) KANNO, C. and K. YAMAUCHI, Antigenic identity between the soluble glycoprotein of milk fat globule membrane and a heat-stable protein fraction of whey. *Agric. Biol. Chem.*, 42: 1697-1705. 1978.
 - 54) KANNO, C. and K. YAMAUCHI, Relationship of soluble glycoprotein of milk fat globule membrane to component-3, -5 and -8 fractions of proteose-peptone. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2105-2113. 1979.
 - 55) 菅野長右門・牛乳脂肪球皮膜に関する最近の研究-特に構成蛋白質を中心に-. *日畜会報*, 51: 75-88. 1980.
 - 56) 菅野長右門・趙 鎮国・小森 明, 泌乳初期における牛乳でのウシ乳腺細胞の細胞膜標識酵素の活性の変動と分布, 第80回日本畜産学会大会講演要旨, pp. 61. 1988.
 - 57) 菅野長右門・岩本 泉, ラクトフォリンは乳脂肪球皮膜から産出されるか. 第83回日本畜産学会大会講演要旨, pp. 177. 1990.
 - 58) 菅野長右門・土井隆司, 未発表
 - 59) KEENAN, T.W., D.P. DYLEWSKI, T.A. WOODFORD and R. H. FORD, Origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. *Developments in Dairy Chemistry*, vol. 2, (Fox, P.F. ed.) 83-118. Applied Scientific Publishers. London. 1983.
 - 60) KEENAN, T.W., K.M. POWELL, M. SASAKI, W.N. EIGEL and W.W. FRANKE, Membranes of mammary gland. XIV. Isolation and partial characterization of a high molecular weight glycoprotein fraction from bovine milk fat globule membrane. *Cytobiologie*, 15: 96-115. 1977.
 - 61) KEENAN, T.W., I.H. MATHER and D.P. DYLEWSKI, Physical equilibria: Lipid phase. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, Third ed. (WONG, N.P. ed.) 511-582. Van Nostrand Reinhold. New York. 1988.
 - 62) KEENAN, T.W., H.M. VALIVULLAH and J.T. DUNLEVY, Isolation of plasma membranes from mammary gland by two-phase polymer partitioning. *Anal. Biochem.*, 177: 194-198. 1989.
 - 63) KESTER, J.J. and J.R. BRUNNER, Milk fat-globule membrane as possible origin of proteose-peptone glycoprotein. *J. Dairy Sci.*, 65: 2241-2252. 1982.
 - 64) KITCHEN, B.J., A comparison of the properties of membranes isolated from bovine skim milk and cream. *Biochim. Biophys. Acta*, 356: 257-269. 1974.
 - 65) KOLAR, C.W. and J.R. BRUNNER, Characteristics of proteose-peptone component five and eight. *J. Dairy Sci.*, 51: 945. 1968. (Abstr.)
 - 66) KOLAR, C.W. and J.R. BRUNNER, Proteose-peptone fraction of bovine milk: Distribution in the protein system. *J. Dairy Sci.*, 52: 1541-1546. 1969.
 - 67) KOLAR, C.W. and J.R. BRUNNER, Proteose-peptone fraction of bovine milk: Lactal serum component 5 and 8-Casein associated glycoproteins. *J. Dairy Sci.*, 53: 997-1008. 1970.
 - 68) LARSON, B.L. and G.D. ROLLERI, Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. Dairy Sci.*, 38: 351-360. 1955.
 - 69) McPHERSON, A.V. and B.J. KITCHEN, Reviews of the progress of dairy science: The bovine milk fat globule membrane-its formation, structure and behaviour in milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 50: 107-133. 1983.
 - 70) NEJJAR, Y., D. PAQUET, F. AUBERT and G. LINDEN, The PP 3 component of the proteose-peptone. Extraction from unheated skim milk. *Milchwissenschaft*, 45: 84-87. 1990.
 - 71) NEJJAR, Y., D. PAQUET, G. GODBILLON and Y.L. DEAUT, Immunological relationship between the hydrophobic fraction of proteose-peptone and the milk fat globule membrane of bovine milk. *Int. J.*

- Biochem., 18 : 893-900. 1986.
- 72) NG, W.S., J.R. BRUNNER and K.C. RHEE, Proteose-peptone fraction of bovine milk: Lactal serum component 3-A whey glycoprotein. *J. Dairy Sci.*, 53 : 987-996. 1970.
- 73) 小川英子・菅野長右門, 未加熱牛乳からのラクトフォリンの単離とその特性. 日本農芸化学会 1989 年大会. 63 : 570. 1989.
- 74) PAQUET, D., Review : The proteose-peptone fraction of milk. *Lait*, 69 : 1-21. 1989. (French)
- 75) PAQUET, D. and C. ALAIS, Purification and some molecular characteristics of the "component-3" of proteose-peptone. *Lait*, 62 : 338-349. 1982. (French)
- 76) PAQUET, D., Y. NEJJAR and G. LINDEN, Study of a hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *J. Dairy Sci.*, 71 : 1464-1471. 1988.
- 77) PATTON, S. and T.W. KEENAN, The relationship of milk phospholipids to membranes of the secretory cell. *Lipids*, 6 : 58-61. 1971.
- 78) PATTON, S. and T.W. KEENAN, The milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 415 : 273-309. 1975.
- 79) PEARCE, K.N. and J.E. KINSELLA, Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidmetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26 : 716-723. 1978.
- 80) RIBADEAU-DUMAS, B., G. BRIGNON, F. GROSCLAUDE and J.-C. MERCIER, Primary structure of β -casein of bovine milk. Complete sequence. *Eur. J. Biochem.*, 25 : 505-514. 1972. (French)
- 81) ROSE, D., J.R. BRUNNER, E.B. KALAN, B.L. LARSON, P. MELNYCHYN, H.E. SWAISGOOD and D.F. WAUGH, Nomenclature of the proteins of cow's milk. Third revision. *J. Dairy Sci.*, 53 : 1-17. 1970.
- 82) ROWLAND, S.J., The soluble protein fraction of milk. *J. Dairy Res.*, 8 : 6-14. 1937.
- 83) SHIMIZU, M., C. KANNO and K. YAMAUCHI, Dissociation of the soluble glycoprotein of bovine milk fat globule membrane by sodium dodecyl sulfate. *Agric. Biol. Chem.*, 40 : 1711-1716. 1976.
- 84) SHIMIZU, M., H. MIYAJI and K. YAMAUCHI, Inhibition of lipolysis by milk fat globule membrane materials in model milk fat emulsion. *Agric. Biol. Chem.*, 46 : 795-799. 1982.
- 85) SHIMIZU, M. and K. YAMAUCHI, Isolation and characterization of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane. *J. Biochem.*, 91 : 515-524. 1982.
- 86) SHIMIZU, M., K. YAMAUCHI, Y. MIYAUCHI, T. SAKURAI, K. TOKUGAWA and R.A.J. McILHINNEY, High-Mr glycoprotein profiles in human milk serum and fat-globule membrane. *Biochem. J.*, 233 : 725-730. 1986.
- 87) SHIMIZU, M., K. YAMAUCHI and M. SAITO, Emulsifying properties of the proteose-peptone fraction obtained from bovine milk. *Milchwissenschaft*, 44 : 497-500. 1989.
- 88) 鈴木恵美・東 徳洋・菅野長右門, 牛乳プロテオースペプトン画分の乳化機能. 第 83 回日本畜産学会大会講演要旨, pp. 195. 1990.
- 89) SWOPE, F.C., K.C. RHEE and J.R. BRUNNER, The isolation and partial characterization of a fat globule membrane glycoprotein. *Milchwissenschaft*, 23 : 744-746. 1968.
- 90) TAKAMIZAWA, K., M. IWAMORI, M. MUTAI and Y. NAGAI, Gangliosides of bovine buttermilk. Isolation and characterization of a novel monosialoganglioside with a new branching structure. *J. Biol. Chem.*, 261 : 5625-5630. 1986.
- 91) 高見沢康太郎, 人乳・牛乳およびヤギ乳のガングリオンド組成の特徴と細菌毒素に対する結合特性. 酪農科学・食品の研究, 37 : A-259-273. 1988.
- 92) THOMPSON, M.P. and J.R. BRUNNER, The carbohydrates of some glycoproteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 42 : 369-370. 1959.
- 93) WHITNEY, R.M., J.R. BRUNNER, K.E. EBNER, H.M. FARRELL, Jr., R.V. JOSEPHSON, C.V. MORR and H.E. SWAISGOOD, Nomenclature of the proteins of cow's milk. Fourth revision. *J. Dairy Sci.*, 59 : 795-815. 1976.
- 94) WOODING, F.B.P. and P. KEMP, Ultrastructure of the milk fat globule membrane with and without triglyceride. *Cell Tiss. Res.*, 165 : 113-127. 1975.
- 95) YAMAUCHI, K., M. SHIMIZU and C. KANNO, Effect of preparation on properties of a soluble glycoprotein fraction of milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 61 : 688-696. 1978.