

牛乳成分、特にそのタンパク質に由来する生理活性物質に関する研究

—牛乳タンパク質に由来する細胞増殖促進活性ペプチドの検索—

東京大学農学部農芸化学科畜産物利用学研究室

教授 山内 邦男

東 徳洋

長 睦 慎一

上野川 修一

目 的

牛乳タンパク質は、優れたアミノ酸供給源として我々の健康維持に大きな役割を果たしてきたが、最近、牛乳タンパク質中にはラクトフェリン等、生体内で様々な機能を果たす可能性のある成分が存在していることが明らかになり、優れた天然の機能性食品としての特徴を持つことが示唆されている。一方、ホルモンをはじめとする情報伝達機能を持つタンパク質についての最近の研究の発展にともない、バソプレシン、ニューロテンシン、アンジオテンシン、ブラジキニン等、低分子のペプチドが重要な生理活性を持つことが明らかにされた。このような発見を機に、牛乳タンパク質のうち、従来生理活性は持たないとされていたカゼインの酵素分解ペプチドが注目され、 β -カゾモルフィン、 α -エクスルフィンを初めとする機能ペプチドが相次いで発見された。これらの研究により、カゼインは様々な機能ペプチドの前駆体ではないかという推測がなされるようになった。そこで我々は新たな機能として細胞増殖促進活性を選び、カゼインの中でもヒトと牛に共通な成分である β -カゼインの消化酵素分解物中に細胞増殖促進活性ペプチドを検索することを試みた。

材料及び方法

ホルスタイン種の個乳を脱脂し等電沈澱によりカゼイン画分を得た。これよ

り Fox and Guineyの方法¹⁾により粗 β -カゼイン画分を得、さらにこれを DEAE-Sephacelイオン交換クロマトグラフィーにより精製したものを牛 β -カゼインとした。この牛 β -カゼインにpH8.0、37℃条件下でトリプシンを24時間作用させ、この分解物をC₈逆相HPLCにて各ペプチドに分画し、DNA合成促進活性を検索した。DNA合成促進活性の測定は、BALB/3T3細胞をスパーズ法²⁾でG₀またはG₁期に同調させ、各ペプチドを添加し48時間作用させた後の、細胞への³H-チミジン取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定し、そのカウント数をもってDNA合成促進活性とした。活性の確認は該当ペプチドをペプチドシンセサイザーを用いて合成し、再度DNA合成促進活性を測定することにより行った。

結 果

β -カゼイントリプシン分解物の逆相HPLC分画パターンと、その各フラクションのDNA合成促進活性を図1に示す。この結果によりフラクション6に活性が認められ、これに属するピーク6に活性があると推測された。このピーク6を分取し、アミノ酸分析を行った結果を表1に示す。この結果とすでに知られている β -カゼインの一次構造を比較した結果、このピーク6は、 β -カゼインの一次構造上177番目のアスパラギン酸から、183番目のアルギニンに至る7残基からなるペプチド β -CN (f177-183)であることが判明した。牛 β -カゼインの一次構造と β -CN (f177-183)の存在する位置を図2に示した。さらに確認のため、この β -CN (f177-183)に相当する合成ペプチドのDNA合成促進活性のDose Responseを調べた結果、図3に示すように活性が確認された。

考 察

本研究において、牛乳 β -カゼイン酵素分解ペプチド中に、DNA合成活性を持つものが存在することが明らかになった。牛乳をはじめとする乳の摂取対象である乳児は、その各器官とも未だ増殖段階にあると思われるので、多量の増

殖因子が必要となるはずである。今回同定された β -CN (f177-183) ペプチドは乳児の腸管内で生成すると考えられ、これが増殖段階にある乳児の消化管に直接作用して細胞の増殖を助けている可能性がある。さらには腸管により吸収され血流に乗って他の臓器に作用していることも考えられる。またこの β -CN (f177-183) ペプチドはDNA合成活性を持つペプチドとしては最も短いものであるが、このペプチドは同時にアンジオテンシンコンバーターの阻害作用、即ち降圧作用があることが知られており³⁾、今回の発見で複数の機能を持つ多機能ペプチドであることも明らかになった。今回の結果は、牛乳が単に栄養素の給源として優れているだけでなく、生理機能の面でも優秀な食物であることを示したものである。

引用文献

- 1) Fox, P. F. and Guiney, J. (1972) *J. Dairy Res.* 39, 49-53.
- 2) Nishikawa, K. (1982) *Biochem. Intl.* 4, 169-175
- 3) Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N. and Suzuki, H. (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49, 1405-1409.

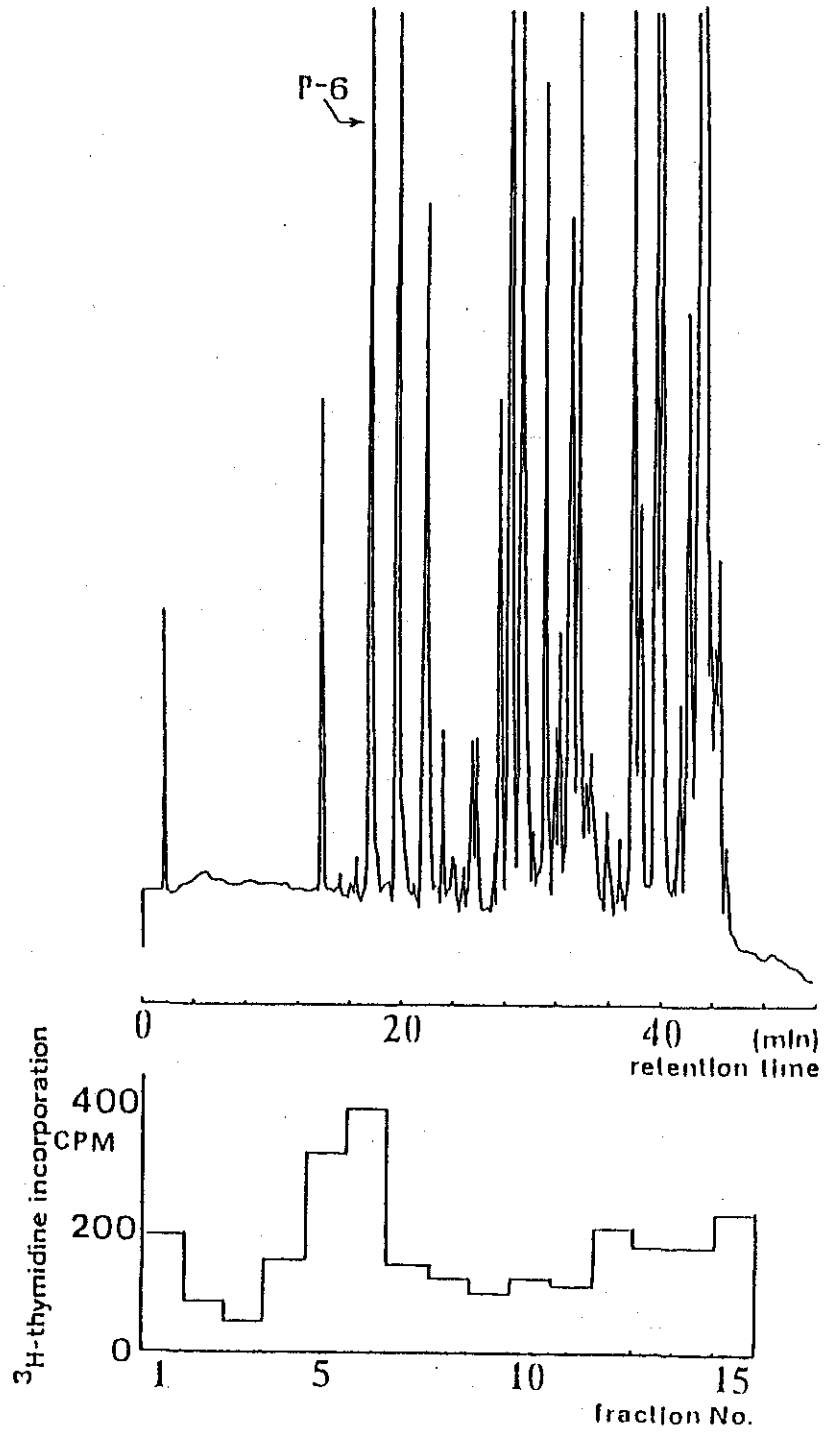


図1. β -カゼインのトリプシン分解物の逆相HPLCパターンと各フラクションのDNA合成促進活性

表1. ピーク6 (P - 6) のアミノ酸組成

	P - 6	β - CN (f 1 7 7 - 1 8 3)
G l u + G l n	1.1 0	1
P r o	2.1 9	2
A l a	1.0 3	1
V a l	0.9 9	1
T y r	1.0 4	1
A r g	1.0 0	1

左側の数字は Arg を 1 とした時の分析値、右側はこのペプチド 1 分子中の各アミノ酸残基の数を示す。両者は一致している。

1	10	20
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-		
21	30	40
Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-		
41	50	60
Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-		
61	70	80
Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-		
81	90	100
Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-		
101	110	120
Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe-Thr-		
121	130	140
Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Pro-Leu-Leu-Leu-		
141	150	160
Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-		
161	170	180
Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-		
181	190	200
<u>Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-</u>		
201	210	220
Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val		

BOVINE beta-Casein-A2

図 2. β - カゼイン (A 2 変異体) と β - CN (f 1 7 7 - 1 8 3) の一次構造

β - CN (f 1 7 7 - 1 8 3) はアンダーラインで示した部分が相当する。

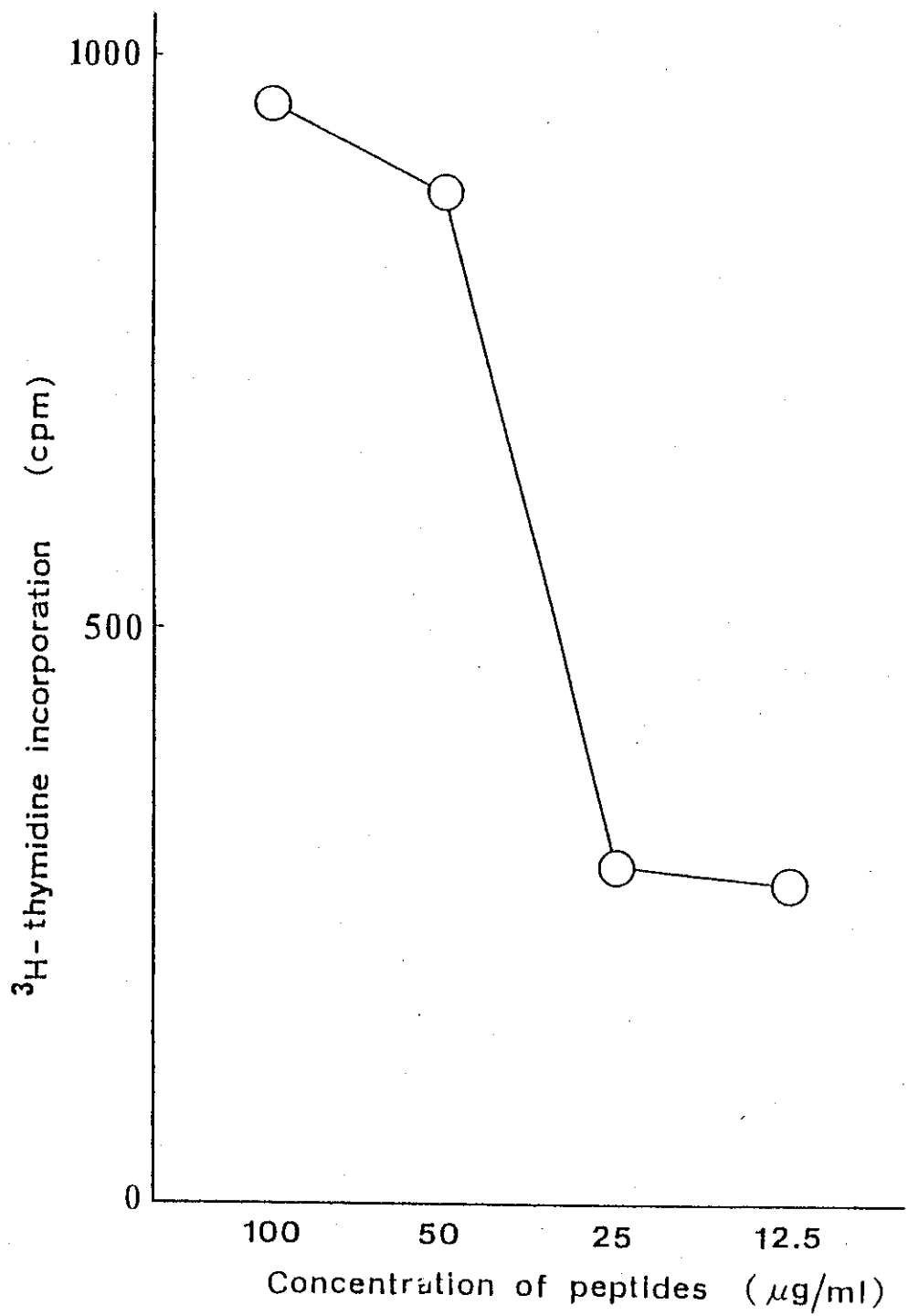


图3. 合成 $\beta\text{-CN}(177-183)$ 的Dose Response