

脱脂粉乳の有効利用による生活習慣病の予防に関する研究

京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品生理機能学分野

教授 吉川 正明

講師 大日向 耕作

非常勤研究員 臼田 八郎

大学院生 趙 慧

研究生 侯 依静

要約

脱脂粉乳の主成分である乳タンパク質の持つ生活習慣病予防機能を、タンパク質の消化によって派生する生理活性ペプチド、および未消化の乳タンパク質そのものが示す機能という2つの観点から解析した。

κ -カゼイン由来のLeu-Ser-Arg (LSR)、および β -ラクトグロブリン由来のHis-Ile-Arg-Leu (β -lactotensin) は、いずれも高コレステロール食給餌マウスへの経口投与 (100 mg/kg) で迅速な血中コレステロール低下作用を示した。両ペプチドはラットにおいて、胆汁酸分泌促進作用を示したが、この作用が、迅速な血中コレステロール低下作用と関連していると考えられる。そこで、両ペプチドによる胆汁酸分泌促進作用機構を解析し、LSRの場合はアセチルコリン、および一酸化窒素 (NO) が関与するのに対し、 β -lactotensinの場合はドーパミンが関与することを見出した。

茶カテキンは経口投与の際に一過性の血圧降下作用を示すが、乳タンパク質、または脱脂粉乳との複合体として投与した場合には、持続的な血圧降下作用を示した。その際、乳清タンパク質の寄与が大きいことを示す結果が得られた。乳タンパク質はカテキンの腸管吸収を遅延させることによって、血圧降下作用に持続性を与えるものと考えられる。

キーワード

脱脂粉乳、乳タンパク質、ペプチド、カゼイン、乳清タンパク質、 β -ラクトグロブリン、コレステロール、胆汁酸、ニューロテンシン、カテキン、自然発症高血圧ラット (SHR)、血圧

はじめに

牛乳は各種栄養素を高濃度に含有する食品であるが、脱脂粉乳は牛乳成分のうち、乳脂肪のみが除かれている点で、特に脂肪やカロリーの過剰摂取が気になる人にとっては理想的な食品と言える。しかしながら、クリームおよびバター生産の際の副産物として大量に生産される脱脂粉乳は、十分に有効利用されているとは言い難い状況にある。以下では、脱脂粉乳の利用促進を図る目的で、1. 乳タンパク質由来のコレステロール低下ペプチドに関する研究、および昨年度に続いて、2. 乳タ

ンパク質との複合体形成による茶カテキンの血圧降下作用の持続化に関する研究を実施した。

1. 乳タンパク質由来のコレステロール低下ペプチド

乳タンパク質は、カゼインと乳清タンパク質からなり、その比率は約4：1である。従来、牛乳タンパク質の主要成分であるカゼインは血中コレステロールを上昇させると言われてきたが、少なくともマウスを用いた我々の検討では、カゼインは血中コレステロールレベルを上昇させなかった。今回我々は、カゼインに由来する低分子ペプチドLeu-Ser-Arg (LSR) が経口投与の際にコレステロール低下を示すことを見出した。さらに、乳清タンパク質である β -ラクトグロブリンから派生する β -lactotensin (His-Ile-Arg-Leu, HIRL) もコレステロール低下作用を示した。本研究では、これら2種類のコレステロール低下ペプチドの作用機構についても検討した。

1-1. κ -カゼイン由来のコレステロール低下ペプチドLSR

以前に牛乳(-カゼインのトリプシン消化物から回腸収縮ペプチドとして単離したcasoxin C (Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg, YIPIQYVLSR) (Takahashi et al., 1997; Peptides 18: 329-336) のフラグメントペプチドの中から、コレステロール低下作用を有する最小単位として、C末端3残基に相当するLeu-Ser-Arg (LSR) が得られた。

1-1-1. LSRおよび関連ペプチドのコレステロール低下作用

雄性ICR系マウスに高コレステロール食(粉末飼料CE2に1%コレステロール、0.5%コール酸を添加)を3日間給餌した後に、LSR 100 mg/kg (270 μ mol/kg) とモル数が等しくなるようにcasoxin C

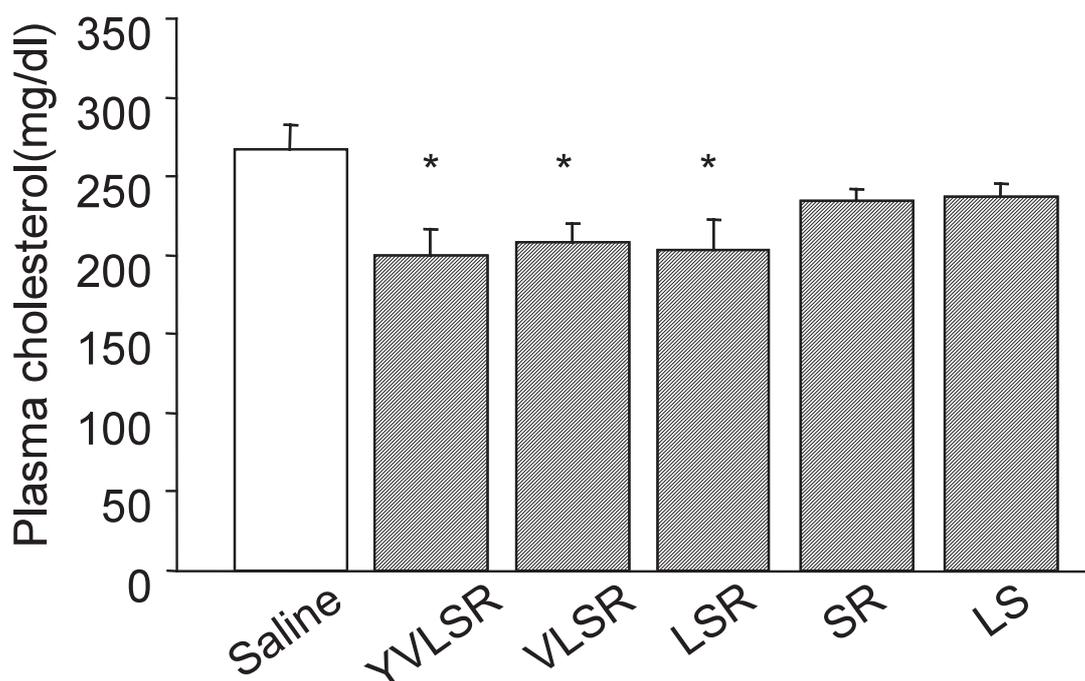


図1. Casoxin C類縁体の腹腔内投与によるコレステロール低下作用

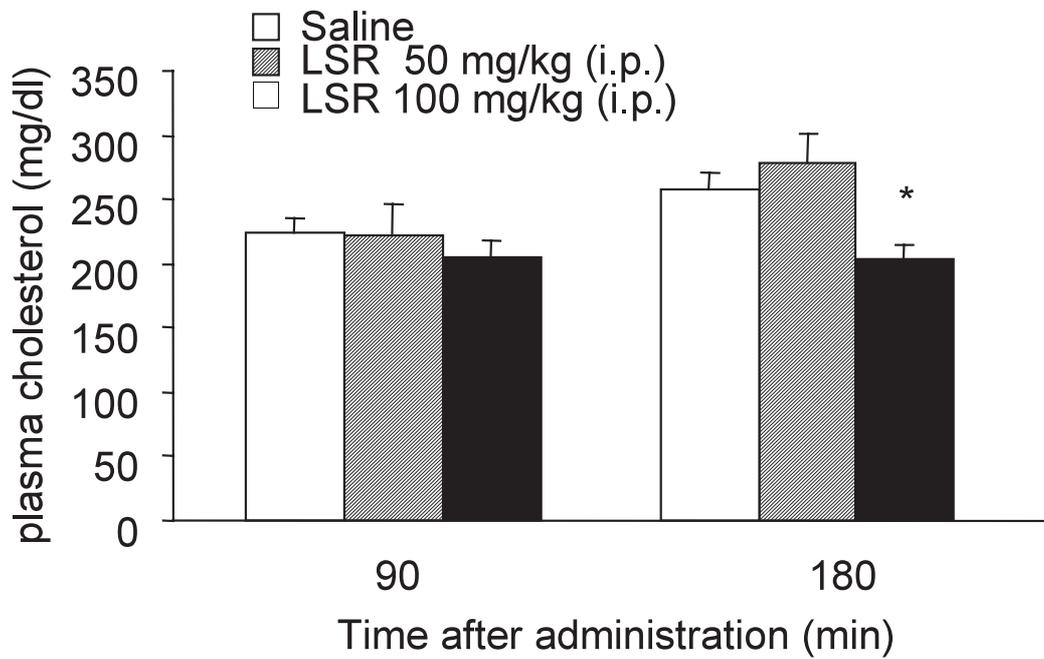


図2. LSRの腹腔内投与による血中コレステロール濃度の経時変化

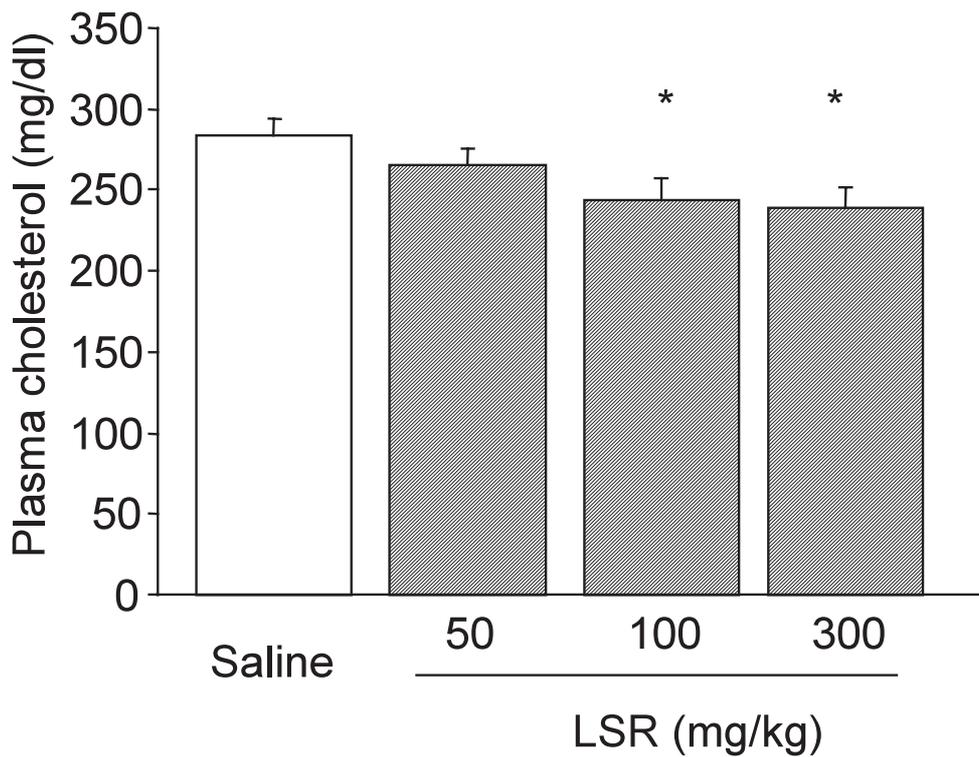


図3. LSRの経口投与による血中コレステロール低下作用

のC末端フラグメントペプチド (YVLSR: 170 mg/kg, VLSR: 130 mg/kg, LSR: 100 mg/kg, SR: 70 mg/kg, LS: 60 mg/kg) を腹腔内投与後、経時的に採血し、血中コレステロールを酵素法で測定した。その結果、C末端3-5残基に相当するYVLSR、VLSR、LSRの腹腔内投与により短時間で血中コレステロールの低下作用が認められたが、LSおよびSRには活性が認められなかった (図1、2)。したがって、コレステロール低下作用に必要な最小構造は3残基のLSRであることが明らかとなった。回腸収縮活性に必要な最小構造はYVLSRであることから、回腸収縮活性はコレステロール低下作用に必須でないことがわかった。さらに、LSRを100 mg/kg経口投与したところ、血中コレステロールレベルの低下が認められた (図3)。LSRは低分子ペプチドであるため、速やかに吸収されコレステロール低下作用を示したものと考えられる。

1-1-2. LSRの胆汁酸分泌促進作用

次に、LSRのコレステロール低下作用のメカニズムについて検討した。コレステロールは肝臓中で胆汁酸に異化され消化管内に排出されることが知られている。LSRの腹腔内投与および経口投与より3時間という短時間内に血中コレステロール低下作用が認められたことから、肝臓からの胆汁酸分泌が亢進している可能性が考えられた。そこで、LSRの胆汁酸分泌に及ぼす影響を検討した。

7-9週齢の雄性SDラットの胆管と十二指腸にカニューレを挿入した後に、LSRを十二指腸内投与し、胆汁を採取して、その体積と、酵素法により求めた胆汁酸濃度から総胆汁酸量を計算した。LSR (100 mg/kg) 投与後60-90分をピークとした胆汁酸濃度の上昇が認められ、その曲線下面積が有意に高い値を示したことから、LSRは胆汁酸分泌促進作用を有することが明らかとなった (図4、5)。

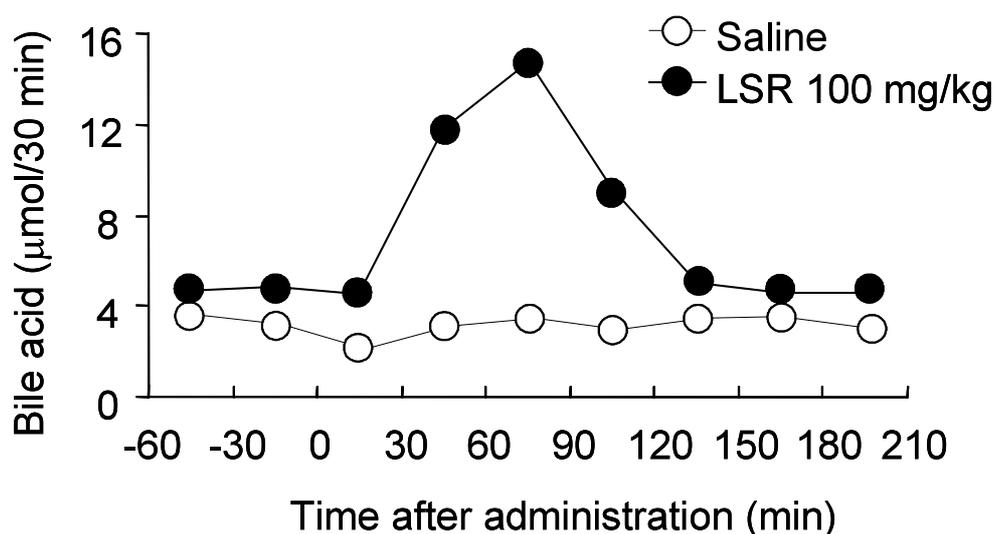


図4. LSRの十二指腸内投与による胆汁酸分泌促進作用

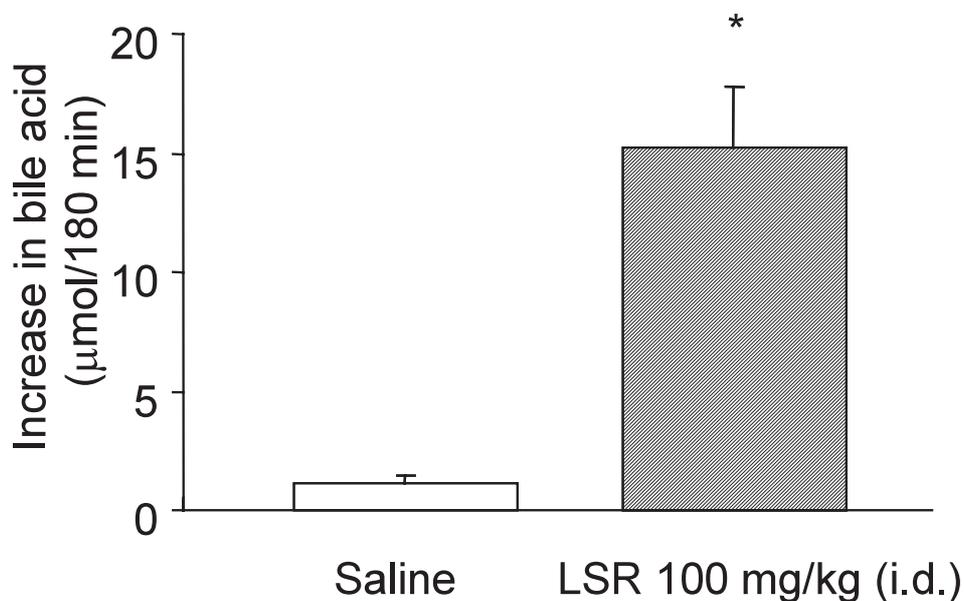


図5. LSRの十二指腸内投与による胆汁酸分泌の増加

1-1-3. LSRの胆汁酸分泌促進の作用機構

次に、LSRの胆汁酸分泌促進の作用機構を検討した。LSRの胆汁酸分泌促進作用は、ムスカリン性アセチルコリンのアンタゴニストであるアトロピン、および一酸化窒素(NO)合成酵素の阻害剤であるN^G-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を前処置することにより阻害されたことから(図7)、LSRの胆汁酸分泌促進作用はアセチルコリンとNOを介していることが判明した(図6)。

casoxin Cの回腸収縮作用は補体C3aレセプターを介しているが、本レセプターとの結合にはYVLSRという構造が最小限必要であることから、LSRの胆汁酸分泌促進およびコレステロール低下作用は補体C3aレセプターを介したものではない。LSR配列はレプチン、成長ホルモン、セクレチン、CGRP、PAMPなど種々のホルモンの一次構造中に存在することを見出しており、今後、これらの受容体を含め、LSRが結合する受容体を解明することが必要である。

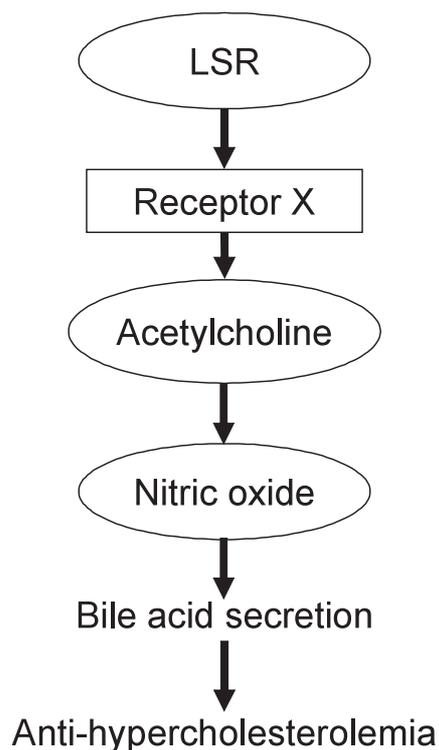


図6. LSRのコレステロール低下機構

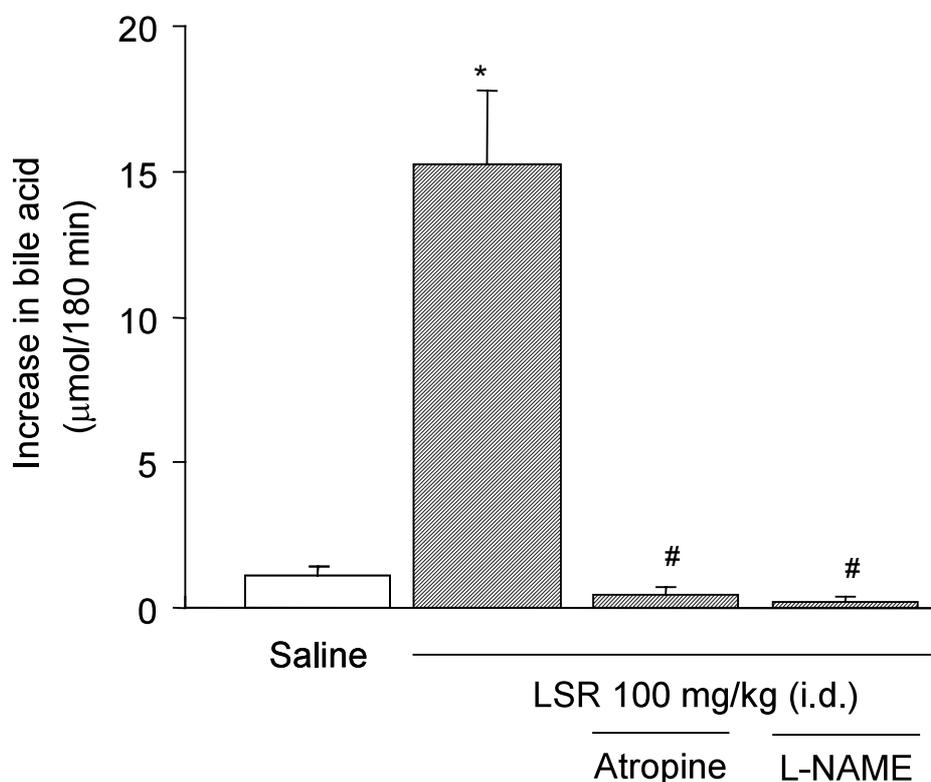


図7. LSRの胆汁酸分泌促進作用に及ぼすatropineとL-NAMEの影響

1-1-4. カゼインからのLSRの生成条件

消化管内での酵素消化を想定し、試験管内でカゼインをペプシンとトリプシンで消化したところ、VLSRは生成したが、LSRは検出されなかった。しかし、微生物由来のサーモリシンおよびトリプシンで消化することによりLSRが生成することが判明した。これは、サーモリシンにより κ カゼイン中に存在するLSR配列のLeuのN末端側で切断され、さらにトリプシンによりLSRのArgのC末端側でされたためと考えられる。事実、ラットではカゼインをタンパク質源とする高コレステロール食を長期投与すると血中コレステロールレベルが上昇するが、カゼインのサーモリシン消化物の投与により、コレステロールレベルの上昇が抑制されることを観察している (data not shown)。このことは、通常の消化過程ではカゼインから派生しないLSRが、サーモリシンで前処置したカゼインを投与することによって消化管内で生成することを示唆している。カゼインは脱脂粉乳のタンパク質の主成分であることから、本実験結果は、脱脂粉乳の有効利用を考える上で極めて有用な知見といえる。

なお、LSR配列は牛乳 κ -カゼイン以外にも大豆グリシニンの一次構造中に存在し、サーモリシンおよびトリプシンで消化することによってLSRが派生することも見出している。

1-2. β -ラクトグロブリン由来のコレステロール低下ペプチド β -lactotensin

牛乳カゼインとは対照的に、乳清タンパク質は血清コレステロール低下作用を有することが知られている。 β -ラクトグロブリンから派生するIle-Ile-Ala-Glu-Lys (IIAEK) は200 mg/kgの経口投与により、コレステロール低下作用を示すことが報告されている (Nagaoka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001; 281: 11-17)。一方、以前に我々が β -ラクトグロブリンのキモトリプシン消化物から回腸収縮ペプチドとして単離した β -lactotensin (His-Ile-Arg-Leu, HIRL) (Yamauchi et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003; 67: 940-943, Peptides 2003; 24: 1955-1961) は100 mg/kgの単回経口投与で迅速な血清コレステロール低下作用を示す。そこで、その作用機構を検討した。

1-2-1. β -lactotensinのコレステロール低下作用

高コレステロール食を3日間給餌した雄性ICR系マウスに対し、 β -lactotensinを経口投与した後に、経時的に採血し、血清コレステロール濃度を測定した。その結果、100 mg/kgの β -lactotensinを経口投与した90分後に血清コレステロール値が有意に低下した (図8)。このように β -lactotensinによるコレステロール低下作用も短時間で起こることから、LSRの場合と同様、胆汁酸分泌を促進するかどうかを検討した。

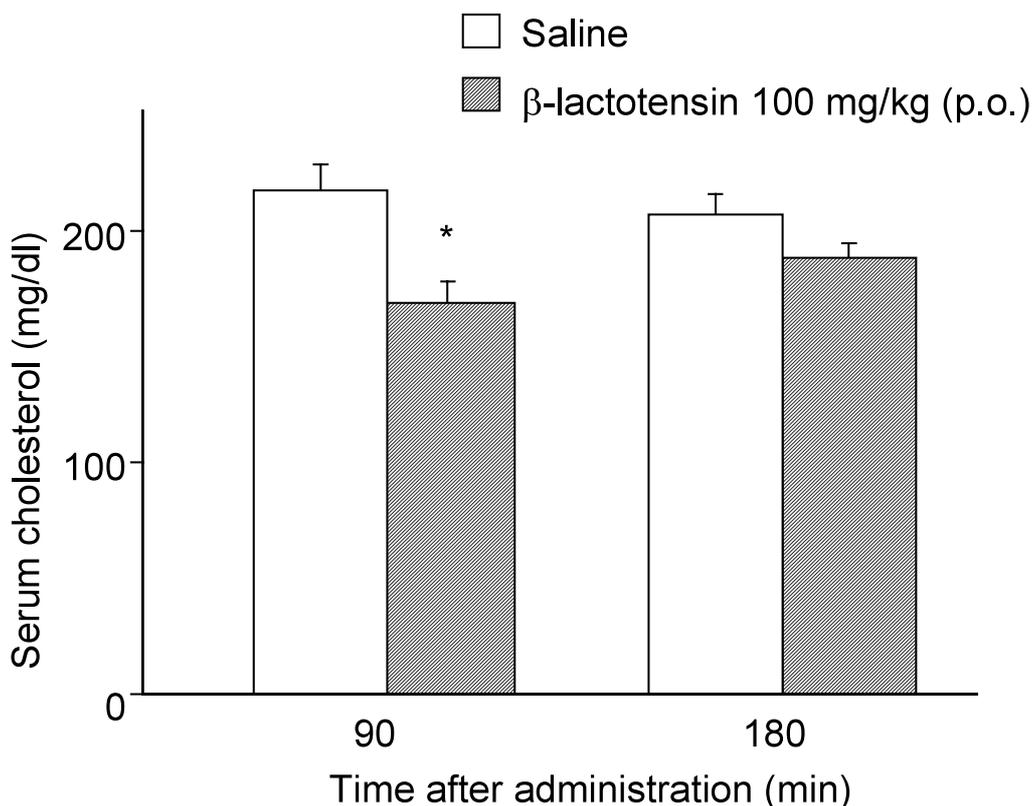


図8. β -lactotensinの経口投与による血清コレステロール低下作用

1-2-2. β -lactotensin の胆汁酸分泌促進作用

LSRの胆汁酸分泌実験と同様に、雄性SDラットの胆管と十二指腸にカニューレを挿入し、 β -lactotensin を十二指腸内投与した後に、胆汁を採取して胆汁酸量を測定した。 β -lactotensin (30 mg/kg) の投与後60-90分をピークとする胆汁酸濃度の上昇が認められた (図9)。 β -lactotensin投与により曲線下面積が有意に上昇したことから、胆汁酸分泌促進作用を有することが明らかとなった (図10)。

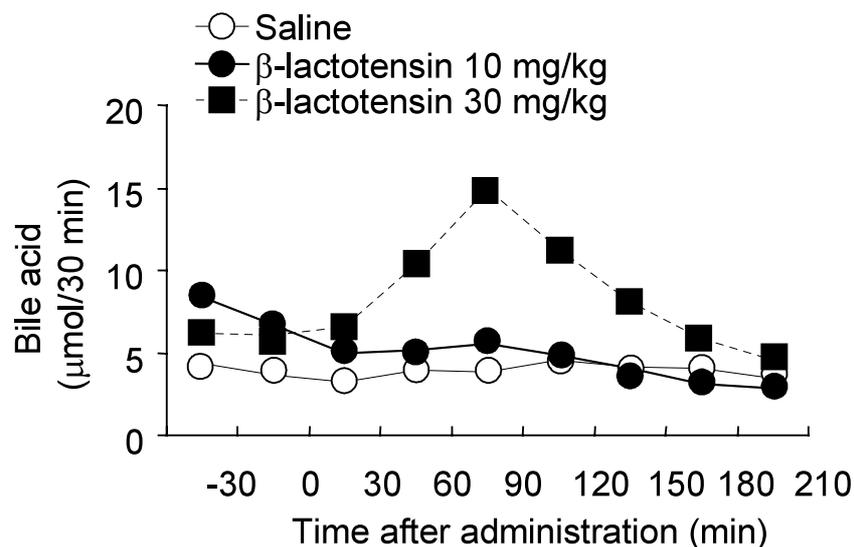


図9. β -lactotensinの十二指腸内投与による胆汁酸分泌促進作用

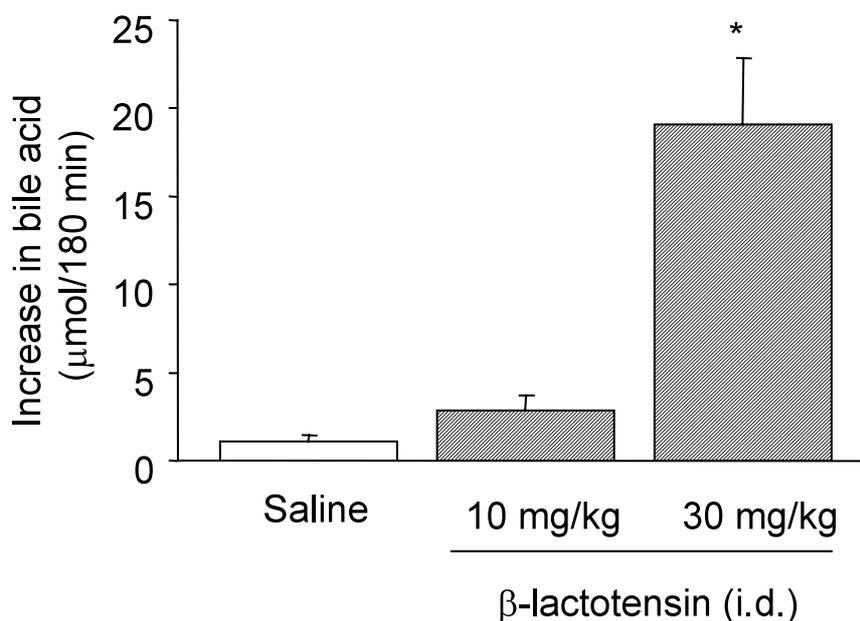


図10. β -lactotensinの十二指腸内投与による胆汁酸分泌促進作用

β -lactotensinは、内因性の脳腸ペプチドとして知られる13残基のニューロテンシン (Pyr-LYENKPRRPYIL) とのホモロジーが小さいにも関わらず、その受容体に親和性を示す。ニューロテンシン受容体にはNT₁ (高親和性)、およびNT₂ (低親和性) という2種類のサブタイプが知られている。ニューロテンシンはNT₁受容体に約50倍の選択性を示すのに対し、 β -lactotensinは逆にNT₂受容体に対して約50倍の選択性を示すことから、NT₂レセプター選択的な天然リガンドとしては最初の物質である。そこで、 β -lactotensinの胆汁酸分泌促進作用がニューロテンシン受容体のいずれのサブタイプを介しているかを検討した。その結果、その胆汁酸分泌促進はNT₁受容体の選択的アンタゴニストであるSR48692 (0.1 mg/kg) の前処置では阻害されなかったが、NT₁受容体とNT₂受容体の両レセプターに対するアンタゴニストであるSR142948 (1 mg/kg) により阻害された (図11)。したがって、 β -lactotensinはNT₂受容体を介して消化管への胆汁酸分泌を促進していることが判明した。なお、 β -lactotensinはコレステロール低下作用の他に鎮痛作用を示すことを明らかにしているが、この場合もNT₂受容体を介するという実験結果を得ている (Yamauchi et al., 2003; Life Sci. 73:1917-1923)。

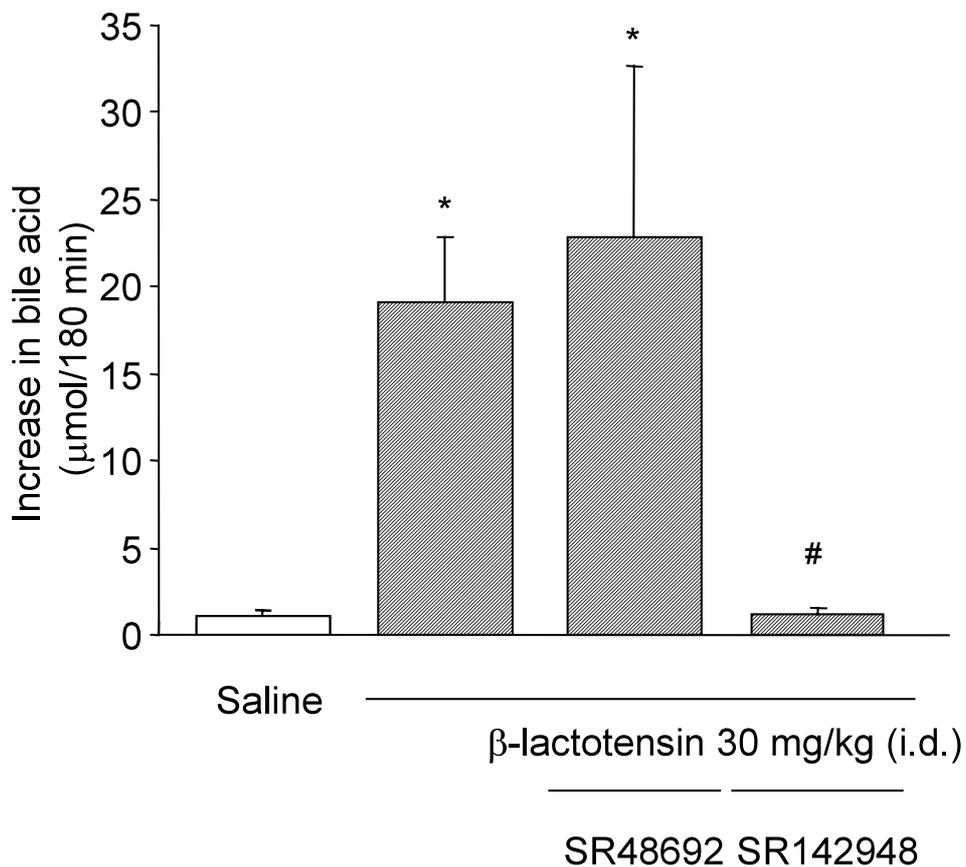


図11. β -lactotensinの胆汁酸分泌促進作用に対するニューロテンシンアンタゴニストの影響

次に、 β -lactotensinの胆汁酸分泌促進におけるNT2受容体の下流の作用機構について検討した。中枢神経系ではニューロテンシン投与によりドーパミン分泌が亢進することが報告されている。そこで、 β -lactotensinによる胆汁酸分泌がドーパミン放出を介しているかをドーパミンD₁およびD₂受容体の選択的アンタゴニストを用いて検討した。その結果、十二指腸内投与における β -lactotensinの胆汁酸分泌作用は、D₁受容体アンタゴニストであるSCH23390 (0.3 mg/kg 腹腔内投与)、およびD₂受容体アンタゴニストであるraclopride (0.5 mg/kg 腹腔内投与)で阻害され、 β -lactotensinの作用はD₁とD₂両方の受容体サブタイプを介することが判明した (図12)。以上の結果より、 β -lactotensinはNT2受容体に結合した後に、ドーパミンを放出し、さらにD₁およびD₂受容体を介して、胆汁酸放出を促進することによって、血中コレステロールを低下させるものと推察される (図15)。

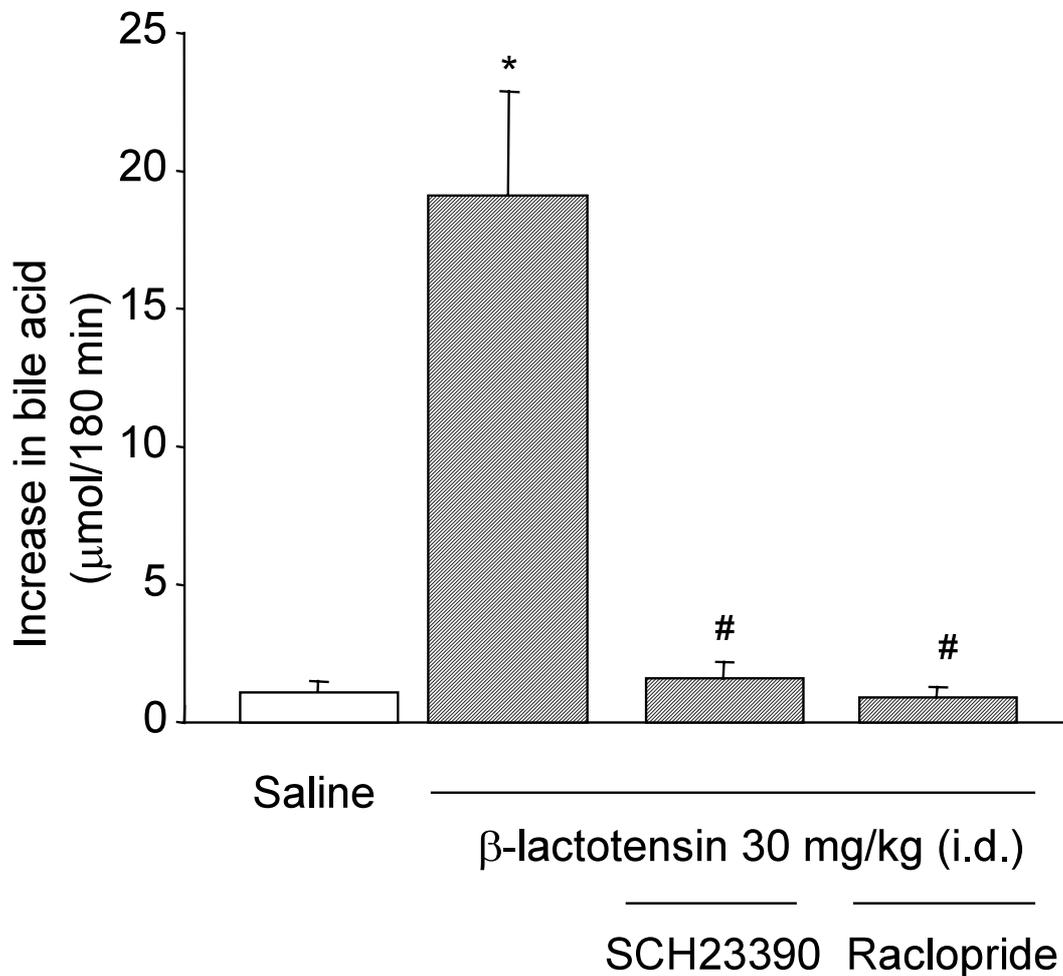


図12. β -lactotensinの胆汁酸分泌作用に対するドーパミンアンタゴニストの影響

1-2-3. ニューロテンシンの胆汁酸分泌促進作用

次に、ニューロテンシンそのものが胆汁酸の分泌促進作用を有するかを検討したところ、ニューロテンシン (60-200 $\mu\text{g}/\text{rat}$) の腹腔内投与により用量依存的な胆汁酸分泌作用が認められた (図13)。したがって、ニューロテンシンは β -lactotensin の1/500の用量で活性を示したことになる。ニューロテンシンの NT_1 受容体に対する親和性は β -lactotensin の3,000,000倍強力であるのに対して、 NT_2 受容体への親和性は1,400倍であることから、 NT_2 受容体が胆汁酸分泌を仲介しているものと考えられる。さらに、ニューロテンシンの胆汁酸分泌促進作用は、 β -lactotensinと同様に NT_1 および NT_2 受容体に対するアンタゴニストであるSR142948 (2 mg/kg) の前処置により阻害された (図14)。以上の結果より、 NT_2 受容体が胆汁酸分泌を仲介することが判明し、胆汁酸分泌を含めたコレステロール代謝において NT_2 受容体が重要な役割を演じていることが初めて明らかとなった (図15)。

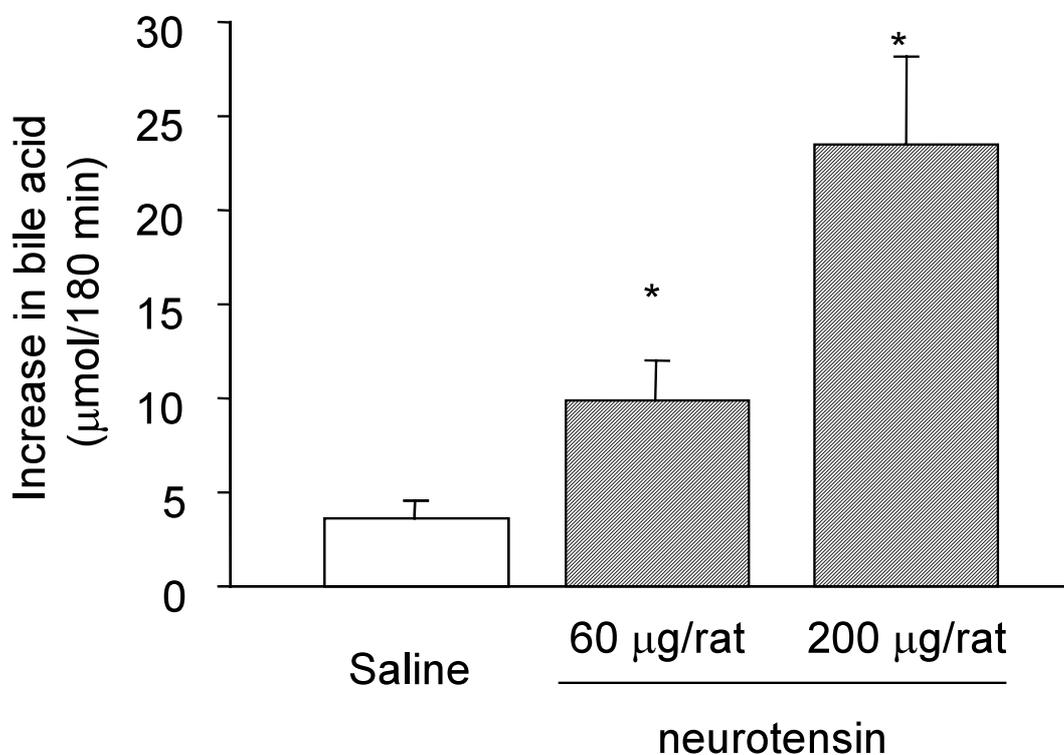


図13. ニューロテンシンの腹腔内投与による胆汁酸分泌促進作用

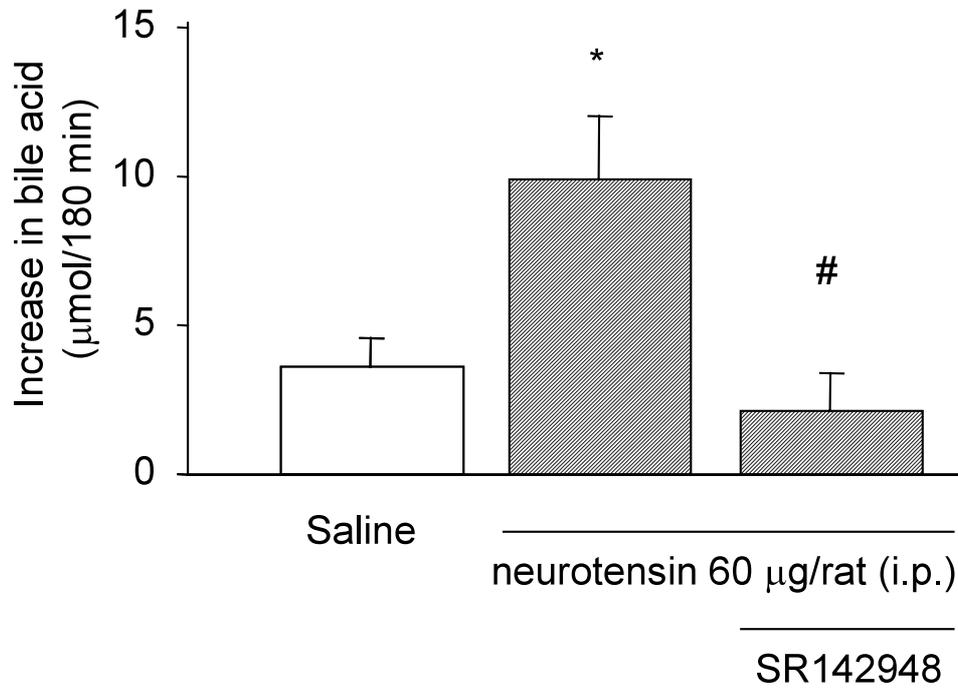


図14. ニューロテンシンの胆汁酸分泌促進作用に及ぼすニューロテンシンアンタゴニストの影響

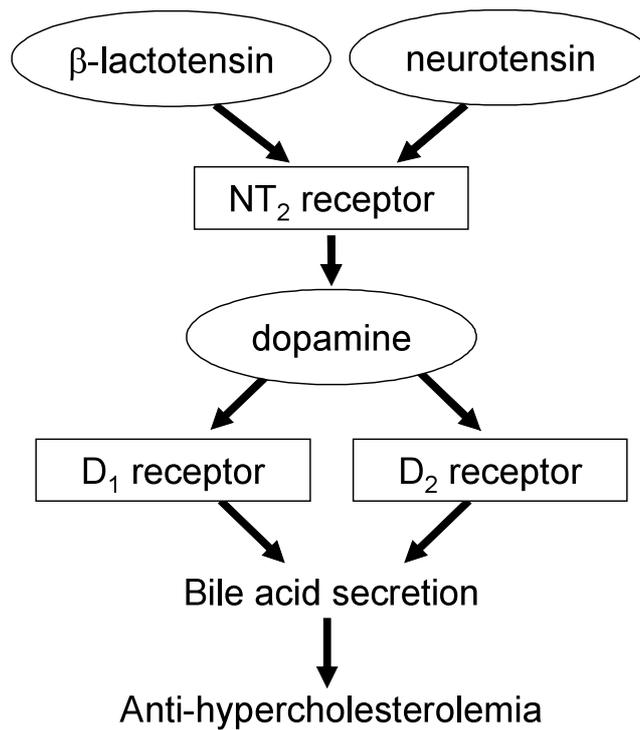


図15. β-lactotensinおよびニューロテンシンのコレステロール低下作用機構

2. 乳タンパク質との複合体形成による茶カテキンの血圧降下作用の持続化

茶カテキンは抗酸化作用、抗菌作用、および血圧降下作用等の生活習慣病予防機能を有することが知られている。従来、茶と乳を一緒に摂取すると、茶カテキンと乳タンパク質が結合し、沈殿するため、茶カテキンの作用が抑制されるとされてきた。茶カテキンは摂取後、速やかに吸収され、2時間後に血圧降下作用は最大となるが、速やかに排泄されるため、作用の持続性はない。昨年度、我々は茶カテキンと乳タンパク質の混合物を高血圧自然発症ラット（SHR）に投与した際に、茶カテキンの血圧降下作用が長時間持続することを初めて見出した。本年度は、カゼイン、乳清タンパク質、および他のタンパク質との比較を行い、カテキンの血圧降下作用の持続化に関するメカニズムを解析した。

2-1. 茶カテキンの血圧降下作用に対する乳タンパク質の添加効果

脱脂粉乳は明治乳業製を用いた。脱脂粉乳中に半分程度含まれる乳糖の影響を取り除くため、脱脂粉乳を透析し、凍結乾燥した乳タンパク質（300 mg/kg）、および茶カテキン（160 mg/kgサンフェノンBG, 太陽化学製）を生理的食塩水中で混合したものをSHRに経口投与し、血圧を2時間おきにTail Cuff法（MK-2000, 室町機械製）で測定した。

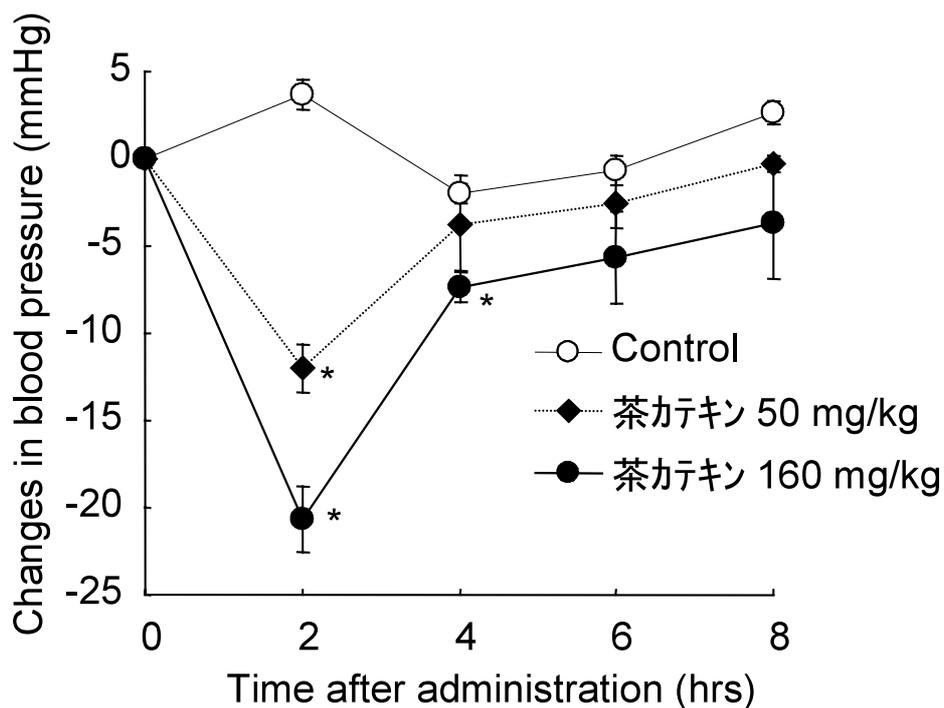


図16. 茶カテキンの血圧降下作用

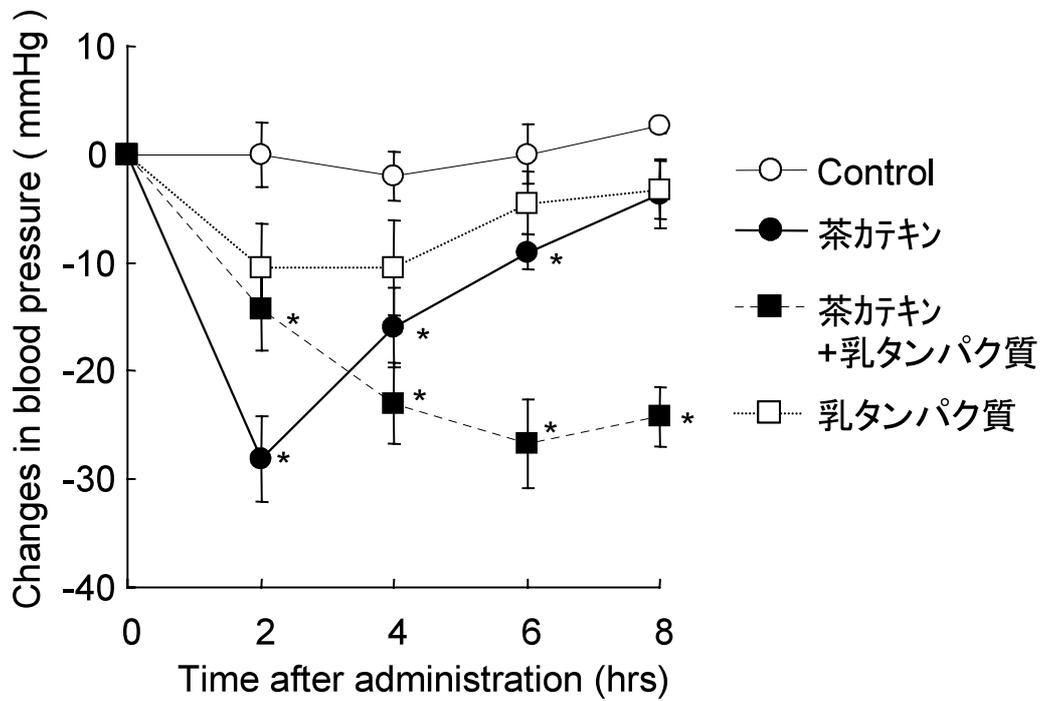


図 1 7. 茶カテキンの血圧降下作用に及ぼす乳タンパク質の影響

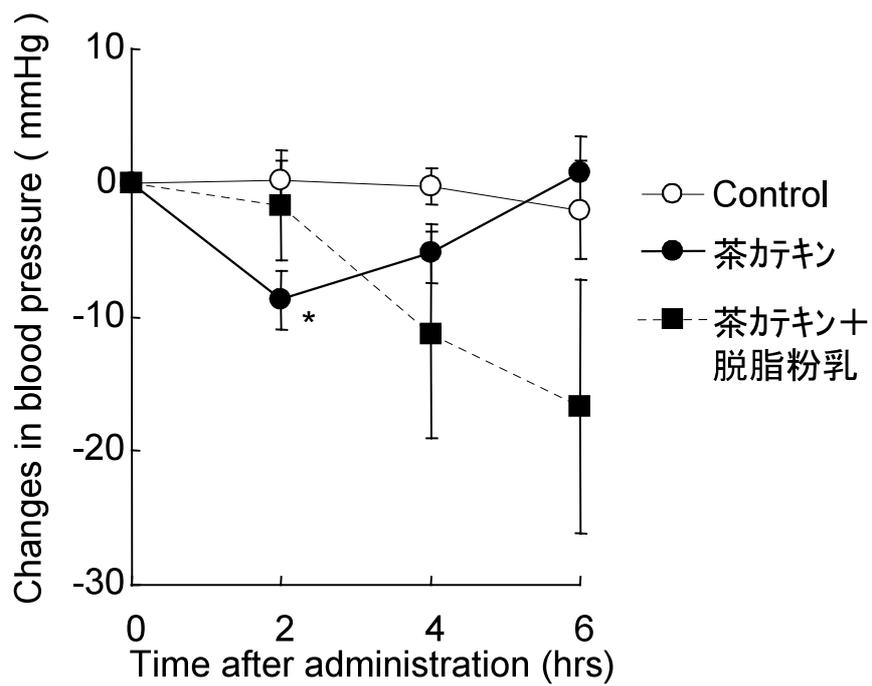


図 1 8. 茶カテキンの血圧降下作用に及ぼす脱脂粉乳添加の影響

茶カテキン単独投与群では、投与2時間後に最も血圧が低下し、その後、上昇するという一過性の血圧低下作用が認められた（図17）。一方、茶カテキン+乳タンパク質投与群では、投与2時間後から8時間後までの持続的な血圧低下作用を示した。なお、乳タンパク質単独でも投与2時間後から4時間後において弱い血圧低下作用が認められたが、8時間後では投与前のレベルにまで回復しており、乳タンパク質+茶カテキン群の持続的な血圧低下作用は、乳タンパク質と茶カテキンの単純な相加作用ではなく、相乗作用によるものと考えられる。

また、乳糖を含む脱脂粉乳（280 mg/kg）と茶カテキンを混和して経口投与した場合にも、血圧低下作用の持続化が認められた（図18）。この脱脂粉乳にはタンパク質が35%含まれることから、乳タンパク質としては100 mg/kgを投与したことになり、上記の実験の1/3量の乳タンパク質でも茶カテキンと相互作用により、持続性を賦与することが明らかとなった。

次に、ペプシン消化により予め低分子化されたペプチドにも茶カテキンによる血圧低下作用の持続化が認められるか検討した。茶カテキン+ペプシン消化乳タンパク質（300 mg/kg）群では、血圧低下作用が遅延するとともに持続性を獲得する傾向が一見認められたが、その効果は、未消化乳タンパク質より弱かった（図19）。また、ペプシン消化乳タンパク質は、ペプシン消化乳タンパク質+茶カテキン群よりもむしろ強力、且つ、持続性のある血圧低下作用を示したことから、ペプシン消化乳タンパク質はカテキンの血圧低下作用の持続化にはほとんど寄与しないことがわかった。このことは、乳タンパク質をカテキンの複合体として投与した場合には、体内で消化管プロテアーゼによって消化されるにしたがって、カテキンが徐々に放出され、持続的な血圧低下作用が得られることを示唆している。

2-2. カゼインおよび乳清タンパク質による血圧低下作用の持続化

次に、乳タンパク質の80%を占めるカゼイン、および20%を占める乳清タンパク質のいずれが、カテキンの血圧低下作用の持続化に重要なかを解明すべく、乳酸カゼイン（日本プロテイン製）と分離乳清タンパク質（WPI, DAVISCO INTERNATIONAL製）を用いて検討した。まず、乳タンパク質300 mg/kgに相当する240 mg/kgカゼインと茶カテキンの混合物の場合には、投与2時間後に血圧低下が見られたが、6時間後では血圧低下作用が消失し始めており、乳タンパク質の場合より血圧低下持続化作用は弱かった（図20）。一方、カテキンと240 mg/kg乳清タンパク質との混合物の投与では、乳タンパク質300 mg/kgとの混合投与の場合同様、投与2時間後には血圧低下作用は見られず、6時間後に血圧低下作用が認められた（図21）。さらに、300 mg/kg乳タンパク質に含まれている量に相当する60 mg/kg乳清タンパク質でも、240 mg/kgの場合とほぼ同等の血圧低下作用の持続化が認められた。以上より、乳タンパク質の主成分であるカゼインよりもむしろ、存在比率が少ない乳清タンパク質の方が、血圧低下持続化作用への寄与は大きいと考えられる。この原因の一つとしては、カゼインの方が乳清タンパク質より速やかに消化されるため持続時間が短いことが考えられる。

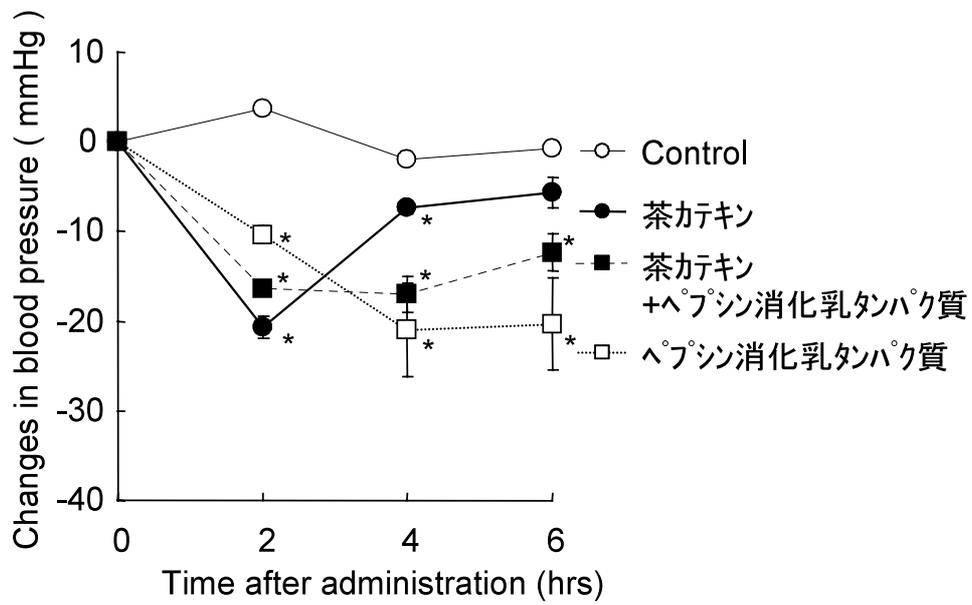


図 19. 茶カテキンの血圧降下作用に対するペプシン消化乳タンパク質の影響

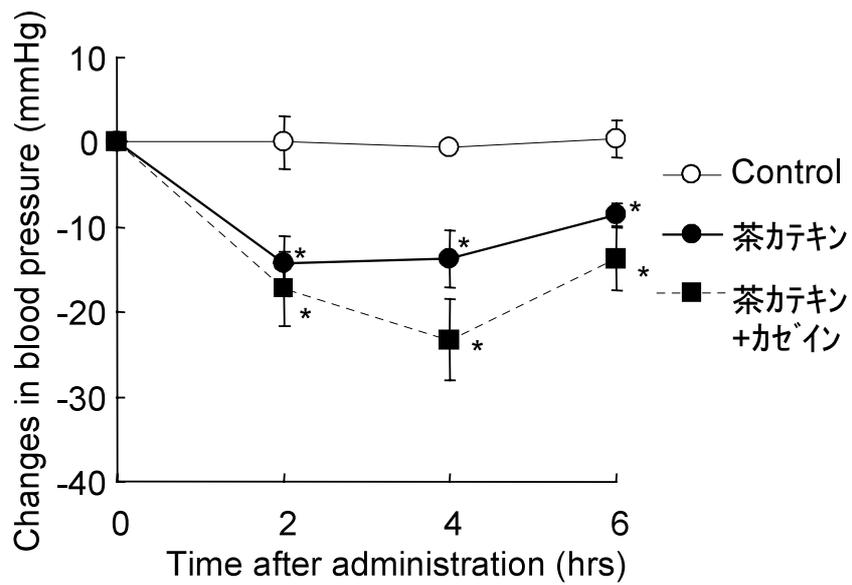


図 20. 茶カテキンの血圧降下作用に対するカゼインの影響

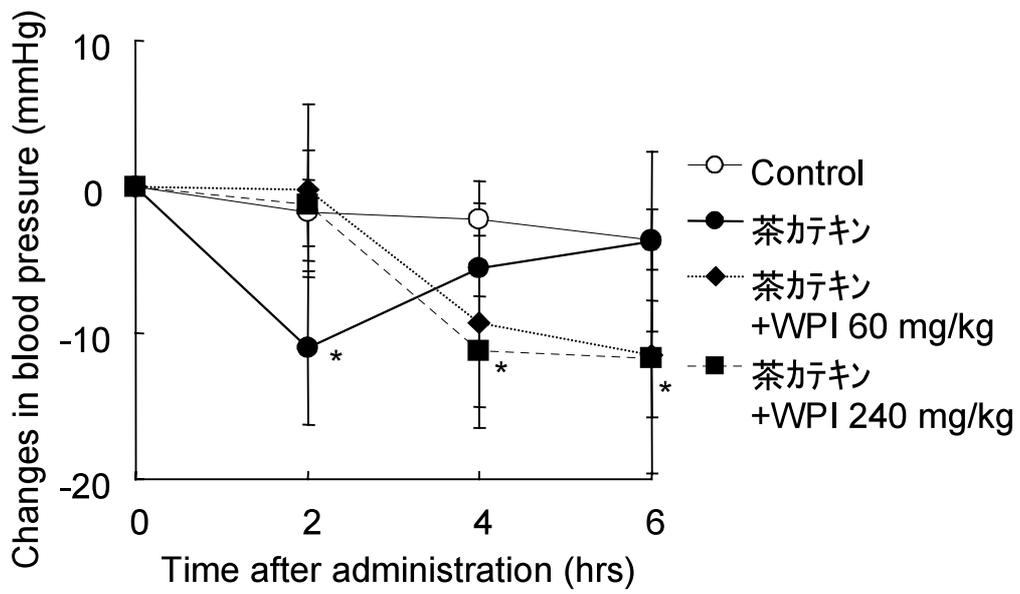


図 2 1. 茶カテキンの血圧降下作用に対する乳清タンパク質の影響

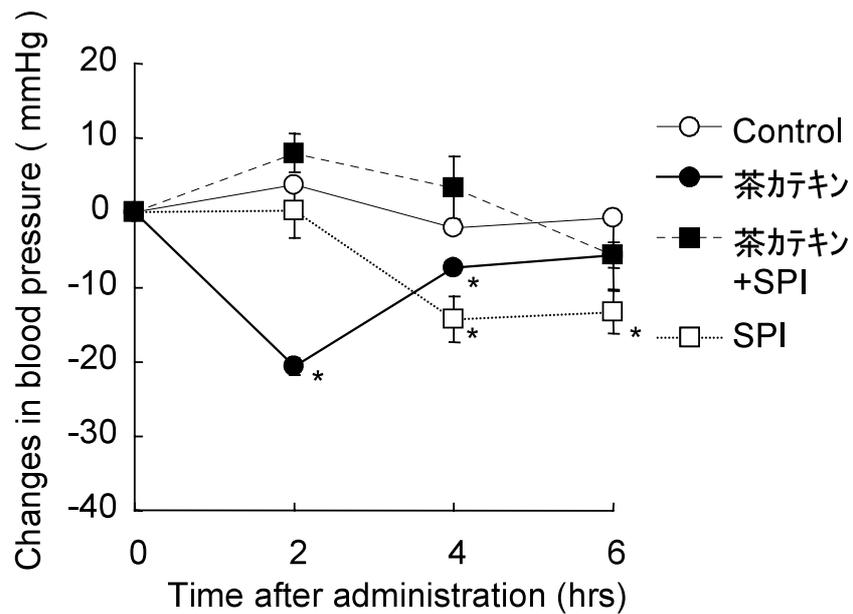


図 2 2. 茶カテキンの血圧降下作用に及ぼす大豆タンパク質の影響

次に、乳タンパク質と同量の300 mg/kg分離大豆タンパク質（SPI，不二製油製）と茶カテキンを混合し、SHRに投与したところ、血圧降下作用は全く見られなかった（図22）。このことは、カテキンおよび大豆タンパク質の血圧降下作用が、両者の混合により消失したことを意味している。この原因としては、大豆タンパク質は茶カテキンと強固な複合体を形成するため、体内でのその消化が阻害され、カテキンおよび大豆タンパク質由来の血圧降下ペプチドの放出が阻害されることが考えられる。

以上より、カテキンの血圧降下作用を持続化させる効果は乳タンパク質に特異的な作用であることが判明した。その機構としては、乳タンパク質、特に乳清タンパク質がカテキンとの間で、適度の親和性に基づいた複合体を形成し、体内で徐々に消化されるに伴ってカテキンを放出し、その腸管吸収を遅延させることによって、持続的な血圧降下作用を示すものと考えられる。

おわりに

以上のように、 κ -カゼイン、および β -ラクトグロブリンの酵素消化によって生成するLSR、および β -lactotensinという2種類の低分子ペプチドが、いずれも経口投与により迅速な血中コレステロール低下作用を示すことを見出した。従来、血清コレステロールを上昇させると言われてきたカゼインからもコレステロール低下ペプチドが生成し、また、乳清タンパク質の主成分である β -ラクトグロブリンからも新しいコレステロール低下ペプチド派生するという事実は、これらのタンパク質を含む脱脂粉乳、またはその酵素消化物を素材として、脂質代謝改善機能を有する食品の開発が可能であることを示唆している。

茶カテキンは、抗酸化作用および血圧降下作用等、多様な生活習慣病予防機能を有することが知られているが、速やかに血中から消失し、持続時間が短いという欠点があった。今回の研究により、乳タンパクまたは脱脂粉乳がカテキンの血圧降下作用に持続性を与え、特に乳清タンパク質にその効果が大きいということが判明したが、これらの結果は、乳タンパク質または脱脂粉乳の新しい用途の可能性を示すものである。

謝辞

研究にご協力頂きました、山内玲奈氏、森孝明氏、武田伸介氏、および八原雅子氏に感謝致します。