人乳および牛乳ラクトフェリンの ペプシンによる加水分解

鈴木 隆, 野 中 真 弓
清 沢 功, 小 笠 勝 啓

森永乳業株式会社中央研究所

Peptic Digestion of Human and Bovine Lactoferrin

Takashi SUZUKI, Mayumi NONAKA

Isao KIYOSAWA, Katsuhiko OGASA

Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.,
Meguro-ku, Tokyo

Human and bovine lactoferrins in the iron-saturated and free forms were digested with pepsin at different pH, *in vitro*. The amount of 6% TCA soluble peptides, the iron-binding capacity, immunological reactivity and electrophoretic patterns were analyzed.

At pH 2.0, each lactoferrin was very susceptible for the peptic digestion, independent upon the exist of iron. The iron-binding capacity and immunological reactivity almost disappeared after 30 min incubation. At pH 4.5, iron-saturated lactoferrin was more resistant to peptic digestion than iron-free lactoferrin. The iron-binding capacities of the former in human and bovine milk were 94.7% and 92.6%, respectively, after 3 hrs incubation, while those of the latter were 50.5% and 69.2%. At pH 6.0, both iron-saturated and iron-free lactoferrin was little digested with pepsin. Human and bovine caseins, however, were more susceptible to peptic digestion than the corresponding lactoferrin at the same condition.

The structural differences between human and bovine lactoferrins were suggested by disc gel electrophoretic and immunoelectrophoretic patterns.

Furthermore, some fragments or undigested portion with iron-binding property were found in the iron-free bovine lactoferrin digests by means of radioactive iron.

(Received December 26, 1977)

ラクトフェリンは、乳汁などの外分泌液中に存在する鉄結合性たん白質であるが¹⁾、その鉄結合能により病原性細菌に対して制菌活性を有することが明らかにされて以来²⁾、免疫グロブリンやリゾチームなどとともに乳汁中の感染防御物質として乳児栄養学上注目されている。著者らは、これまで、人乳³⁾および牛乳⁴⁾中の含量ならびに病原性大腸菌に対する制菌効果⁵⁾などについて検討を行ってきた。その結果、乳汁中のラクトフェリンはとくに初乳に多く含有されており、初乳を摂取する新生児や子牛の腸管内で感染防御物質として作用している可能性が示唆された。しかし、ラクトフェリンが胃腸管内において消化酵素により加水分解を受け、その制菌活性を失うことも十分考えられるため、ラクトフェリンの消化管内における挙動を明らかにすることは重要であ

る。しかし、ラクトフェリンに対する酵素作用については、種々の消化酵素による人乳ラクトフェリンの加水分解に関する断片的な報告^{7,8)}およびトリプシンによる牛乳ラクトフェリンの加水分解に関する報告⁹⁾があるのみであり、必ずしも十分な検討は行なわれていない。そこで今回、ラクトフェリンの胃内における加水分解性を検討することを目的とし、ペプシンにより *in vitro* に人乳および牛乳の鉄飽和および脱鉄ラクトフェリンを加水分解し、残存する鉄結合能、免疫学的反応性および 6% TCA 可溶性ペプチドの増加率を測定した。また、ディスクゲル電気泳動および免疫電気泳動により、加水分解によるラクトフェリンの経時的变化を観察した。さらに、脱鉄ラクトフェリン加水分解物の鉄結合性成分についても放射性鉄 (⁵⁹Fe) を用いて検討したので、これらの結果について報告する。

Fig. 1. Absorption spectra of human and bovine Fe-sat. lactoferrin at different pH.

実験方法

1. 試料の調製

人乳および牛乳ラクトフェリンの分離・精製は、前報⁵⁾と同様に行なった。鉄飽和ラクトフェリンは、分離・精製したラクトフェリンの1%水溶液10 mlに0.003 M 塩化第二鉄を含む0.1 M クエン酸ナトリウム溶液2 mlを加え、1時間おだやかに攪拌後、脱イオン水に対し24時間透析し、凍結乾燥して得た。また、脱鉄ラクトフェリンは、Massonらの方法¹⁰⁾に従い、1%ラクトフェリン水溶液を20倍量の0.05% EDTAを含む0.1 M クエン酸溶液(pH 2.2)に対し、4°C下で30時間透析した後、さらに、脱イオン水に対し24時間透析し、凍結乾燥して得た。また、人乳および牛乳カゼインは、脱脂乳に0.1 N HClを滴下してpH 4.6とし、生じた沈殿を水に懸濁した後、脱イオン水に対し透析し、凍結乾燥することにより得た。鉄飽和ラクトフェリンのpH 2.0, 4.5および6.0における可視部吸収スペクトルはFig. 1のとおりであった。

2. 加水分解

ペプシンによる加水分解は次のように行なった。分解のpHは、新生児の胃内pH¹¹⁾を考慮してpH 2.0, 4.5および6.0の3点とし、pH 2.0においては0.01 N 塩酸、pH 4.5および6.0においては0.1 M 酢酸緩衝液を、それぞれ使用した。これらの緩衝液に溶解した0.2%ラクトフェリン溶液に、ペプシン(Sigma Chem. Comp., Hog stomach mucosa, 1:60,000)を基質に対しpH 2.0, 4.5および6.0においてそれぞれ1/100, 1/50および1/25量となるように加え、37°Cで30分、1時間および3時間加水分解を行なった。加水分解終了後、水酸化ナトリウム溶液でpH 7.0として反応を停止させ、以下の分析に供した。

鉄結合能は、加水分解液にクエン酸鉄アンモニウム溶液を鉄が過剰となるように加え、37°C, 1時間インキュベートし、さらに、Amberlite IRA 400 (Cl⁻型)を加え、30分放置後、2,500 rpm, 10分間遠心分離し、上清中の鉄含量を測定することにより得た。鉄含量の測定は、Schadeらの方法¹²⁾を一部変法したKirkpatrickらの方法¹³⁾により行なった。免疫学的反応性は抗ラクトフェリン兔抗血清を用いてLaurellの定量免疫電気泳動¹⁴⁾により測定した。6% TCA可溶性ペプチドの増加率は、加水分解液に6%濃度となるようにTCA溶液を加え、30分以上放置後、3,000 rpm, 10分間遠心分離し、上清中のペプチド含量をLowry法¹⁵⁾により測定して得た。ディスクゲル電気泳動は、トリス-グリシン緩衝液(pH 8.3)中で、7.5%ポリアクリルアミドゲルを使用し、常法により行なった。免疫電気泳動は、1.2%アガロース(ヘキスト社)ゲル板上で0.05 M バルビタール緩衝液(pH 8.6)を用いて60 V, 1時間泳動した後、溝に抗ラクトフェリン兔抗血清を注入し、16時間放置することにより行なった。

3. オートラジオグラフィーおよび⁵⁹Fe放射能測定

加水分解液に⁵⁹Fe(⁵⁹FeCl₃ in 0.5 N HCl soln, New England Nuclear Corp.)を含むクエン酸鉄アンモニウム溶液を加え、よく混和し、37°C, 1時間加水分解後、前述の方法と同様にディスクゲル電気泳動および免疫電気泳動を行なった。ディスクゲル電気泳動については泳動ゲルを染色後、原点側より3 mmまたは5 mm間隔に輪切りにし、ウェル型シンチレーションカウンター(アロカ社 NDW-353型)で⁵⁹Fe放射能を測定した。また、免疫電気泳動のオートラジオグラフィーは、泳動板を除いたん白した後、乾燥し、X線フィルム(富士写真フィルム社, Ix-100)を密着させ、デシケーター中で4日間、4°C下で露出させることにより行なった。

Fig. 2. Iron-binding capacity and immunological reactivity remaining, and the amount of 6% TCA-soluble peptides in the lactoferrin digests at pH 2.0.

●—● Fe-sat. lactoferrin, ●----● Fe-free lactoferrin, ×—× casein

実験結果

1. 各 pH におけるラクトフェリンの加水分解状態

pH 2.0 におけるラクトフェリン加水分解物の鉄結合能, 免疫学的反応性の残存率および 6% TCA 可溶性ペプチドの増加率を Fig. 2, また, ディスクゲル電気泳動パターンを Photo. 1 に示す。pH 2.0 では, 人乳ラクトフェリン, 牛乳ラクトフェリンいずれの場合も, 鉄の存在の有無にかかわらず, 分解開始後 30 分で鉄結合能および免疫学的反応性はほとんど消失した。ディスクゲル電気泳動においても, 原点の位置にあった未分解のラクトフェリンのバンドは 30 分で完全に消失し, それに代わって多数の細かいバンドが出現した。しかし, 人乳ラクトフェリンと牛乳ラクトフェリンはその電気泳動のパターンが明らかに異なっていた。また, 6% TCA 可溶性ペプチドの増加率は, カゼインと比較した場合, 人乳ラクトフェリンも牛乳ラクトフェリンも, カゼインとほぼ同程度の分解率を示したが, 人乳ラクトフェリンと牛乳ラクトフェリンの比較では, 牛乳ラクトフェリンのほうがその分解率は大きかった。

次に, pH 4.5 における結果を Fig. 3 および Photo. 2 に示す。pH 4.5 においては, 人乳・牛乳とも脱鉄ラクトフェリンは時間とともに分解が進み, 鉄結合能および免疫学的反応性の残存率は 3 時間でそれぞれ, 人乳 50.5%, 30.7%, 牛乳 69.2%, 35.2% となったのに対

し, 鉄飽和ラクトフェリンは 6% TCA 可溶性ペプチドがやや増加したのみであり, 鉄結合能および免疫学的反応性の残存率は 3 時間でそれぞれ, 人乳 94.7%, 104.8%, 牛乳 92.6%, 96.3% と未分解のラクトフェリンとほとんど差異が認められなかった。また, 人乳ラクトフェリンと牛乳ラクトフェリンを比較した場合, 6% TCA 可溶性ペプチドの増加率は同程度であったが, ディスクゲル電気泳動のパターンは異なっていた。すなわち, 人乳ラクトフェリンの場合には, 易動度の大きい先端の部分に分解成分のバンドが強くなってきたが, 牛乳ラクトフェリンの場合には比較的易動度の小さい位置に 3 本のバンドが出現し, これは時間とともに消失した。すなわち, 人乳の場合には, ペプシンにより末端から比較的小さいペプチドに切断されていくのに対して, 牛乳の場合は, 最初に数個のポリペプチドに分解され, それらが徐々により小さいペプチドに加水分解されることが明らかとなった。

pH 6.0 における加水分解の結果は, Fig. 4 および Photo. 3 に示すとおりであった。pH 6.0 においては, 人乳・牛乳のいずれにおいても, 脱鉄ラクトフェリンおよび鉄飽和ラクトフェリンはほとんど分解を受けず, 鉄結合能および免疫学的反応性の残存率は 3 時間後においてもなお, 100% を維持した。6% TCA 可溶性ペプチドの増加率においてカゼインと比較した場合, カゼインは人乳・牛乳とも, 脱鉄ラクトフェリンよりもさらに分解

Fig. 3. Iron-binding capacity and immunological reactivity remaining, and the amount of 6% TCA-soluble peptides in the lactoferrin digests at pH 4.5.

●—● Fe-sat. lactoferrin, ●----● Fe-free lactoferrin

されやすかった。

2. pH 4.5 における脱鉄ラクトフェリン加水分解物の免疫電気泳動パターンおよび鉄結合性

pH 4.5 において加水分解した脱鉄ラクトフェリンの免疫電気泳動の結果を Photo. 4(A) に示す。人乳ラクトフェリンと牛乳ラクトフェリンは、その泳動パターンが異なっており、人乳ラクトフェリンの免疫電気泳動の場合、分解時間 30 分で沈降線にテーリングが生じた。これは、ペプシンにより、未分解のラクトフェリンと抗原性は同一であるが易動度のやや異なるペプチドが産生されたためと考えられる。しかし、このテーリングはそれ以上広がらず、沈降線はしだいに消失した。一方、牛乳ラクトフェリンは、分解時間 30 分で 2 本の沈降線に分かれた。この沈降線が互いに融合しているか否かはこの時点では判別しにくかったが、分解 1 時間ではまったく融合しておらず、相異なる抗原性を示した。また、3 時間では沈降線はわずかに観察されたのみであった。これらのことから、牛乳ラクトフェリンには少なくとも二つの異なる抗原決定基が存在し、ペプシンによりその間が切断されたと考えられる。

次に免疫電気泳動およびディスクゲル電気泳動において観察されたラクトフェリン加水分解物の鉄結合性について ^{59}Fe を用いて検討した結果をそれぞれ、Photo. 4 (B) および Fig. 5 に示した。免疫電気泳動のオートラジオグラフィーの結果、人乳ラクトフェリン、牛乳ラク

トフェリンいずれの場合も、観察された沈降線のすべてに鉄が結合していることが認められた。とくに、牛乳ラクトフェリンの場合には、30 分、1 時間分解で観察された相異なる抗原性をもつ 2 本の沈降線のいずれにも鉄が結合していることが明らかとなり、ラクトフェリン加水分解物中に鉄結合能が残存することが確認された。また、ディスクゲル電気泳動において観察されたバンドの鉄結合性について検討した結果、Fig. 5 に示すように、人乳ラクトフェリンの場合、 ^{59}Fe 放射能は 30 分および 1 時間分解においては原点部分、3 時間分解では原点よりやや移動した部分に認められ、アミドブラック 10B によるたん白質の染色パターンと同様な傾向を示した。しかし、泳動の先端部分のバンドの位置では ^{59}Fe 放射能は検出されなかった。牛乳ラクトフェリンの場合、30 分および 1 時間分解で認められた比較的易動度の小さい 3 本のバンドの位置にも ^{59}Fe 放射能が認められ、ラクトフェリン加水分解物中に鉄結合性成分の存在することが明らかになった。

考 察

鉄結合の有無による酵素分解性の差異に関しては、ラクトフェリンと類似した鉄結合性たん白質である血清トランスフェリンおよび卵白コンアルブミンに関する報告があるが¹⁰⁾、今回、ラクトフェリンについても pH 4.5 においてその差異が明確に認められた。しかし、pH 2.0

Photo. 1. Disc gel electrophoretic patterns of lactoferrin digests at pH 2.0.

Photo. 2. Disc gel electrophoretic patterns of lactoferrin digests at pH 4.5.

においては、非常に速く分解が進み、鉄結合の有無による差は認められなかった。これは、この pH では、Fig. 1 から明らかなように、鉄がラクトフェリンから解離してしまうためと考えられる。これらの結果から、鉄飽和ラクトフェリンの酵素耐性は、鉄イオンによるペプシン活性の阻害によるものではなく、ラクトフェリンが鉄を結合することによりペプシンに耐性な分子構造となるこ

とによってもたらされることを示している。鉄飽和ラクトフェリンは pH 4.5 および pH 6.0 においてやや分解を受けているが、これは、これらの pH において鉄が一部解離しているため (Fig. 1)、脱鉄ラクトフェリンが優先的に分解されたものと考えられる。pH 6.0 においては、ペプシンの至適 pH よりかなり高いため、脱鉄ラクトフェリンはほとんど分解を受けなかったが、対照と

Photo. 3. Disc gel electrophoretic patterns of lactoferrin digests at pH 6.0.

Photo. 4. Immunoelectrophoretic pattern (A) and the corresponding autoradiography (B) of Fe-free lactoferrin digests labelled with ^{59}Fe at pH 4.5.

して用いたカゼインは、同一条件下で比較的分解が進んでおり、ラクトフェリン分子は、鉄を結合していない場合でもカゼインより分解されにくい構造を有していると思われる。また、ラクトフェリンと同様に外分泌液中に存在し、乳汁中にも多量に含まれる IgA が、IgG などにくらべ分解されにくく¹⁷⁾、さらに Secretory Component と結合すると、より酵素耐性となる¹⁸⁾ことが知ら

れている。このように、ラクトフェリンや IgA など外分泌性の感染防御物質が酵素によって加水分解を受にくい性質は、腸管内へ安定に移行するために役立つと考えられ、感染防御上、きわめて興味深い。

人乳ラクトフェリン¹⁹⁾および牛乳ラクトフェリン²⁰⁾そのアミノ酸組成が非常に類似しているにもかかわらず、免疫学的には交差反応を示さないため、分子構造

Fig. 4. Iron-binding capacity and immunological reactivity remaining, and the amount of 6% TCA-soluble peptides in the lactoferrin digests at pH 6.0.

●—● Fe-sat. lactoferrin, ●----● Fe-free lactoferrin, ×—× casein

若干異なると考えられるが、これは、今回のペプシンによる加水分解液のディスクゲル電気泳動および免疫電気泳動のパターンの差異からも明らかである。しかし、6% TCA 可溶性ペプチド増加率や残存する鉄結合能および免疫学的反応性などの点においてはほとんど差異はみられなかった。

ラクトフェリン加水分解物中に鉄結合能を有する部分が存在することは Blanc⁹⁾ によって人乳ラクトフェリンにおいて示されており、鉄結合部位は比較的ペプシンにより加水分解を受けにくいと考えられる。しかし、Blanc による免疫電気泳動では、人乳ラクトフェリンの加水分解物が2本の沈降線に明確に分かれており、今回の結果とは異なっていた。これは、Blanc は乳清たん白質について酵素分解を行なっているの、ラクトフェリン単独の場合と加水分解の受け方が異なるためとも考えられる。

一方、乳児、とくに新生児の胃内 pH は乳汁が入る前には pH 2 前後であるのが、乳汁が摂取されると pH 6 ないし 7 となり、pH 4 まで下がるのに2ないし3時間を要することが知られている¹¹⁾。また、乳汁の胃内滞留時間は約3時間であり、一部の乳清はわずかに約20分で十二指腸へ移行するといわれている²¹⁾。さらに、乳汁中のラクトフェリンの鉄飽和度は約30%である。したがって、これらの知見と今回の結果を考え合わせた場合、

摂取された乳汁ラクトフェリンのうち、その約30%は胃内においてほとんど加水分解を受けずに腸管内へ移行し、また残り70%の鉄を結合していないラクトフェリンも、大部分が鉄結合能および免疫学的反応性を有したまま腸管内へ移行する可能性が示唆された。しかし、腸管内においてさらにトリプシンなどの消化酵素により加水分解されることが考えられる。さらに、ラクトフェリンは他のたん白質との相互作用が強く²²⁾、乳汁中では他のたん白質となんらかの結合をして存在していると考えられるので、ラクトフェリンは乳汁とともに摂取された場合には、ラクトフェリン単独の場合と異なる挙動を示すことも考えられる。これらの点については今後さらに検討する必要がある。

要 約

人乳と牛乳の鉄飽和および脱鉄ラクトフェリンを pH 2.0, 4.5 および 6.0 において *in vitro* にペプシンにより加水分解を行ない、6% TCA 可溶性ペプチドの増加率、残存する鉄結合性、免疫学的反応性、ディスクゲル電気泳動および免疫電気泳動などを検討し、以下の結果を得た。

pH 2.0 においては、人乳・牛乳とも、ラクトフェリンは鉄を解離しており、鉄の存在の有無にかかわらず加水分解は非常に速く進み、残存する鉄結合能および免疫

Fig. 5. Iron-binding properties of Fe-free lactoferrin digests labelled with ^{59}Fe at pH 4.5. Solid lines, acrylamide gel electrophoretic patterns; oblique portions, ^{59}Fe activities detected in the corresponding bands.

学的反応性は分解時間 30 分でほとんど消失した。pH 4.5 においては、人乳・牛乳とも、脱鉄ラクトフェリンが時間とともに加水分解が進み、鉄結合能および免疫学的反応性の残存率が 3 時間でそれぞれ、人乳 50.5%, 30.7%, 牛乳 69.2%, 35.2% となったのに対し、鉄飽和ラクトフェリンの鉄結合能および免疫学的反応性の残存率は、3 時間でそれぞれ、人乳 94.7%, 104.8%, 牛乳 92.6%, 96.3% と未分解のラクトフェリンとほとんど差異が認められなかった。pH 6.0 においては、人乳・牛乳のいずれにおいても、脱鉄ラクトフェリンおよび鉄飽和ラクトフェリンは、ほとんど加水分解を受けず、鉄結合能および免疫学的反応性はほぼ 100% 残存した。

ディスクゲル電気泳動および免疫電気泳動のパターンは人乳と牛乳とで異なっており、両者間に分子構造上の相違が認められた。

さらに、pH 4.5 における脱鉄ラクトフェリン加水分解物中に、鉄結合能を有する部分が存在することが確認された。

文 献

- 1) Masson, P.L., Heremans, J.F. and Dive, C.H. : *Clin. Chim. Acta*, **14**, 735 (1966)
- 2) Bullen, J.J., Rogers, H.J. and Leigh, L. : *Br. Med. J.*, **1**, 69 (1972)
- 3) Oram, J.D. and Reiter, B. : *Biochim. Biophys. Acta*, **170**, 351 (1968)
- 4) Nagasawa, T., Kiyosawa, I. and Kuwahara, K. : *J. Dairy Sci.*, **55**, 1651 (1972)
- 5) 鈴木 隆, 野中真弓, 清沢 功, 小笠勝啓 : 栄養と食糧, **30**, 317 (1977)
- 6) 鈴木 隆, 阿部美保子, 清沢 功, 久保山盛男, 小笠勝啓 : 第 30 回栄養・食糧学会総会講演要旨集, p.77 (1976), (仙台)
- 7) Got, R. : *Prot. Biol. Fluids*, **12**, 387 (1964)
- 8) Blanc, B. : *Prot. Biol. Fluids*, **14**, 125 (1966)
- 9) Brock, J.H., Arzabe, F., Lampreave, F. and Pineiro, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **446**, 214 (1976)
- 10) Masson, P.L. and Heremans, J.F. : *Prot. Biol. Fluids*, **14**, 115 (1966)
- 11) Mason, S. : *Arch. Dis. Child.*, **37**, 387 (1962)
- 12) Schade, A.L., Oyama, J., Reinhart, R.W. and Miller, J.R. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 443 (1954)
- 13) Kirkpatrick, C.H., Green, I., Rich, R.R. and Schade, A.L. : *J. Infect. Dis.*, **124**, 539 (1971)
- 14) Laurell, C-B. : *Anal. Biochem.*, **15**, 45 (1966)
- 15) Lowry, O.H., Rowebrrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 16) Azari, P.R. and Feeney, R.E. : *J. Biol. Chem.*, **232**, 293 (1958)
- 17) Brown, W.K., Newcomb, R.W. and Ishizaka, K. : *J. Clin. Invest.*, **49**, 1374 (1970)
- 18) Underdown, B.J. and Dorrington, K.J. : *J. Immunol.*, **112**, 949 (1974)
- 19) Querinjean, P., Masson, P.L. and Heremans, J.F. : *Eur. J. Biochem.*, **20**, 420 (1971)

- 20) Castellino, F.J., Fish, W.W. and Mann, K.G. :
J. Biol. Chem., 245, 4269 (1970)
- 21) 高木俊男編：乳児栄養学, p. 197 (1968), 朝倉書店 (東京)
- 22) Hekman, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 251, 380 (1971)

(昭和 52 年 12 月 26 日受理)