

牛乳成分、特にその蛋白質に由来する

生理活性物質に関する研究

東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室

教授 上野川 修 一

長 畦 慎 一

清 水 誠

日本大学農獣医学部食品工学科教授 山 内 邦 男

目 的

牛乳の主要蛋白質であるカゼインを消化酵素で分解した際に生成するペプチドの中には様々な生理的機能を持つものが存在することが、近年多くの研究者によって報告されている。我々は牛乳や人乳のカゼイン分解物がマウスの繊維芽細胞の増殖（DNA合成）を促進することを見だし^{1,2)}、カゼインが単なるアミノ酸給源としてではなく、細胞増殖因子の前駆体として乳幼児の身体の発育に寄与している可能性を示唆してきた。また、牛乳カゼイン由来の細胞増殖促進ペプチドは β -カゼインの177-183番目に相当するフラグメントであることを認めた。このペプチド、 β -CN (f177-183) はアンジオテンシン変換酵素の阻害活性を示し³⁾、また肝細胞における尿素合成を促進する性質を持つことも報告されている⁴⁾ことから、多機能性ペプチドとして関心を集めている。昨年度の報告に示したように、本ペプチドのマウス3T3細胞増殖促進効果はFCS(牛胎児血清)の存在下で増強されることから、本ペプチドはFCS中の成分と相乗的に作用することが示唆された。本年度はFCS中に存在し得る代表的な増殖因子としてEGF(上皮増殖因子)及びPDGF(血小板由来細胞増殖因子)を選び、それらと β -CN(f177-183)との相乗効果について検討した。またカゼインペプチドが別の繊維芽細胞株であるL細胞や小腸上皮細胞株であるIEC-6細胞に及ぼす影響についても検討した。さらに牛乳ホエ-蛋白質の酵素分解物中にも3T3細胞増殖促進活性を持つペプチドの検索を行った。

材料と方法

β -カゼインは常法により調製し、DEAE-クロマトグラフィーによって精製した。精製した β -カゼインあるいはホエー蛋白質画分をトリプシンあるいはキモトリプシンで分解し、逆相カラムを用いたHPLCによってペプチドを分画・精製した。また、一部のペプチドについてはペプチドシンセサイザーで合成を行った。これらの試料をマウス繊維芽細胞であるBALB/c 3T3 (3K)細胞に加え、DNA合成促進活性をスパース法で⁵⁾測定した。また、10% FCSを含む培地中で培養してあるLtk⁻細胞あるいはラット小腸上皮細胞であるIEC-6細胞にペプチドを加え、その増殖促進活性を細胞数の測定を行うことによって調べた。

結果と考察

(1) ペプチドの示す増殖促進活性の特性

3T3細胞の増殖には少なくとも2種の増殖因子が関与していることが最近明らかにされてきた。即ち、G₀期にある細胞をG₁期に移行させるコンピテンシ因子(PDGFなど)とG₁期~S期への過程に作用するプログレッション因子(EGFなど)の両者が存在して初めて増殖のサイクルが回転するとされている。 β -CN(f177-183)がこのどちらの活性を有しているのかを知るためにEGF、PDGFとの共存の影響を調べた。対照として、やはり3T3細胞の増殖促進活性を示すことが明かになっているヒト β -CN(f112-117)についても検討したところ、図1に示すように、ヒト β -CN(f112-117)はPDGFと相乗的に作用することが認められ、おそらくプログレッション因子として(EGF様に)作用していることが示唆されたが、ウシ β -CN(f177-183)はEGF、PDGFとも相乗効果を示さなかった。このペプチドは、その一次

構造上に両親媒性をもっているのです、例えば細胞膜に直接作用することによって細胞の増殖を促進する可能性が考えられた。

なお、 β -CN(f177-183)は5~10% FCS存在下で培養されているL細胞やIEC-6細胞に対しては増殖促進活性を示さなかったが、この点については実験条件等を変えてさらに検討する必要があるだろう。

(2) ホエー蛋白質分解ペプチドの細胞増殖促進活性

ホエー蛋白質のトリプシン分解物のHPLCによる分画パターンと、分離された各画分の3T3細胞におけるDNA合成促進活性を図2に示した。また、キモトリプシン分解物での結果を図3に示した。いずれの場合もいくつかの活性ピークが認められ、ホエー蛋白質由来のペプチドにも3T3細胞の増殖を促進するものが存在することが示唆された。しかし、これらの活性ピークはほとんどのペプチドが溶出した後の、保持時間30~40分のところに現われることから、比較的大きい分子量を持つ成分であると考えられ、カゼインペプチドとはかなり性質の異なるものである可能性が強い。これらの成分の精製と同定は今後の課題である。

参考文献

- 1) N. Azuma et al., *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2631 (1989).
- 2) S. Nagaune et al., *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3275 (1989).
- 3) S. Maruyama et al., *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405 (1985).
- 4) 竹中昭雄ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p.269.
- 5) K. Nishikawa, *Biochem. Intl.*, 4, 169 (1982).

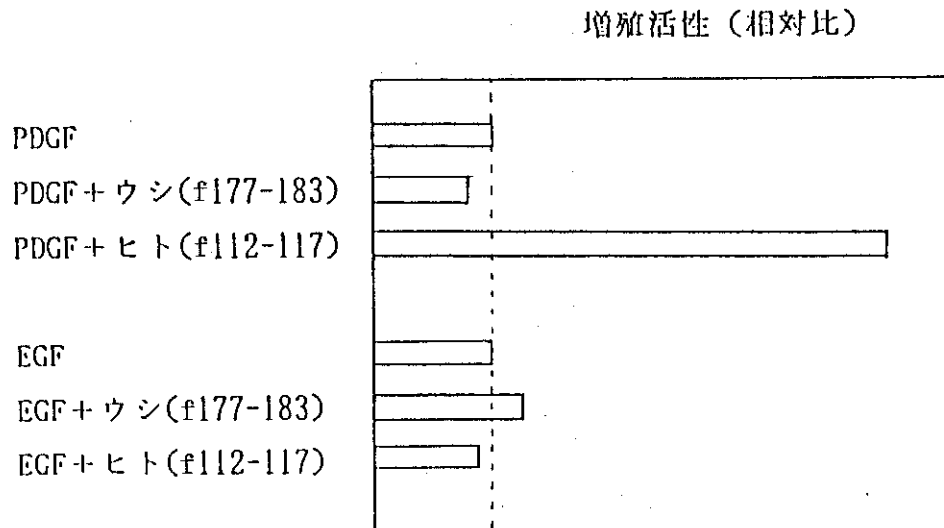


図1. 3T3細胞の増殖促進におけるガゼインペプチドとPDGFあるいはEGFとの相乗効果

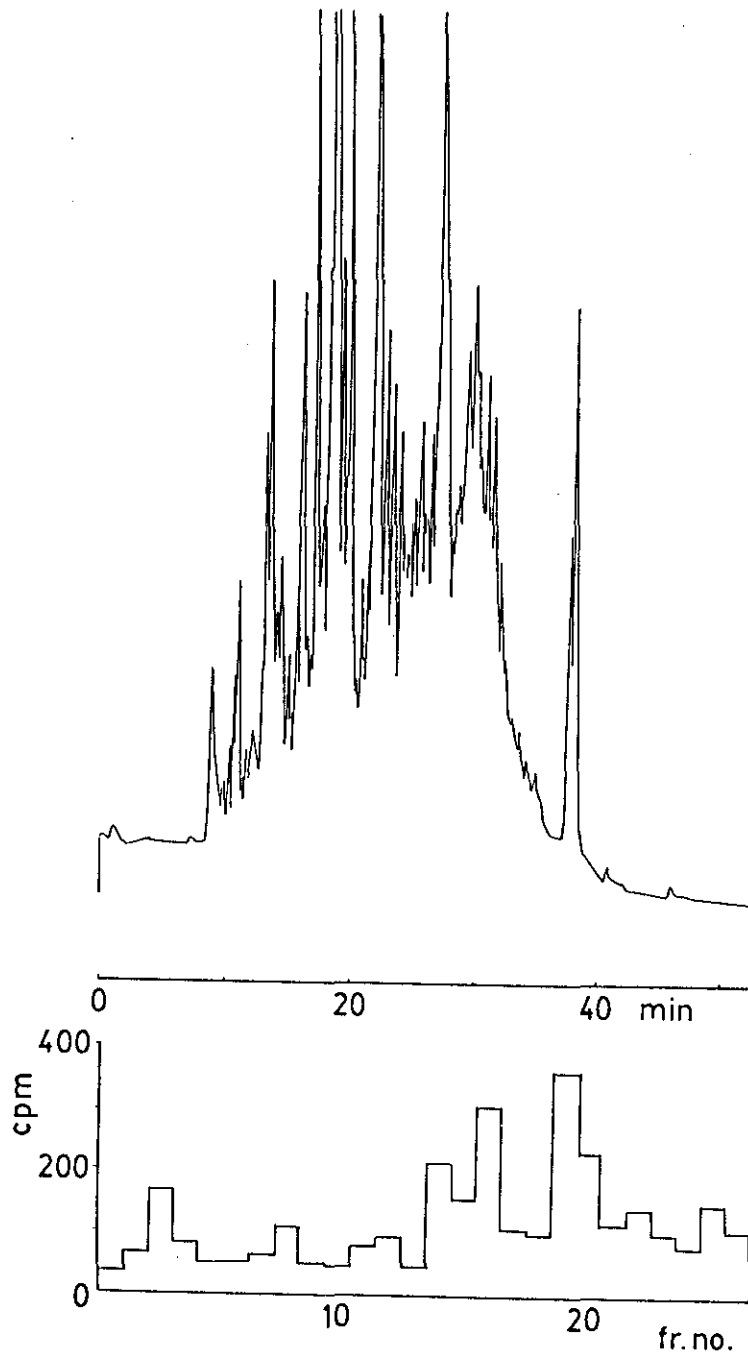


図2. 牛乳ホエイ蛋白質トリプトシン分解物のHPLCパターン(上)と各画分の3T3細胞DNA合成促進活性(下)。

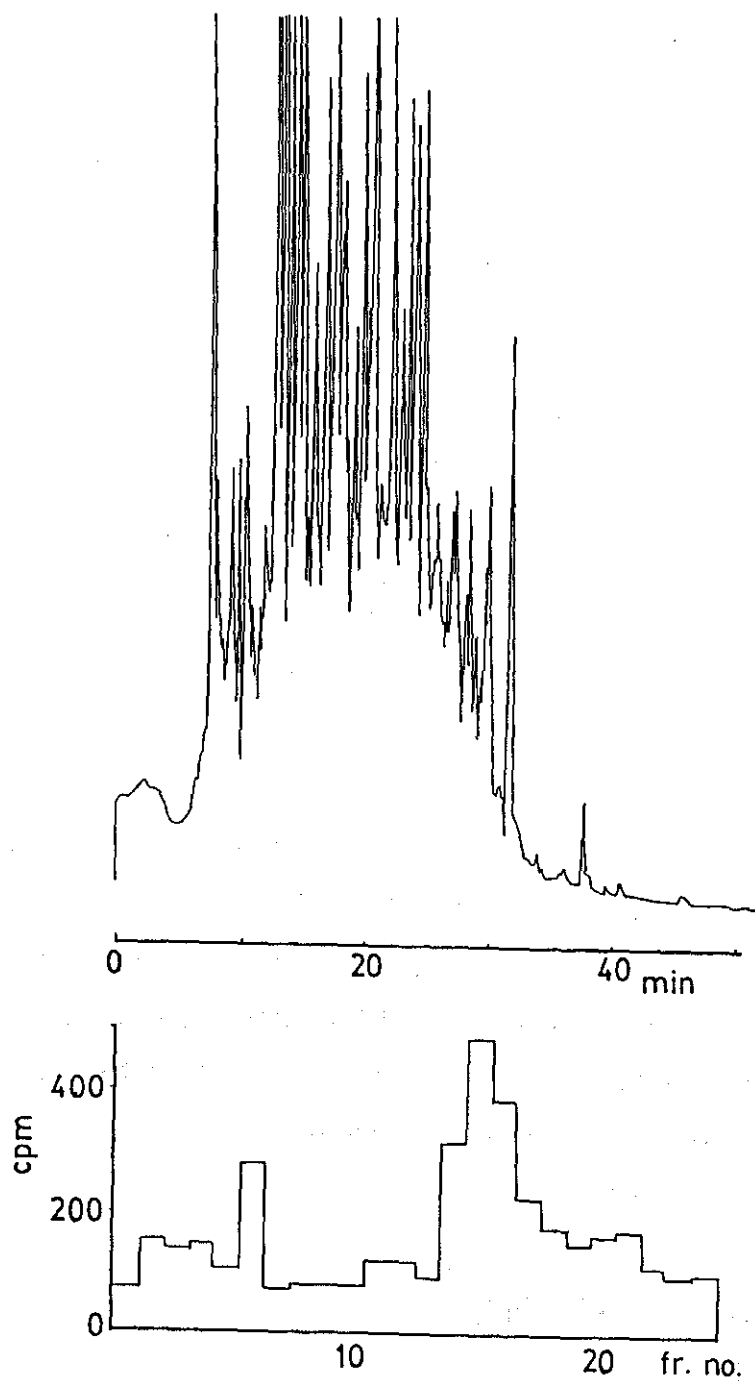


図3. 牛乳ホエイ蛋白質キモトリプシン分解物のHPLCパターン(上)と各画分の3T3細胞DNA合成促進活性性(下)。