

# 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 山内邦男  
長 睦 慎 一  
清 水 誠  
上野川 修 一

## 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，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 $\beta$ -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， $\beta$ -CN (f 177-183) はアンジオテンシン変換酵素の阻害活性を示し<sup>1)</sup>，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<sup>2)</sup>ことから，多機能性ペプチドとして関心を集めている。しかし，このようなペプチドが，他の増殖因子とは全く別個に，単独で細胞の増殖を引き起こし得るものなのかについては明らかではない。我々は今回，このペプチドがどのようなメカニズムで細胞の増殖を促進するのかについて考えると共に，牛乳カゼイン中に他にも同様のペプチドが存在しないか検討した。さらに，このようなペプチドが消化管細胞に及ぼす影響についても若干の実験を試みた。

## 材料と方法

$\alpha$ s<sub>1</sub>-及び $\beta$ -カゼインは常法により調整し，DEAE-クロマトグラフィーに

よって精製した。これ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離精製した。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したものも用いた。マウス繊維芽細胞としてはBALB/c3T3 (3 K) 細胞を用い、DNA合成促進活性はスパース法<sup>3)</sup>で測定した。また、消化管細胞としてラット新生児胃細胞を用いて、同様の方法で増殖活性の測定を試みた。

## 結果と考察

### (1) ペプチドの示す増殖促進活性の特性

本研究で用いてきたスパース法は、飢餓状態(0.2% FCS中)に置いてG<sub>0</sub>またはG<sub>1</sub>期に同調させた細胞にペプチドを加え、48時間後に<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量を測定するものであるが、本方法でペプチドの細胞増殖促進活性を測定すると、その活性の強さは実験によってかなりの変動することが観察された。 $\beta$ -CN (f 177-183)を加えた場合にも、その活性は10% FCSを加えた時(Positive control)の0~40%と変動した。このことは、細胞の生理的状态(例えば細胞がG<sub>0</sub>期にあるのかG<sub>1</sub>期にあるのか等)によってペプチドの作用し易さが異なるということを示唆している。そこで、飢餓状態の細胞をあらかじめ短時間10% FCSで処理し、細胞の多くをG<sub>1</sub>期に導いた場合、またG<sub>0</sub>期に細胞には作用しないがG<sub>1</sub>期の細胞には作用してDNA合成を促進させる上皮細胞増殖因子(EGF)を共存させた場合にペプチドの作用はどうなるかについて検討した。

図1に示したように、10分間FCSで処理することによって細胞のDNA合成活性は十倍近く上昇するが、 $\beta$ -CN (f 177-183)が共存するとその活性はさらに数倍上昇することが明らかになった。特にEGFが共存する場合にはその効果が大きく、このペプチドは細胞のEGF取り込みを促進するか、あるいはEGFと協力的に作用して細胞の増殖を高めるものと考えられた。FCSでの処理時間を30分に延長したときも同様な効果が認められたが、この場合にはEGFが共存しなくてもペプチドは強力に細胞の増殖を促進した。FCS中にはPDGF(血小板由来細胞増殖因子)等が存在し、これはG<sub>0</sub>期にある細胞をG<sub>1</sub>期に誘導する作用を持つ

ことが知られている。 $\beta$ -CN (f 177-183) ペプチドはG<sub>1</sub>期にある細胞に作用し、それがS期、G<sub>2</sub>期へと進行していくのを助けるものと考えられたが、EGFとの関わりなどまだ不明の点も多く、今後の研究課題である。

## (2) 他のカゼインペプチドの増殖活性

$\alpha$ <sub>S1</sub>-カゼインの消化酵素による分解物、及び合成ペプチドをもちいて、スパース法により3T3細胞の増殖促進活性を測定した。その結果、トリプシン分解ペプチドである $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (f 106-125) と $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (f 61-110) に細胞増殖促進活性があることが見いだされた。また、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (f 106-125) については合成ペプチドをもちいてその活性が確認された (図2)。

## (3) ラット新生児胃細胞の増殖に及ぼすペプチドの作用

ラット新生児胃細胞を10%FCSを含むDMEM培地中で培養し3T3細胞と同様の方法を用いてその増殖に及ぼすペプチドの影響を調べた。 $\alpha$ <sub>S1</sub>-CN (f 106-125) 及び $\beta$ -CN (f 177-183) を用いて実験を行ったが、細胞増殖の促進活性は認められなかった (データ省略)。しかし、本結果は胃細胞の測定を3T3細胞と同条件で行ったことに起因する可能性が強く実験条件の検討を含めて再度実験を試みる予定である。

以上の結果から、牛乳のカゼインに由来するペプチドは既知の細胞成長因子であるPDGFやEGFと協力的に働いて3T3細胞の増殖を促進することが示唆された。その詳細な機能メカニズムについては検討中である。また、 $\beta$ -CN (f 177-183) 以外にも、 $\alpha$ <sub>S1</sub>-カゼイン中に細胞増殖促進活性を有するペプチドが存在することを認めた。

## 参考文献

- 1) S. Murayama, K. Nakagomi, N. Tomizuka and H. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405(1985).
- 2) 竹中昭雄, 野口 忠, 内藤 博, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 1987, p. 269.
- 3) K. Nishikawa, *Biochem. Intl.*, 4, 169(1982).

図1  $\beta$ -CN (f177-183) ペプチドの3T3細胞増殖活性におよぼす  
FCS 処理およびEGF の影響

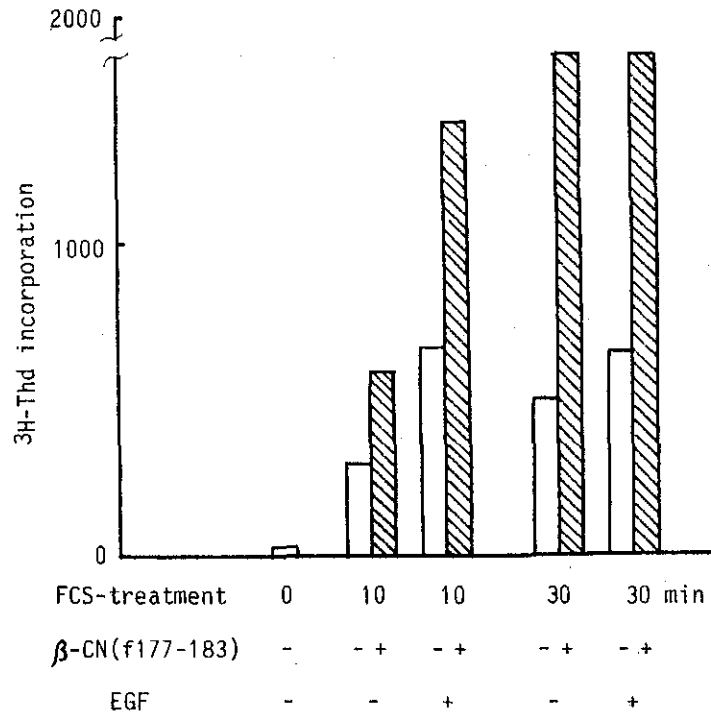


図2 合成した $\alpha$ <sub>1</sub>-カゼインペプチドによる3T3細胞のDNA合成促進

