

氏 名 (本籍) おお 大 たに 谷 はじめ 元

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 247 号

学位授与年月日 昭和 58 年 9 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 牛乳 β -ラクトグロブリンの抗原性に関する免疫化学的研究

論文審査委員 (主 査)

教授 足立 達 教授 勝野正則

助教授 伊藤敏敏

論文内容要旨

大 谷 元

第一章 緒論

牛乳には種々のタンパク質が含まれているが、その中の主要タンパク質の一つである β -ラクトグロブリン(β -Lg)は人乳には含まれていない。このため、 β -Lgは牛乳アレルギー誘発の主因物質の一つとして注目され、その抗原構造の解析が研究課題として取り上げられている。しかし、その抗原決定部位はシーケンシャルなものであるかコンホメーションなものであるかさえ明らかでない。

一方、牛乳および乳製品は加工過程において殺菌、あるいは滅菌を主目的として必ず加熱される。その場合、加熱の条件により牛乳タンパク質は変性、凝集、アミノ・カルボニル反応などの諸変化を受ける。したがって、牛乳および乳製品中での β -Lgの抗原性が、生乳のそれとは異なることは十分に予測されるところである。しかし、加工処理した牛乳および乳製品中での β -Lgの抗原性についてはほとんど不明である。

以上のような背景から、本論文は、牛乳 β -Lgの抗原性を究明する目的で、天然 β -Lg、および乳製品の製造工程で用いられる加熱処理、あるいはタンパク質分解酵素処理をした β -Lgを対象に、抗原構造を中心に検討した結果を記述したものである。

第二章 天然 β -Lgの抗原性に関する検討

本研究の遂行に当たり、本実験を通して使用できる β -Lgに特異的な抗血清をうる必要があった。そこで、まず、ホルスタイン種牛新鮮乳より β -Lgを精製し、家兔に免疫し、牛乳タンパク質の中では β -Lgに対してのみ特異性を示す抗血清をえた。

ついで、その抗血清を用いて、市販乳製品16種中の抗原性 β -Lg量を測定した。その結果、表-1に示すとおり、各乳製品には天然 β -Lgの抗原構造を保持するタンパク質の存在が確認され、各乳製品中での天然 β -Lgの抗原構造の破壊度合いは、それらの製造過程で用いられた加熱条件により、異なることが予測された。

このことより、 β -Lgの抗原性の加熱破壊とそれにおよぼす各種乳成分の影響を検討した。その結果、表-2に示すとおり、加熱過程における天然 β -Lgの抗原性低下の促進物質としてカゼインが、抑制物質としてラクトースが関係していることが認められた。

一般に、カゼインと β -Lgの相互作用はk-カゼインとの間でSH/SS交換反応を介して

起こることが知られている。このことから、SH基のアルキル化試薬であるN-エチルマレイミドを添加した脱脂乳を加熱し、その時の β -Lgの抗原性の変化を脱脂乳単独で加熱した場合と比較した。その結果、天然 β -Lgの抗原構造の加熱破壊はN-エチルマレイミドの添加により抑制され、抗原性の低下とSH/SS交換反応に関連性のあることが予測された。

つぎに、この抗原性の低下の原因が、 β -Lgの熱変性機構の初期段階に生じる、SH/SS交換反応それ自身によるものか否かを知る目的で、 β -Lgの尿素処理および化学処理を行ない、それら処理 β -Lgの抗原性を調べた。その結果、表-3および表-4に示すとおり、SH/SS交換反応による重合では天然 β -Lgの抗原構造は影響を受けないが、SS結合の解裂により著しく破壊される傾向にあることが認められた。

このようにSS結合の解裂により抗原構造が破壊された事実より、抗原決定部位はコンホメーションなものであることが示唆されたために、 β -Lgの臭化シアンによる限定分解、あるいは基質特異性の異なるタンパク質分解酵素による分解を行ない、それら分解物と抗 β -Lg血清との反応性を調べた。その結果、それら分解物には天然 β -Lgの抗原決定部位を含むペプチドは存在せず、これによって、天然 β -Lgの抗原決定部位はコンホメーションなものが主体をなすものと考えられた。

第三章 加熱 β -Lgの抗原性に関する検討

第二章で述べたように、ラクトースは β -Lgの天然抗原性の加熱低下を抑制することから、天然 β -Lgの抗原構造の加熱破壊に対するラクトースの抑制機構、およびラクトースとの加熱 β -Lgの抗原性を検討した。

種々の濃度でラクトースを添加した β -Lg溶液を加熱し、その時の天然 β -Lgの抗原性の変化を測定した。その結果、ラクトースは広い加熱条件下で天然 β -Lgの抗原性の加熱破壊を抑制し、その原因として、加熱の初期段階にラクトースはアミノ・カルボニル反応により β -Lgに結合し、 β -Lgの熱凝集を遅延させることが示唆された(図-1)。

一方、ラクトースと β -Lgの加熱物(Lac- β -Lg)を家兔に免疫し、えられた抗血清とLac- β -Lgの反応性を調べた。その結果、抗Lac- β -Lg血清には天然 β -Lgの抗体に加えて、Lac- β -Lgに特異的な抗体が生産されていることが認められた(図-2)。

そこで、このLac- β -Lgに特異的な抗原決定部位の性質について検討し、その抗原決定部位はSS結合の還元および臭化シアンによる分解後も安定なものであり、かつ、その中のいくつかは未加熱の β -Lgからえたペプチドにも共通していることから(表-5)、加熱過程に β -Lg分子自身の熱変性により形成されたものであることが示された。

また、各種還元糖と β -Lg、ラクトースと血清アルブミンやオボアルブミンのアミノ・カ

ルボニル反応物を調製し、それらと抗Lac- β -Lg血清との反応性より(表-6, 表-7), Lac- β -Lgの抗原決定部位には、アミノ・カルボニル反応により結合した糖部分の関係したのも存在することが示唆された。

これらの結果から、牛乳の殺菌や滅菌などの加熱処理において、 β -Lgはその天然抗原構造に加えて、より安定な二次的抗原決定部位を容易に形成することが推察された。

第四章 タンパク質分解酵素処理 β -Lgの抗原構造に関する検討

第二章において、タンパク質分解酵素処理 β -Lgの抗原性を検討する過程で、 β -Lgにトリプシンを作用させると、未分解の β -Lgよりも分子量の大きい巨大分子の生成することが認められた。

従来、牛乳アレルギー患者用の低抗原価乳の製造には、タンパク質分解酵素による前処理が最も効果的と考えられている。このことから、本巨大分子の性質の解明はきわめて重要と考えられ、その化学的・免疫化学的性質を検討した。

生成した巨大分子の分子量は500万以上であり、生成のための至適pHは β -Lgのトリプシン分解のための至適pHと一致していた。また、巨大分子の生成度は β -Lgとトリプシン濃度に依存し、トリプシン濃度、あるいは双方の濃度が高い場合は、不溶性の巨大分子が形成された(図-3)。

この不溶性の巨大分子(IM)と可溶性の巨大分子(SM)は、表-8に示すとおり、未処理 β -Lgと比べて、含硫アミノ酸や水酸基を持つアミノ酸が多く、ヒスチジン、リジンなどが少ない。また、これらSMおよびIMを免疫してえられた抗血清とSMおよびIMは、お互いに強い交叉反応性を有しているが、天然 β -Lgとの反応性は認められず、巨大分子の抗原構造は天然 β -Lgのものとは全く異質であることが示された(図-4)。

一方、このような巨大分子生成防止の立場から検討を行なった。その結果、表-9および表-10に示すとおり、 β -Lgを予じめキモトリプシン処理したり、キモトリプシン共存下でのトリプシン処理、あるいは β -LgのS-カルボキシメチル化やニトロ化により、巨大分子の生成は著しく抑制されることが認められた。

いずれにしても、 β -Lgは、従来分解されるはずのトリプシンの作用によっても、天然抗原構造とは異質の抗原構造を容易に形成することが証明された。

第五章 総括

本論文では、まず、牛乳アレルギーの主因物質の一つである天然 β -Lgの抗原性について検討し、天然 β -Lgの抗原決定部位はコンホメーション的なものが主体をなすことを示した。

ついで、 β -Lgをラクトース存在下で加熱すると、天然 β -Lgの抗原構造の加熱破壊が抑制されることを見出し、その加熱物の抗原性を検討した。その結果、加熱過程にラクトースはアミノ・カルボニル反応により β -Lgに結合し、そのアミノ・カルボニル反応物には、天然 β -Lgの抗原決定部位に加えて、 β -Lg分子自身の熱変性により形成されたものと、アミノ・カルボニル反応により結合した糖部分の関係した新たな抗原決定部位が存在することを示した。

一方、低抗原価乳の調製には、原料乳のタンパク質分解酵素による前処理が最も効果的と考えられているが、 β -Lgにトリプシンを作用させると、分解物が重合し分子量500万以上の巨大分子が生成することを見出した。また、この巨大分子の生成条件および防止法について検討するとともに、この巨大分子は天然 β -Lgとは全く異質の抗原構造を持つタンパク質であることを証明し、低抗原価乳の調製におけるタンパク質分解酵素使用の危険性を示唆した。

従来、 β -Lgが高い抗原性を示す原因は、主としてこのタンパク質が人乳中に存在しないことと関連づけて考えられてきた。しかし、以上示した実験結果から明らかのように、天然 β -Lgの抗原構造は不安定であり、加熱やタンパク質分解酵素処理により初めてより安定な抗原決定部位が形成される。このことから、牛乳 β -Lgが高い抗原性を示し、牛乳アレルギーの主な原因物質となっている原因は、単にこのタンパク質が人乳中に存在しないことによるためだけでなく、 β -Lgの持つ構造上の機能的性質に負うところも大きいものと考えられる。

Table 1. Beta-lactoglobulin contents in the milk products.

Samples		β -Lactoglobulin ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ of total protein)
Raw milk		9.61
UHT* processing milk	A	9.55
	B	8.94
	C	9.51
UHT* processing & aseptic packaging milk	B	8.33
	C	9.45
Condensed milk sweetened	A	7.69
	B	8.04
	C	6.23
Evaporated milk	A	7.82
	D	<2.18
Modified milk powder	A	16.96
	B	12.79
	C	7.63
Skim milk powder	A	4.79
	B	2.84
	C	2.97

*UHT:ultra-high temperature

Table 2. Effects of milk components and salts on antigenic value of β -lactoglobulin upon heat treatments.

Components added*	Concentration (w/v, %)	Antigenic value after heat treatment at 96°C for:		
		0 min	3 min	10 min**
None	—	2560	1280	640
α -Lactalbumin	0.13	2560	1280	640
Casein	2.6	2560	1280	320
α -Lactalbumin+Casein	0.13+2.6	2560	1280	320
Lactose	4.6	2560	2560	1280
CaCl_2	0.15	2560	1280	640
KCl	0.15	2560	1280	640
NaCl	0.15	2560	1280	640
MgCl_2	0.01	2560	1280	640
KH_2PO_4	0.15	2560	1280	640
NaH_2PO_4	0.15	2560	1280	640

* Each component was added in 0.3% β -lactoglobulin solution dissolved in McILVAINE's buffer, pH 6.6. ** Antigenic values were exhibited as the reciprocal titers.

Table 3. Apparent molecular weights and antigenic activity of β -lactoglobulins treated with 8M urea.

Treatments	Molecular weights	Antigenic activity*
None (Native)	36000	2560
8M Urea alone	53000(II), 35000(III)	2560
8M Urea added N-ethylmaleimide	18000(IV)	2560

* 0.3% (w/v) Native or urea-treated β -lactoglobulin solution was diluted with physiological saline solution, and the antigenic activity was shown with maximum degree of dilution which formed precipitin ring with anti β -lactoglobulin serum.

Table 4. Antigenic activity of β -lactoglobulins treated with chemical reagents.

Reagents	Antigenic activity*	Relative activity(%)
None (Native)	2560	100
p-Chloromercuribenzoate	2560	100
2-Mercaptoethanol+Iodoacetic acid	640	25
2-Mercaptoethanol+Iodoacetic acid (in the presence of 8M urea)	640	25
Iodoacetic acid	2240	87.5
Hydrogen peroxide	2240	87.5

* 0.3% (w/v) Native or chemically treated β -lactoglobulin solution was diluted with physiological saline solution, and the antigenic activity was shown with the maximum degree of dilution which formed precipitin ring with anti β -lactoglobulin serum.

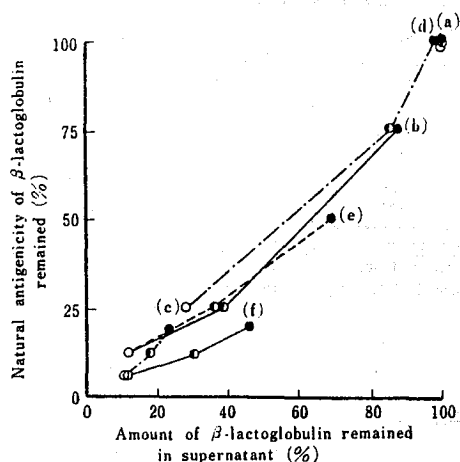
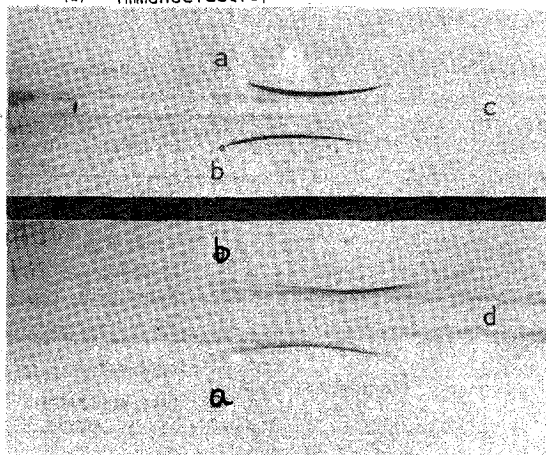


Fig. 1. Correlation between natural antigenicity and coagulation of β -lactoglobulin heated for 20 h with or without the addition of lactose. (a) pH 6.6, 60°C, (b) pH 6.6, 70°C, (c) pH 6.6, 96°C, (d) pH 8.0, 60°C, (e) pH 8.0, 70°C, (f) pH 8.0, 96°C. Lactose added (%): —○— 0, —●— 5, —●— 10.

(1) Immunelectrophoretic patterns



(2) Precipitin test

Antigens	Antibody value (Degree of dilution of antisera*)	
	c	d
a	64	64
b	64	128

Fig. 2. Cross reactions of β -lactoglobulin and Lac- β -Lg against antisera to β -lactoglobulin and Lac- β -Lg by means of immunelectrophoresis (1) and precipitin test (2). * Antibody values were exhibited as the reciprocal titers. a: β -Lactoglobulin, b: Lac- β -Lg, c: Anti β -lactoglobulin serum, d: Anti Lac- β -Lg serum.

Table 5. Inhibitory effect of the cyanogen bromide-fragments on PCA tests in various antigen-antiserum systems

Fragments	System: Antiserum Antigen	Anti Lac- β -Lg serum		Anti β -Lg serum
		SCM Lac- β -Lg	SCM β -Lg	β -Lg
L-3		+	+	-
L-4		+	+	-
N-3		+	+	-
N-4		+	+	-

+: inhibited, -: not inhibited.

Table 6. Inhibitory effect of sugar- β -Lg products on PCA test in Lac- β -Lg-anti Lac- β -Lg system

Products	Available lysine index*	$\frac{305 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$	Inhibition**
Native β -Lg	100.0	0.082	+
Lac- β -Lg	73.1	0.118	++
Glu- β -Lg	70.2	0.164	+
Gal- β -Lg	64.5	0.231	+
Fru- β -Lg	64.5	0.225	+

*Available lysine index = $\frac{\text{Available lysine content of the product}}{\text{Available lysine content of native } \beta\text{-Lg}} \times 100$

**The number of symbol (+) shows the degree of inhibition: ++ inhibited completely, + inhibited strongly but not completely.

Table 7. Reactivity of lactose-protein products with anti Lac- β -Lg serum

Products	Available lysine index*	$\frac{305 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$	Antibody titer**
Native β -Lg	100.0	0.082	2048
Lac- β -Lg	73.1	0.118	4096
Native BSA	100.0	0.044	0
Lac-BSA	79.4	0.137	1024
Native OVA	100.0	0.056	0
Lac-OVA	81.5	0.151	128

*Available lysine index = $\frac{\text{Available lysine content of each product}}{\text{Available lysine content of native protein}} \times 100$

**Antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution at which a positive reaction was induced.

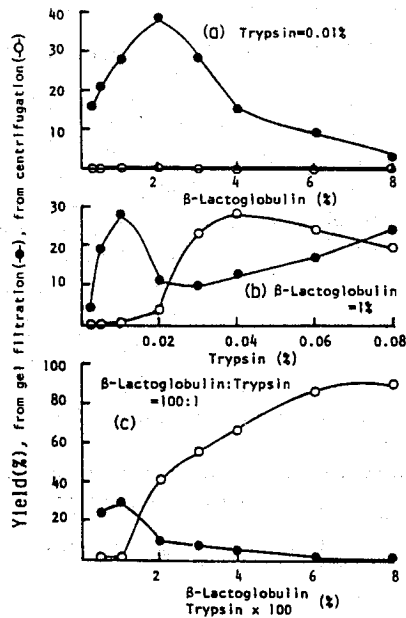
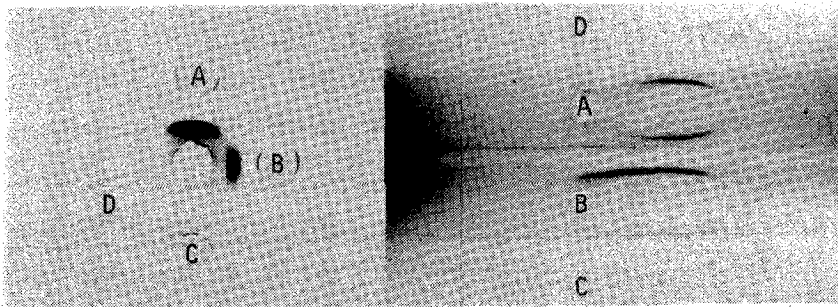


Fig. 3. Effect of β -lactoglobulin and trypsin concentrations on the formation of macro-molecule.

Table 8. Amino acid compositions of SM and IM

Amino acids	β -Lactoglobulin	SM	IM
	Molar ratio		
Asp	15.18	16.54	15.62
Thr	7.82	5.53	10.82
Ser	6.76	21.49	13.94
Glu	24.03	53.15	34.42
Gly	3.5	3.5	3.5
Ala	13.85	17.81	16.45
Cys	2.05	11.47	5.71
Val	8.18	17.60	15.01
Met	3.87	9.59	7.88
Ile	7.66	3.46	6.48
Leu	20.75	42.81	33.99
Tyr	4.16	10.46	8.48
Phe	4.24	10.59	6.52
Lys	14.62	6.66	10.33
His	2.01	1.36	1.82
Arg	2.76	8.70	4.92
Pro	9.01	15.50	10.85
NH ₃	22.67	77.00	39.75

1) Antiserum against SM



2) Antiserum against IM

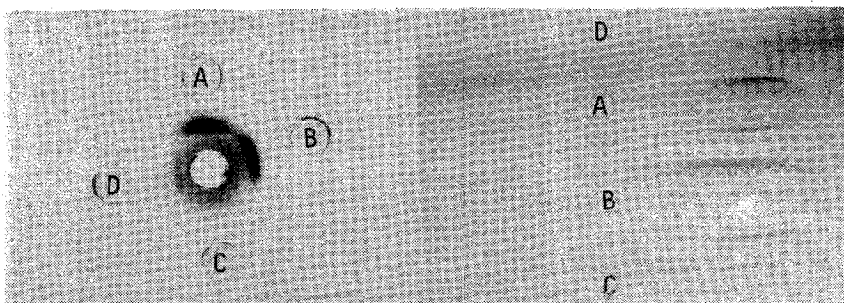


Fig. 4. Immunological assays of SM and IM.
 A: SM, B: IM, C: native β -lactoglobulin,
 D: trypsin.

Table 9. Production of macro-molecules during hydrolysis of β -lactoglobulin by proteolytic enzymes

Enzymes	Macro-molecules (mg/50 mg β -Lg*)		Yield (%)		
	SM	IM	SM	IM	Total
Trypsin alone	11.19	0	22.38	0	22.38
Pepsine and Trypsin	9.71	0	19.42	0	19.42
Pepsin, Trypsin and Chymotrypsin	0	0	0	0	0
Trypsin and Chymotrypsin	0.16	0	0.32	0	0.32
Chymotrypsin and Trypsin (successive)	0	0	0	0	0

* β -Lg: β -Lactoglobulin.

Table 10. Production of macro-molecules during hydrolysis of chemically modified β -lactoglobulins by tryptic treatments

Modifications	Macro-molecules (mg/50 mg β -Lg*)		Yield (%)		
	SM	IM	SM	IM	Total
Unmodified	11.19	0	22.38	0	22.38
Reductive alkylated (30% lysine residues)	6.42	5.67	12.84	11.34	24.18
Reductive alkylated (50% lysine residues)	6.62	6.36	13.24	12.72	25.96
Acetylated (70% lysine residues)	4.96	3.39	9.92	6.78	16.70
S-Carboxymethylated	0	3.24	0	6.48	6.48
Nitrated (0.8/4 tyrosine residues)	0.36	0.90	0.72	1.81	2.53
Nitrated (2.5/4 tyrosine residues)	0	0.75	0	1.50	1.50

* β -Lg: β -Lactoglobulin.

審 査 結 果 の 要 旨

牛乳タンパク質の一種である β -ラクトグロブリンは人乳に含まれていないため、牛乳アレルギー誘発の主因物質とされてきたが、その抗原構造の解析はほとんど行なわれていない。

乳児栄養学上の牛乳アレルギーの重要性にかんがみ、本論文は、この主因物質である牛乳 β -ラクトグロブリンを取上げて、その抗原構造を免疫化学的に明らかにするとともに、牛乳の処理・加工中における抗原性の変化を詳細に検討したものである。

まず、著者は各種SH試薬、尿素処理の結果から、SH/SS交換反応による重合では β -ラクトグロブリンの抗原構造に変化を受けず、SS結合の解裂によって抗原構造の破壊がおこることを確かめた。そして、さらに臭化シアンによる限定分解、基質特異性の異なるタンパク質分解酵素による分解にともなう抗原性の変化から、これらの分解物には天然 β -ラクトグロブリンの抗原決定部位を有するペプチドの存在しないことを示し、天然 β -ラクトグロブリンの抗原決定部位はシーケンシャルなものではなく、コンホーメーションナルなものであることを証明した。

ついで、ラクトースの存在下での加熱によって、 β -ラクトグロブリンの抗原構造の破壊が抑制されることを認め、この現象は加熱過程におこるアミノ・カルボニル反応によって、ラクトースの β -ラクトグロブリンへの結合がおこり、天然 β -ラクトグロブリンの抗原決定部位のほか、 β -ラクトグロブリン自体の熱変性により二次的に形成された抗原決定部位、さらに結合糖質部分の関与した新たな抗原決定部位の存在によるものであることを明らかにした。

そして最後に、低抗原価乳の調製に利用される β -ラクトグロブリンのトリプシン処理過程で、分子量500万以上の巨大分子の生成することを見出し、 β -ラクトグロブリンと異質の抗原構造を有する本物質の生成条件の検討結果からこの生成の防止法を示唆するに至った。

以上、本研究は牛乳 β -ラクトグロブリンの抗原性について幾多の新知見を加えたものとして、審査員一同は農学博士の称号を授与するに値すると判定した。