

## 乳タンパク質中に存在する酸化タンパク質の検出と変動

田中正仁・岩間裕子・織田 潤・塩谷 繁 (九州農業試験場)

Masahito TANAKA, Yuko IWAMA, Jun ORITA and Shigeru SHIOYA :  
Detection and Alteration of Oxidized Proteins in Bovine Milk

生体内で発生した活性酸素などのラジカルは脂質やタンパク質を酸化して有害な過酸化脂質や酸化タンパク質を生成することが知られている。その酸化タンパク質はラジカルの酸化反応によってアミノ酸側鎖にカルボニル基などが導入され、異常な構造および機能を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。一方、高い生産負荷がかかっている泌乳牛においては、高度の酸化ストレス下に曝されていると考えられるが、泌乳中の個体に含まれるタンパク質の酸化状態を詳細に検討した報告はほとんどない。そこで、ホルスタイン種泌乳牛の生乳中に含まれるカルボニル基が導入された酸化タンパク質の検出と環境温度によるその量的な変動について調べた。

### 1. 材料および方法

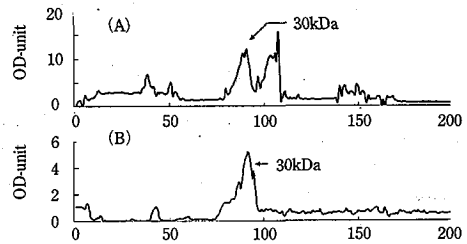
当場で分娩し泌乳中のホルスタイン種搾乳牛6頭から1997年9月上旬の高温環境下と1998年1月下旬の低温期にそれぞれミルクメーターを用いて採乳した。採乳時の最高気温と最低気温はおのおの9月上旬で30.1と21.7℃、そして1月下旬には7.1と-3.2℃であった。生乳中のタンパク質、脂肪、乳糖含量は赤外線分析装置によって測定した。そして、タンパク質濃度を一定に調製した後にフェニルヒドラジン処理を行い、PVDF膜にドットプロットした。また、一部はSDS-PAGEで展開した後、PVDF膜にプロットした。膜上の酸化タンパク質にはフェニルヒドラジン特異性を持つ一次抗体を反応させた後、パーオキシダーゼ標識された二次抗体を結合させた。発色は化学発光法を用いフィルム上の感光強度から酸化タンパク質の相対量を求めた。

### 2. 結果および考察

生乳タンパク質のSDS-PAGE(第1図-A)では主要なピークが30-35kDa付近に認められた。このピークはpH4.6の等電点沈澱処理によって消失したことからカゼインを主とするタンパク質であると考えられた。また、採取した生乳中に含まれる酸化タンパク質の電気泳動像(第1図-B)では複数のピークが認められたが、30kDa付近のピークが最も高くまた面積比率も高かった。そして、このピークは第1図-Aのカゼインのピークに相当することから生乳中の酸化タンパク質の多くはカゼインに由来し、乳腺細胞で合成されることが示唆された。

生乳中の酸化タンパク質の相対的な量比と乳中のタンパク質、脂肪、乳糖などの乳成分との間には明確な相関関係は認められなかった。しかし、生乳中の酸化タンパク質の量は、単位乳タンパク質および単位乳量当たりの

どちらにおいても冬季よりも気温の高い夏季に多い傾向が見られた(第1表)。高温環境下において細胞内にフリーラジカルが発生し、過酸化脂質や酸化タンパク質が蓄積すること<sup>2)</sup>、また、フリーラジカルはアポトーシスの誘発因子であること<sup>3)</sup>、さらに個体の老化に伴い酸化タンパク質が細胞内に蓄積すること<sup>4)</sup>が報告されている。これらのことから、夏季の高温環境が泌乳牛に対して、フリーラジカル発生によるアポトーシスタイプの細胞死から来るエネルギー損失などを通して生産性の低下や経済的寿命の短縮に影響しているものと考えられる。したがって、夏季暑熱期においては泌乳牛の体温上昇防止策とともに体内で発生するラジカルに配慮し、抗酸化剤の投与などを含めた栄養管理が必要である。



第1図 SDS-PAGEによる生乳中の全タンパク質(A)と酸化タンパク質(B)の分布

第1表 夏季および冬季における生乳中酸化タンパク質含量の相対値比較

個体	9月	個体	1月	個体	9月	個体	1月	
A	2.77	I	1.33	A	3.15	I	2.16	
B	5.85	J	0.84	B	3.61	J	1.00	
C	1.22	K	1.01	C	1.18	K	1.14	平均
D	5.52	L	5.33	D	5.68	L	6.73	9月 1.98
E	2.89	M	0.86	E	2.92	M	0.94	(1.60)
F	1.00	N	1.20	F	1.00	N	1.25	1月 1.00
G	7.13	O	1.38	G	6.23	O	1.49	(1.00)
H	1.55	P	1.13	H	1.52	P	1.11	( )は単位乳量
				単位タンパク質当たり				単位乳量当たり

### 引用文献

- 1) STADTMAN, E. R. : *Ann. Rev. Biochem.*, 62 : 797 - 821, 1993.
- 2) SHAWN, W. F., P.L. MOSELEY and G. R. BUETTNER : *FEBS Lett.* 431 : 285 - 286, 1998.
- 3) TAN, S., Y. SAGARA, Y. LIU, P. MAHER and D. SCHUBERT : *J. Cell Biol.* 141 : 1423 - 1432, 1998.
- 4) STADTMAN, E. R. : *Science*, 257 : 1220 - 1224, 1992.