

「脱脂粉乳を原料にした腸管IgA産生促進食品の開発」

信州大学大学院農学研究科機能性食料開発学専攻 教授 大谷 元

要 約

13種類の市販食品添加用プロテアーゼを作用させた牛乳カゼインから塩化カルシウムとエタノールを用いた分別沈殿法によりカゼインホスホペプチドを調製した。マウス脾臓細胞培養系において本実験で調製したすべてのカゼインホスホペプチドがIgA産生促進活性を有しており、中でも、*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼA「アマノ」GおよびデナチームAP消化物から調製したカゼインホスホペプチド（AoCPP）のIgA産生促進活性は市販のカゼインホスホペプチドであるCPP-ⅢのIgA産生促進活性の約2倍であった。また、本実験で調製したすべてのカゼインホスホペプチドは抗 β -カゼイン（1-28）との反応性を有していたが、AoCPPの抗 β -カゼイン（1-28）との反応性はCPP-Ⅲの場合の1/100以下であった。一方、AoCPP中の有機リン量は59.2~73.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であり、バイオゲルP-6を用いたゲル濾過によりAoCPPのほとんどのペプチドはバリノマイシン（1111Da）の溶出位置とほぼ同じ溶出位置であった。さらに、RP-HPLCにおいて、AoCPPの主要ピークの溶出位置はCPP-Ⅲ中のホスホペプチドである α_{s2} -カゼイン（1-32）および β -カゼイン（1-28）の溶出位置よりも明らかに早く、両ペプチドよりも親水性であることが示された。これらのことから、コウジ菌のアルカリ性プロテアーゼはトリプシンよりもIgA産生促進活性が強く、低抗原性のペプチドを生成するものと考えられる。

一方、AoCPP添加飼料でC3H/HeN系マウスを35日間飼育し、カゼインホスホペプチド無添加（コントロール）飼料およびCPP-Ⅲ添加飼料で飼育したマウスの抗体応答性と比較した。コントロール飼料で飼育したマウスの増体重は、AoCPP無添加飼料で飼育したマウスのそれと殆んど同じであった。しかし、AoCPPの添加により、腸管および血清のIgAレベルが高くなるとともに、血清中のLPS特異IgGレベルも高くなった。これらの結果から、AoCPPはマウスにおいて局所免疫系だけではなく全身免疫系も増強するものと考えられる。

他方、*Aspergillus oryzae*の生産するアルカリ性プロテアーゼであるプロテアーゼA「アマノ」Gを還元脱脂乳に作用させて得られる上澄みは用いた脱脂乳固形物のおよそ99%を含むとともに、その上澄みはマウス脾臓細胞によるIgA産生を統計的に有意に促進した。

キーワード

脱脂粉乳、カゼイン、カゼインホスホペプチド、免疫賦活、牛乳アレルギー、抗体、腸管IgA、サルモネラ菌リポポリサッカライド、マウス脾臓細胞、経口投与試験

緒 論

食物とともに私たちは毎日無数の微生物を腸管に取り込んでいる。また、食物には膨大な量と種類のたんぱく質が含まれており、それらはすべて食物アレルギーの原因となる可能性を秘めている。しかしながら、私たちがほとんど感染することや食物アレルギーに陥ることなく健康を維持できるのは、腸管に備わっている特有の免疫機構によるためである。

腸管特有の免疫機構の1つに、腸管ではIgAクラスの抗体が優先的に産生されることがある。腸管をはじめとして粘膜組織で産生されるIgAは分泌片と呼ばれるたんぱく質に覆われており、分泌型IgAと呼ばれている（以後、単にIgAと言う）。IgAはたんぱく質や病原菌と結合してもそれを破壊する能力はほとんどなく、抗体に結合したままの状態では体外に排泄することにより無毒化する。IgAが腸管で結合した抗原の破壊処理を行わないことは、腸管上皮細胞に炎症を生じないという合目的性を有している。何故ならば、もし、腸管上皮細胞で炎症反応が活発に生じれば腸管上皮組織が傷つき感染や食物アレルギーに陥る可能性が高くなるからである¹⁾。

食物とともに摂取した病原菌やたんぱく質抗原は、腸管の管腔側に散在している腸管関連リンパ組織のパイエル板に取り込まれ、そこに存在するB細胞やT細胞と接することにより、それらの細胞を感作する。感作された細胞は腸管膜リンパ節や胸管を経て、腸管上皮細胞層、腸管粘膜固有層、呼吸器粘膜固有層、乳腺、涙腺などの粘膜組織に移動する。それらの組織でB細胞はTh2細胞の生産するIL-5やIL-6の作用を受けてIgA産生形質細胞に分化し、腸管で感作された抗原と特異的に反応するIgAを産生する。産生されたIgAは粘膜上皮細胞で合成される分泌片と結合し、分泌型IgAとなり、感染防御やアレルゲンの排除に寄与する¹⁾。

一方、カゼインは脱脂乳中の主要たんぱく質であり、分子内にホスホセリン (SerP) 集中域をもつカルシウム感受性カゼインとSerP集中域をもたないが糖鎖をもつカルシウム非感受性カゼインに大別される。哺乳類には長い進化の歴史があるのにもかかわらず、すべての動物の脱脂乳にカルシウム感受性カゼインとカルシウム非感受性カゼインが含まれる。このことから、両カゼインにはそれぞれ新生仔の発育にとって重要な生理的機能が備わっていることが示唆される。

カルシウム感受性カゼインを食物として摂取すると、腸管でSerP集中域を含むカゼインホスホペプチドが生成することはよく知られたところである。カゼインホスホペプチドは消化管で脱リンやそれ以上の分解を受けることはなく、また、腸管から吸収されることもなく糞便として排泄される。そのために、カゼインホスホペプチドは腸管に滞在中にカルシウムの吸収を促進する²⁾。それ故に、カルシウム感受性カゼインの新生仔における生理的機能の1つは、カゼインホスホペプチドの生成によるカルシウムの吸収促進機能と考えられる。

他方、筆者らは牛乳カゼインの消化物を対象に、マウス脾臓細胞やウサギパイエル板細胞の培養系を用いてリンパ球の増殖や免疫グロブリンの産生を調節する成分を系統的に探索する過程で、カゼインホスホペプチドの1つである牛乳 α_{s1} -カゼイン (59-79) を分離・同定した³⁾。また、牛乳 α_{s1} -カゼイン (59-79) やそれと同様にカゼインホスホペプチドの1つである β -カゼイン (1-28) はIgA産生

の促進、静止期の状態にあるリンパ球に対して増殖の誘導、増殖状態にあるT、B両細胞の増殖の促進など様々な免疫調節活性を有していることを明らかにした⁴⁻⁹⁾。

一般に、リンパ球へのカルシウムの流入はリンパ球の増殖のための最初のシグナルとして重要であり、カルシウムの細胞への取り込みを促進するカルシウムイオノフォアA23187と名づけられた物質がリンパ球の増殖を誘導することは古くから知られている¹⁰⁾。カゼインホスホペプチドはホスホセリン集中域を介して腸管でカルシウムの吸収を促進すること²⁾から、カゼインホスホペプチドの免疫促進活性はホスホセリン集中域により生じていることが示唆された。そこで、筆者らは、牛乳β-カゼイン(14-21)(Glu¹⁴-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu²¹)のホスホセリン集中域の化学合成部分ペプチドを用いることにより、カゼインホスホペプチドのIgA産生促進活性はSerP-X-SerPというトリペプチド配列により生じていることを明らかにした¹¹⁾。

一般に、B細胞はマクロファージやT細胞などの生産する種々のサイトカインの作用によりIgA産生細胞へと分化する。筆者らは、カゼインホスホペプチド存在下で培養したマウス脾臓細胞の各種サイトカインレベルをCPP無添加で培養した場合と比較することにより、IL-5とIL-6量がカゼインホスホペプチド存在下で培養することにより顕著に高くなることを確認した¹²⁾。合わせて、カゼインホスホペプチドとともに抗IL-5抗体や抗IL-6抗体を加えてマウス脾臓細胞を培養すると、産生されるIgA量は添加した抗体量に依存して少なくなることを観察した¹²⁾。さらに、カゼインホスホペプチドを添加した飼料で35日間飼育したマウスの脾臓細胞によるIL-6の生産量は、カゼインホスホペプチド無添加飼料で飼育したマウスの脾臓細胞によるそれと比べて明らかに高いことを確認した^{13,14)}。IL-5とIL-6はTh2細胞の生産するサイトカインであり、マウスではIgA産生細胞への分化や抗体のクラススイッチを担うサイトカインとして知られている¹⁵⁾。これらのことから、カゼインホスホペプチドはSerP-X-SerPというアミノ酸3残基からなる領域を介してB細胞に結合し、B細胞の増殖を誘導するとともに、同じ領域を介してTh2細胞に作用してIL-5やIL-6の生産を高めることによりIgA産生を促進すると結論される。また、カルシウム感受性カゼインの新生仔における生理的機能は、腸管からのカルシウム吸収の促進とともに、IgA応答の増強を介した粘膜免疫系の調節であるものと考えられる。

さらに筆者らは、マウスや仔豚の飼料に市販のカゼインホスホペプチド標品を飼料重量の0.06%量添加すると腸管や糞便の総IgAレベルや飼料たんぱく質や経口投与したサルモネラ菌のリポポリサッカライドに対する腸管や糞便のIgAレベルが上昇すること^{13,16,17)}、妊娠45日目の豚にその豚が出産して仔豚が離乳するまでの間カゼインホスホペプチドを飼料重量の0.06%量添加して与えると分娩日と分娩10日後の乳汁中のIgAレベルと分娩日のIgGレベルがカゼインホスホペプチドの代わりにオポアルブミンを添加した飼料で飼育した場合と比べて明らかに高くなること¹⁸⁾、アレルギー自然発症マウスをカゼインホスホペプチド添加飼料で飼育するとカゼインホスホペプチド無添加飼料で飼育した場合より腸管IgAレベルは高くなり血清IgEレベルは低くなることによりアレルギー症状の発現が軽減されること¹⁴⁾、並びに7名の健康なボランティアがカゼインホスホペプチドを約290 mg、1ヶ

月間続けて食べると6名においてカゼインホスホペプチドを食べていない場合よりも糞便中のIgAレベルが上昇する傾向にあること¹⁹⁾を観察した。すなわち、これらの結果は、カゼインホスホペプチドは粘膜IgA応答の促進を介した感染予防食品やアレルギー軽減食品素材として利用できる可能性を示唆している。

カゼインホスホペプチドはカルシウムの吸収を促進することから、既に、トリプシン消化牛乳カゼインから工業的にカゼインホスホペプチド標品が製造され、食品素材や飼料素材として市販されている。ところが、トリプシンをカゼインに作用させるとIgA産生を促進するカゼインホスホペプチドだけではなく、アポトーシス誘導ペプチドやネクロトーシス誘導ペプチドも同時に生産されるとともに、それらの細胞傷害性ペプチドが細胞傷害活性を発現するためにはカルボキシ末端のリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸が不可欠であることを著者らは明らかにしている²⁰⁻²³⁾。したがって、トリプシンの基質特異性から考えると、トリプシン消化脱脂乳からIgA産生促進活性を有するカゼインホスホペプチドのみを高濃度にする処理が必要である。事実、トリプシン消化カゼインにカルシウムとエタノールを加えて分別沈殿処理を行うことにより工業的にカゼインホスホペプチドが製造されている²⁴⁾。そのために、エタノールを使用しないで、かつ、より簡便な方法で脱脂乳を原料にしたIgA産生促進素材の調製法の確立が望まれるところである。

そこで、本研究は、①食品として利用することが許可されているプロテアーゼを対象に、トリプシンの場合よりも強いIgA産生促進活性を有するペプチドを牛乳カゼインから遊離させるプロテアーゼのスクリーニング、②①でスクリーニングしたプロテアーゼで処理したカゼインから分離したカゼインホスホペプチドを経口摂取したマウスにおいて腸管IgAレベルが上昇することの確認、並びに③脱脂乳に直接①でスクリーニングしたプロテアーゼを作用させ、pH調整と遠心分離だけによりIgA産生促進素材の調製が可能であることの確認を目的として行ったものである。得られた結果は以下に述べるとおりである。

実験成果

① 各種プロテアーゼ処理カゼインから調製したカゼインホスホペプチドのIgA産生促進活性

牛乳アレルギー患者の血清IgE抗体にはカゼインホスホペプチドを認識したものもあり²⁵⁾、既に牛乳アレルギーの患者が感染予防やアレルギー症状の軽減を目的としてカゼインホスホペプチドを摂取した場合に逆にアレルギー症状を促進することが起こることも考えられる。一方、筆者らは、カゼインホスホペプチドのエピトープにはホスホセリンが3残基連なることが必要であり、SerP-Leu-SerPは抗原性を持たないがIgA産生促進活性を有していることを明らかにした²⁶⁾。そこで、トリプシンの場合よりも強いIgA産生促進活性を有するとともに、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性の低いカゼインホスホペプチドを遊離するプロテアーゼのスクリーニングが本項の実験目的である。

すなわち、本項では、13種類の食品添加用プロテアーゼを牛乳全カゼインに作用させ、塩化カルシウムとエタノールを用いた粗カゼインホスホペプチドの調製法に準じてそれらプロテアーゼ処理カゼインからカゼインホスホペプチドを調製し、それらのIgA産生促進活性および抗 β -カゼイン（1-28）抗体との反応性を調べた。

材料および方法

ペプチド

ペプチダーゼR、プロテアーゼA「アマノ」G、プロテアーゼNGおよびパパインW-40はアマノエンザイム株式会社（名古屋）から、ビオプラザーゼSP-15FG、デナプシン10P、デナチームAPおよびパパインはナガセ化学株式会社（京都）から、PTN 6.0S、ニュートラーゼ0.8L、フレーバーザイム500Lおよびアルカラーゼ2.4L FGはノボザイムズジャパン株式会社（千葉）から、ブロメラインは日本バイオコン株式会社（名古屋）から得た。

インスリン（5733Da）、インスリンB鎖（3495Da）、ウシ血清アルブミン（BSA）およびオボアルブミン（OVA、Grade II）はシグマケミカル社（St. Louis, USA）から得た。バリノマイシン（1111Da）はモレキュラープロブス社（Oregon, USA）から購入した。CPP-IIIは明治製菓株式会社（東京）から、抗 β -カゼイン（1-28）抗体はサワディーテクノロジー株式会社（東京）から得た。

カゼインの酵素処理およびカゼインホスホペプチドの調製

ホルスタイン種の新鮮な生乳から等電点沈殿法により調製した全カゼインを13種類の食品添加用プロテアーゼで処理し、その処理物から塩化カルシウムとエタノールを用いて、Reynolds²⁷⁾らの手順の一部を改良した方法によりカゼインホスホペプチドを調製した。すなわち、全カゼイン1 gを15 mlの脱塩水に懸濁し、3M NaOHでpH8に調整しながら溶解後、供試酵素20 mgを2 mlの脱イオン水に溶解して加えた。次いで、3M NaOHまたは3M HClを用いて、Table 1に示した各酵素の反応pHに調整後、脱塩水を加えて全容量を20 mlに調整した（基質最終濃度は5%、S:E=50:1, w/w）。その反応容器の口にアルミ箔で蓋をして、50℃のウオーターバスに浸し、30分ごとに3M NaOHで各酵素の反応開始時のpHに調整しながら放置した。2時間放置後、3M HClを用いて、反応液のpHを4.6に調整し、4℃で3000rpm、30分間の遠

Table 1: Yields and organic phosphorus quantities of peptides prepared from caseins hydrolyzed by 13 kinds of industrial- and food-grade proteases

Protease	Origin	Reaction pH	Yield mg/g*	Organic P in peptide μ g/mg*
Protease AG	<i>Asp. oryzae</i>	8.0	48.5	59.2
Denazyme AP	<i>Asp. oryzae</i>	8.0	41.0	73.0
Flavourzyme 500L	<i>Asp. oryzae</i>	6.0	22.4	62.5
Denapsin 10P	<i>Asp. niger</i>	4.0	6.9	42.8
Peptidase R	<i>Rhiz. oryzae</i>	8.0	11.9	47.6
Alcalase 2.4L FG	<i>B. licheniformis</i>	8.0	47.5	59.8
Biopraser SP-15FG	<i>B. subtilis</i>	8.0	36.1	53.8
Protease NG	<i>B. subtilis</i>	8.0	34.1	48.2
Neutrase 0.8L	<i>B. amyloliquefaciens</i>	6.0	44.3	66.2
P.T.N. 6.0S	Porcine pancreas	8.0	35.5	59.2
Papain	Papain latex	8.0	27.6	39.6
Papain W-40	Papain latex	8.0	19.3	54.6
Bromelain	Pineapple latex	5.0	12.4	79.4

*Values are averages based on 3 analyses.
Protease AG: Protease A(amano)G,
Asp., *Aspergillus*; *Rhiz.*, *Rhizopus*; *B.*, *Bacillus*.

心分離を行った。得られた上清を1M NaOHでpH7.2に調整し、アドバンテック UP-10膜（分子量10000で分画、東洋濾紙株式会社、東京）を装着したアミコン限外濾過器52型（アミコンコーポレーション, Danvers, USA）を用いて濾過を行い、酵素および分子量10000以上のペプチドを除去した。次いで、濾液を回収して、塩化カルシウムとエタノールをそれぞれ最終濃度が1.1%（w/v）と50%（v/v）なるように添加し、遠心分離により沈殿を回収した。回収した沈殿を脱イオン水に溶解させ、透析後、凍結乾燥し、本実験におけるカゼインホスホペプチド調製物（調製ペプチド）として分析に供した。

有機リンの定量

有機リンは比色法²⁸⁾により定量した。すなわち、0.1%調製ペプチド溶液2.0 mlを25 ml容メスフラスコに入れ、70%過塩素酸2.0 ml、アミドール試薬（アミドール1%と亜硫酸ナトリウム20%を含む溶液）2.0 mlおよび8.3%モリブデン酸アンモニウム溶液1.0 mlを加えた後、脱塩水を加えて25 mlとした。その混合液を20分間室温で放置後、720nmにおける吸光度を分光光度計（UV-VIS1200型、島津製作所、京都）を用いて測定した。既知量のリン酸二水素カリウム溶液を用いて得た標準曲線に吸光度を代入することにより調製したペプチドの無機リン量を求めた。

一方、0.1%試料溶液2.0 mlと70%過塩素酸2.2 mlを30 ml容ケルダール分解フラスコに入れ、ケルダール分解装置を用いて20分間加熱した。放冷後、30%過酸化水素水20 μ lを加えてケルダール分解装置で5分間加熱して湿式灰化した。次いで、その溶液に上述した無機リン量の測定時と同様の操作を行い、得られた吸光度を標準曲線に代入することにより調製したペプチド中の全リン量を求めた。全リン量から無機リン量を減ずることにより有機リン量とした。なお、値は調製ペプチド1 mgのリン量として表示した。

ゲル濾過

調製ペプチド35 mgを4 mlの蟻酸：酢酸：脱イオン水（25：87：888, v/v）溶液に溶解し、同溶液で平衡させたバイオゲルP-6カラム（2.5×70cm、Bio-Rad Laboratories, California, USA）に供した。ペプチドの溶出には同溶媒を用い、流速は15 ml/hとした。溶出液をニンヒドリン法で発色させ、前述した分光光度計を用いて570nmの波長で吸光度を測定した。

逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）

RP-HPLCはTSK-Gel ODS 80TM カラム（6.0mmID×15cm、東ソー、東京）を装着した島津システム10型HPLC装置（島津製作所）を用いて行った。なお、固定相にはODSシリカを、移動相には0.05%トリフルオロ酢酸（TFA、和光純薬）を含む蒸留水とアセトニトリルの混合液を用いた。また、溶出開始から40分後まではアセトニトリル濃度を5～40%の直線濃度勾配とし、40分後から50分後までは40～80%の直線濃度勾配とした。なお、ペプチドの測定波長は214nm、試料の注入量は50 μ l、

流速は0.8 ml/minとした。

マウス脾臓細胞の培養

雄C3H/HeN系マウス、6週齢を日本SLC株式会社（静岡）から購入した。マウスを頸椎脱臼により屠殺し、脾臓を無菌的に取り出した。次いで、培養培地（ペニシリン100単位/mlおよびストレプトマイシン100 μ g/mlを含むRPIM-1640）中で脾臓を丁寧にほぐして細胞懸濁液を調製した。細胞をRPIM-1640で3回洗浄し、 6×10^6 cells/mlになるように同培地に懸濁し、マウス脾臓細胞浮遊液とした。なお、トリパンブルー染色による細胞の生存率は98%以上であった。

細胞培養は平底マイクロプレート（Falcon Labware, California, USA）で4穴ずつ行った。各ウェルに細胞懸濁液100 μ l、0.15M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液（pH7.2、PBS）に溶解した調製ペプチド溶液10 μ lおよびPBS10 μ lを分注し（最終濃度は、脾臓細胞が 5×10^6 生細胞/ml、ペニシリンが100単位/ml、ストレプトマイシンが100 μ g/mlである）、5%CO₂-95%air存在下、37℃で96時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養上清を回収し、IgAレベルをサンドイッチ酵素免疫測定法（ELISA）により調べた。

ELISA

0.05M炭酸緩衝液（pH9.6）に溶解したヤギ抗マウスIgA（10 μ g/ml、Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA）200 μ lを96穴マイクロプレート（Nunc, Roskilde, Denmark）の各ウェルに入れ、4℃で一夜静置した。静置後、0.05%Tween20を含むPBS（PBS-Tween）で各ウェルを3回洗浄した。次いで、各ウェルに、0.1M炭酸緩衝液（ELISAの場合）、または0.05M炭酸緩衝液（サンドイッチELISAの場合）に溶解した0.2%BSA溶液300 μ lを加え、25℃で90分間静置した。PBS-Tweenで各ウェルを3回洗浄後、2%ポリビニルピロリドンを含むPBS-Tweenで希釈したマウス脾臓細胞の培養上清を加えて25℃で120分間反応させた。反応終了後、PBS-Tweenで各ウェルを5回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgA（2 μ g/ml、Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA）100 μ lを各ウェルに加えて25℃で60分間反応させた。各ウェルを再度PBS-Tweenで5回洗浄後、暗室で0.4%オフェニレンジアミンと0.01%過酸化水素水を含む0.1Mクエン酸0.2Mリン酸緩衝液（pH 5.0）100 μ lを各ウェルに入れ、25℃で反応させた。15分後、3.5N硫酸25 μ lを各ウェルに加えて反応を停止させ、直ちにマイクロプレートリーダー550型（Bio-Rad Laboratories, California, USA）により、その490nmにおける吸光度を測定した。

ELISA阻害試験

調製ペプチドの抗 β -カゼイン（1-28）との反応性をELISA阻害試験により調べた。すなわち、0.05M炭酸緩衝液（pH9.6）に溶解した β -カゼイン（1-28）溶液（2 μ g/ml）200 μ lを96穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、4℃で一夜静置後、PBS-Tweenでウェルを3回洗浄した。次いで、各

ウエルに0.05M炭酸緩衝液に溶解した0.2%BSA溶液300 μ lを加えて25℃で90分間静置した。PBS-Teenで各ウエル3回洗浄後、あらかじめ37℃で1時間反応させておいた調製ペプチドまたはCPP-IIIと抗 β -カゼイン(1-28)との反応液の遠心分離後の上清100 μ lを加え、25℃で120分間反応させた。反応後、PBS-Teenで5回洗浄し、100 μ lのペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (Cooper Biomedical, Inc., Pennsylvania, USA) 溶液を各ウエルに加え、25℃で60分間反応させた。反応後、再度PBS-Teenで各ウエルを5回洗浄し、上述したELISAの場合と同様にペルオキシダーゼ活性を測定し、抗 β -カゼイン(1-28)との反応性として490nmにおける吸光度により表示した。なお、結果は4個のウエルの平均値と標準偏差で表示した。

結果

調製ペプチドの収量および有機リン量

13種類の市販の食品添加用プロテアーゼで処理した牛乳カゼインからカゼインホスホペプチドの調製法に準じて調製したペプチドの収量と有機リン量の測定結果をTable 1に示した。Table 1から、1gの牛乳カゼインから得られるペプチド量は6.9~48.5 mgであり、各ペプチド調製物1 mgに含まれる有機リン量は39.6~79.4 μ gであることがわかる。

調製ペプチドのIgA産生促進活性および抗 β -カゼイン(1-28)抗体との反応性

調製したペプチドを100 μ g/ml濃度になるようにマウス脾臓細胞培養系に添加して72時間培養し、その培養上澄のIgA量を求めた結果と β -カゼイン(1-28)とその抗体との反応に対する阻害活性を求めた結果をTable 2に示した。Table 2から、13種類のプロテアーゼ消化物から調製したいずれのペプチドを添加した場合よりも培養上澄中のIgA量はカゼインホスホペプチド無添加(CPP-free)の場合よりも多く、かつ、その量は市販のカゼインホスホペプチド標品であるCPP-IIIよりも明らかに多いことがわかる。また、 β -カゼイン(1-28)とその抗体との反応に対する阻害活性は調製した13種類のすべてのペプチドにおいてCPP-IIIよりも低いこと、すなわち、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性が低いことがわかる。なかでも、コウジ菌由来のプロテアーゼA「アマノ」G、デナチームAPおよびフレーバーザイム500L、*Bacillus*

Table 2: IgA levels in cell supernatants cultured with the prepared peptides and inhibitory activities of the peptides on antigenic reactivity of β -casein (1-28) with its antibody

Protease for preparation	IgA level (ng/ml)	Inhibition (%)
Protease AG	112.8	49.2
Denazyme AP	112.0	49.2
Flavourzyme 500L	96.5	56.9
Denapsin 10P	104.1	61.6
Peptidase R	108.2	67.9
Alcalase 2.4L FG	94.5	65.4
Biopraxe SP-15FG	86.4	67.9
Protease NG	87.8	53.2
Neutrase 0.8L	92.8	63.5
P.T.N. 6.0S	100.7	66.9
Papain	85.6	76.4
Papain W-40	85.8	71.9
Bromeline	85.0	51.2
CPP-III	46.2	80.9
CPP-free	33.7	-

The peptide concentration for each determination was 100 μ g/ml. The value is the average for 3 analyses. Protease AG: Protease A(amano)G.

*subtillus*由来のプロテアーゼNG、並びにパイナップル由来のプロメラインを用いて調製したペプチドのIgA産生促進活性は高く、抗 β -カゼイン(1-28)との反応性は低いことがわかる。

プロテアーゼA「アマノ」GとデナチームAPを用いて調製したペプチドおよびCPP-IIIの各種濃度でのIgA産生促進活性と β -カゼインとその抗体との反応に対する阻害活性を調べ、その結果をFig. 1に示した。Fig. 1から、カゼインホスホペプチド無添加の場合よりもIgA量を3倍増強するのに必要なペプチド濃度はCPP-IIIでは約500 μ g/mlであるのに対して、プロテアーゼA「アマノ」GおよびデナチームAPを用いて調製したペプチドではいずれもおよそ1/10量の50 μ g/mlであることをわかる。また、Fig. 1から、 β -カゼイン(1-28)とその抗体との反応を50%阻害するのに必要なペプチド量はCPP-IIIでは1 μ g/ml以下であるのに対して、プロテアーゼA「アマノ」GおよびデナチームAPを用いて調製したペプチドではいずれもおよそ100 μ g/mlであることがわかる。

ゲル濾過およびPR-HPLC

プロテアーゼA「アマノ」GおよびデナチームAP処理カゼインから調製したペプチドのバイオゲルP-6カラムにおける溶出曲線とRP-HPLCにおける溶出曲線をFig. 2に示した。Fig. 2から、CPP-IIIの主要ペプチドはインスリン(5733Da)とほぼ同じ位置に溶出するが、コウジ菌のアルカリ性プロテアーゼ処理カゼインから調製したペプチド(AoCPPと呼ぶ)の主要ペプチドは2社の酵素で調製したペプチドともに、バリノマイシン(1111Da)の溶出位置とほぼ同じ位置であることがわかる。また、Fig. 2から、プロテアー

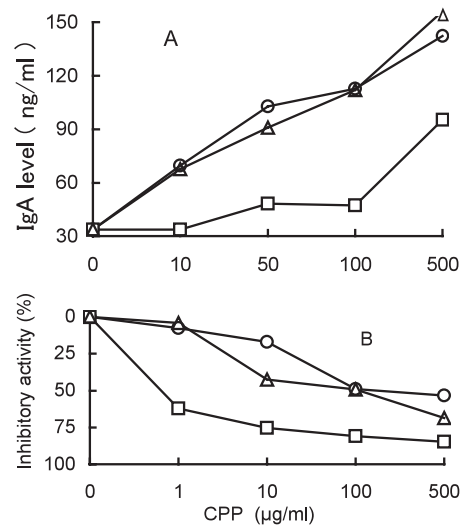


Fig. 1: Effect of the peptide prepared from protease A(amano)G or denazyme AP hydrolysate and CPP-III on IgA production in mouse spleen cell cultures (A) and on antigenic reactivity of β -casein (1-28) and its antibody (B).
○, peptide from protease A(amano)G hydrolysate; Δ , peptide form denazyme AP hydrolysate; \square , CPP-III.

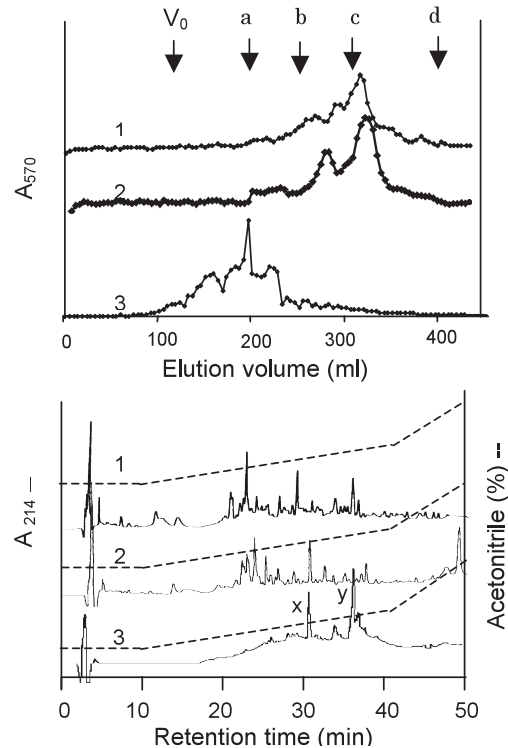


Fig. 2: Typical elution profiles of the peptide from protease A(amano)G (1) or denazyme AP hydrolysate (2) and CPP-III (3) on a Bio-Gel P-6 column (upper) and on a TSK-Gel ODS-80TM column (bottom). Arrows show the elution position of blue dextran (V_0), insulin (a), insulin β -chain (b), valiniomycin (c) or tyrosine (d). x, elution position of α -casein (1-32); y, elution position of β -casein (1-28).

ゼA「アマノ」GおよびデナチームAP処理カゼインから調製したペプチドの半分以上のピークの位置は、CPP-Ⅲに含まれている2つの主要ペプチドである α_{s2} -カゼイン（1-32）および β -カゼイン（1-28）の溶出位置よりも、より早いことがわかる。

考 察

カゼインホスホペプチドのホスホセリン集中域を認識している抗体との反応にはSerP-SerP-SerP配列が重要であり、SerP-Leu-SerPには反応性は殆んどないことを筆者らは明らかにしている²⁶⁾。また、筆者ら¹¹⁾は、SerP-SerP-SerPとSerP-Lue-SerPは β -カゼイン（1-28）と同様のIgA産生促進活性を有することを明らかにしている。したがって、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性を殆ど持たず、高いIgA産生促進活性を有するペプチドの調製が可能であるという仮説の下に実験を行ったのが本項である。

13種類の市販食品添加用プロテアーゼ処理牛乳カゼインから、従来のカゼインホスホペプチドの調製法に準じて調製したペプチドの中でもコウジ菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来のプロテアーゼであるプロテアーゼA「アマノ」GおよびデナチームAP消化物から調製したAoCPPのIgA産生促進活性はCPP-ⅢのIgA産生促進活性より約2倍強く、抗 β -カゼイン抗体との反応性はCPP-Ⅲの1/100以下であることが示された。また、AoCPPに含まれるほとんどのペプチドはバリノマイシン（1111Da）と同じ位置に溶出し、CPP-Ⅲ中の主要ペプチドの溶出位置がインスリン（5733Da）のそれであったことから、AoCPP中のペプチドは明らかに低分子化しており、このことがAoCPPの抗原性が低下していることを裏付けている。なお、逆相高速液体クロマトグラムにおいてCPP-Ⅲに含まれる2つの主要ホスホペプチドである α_{s2} -カゼイン（1-32）と β -カゼイン（1-28）の溶出位置は、AoCPP中のペプチドの溶出位置よりも明らかに遅いことが示された。本結果はAoCPP中のカゼインホスホペプチドは α_{s2} -カゼイン（1-32）や β -カゼイン（1-28）よりも、疎水性アミノ酸を失いホスホセリン集中域のみの構造に近いことを示唆している。以上のことから、コウジ菌のアルカリ性プロテアーゼから現在市販されているカゼインホスホペプチドよりも低アレルギー性でIgA産生促進活性の強いペプチドの調製が可能であるものと思われる。

要 約

13種類の市販食品添加用プロテアーゼを作用させた牛乳カゼインから塩化カルシウムとエタノールを用いた分別沈殿法によりカゼインホスホペプチドを調製した。マウス脾臓細胞培養系において本実験で調製したすべてのカゼインホスホペプチドがIgA産生促進活性を有しており、中でも、*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼA「アマノ」G およびデナチームAP消化物から調製したカゼインホスホペプチド（AoCPP）のIgA産生促進活性は市販のカゼインホスホペプチドであるCPP-ⅢのIgA産生促進活性の約2倍であった。また、本実験で調製したすべてのカゼインホスホペプチドは抗 β -カゼイン（1-28）との反応性を有していたが、AoCPPの抗 β -カゼイン（1-28）との反応性は

CPP-Ⅲの場合の1/100以下であった。一方、AoCPP中の有機リン量は59.2~73.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であり、バイオゲルP-6を用いたゲル濾過によりAoCPPのほとんどのペプチドはバリノマイシン (1111Da) の溶出位置とほぼ同じ溶出位置であった。さらに、RP-HPLCにおいて、AoCPPsの主要ピークの溶出位置はCPP-Ⅲ中のホスホペプチドである α_{s2} -カゼイン (1-32) および β -カゼイン (1-28) の溶出位置よりも明らかに早く、両ペプチドよりも親水性であることが示された。これらのことから、コウジ菌のアルカリ性プロテアーゼはトリプシンよりもIgA産生促進活性が強く、低抗原性のペプチドを生成するものと考えられる。

② AoCPP添加飼料で飼育したマウスの免疫応答

ヒトが生命を維持して存続するためには食べること、飲むこと、吸うことおよび排出することの行為が不可欠である。したがって、それらの行為を行うためにヒトには口腔、鼻腔、呼吸器、消化器、泌尿器などが備わっており、それらは“内なる外”という粘膜を介して異物に曝されている。また、それら異物に侵されるのを防御するために中心的役割を担っているのが腸管免疫系であり、その主役がIgAである。したがって、粘膜のIgAレベルを増加させることは、感染防御やアレルギーの予防や軽減などに寄与するものと考えられる。

前項において筆者は、13種類の食品用プロテアーゼで処理した全カゼインから調製したペプチドのマウス脾臓細胞培養系におけるIgA産生促進活性および β -カゼイン (1-28) とその抗体との反応に対する阻害活性を調べ、*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼA「アマノ」G消化物から調製したカゼインホスホペプチド (AoCPP) は最も強いIgA産生促進活性を有するとともに、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性は最も低いことを示した。

そこで本項では、AoCPPが腸管IgA産生促進活性を有することを確認する目的で、AoCPP添加飼料でマウスを35日間飼育し、飼料タンパク質や経口投与したサルモネラ菌のリポポリサッカライド (LPS) に対する抗体応答をAoCPP無添加飼料で飼育したマウスのそれらと比較した。

材料および方法

AoCPPおよびCPP-Ⅲ

AoCPPは、市販の*Aspergillus oryzae*由来のプロテアーゼA「アマノ」G処理牛乳カゼインから調製したペプチドであり、本ペプチドの調製法の詳細は前項で述べたとおりである。また、CPP-Ⅲは明治製菓株式会社から得た。

試験飼料および飼育試験

本実験で用いたコントロール (無添加) 飼料、CPP-Ⅲ添加飼料およびAoCPP添加飼料の組成をTable 2に示した。また、飼育試験は、4週齢、雄、C3H/HeN系マウス (日本SLC株式会社) を用いて行った。すなわち、購入したマウスを1週間、市販マウス用固形飼料で予備飼育後、Table 3に示

した試験飼料で35日間飼育した。試験開始日から7、14および21日目に、*Salmonella typhimurium* のLPS (和光純薬工業株式会社) をPBSに5 μ g/ml濃度に懸濁し、マウス1匹あたりに0.2 mlゾンデを用いて胃内に注入した。なお、水及び飼料は自由摂取とするとともに、各群のマウスは6匹とした。

腸管抽出液の調製

35日間試験飼料で飼育したマウスから全採血後、十二指腸から直腸までの器官を摘出した。氷水中 ($2 \pm 1^\circ\text{C}$) に置いた乳鉢に、裁断した器

官2 gに対して3 gの海砂と5 mlの滅菌PBSを入れ、乳棒で15分間磨砕した。次いで、 4°C 、3000 rpmで30分間の遠心分離を行い、得られた上澄を腸管抽出液とした。

酵素免疫測定法 (ELISA)

ELISAの場合は、0.1M炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解したLPSまたはオボアルブミン (OVA) 溶液 (100 μ g/ml) 200 μ lを、また、サンドイッチELISAの場合は0.05M炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解したヤギ抗マウスIgA (10 μ g/ml, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA) 200 μ lを96穴マイクロプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) の各ウエルに入れ、 4°C で一晩静置した。静置後、PBS-Tweenで3回洗浄した。次いで各ウエルに、0.1M炭酸緩衝液 (ELISAの場合) 又は0.05M炭酸緩衝液 (サンドイッチELISAの場合) に溶解した0.2%BSA溶液300 μ lを加え、 25°C で90分間静置した。PBS-Tweenで各ウエルを3回洗浄後、2%ポリビニルピロリドンを含むPBS-Tweenで希釈したマウス抗血清 (抗原特異的IgAの場合は25倍希釈液、IgGの場合は1000倍希釈液、IgMの場合は1000倍液、IgEの場合は原液、総IgAの場合は6000倍希釈液) または腸管抽出液 (抗原特異的IgAの場合は500倍希釈液、IgGの場合は1000倍希釈液、IgMの場合は1000倍希釈液、総IgAの場合は6000倍希釈液) を加えて120分間 25°C で反応させた。反応終了後、PBS-Tweenで各ウエルを5回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗体 (ELISAの場合はヒツジ抗マウスIgA, 0.2 μ g/ml, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA; ヒツジ抗マウスIgG, 0.1 μ g/ml, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA; ヒツジ抗マウスIgM, 0.1 μ g/ml, Tago, Inc., Burlingame, California, USA; ヒツジ抗マウスIgE, 0.4 μ g/ml, Nordic Immunological Laboratories, New York, USA : サンドイッチELISAの場合は、ヤギ抗マウスIgA, 0.05 μ g/ml, Bethyl Laboratories, Inc., Texas, USA;) 100 μ lを各ウエルに加えて 25°C で60分間反応させた。反応後、再度PBS-Tweenで各ウエルを5回洗浄し、暗室で0.4% *o*-フェニレンジアミンと0.01%過酸化水素水を含む0.1Mクエン酸0.2Mリン酸緩衝液 (pH 5.0) を100 μ l入れ、 25°C で振盪反応させた。15分後、

Table 3: Compositions of test diets

Component	Control (CPP-free) (%)	CPP-III-added (%)	AoCPP-added (%)
CPP-III	-	0.10	-
AoCPP	-	-	0.10
Ovalbumin	25.00	24.90	24.90
Sucrose	27.11	22.25	27.11
Solka Floc	2.25	7.11	2.25
RP vitamin mix ^a	1.50	1.50	1.50
RP mineral mix #10 ^b	3.75	3.75	3.75
Choline chloride	0.15	0.15	0.15
Lard	3.75	3.75	3.75
Corn oil	3.75	3.75	3.75
Dextrin	32.74	32.74	32.74
Total	100.00	100.00	100.00

^aRP vitamin mix: thiamin hydrochloride, 20ppm; riboflavin, 20ppm; nicotinic acid, 90ppm; pyridoxine hydrochloride, 20ppm; calcium pantothenate, 60ppm; folic acid, 4.0ppm; biotin, 0.4ppm; inositol, 200ppm; vitamin B₁₂, 20mg kg⁻¹; menadione dimethylpyrimidinol disulfite, 20ppm; vitamin A acetate 22IU g⁻¹; vitamin D₃, 2.2IU g⁻¹; dl-alpha tocopheryl acetate, 50IU kg⁻¹

^bRP mineral mix #10: calcium, 0.60%; phosphorus, 0.40%; potassium, 0.40%; magnesium, 0.065%; sodium, 0.20%; chlorine, 0.20%; fluorine, 5.0ppm; iron, 60ppm; zinc, 20ppm; manganese, 65ppm; copper, 15ppm; cobalt, 3.2ppm; iodine, 0.6ppm; chromium, 3.0ppm; molybdenum, 0.8ppm; selenium, 0.2ppm.

3.5M硫酸25 μ lを各ウェルに加えて反応を停止させ、直ちにマイクロプレートリーダー550型 (Bio-Rad Laboratories, California, USA) により、その490nmにおける吸光度を測定した。なお、結果は5個のウェルの平均値と標準偏差により示し、t検定分析によりコントロール飼料群とAoCPPまたはCPP-III添加飼料群の統計的有意差の有無を調べた。

結果

体重変化

マウスをコントロール飼料、AoCPP添加飼料およびCPP-III添加飼料で35日間飼育し、各群の体重の変化を7日間隔で測定した値の平均値をFig. 3に示した。Fig. 3から、コントロール飼料で飼育したマウスの増体重の平均値は、AoCPPやCPP-III添加飼料で飼育したマウスと殆んど同じであることがわかる。

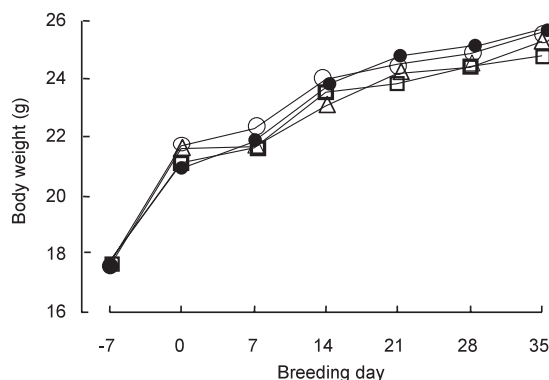


Fig. 3: Changes of body weights in mice during experimental period.
 △, CPP-free diet (control diet, not administered LPS);
 ○, CPP-free diet + LPS (control diet, administered LPS);
 □, CPP-III-added diet + LPS (administered LPS);
 ●, AoCPP-added diet + LPS (administered LPS).

OVAに対する血清抗体レベル

4群のマウスから得られた血清中のOVAに対するIgA、IgG、IgMおよびIgEクラスの抗体価をELISAにより測定し、その結果をFig. 4に示した。Fig. 4から、AoCPP添加飼料で飼育したマウスの血清中のOVAに対するIgMおよびIgE抗体価はLPS投与の有無に関係なく、コントロール飼料の場合と殆んど同じであることがわかる。一方、AoCPP添加飼料群のOVAに対するIgGクラスの抗体価はコントロール飼料の2つの群と比べ、AoCPP添加飼料群とCPP-III添加飼料群では上昇傾向が見られ。さらに、OVAに対するIgAクラスの抗体価は、コントロール群と比べてAoCPP添加飼料群とCPP-III添加飼料群では統計的に有意に上昇することがわかる。

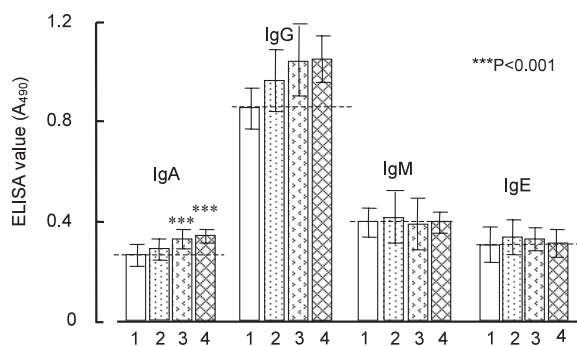


Fig. 4: Serum OVA-specific IgA, IgG, IgM, and IgE levels in mice given test diets.
 1, CPP-free diet (control diet, not administered LPS);
 2, CPP-free diet + LPS (control diet, administered LPS);
 3, CPP-III-added diet + LPS (administered LPS);
 4, AoCPP-added diet + LPS (administered LPS).

サルモネラ菌LPSに対する血清抗体レベル

4群のマウスから得られた血清中の経口投与したサルモネラ菌LPSに対するIgA、IgG、IgMおよびIgEクラスの抗体価をELISAにより測定し、その結果をFig. 5に示した。Fig. 5から、サルモネラ菌

LPSに対するIgMクラスの抗体レベルは4群ともにほとんど同じであるが、IgAクラスとIgGクラス、とくに前者において同じコントロール飼料群でもLPSを投与することにより抗体レベルは明らかに高くなり、かつ、同じようにLPSを投与してもコントロール飼料群よりもAoCPPやCPP-Ⅲ添加飼料群の方が統計的に有意に高いことがわかる。

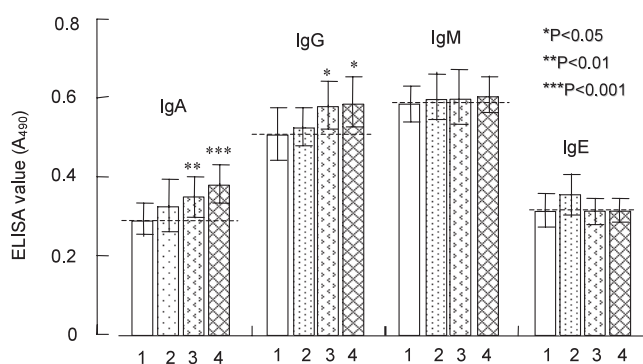


Fig. 5: Serum LPS-specific IgA, IgG, IgM, and IgE levels in mice given test diets.

- 1, CPP-free diet (control diet, not administered LPS);
- 2, CPP-free diet + LPS (control diet, administered LPS);
- 3, CPP-III-added diet + LPS (administered LPS);
- 4, AoCPP-added diet + LPS (administered LPS).

腸管抗体レベル

腸管抽出液中の総IgAレベル、並びにLPSおよびOVAに対するIgAレベルをELISAにより測定し、その結果をFig. 6に示した。Fig. 6から、LPSの投与によりLPS特異IgAレベルおよび総IgAレベルが有意に高くなることがわかる。また、LPSおよびOVAに対するIgAクラスの特異抗体レベル、並びに総IgAレベルは飼料へのAoCPPやCPP-Ⅲの添加により、コントロール飼料の場合よりも上昇することがわかる。

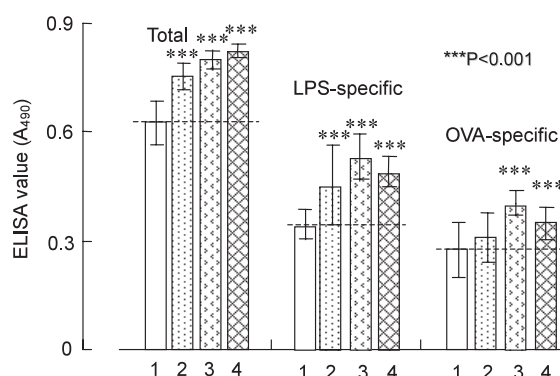


Fig. 6: Intestinal total and antigen-specific IgA levels in mice given test diets.

- 1, CPP-free diet (control diet, not administered LPS);
- 2, CPP-free diet + LPS (control diet, administered LPS);
- 3, CPP-III-added diet + LPS (administered LPS);
- 4, AoCPP-added diet + LPS (administered LPS).

考 察

前章において筆者は、マウス脾臓細胞培養系においてAoCPPはCPP-ⅢよりもIgA産生促進活性は強く、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性が低いことを示した。そこで本章では、AoCPP添加飼料でC3H/HeN系マウスを35日間飼育し、コントロール（CPP無添加）飼料およびCPP-Ⅲ添加飼料で飼育した場合と抗体応答性を比較した。

まず、AoCPPやCPP-Ⅲ添加飼料群とコントロール飼料群の間には増体重に統計的に有意な違いが見られなかったことから、各飼料群にストレスおよび餌の栄養価に差はなく、本実験で得られる抗体レベルの違いは飼料成分であるAoCPPおよびCPP-ⅢとLPSの免疫系への作用によるためと考えられる。また、コントロール飼料群のマウスにLPSを経口投与すると、LPS非投与群と比べて血清および腸管のLPSに対する抗体レベルは明らかな上昇、或いは上昇傾向を示した。このことは、経口投与したLPSに対する抗体応答が誘起されたことを示している。したがって、マウスをAoCPP添加飼

料で飼育してLPSを経口投与することにより、LPS特異抗体産生に及ぼすAoCPPの作用を見ることが可能であり、本項の実験計画は適切であったと結論できる。さらに、LPSはT細胞非依存性抗原であり、OVAはT細胞依存性抗原であることから、OVA特異抗体レベルとLPS特異抗体レベルへのAoCPP添加の影響を比較することにより、AoCPPが、B細胞とT細胞に及ぼす影響を推察することができる。さらに、筆者らは、CPP-Ⅲがマウスだけではなく、豚やヒトでも腸管や糞便のIgAレベルが上昇することを既に明らかにしており¹⁶⁻¹⁹⁾、本実験においてAoCPPはマウスへの経口投与試験においてCPP-Ⅲと同様に腸管IgAレベルを上昇させたことから、AoCPPもヒトにおいて免疫調節機能を有する食品素材としての利用が期待できる。

AoCPP添加飼料群の血清LPS特異IgAおよびIgGや腸管の総IgAおよびLPS特異IgAレベルは、コントロール飼料群と比べて上昇する傾向であるか、或いは統計的に有意に上昇した。また、飼料中のタンパク質源として用いたOVAに対するIgAレベルは、コントロール飼料群と比べて、AoCPP添加飼料群において有意に高くなった。これらのことから、AoCPPの経口摂取は局所免疫系と全身免疫系の双方を促進するとともに、AoCPPはB細胞にもT細胞にも作用していることが明らかである。粘膜組織で主役を担っている抗体はIgAである。一般に、粘膜IgAの増強が感染防御およびアレルギーの予防や軽減に寄与すると考えられている。また、前章において、CPP-Ⅲの抗原性と比べてAoCPPの抗原性は1/100以下に低下していることを示した。したがって、AoCPPは牛乳アレルギー患者においても、CPP-Ⅲよりもアレルギー症状を発現しにくい粘膜IgA産生促進食品素材となることが期待できる。

要約

AoCPP添加飼料でC3H/HeN系マウスを35日間飼育し、カゼインホスホペプチド無添加（コントロール）飼料およびCPP-Ⅲ添加飼料で飼育したマウスの抗体応答性と比較した。コントロール飼料で飼育したマウスの増体重と、AoCPP無添加飼料で飼育したマウスのそれとの間に統計的有意差は見られなかった。しかし、AoCPPの添加により、腸管および血清のIgAレベルが高くなるとともに、血清中のLPS特異IgGレベルも高くなった。これらの結果から、AoCPPはマウスにおいて局所免疫系だけではなく全身免疫系も増強するものと考えられる。

③ 脱脂乳を原料にしたIgA産生促進ペプチドの効率的調製法の確立

筆者らは、牛乳カゼインをトリプシン消化すると α_{s1} -カゼイン（59-79）や β -カゼイン（1-25）のようなホスホセリン集中域を持つIgA産生促進ペプチドを生じるとともに、ネクロシスを誘導する α -カゼシジン（ α_{s1} -カゼイン（1-3）、（101-103）および（104-105））やアポドシスを誘導する κ -カゼシジン（ κ -カゼイン（17-21））のような細胞傷害性ペプチドも生成することを明らかにしている²⁰⁻²³⁾。そのために、トリプシン消化によりIgA産生促進ペプチドを調製するためにはアルコールによる分別沈殿法により、カゼインホスホペプチドを分離する必要がある。

一方、前々項と前項において、コウジ菌の生産するプロテアーゼA「アマノ」G消化牛乳カゼインから調製したカゼインホスホペプチドは、トリプシン消化カゼインから調製したカゼインホスホペプチドであるCPP-IIIよりもIgA産生促進活性は強く、ホスホセリン集中域を認識した抗体との反応性は低いことを明らかにした。 κ -カゼシジンや α -カゼシジンなどの細胞傷害性ペプチドにはカルボキシ末端に塩基性アミノ酸が存在することが不可欠である²²⁾。プロテアーゼA「アマノ」Gの基質特異性は低く、トリプシンの基質特異性はアルギニルペプチド結合とリジルペプチド結合であり、両者の基質特異性は明らかに異なっている。したがって、プロテアーゼA「アマノ」Gを用いれば脱脂乳からでもエタノールによる分別分画を行わなくてもIgAの産生を促進するペプチドが調製できる可能性がある。そこで、本項では、脱脂乳からIgA産生促進ペプチドの効率的な調製法の確立を目的として検討を行った。

材料および方法

脱脂粉乳

本実験で使用した脱脂粉乳は明治乳業株式会社食品開発研究所から提供されたものである。

酵素

プロテアーゼA「アマノ」Gはアマノエンザイム株式会社から、また、トリプシンVは日本バイオコン株式会社から得た。

酵素消化およびペプチドの調製

脱脂粉乳20 gを80 mlの脱塩水に懸濁し、3M NaOHでpH8.0に調整しながら完全に溶解後、5 mlの脱イオン水に溶解した100 mgの酵素を添加し、脱塩水を加えて全容量を100 mlにした。その溶液を三角フラスコに入れアルミ箔で蓋をして、50℃のウオーターバスに浸し、30分ごとに3M NaOHでpH8.0に調整しながら2時間反応させた。次いで、100 mgの酵素を加え、pH8.0に調整後、さらに2時間反応させた。反応終了後、3M HClで反応液のpHを4.6に調整し、4℃で3000rpm、30分間の遠心分離を行った。得られた上清を回収して2分画した。一方は上清をそのまま凍結乾燥して分析に供した（コウジ菌のプロテアーゼ処理物のpH 4.6上澄みをAoSSと呼び、トリプシン処理物のpH 4.6上澄みをTrSSと呼ぶ）。もう一方は①で示したカゼインホスホペプチドの調製法に準じてペプチドを調製した（コウジ菌のプロテアーゼ処理物から調製したものをAoCPPS、トリプシン処理物から調製したものをTrCPPSと呼ぶ）。

有機リンの定量

有機リンは①項で述べた方法に準じて求めた。

マウス脾臓細胞の培養とIgAの測定

マウス脾臓細胞の培養とIgAの測定は①項で述べた方法に準じて行った。

ゲル濾過

バイオゲルP-6カラムを用いたゲル濾過は①項で述べた方法に準じて行った。

結果および考察

調製したペプチドの収量および有機リン量

プロテアーゼA「アマノ」Gまたはトリプシンで処理した還元脱脂乳から調製したペプチドの収量および有機リン量をTable 4に示した。Table 4から、脱脂粉乳1 gからプロテアーゼA「アマノ」G処理により得られるAoSSおよびAoCPPSはそれぞれ994.0 mgおよび93.2 mgであり、

Table 4: Yields and organic phosphorus amounts

Protease	Prepared peptide	Yield (mg/g)	Organic phosphorus ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Protease A (amano) G	AoSS	994.0	4.4
	AoCPPS	93.2	5.6
Trypsin V	TrSS	528.8	3.2
	TrCPPS	79.9	5.4

それらのペプチド1 mgあたりに含まれる有機リン量は前者で4.4 mgであり後者で5.6 mgであることがわかる。一方、脱脂粉乳1 gからトリプシン処理により得られるTrSSおよびTrCPPSはそれぞれ528.8 mgおよび79.9 mgであり、それらのペプチド1 mgあたりに含まれる有機リン量は前者で3.2 mgであり後者で5.4 mgであることがわかる。

プロテアーゼA「アマノ」G処理還元脱脂乳では用いた脱脂乳成分のほとんどすべてがpH4.6可溶性画分として回収されたことから、ほとんどすべてのたんぱく質が水溶性ペプチドになったものと思われる。これに対して、トリプシンではpH4.6可溶性成分としては52.8%しか回収されなかった。このことは、カゼインは疎水域と親水域が局在しているためにリジンとアルギニンの位置だけの切断ではたとえペプチドが生じても疎水性ペプチドであるためにpH4.6で沈殿したためと考えられる。一方、従来のカゼインホスホペプチドの調製法により得られるペプチド (AoCPPS) 量はプロテアーゼA「アマノ」GではpH4.6可溶性ペプチドのおよそ1/10であり、トリプシンではおよそ1/15であった。また、それら有機リン量はともにおよそ5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。前々項で、プロテアーゼA「アマノ」G処理カゼインから調製されるペプチド1 mgには59.2 μg の有機リンが含まれていることを示した。同じエタノール処理により得られる沈殿物でも、脱脂乳を基質とした場合とカゼインを基質とした場合で有機リン量が10倍も異なることの原因は本実験の結果だけでは明らかでなく、さらに検討を要するところである。

マウス脾臓細胞によるIgA産生への調製ペプチドの作用

マウス脾臓細胞培によるIgA産生への調製ペプチドの作用を調べ、その結果をFig. 7に示した。

Fig. 7から、プロテアーゼA「アマノ」G処理還元脱脂乳およびトリプシン処理還元脱脂乳から従来のカゼインホスホペプチドの調製法に準じて調製したAoCPPSおよびTrCPPSはともにIgA生産促進活性を有していることがわかる。一方、トリプシン処理還元脱脂乳から調製したTrSS、すなわちpH4.6の上澄みにはIgA生産促進活性は見られないが、プロテアーゼA「アマノ」G処理還元脱脂乳のpH4.6の上澄みであるAoSSにはAoCPPSのおよそ半分のIgA生産促進活性が見られる。

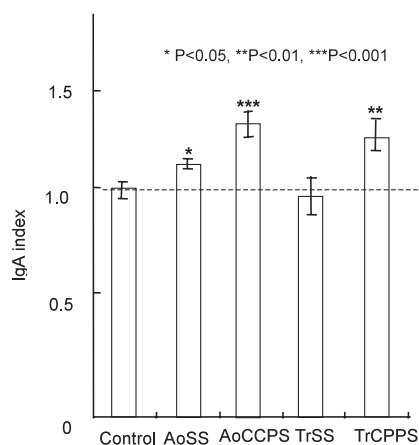


Fig. 7: Effects of peptides prepared from skim milk digested with protease A(amano) G or trypsin V on production of IgA in mouse spleen cell cultures.

AoSSは還元脱脂乳にプロテアーゼA「アマノ」Gを4時間作用させた後のpH4.6上澄みであり、調製には特別な装置も技術も必要でないとともに、用いた脱脂乳のおよそ99%の成分がこの画分として回収できる。したがって、たとへIgA生産促進活性はカゼインホスホペプチドの調製処理を行ったAoCPPSの半分であっても、調製方法の簡便さとコストを考慮すれば、AoSはIgA生産促進食品素材や飼料素材としての利用が十分に期待でき、さらに動物への経口投与試験を行うことが望まれる。なお、トリプシン処理カゼインのpH4.6上澄みはリンパ球に細胞傷害を誘導することを筆者らは確認しているが²⁰⁻²³⁾、トリプシン処理還元脱脂乳のpH4.6上澄みにはプロテアーゼA「アマノ」Gの場合のようなIgA生産促進活性は見られなかった。この原因としては、IgA生産を促進するカゼインホスホペプチドとともに、細胞傷害性を示すペプチドも同時に生成したためと考えられる。トリプシン消化物においてもカゼインホスホペプチドの調製に従来用いられているエタノール沈殿処理を行った画分 (TrCPPS) にはIgA生産促進活性があったことがこの推察を裏付けている。

ゲル濾過

プロテアーゼA「アマノ」Gとトリプシン処理還元脱脂乳から調製したペプチドのバイオゲルP-6カラムにおける溶出パターンを調べ、その結果をFig. 8に示した。Fig. 8から、AoCPPSおよびTrCPPSともに、主要ペプチドはAoSSやTrSSよりも早く溶出する傾向にあることがわかる。本結果は、カゼインホスホペプチドは調製したペプチドの中では分子量の相対的に大きなペプチドであることを示唆している。また、プロテアーゼA「アマノ」Gの方がトリプシン

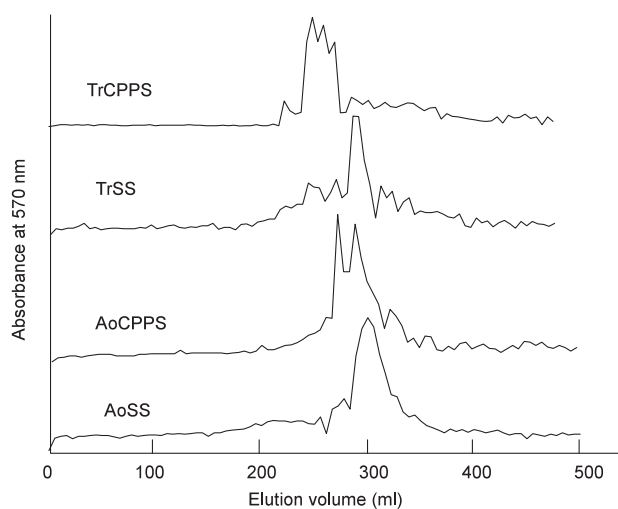


Fig. 8: Elution profile of the prepared peptide on Bio-Gel P-6 column.

よりもペプチドをより低分子化しており、コウジ菌のプロテアーゼが牛乳カゼインを原料にした牛乳アレルギーの予防や治療のためのペプチドの調製に使用されていることを裏付けている。

要約

*Aspergillus oryzae*の生産するアルカリ性プロテアーゼであるプロテアーゼA「アマノ」Gを脱脂乳に作用させて得られる上澄みは用いた脱脂乳固形物のおよそ99%が含まれるとともに、その上澄みはマウス脾臓細胞によるIgA産生を統計的に有意に促進した。

結 論

カゼインホスホペプチドは実験動物や家畜、ヒトなどへの経口投与により腸管IgAレベルを上昇させることに基づき、カゼインを基質に用いて市販の食品用プロテアーゼから、IgA産生促進活性が強く、ホスホセリン集中域を認識している抗体との反応性の低いカゼインホスホペプチドを生成するプロテアーゼとして、コウジ菌の生産するアルカリ性プロテアーゼであるプロテアーゼA「アマノ」Gを選択した。本プロテアーゼを50℃で4時間作用させた還元脱脂乳のpH4.6上澄みは脱脂乳の固形物のおよそ99%を含み、マウス脾臓細胞培養系においてIgA産生を統計的に有意に促進した。これらのことから、脱脂粉乳とコウジ菌の生産するアルカリ性プロテアーゼを原料にすることにより、極めて簡便な手法によりIgA産生を促進する免疫調節食品素材が調製できる可能性がある。また、コウジ菌の生産するアルカリ性プロテアーゼやトリプシンで処理した還元脱脂乳から、従来のカゼインホスホペプチドの調製方法を用いることにより、より強いIgA産生促進活性をもつペプチドの調製が可能である。

文 献

- 1) 清野 宏、石川博通、名倉 宏編：粘膜免疫－腸は免疫の司令塔、東京、中山書店、2001.
- 2) Y. S. Lee, T. Noguchi and H. Naito: Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides, Br. J. Nutr., 49, 67, 1983.
- 3) I. Hata, S. Higashiyama and H. Otani: Identification of a phosphopeptide in bovine α_{s1} -casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures, J. Dairy Res., 65, 569, 1998.
- 4) 大谷 元：牛乳カゼイン由来ペプチドの栄養生理機能－特に、カゼインホスホペプチドと κ -カゼイノグリコマクロペプチドの免疫調節機能とそれらの新生仔における生理的役割に関する一考察、ミルクサイエンス、47, 183, 1998.
- 5) 大谷 元：牛乳カゼインの消化により生成するペプチドの免疫調節機能、ミルクサイエンス、50, 139, 2001.

- 6) 大谷 元：カゼインホスホペプチドの新たな生体調節活性：免疫調節作用、New Food Industry, 44, 1, 2002.
- 7) A. Hosono, H. Otani, H. Yasui and M. Watanuki, Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk (review), Anim. Sci. J., 73, 241, 2002.
- 8) H. Otani: Immunomodulatory function of casein fragments, In "Bio-defensive Function of Dairy Foods" (Eds. by K. Shimazaki and H. Otani), p.1. Research Signpost, 2002.
- 9) 大谷 元：カゼインホスホペプチドは腸管IgA産生を促進する～感染予防食品素材や抗アレルギー食品素材として期待、化学と生物、41, 428, 2003.
- 10) S. Toyoshima, M. Iwata and T. Osawa: Kinetics of lymphocyte stimulation by concanavalin A, Nature, 264, 447, 1976.
- 11) H. Otani, T. Watanabe and Y. Tashiro: Effect of bovine β -casein (1-28) and its chemically synthesized partial fragments on proliferative responses and immunoglobulin production in mouse spleen cell cultures, Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 2489, 2001.
- 12) H. Otani and T. Watanabe: Enhancement of immunoglobulin A formation by a casein phosphopeptide, bovine β -casein (1-28), via modulation of cytokines produced by Th2 type of lymphocytes in mouse spleen cell cultures, Milchwissenschaft, 60, in press, 2005.
- 13) H. Otani, K. Nakano and T. Kawahara: Stimulatory effect of a dietary casein phosphopeptide preparation on the mucosal IgA response of mice to orally ingested lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 729, 2003.
- 14) H. Otani and S. Wakatsuki: Reduction of allergic symptoms in NC/Jic1 mice given a diet containing a commercially available casein phosphopeptide preparation, CPP-III, Anim. Sci. J., 75, 147, 2004.
- 15) D. Yan, H. R. Zhou, K. H. Brooks and J. J. Pestka: Potential role for IL-5 and IL-6 in enhanced IgA secretion by Peyer's patch cells isolated from mice acutely exposed to vomitoxin, Toxicol., 122, 145, 1997.
- 16) H. Otani, H. Kitamura, M. K. Park, Y. Kihara, T. Oshida and Kusuhara S.: Enhancement of intestinal IgA levels in piglets by oral administration of a commercially available casein phosphopeptide preparation Milchwissenschaft, 55, 429, 2000.
- 17) H. Otani, Y. Kihara, and M. K. Park: The immunoenhancing property of a dietary casein phosphopeptide preparation in mice Fd. Agric. Immunol., 12, 165, 2000
- 18) H. Kitamura, T. Oshida, H. Otani, S. Wakaduki and S. Kusuhara: Milk immunoglobulin levels in sows given a diet containing a commercially available casein phosphopeptide preparation, CPP-I, during pregnancy, Milchwissenschaft, 57, 486, 2002.

- 19) H. Kitamura and H. Otani: Fecal IgA levels in healthy persons who ingested cakes with or without bovine casein phosphopeptides, *Milchwissenschaft*, 57, 611, 2002.
- 20) H. Otani and I. Hata: Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests, *J. Dairy Res.*, 62, 339, 1995.
- 21) M. A. Matin and H. Otani: Isolation and characterization of a cytotoxic pentapeptide, κ -casecidin, from bovine κ -casein digested with bovine trypsin. *Anim. Sci. J.* 71, 197, 2000.
- 22) M. A. Matin and H. Otani: Cytotoxic and antimicrobial activities of chemically synthesized κ -casecidin analogue peptides, *J. Dairy Res.*, 69, 330, 2002.
- 23) H. Otani and H. Suzuki; Isolation and characterization of cytotoxic small peptides, α -casecidins, from bovine α s1-casein digested with bovine trypsin, *Anim. Sci. J.* 74, 427, 2003.
- 24) 斎藤安弘：CPPの生理活性と機能性食品への応用、*ジャパンフードサイエンス*、29, 21, 1990.
- 25) 大谷 元：アレルギー低減化食品としての発酵乳、「発酵乳の科学—乳酸菌の機能と保健効果」(細野明義編)、p.148、*アイ・ケイコーポレーション*、2002.
- 26) F. M. Zhang and H. Otani: Immunogenicity and antigenicity of casein phosphopeptides, *Milchwissenschaft*, 58, 9, 2003.
- 27) E. C. Reynolds, P. F. Riley, and N. J. Adamson: Selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification, *Anal. Biochem.*, 217, 277, 1994.
- 28) 中村道徳：燐酸の比色定量法、*日本農芸化学会誌*、24, 1, 1950.