

# 一 母乳タンパク質に由来するペプチドの生理的機能一

分担研究：母乳内物質の人体（乳児）への影響に関する研究  
日本大学農獣医

研究協力者： 山 内 邦 男

**要約**；乳タンパク質から蛋白分解酵素キモシンによって遊離される糖を含む親水性のペプチド(GMP、グリコマクロペプチド)を用いて、細胞増殖効果、リンパ球増殖効果および抗毒中和作用を検討した。その結果、HeLa細胞の増殖効果は認められなかったが、Vero細胞では増殖抑制効果がやや弱いながらも認められた。また、脾臓リンパ細胞 (SP, splenic cells) および腸管パイエル氏板リンパ細胞 (PP, Peyer's patch cells) では、強い細胞増殖効果が認められた。抗毒中和効果では、コレラトキシンのもつ腸管内液体貯溜活性を阻害した。

**見出し語**；グリコマクロペプチド(GMP, glycomacropetide)、脾臓リンパ球細胞(SP, splenic cells)、パイエル氏板細胞(PP, Peyer's patch cells)、ミトジエン活性

**研究方法**；1、乳タンパク質由来のペプチドの分離・精製—ヒトGMP (HGMP) 分画は、母乳から Bezko-rovaniny らの方法によって全カゼインを調製し、キモシン処理後に親水性のペプチドを遠心法によって得た (図1)。

図1

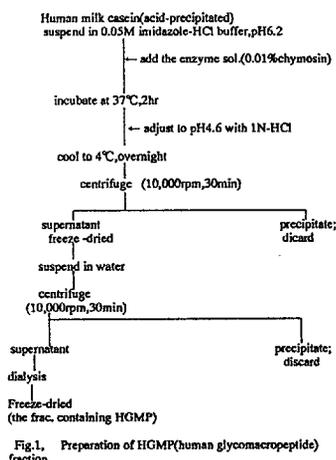


Fig. 1. Preparation of HGMP (human glycomacropetide) fraction.

また、ウシGMP (BGMP) は、脱脂乳から Zittle らの方法によって得られた  $\kappa$ -カゼインにキモシンを処理し、親水性の分画を Q Separose Fast Flow (XK5/20) で精製した。

2、細胞増殖効果—10%牛胎児血清 (FCS) を含む MEM (minimum essential medium) 培地に培養した HeLa 細胞を  $5 \times 10^4$  個/well となるように 24 マイクロプレートにまき、種々の濃度の BGMP 溶液を加えて 5% CO<sub>2</sub>, 37°C のインキュベーターで培養した。その後、経時的に 24 時間までの間、トリチウム標識チミジンを各ウエルに加え、さらに 1 時間インキュベートしてセルハーベスタで回収しシンチレーションカウンターで測定した。

Vero 細胞は、5% FCS-MEM 培地に培養し  $2 \times 10^5$  個/well となるようにして BGMP 溶液を加えて培養した。その後、経時的に 24 時間までの間、WST-1/1 metoxy-PMS (5-methylephenazinium methylesulfate, Dojindo Lab.) 溶液を各ウエルに加え、さらに 1 時間インキュベートして 450 nm における吸光値を測定した。

3、Cholera Toxin (CT) に対する抗毒中和作用—成熟雄 RD ラット (300~350 g) を 1 日絶食させ、適量のネブタールで麻酔し、小腸に約 5 cm 程度のループを 4~5 個作った。そのループにコレラトキシンのまたはコレラトキシンの種々の濃度の BGMP を予め 30 分間インキュベートしたものを 0.2 ml ずつ注入した。その後、開腹口を閉じ、室温で 5 時間おいた後、安楽死させてループの組織重量と貯溜した腸管内の水分重量を測定した。

4、マウスの PP 細胞および SP 細胞の抗原刺激に対する影響—6 週令の BALB/c マウス小腸の漿膜面からパイエル氏板 (PP) を取り、Frangakis らの方法に従って 1.5 mg/ml の Dispass (Grade II, Boehringer, Mannheim

エル氏板 (PP) を取り、Frangakis らの方法に従って 1.5 mg/ml の Dispase (Grade II, Boehringer, Mannheim Biochemicals) を用いて PP 細胞 (1x10<sup>6</sup> 個/well) を調製した。また、SP 細胞 (5x10<sup>5</sup> 個/well) は、McGhee らの方法に従って無菌的に脾臓を摘出し、sterile screen (100 mesh) および 21 G 注射針を用いて脾臓を単細胞に調製し、0.83% NH<sub>4</sub>Cl 溶液を用いて溶血したのち実験に供した。

それぞれの単細胞溶液を 96 ウエルマイクロプレートにまき、種々の濃度の試料溶液を加え、陽性対象群としては、Concanavalin A (2 μg/ml) Lipopoly-saccharide (5 μg/ml) を用い、30 時間培養した後、WST-1 / 1 metoxy-PMS 溶液を各ウエルに 20 μl ずつ加えてさらに、18 時間培養した。培養後、450 nm における吸光値を測定した。

### 結果 ; 1、HGMP および BGMP の分離・精製

母乳の全カゼインから 0.01% のキモシン処理によって得られた HGMP 画分および牛乳 κ-カゼインから得られた BGMP 画分をそれぞれ 12.5% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により分析した (図 2)。しかし、GMP 画分はクマジー染色では染まりにくいため、PAS 染色法により同定した。また、BGMP においては、アミノ酸分析法 (Hitachi 655 A-13 reaction pump 使用) によりアミノ酸組成を調べた。(キモシンによるウシおよびヒト κ-カゼインの切断部位は異なり、図 3 と 4 で示したようにヒト κ-カゼインは<sup>93</sup>Phe-<sup>94</sup>Ile, ウシ κ-カゼインは<sup>105</sup>Phe-<sup>106</sup>Met でそれぞれ特異的に切断される。) その結果、すでに報告されている BGMP の 1 次構造から算出した値とほぼ一致した (表 1)。

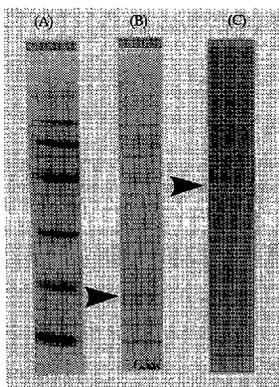


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of BGMP and HGMP fraction hydrolyzed by chymosin for 2hrs. (A), low molecular weight marker protein; (B), BGMP; (C), HGMP fraction.

2、細胞増殖効果—HeLa 細胞への増殖促進効果は認められなかったが、Vero 細胞においては 25 時間目、

BGMP が 200 μg/ml の時に増殖抑制効果がやや弱いながらも認められた。このことから、継代細胞に対しては BGMP は抑制作用は有するものの促進作用はないことが示唆された (図 5、6)。

図 3

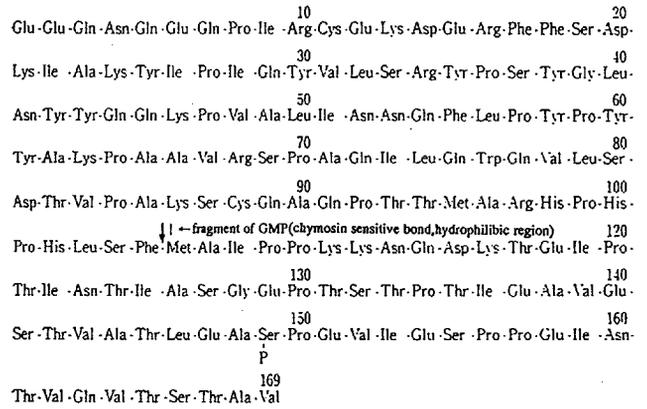


Fig. 3. The primary structure of bovine milk κ-casein type B.

図 4

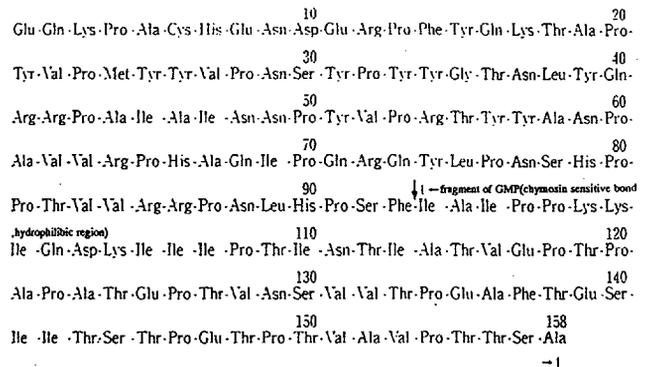


Fig. 4. The primary structure of human milk κ-casein.

表 1

Table 1. Amino acid contents of BGMP

Amino acid	Theoretical value (%)	BGMP*
Asp	8.50	8.96
Thr	18.20	15.13
Ser	7.80	9.80
Glu	19.20	20.37
Pro	11.60	6.23
Gly	0.90	2.10
Ala	5.30	8.15
Val	8.90	7.44
Met	2.00	1.83
Ile	10.10	8.14
Leu	1.70	3.21
Phe	0	0.65
Lys	5.70	5.73
His	0	0.20
Arg	0	0.57
Cys	0	0

\* Experimental value (%) of the BGMP.  
\* Cys was not detected.

図 5

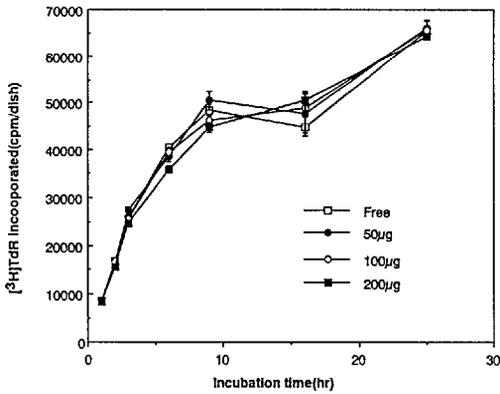


Fig.5, Effect of BGMP on HeLa cell growth pattern.

図 7

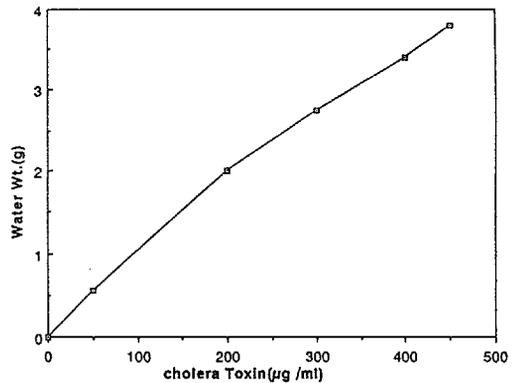


Fig.7, Effect of cholera Toxin on Intestinal water secretion in rats.

図 6

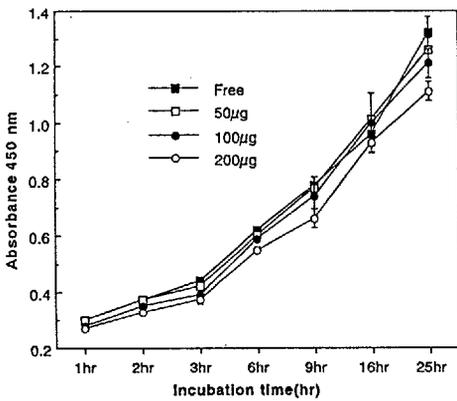


Fig.6, Effect BGMP on the Vero cell growth pattern.

図 8

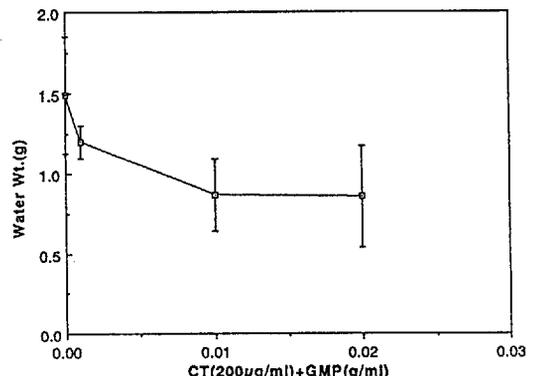


Fig.8, Effect of BGMP for cholera Toxin on Intestinal water secretion in rats.

3、Cholera Toxin(CT)に対する抗毒中和作用—まず、ラットの腸管内での最適な水分貯溜量を誘起するCTの濃度を求めるために種々の濃度のCTと水分の貯溜量との関係を検討した(図7)。その結果、濃度依存性のある直線が得られたことから、ラット腸管ループ法で、CTの毒性発現が測定できることが明らかになった。また、200 µg/mlのCTが最適濃度とし、以下の実験はこの濃度で行なった。次に種々の濃度のBGMPとCTを予め反応させた後の腸管ループ中の水分貯溜量を見てもとBGMPが10 mg/ml以上の濃度になると貯溜量の抑制が認められた(図8)。すなわち、BGMPには、腸管内でのCTの毒性発現を阻害する可能性が示唆された。

図 9

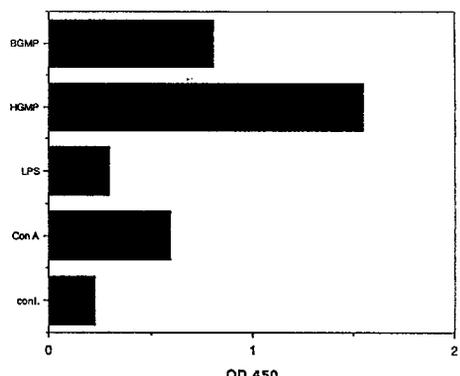


Fig.9, Mitogenic activity of the HGMP and BGMP on the splenic cells.

4、マウスのPP細胞およびSP細胞の抗原刺激に対する影響—HGMPおよびBGMPのSP細胞に対する細胞増殖作用は図9に、PP細胞に対する細胞増殖作用は図10に示した。

PP細胞においてはBGMP添加群では顕著な増殖効果が見られたが、HGMPではやや増殖効果が認められる程度であった。しかし、SP細胞においてはHGMPおよびBGMP添加群とも対象群に比べ有意的に増殖促進作用が認められた。さらにHGMPの方がBGMPより高い活性が認められた。

図 10

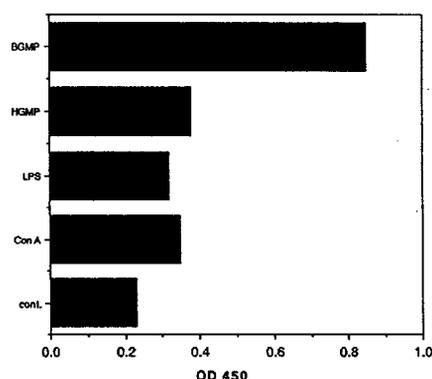


Fig.10. Mitogenic activity of HGMP and BGMP on the Peyer's patch cells.

**考察**；母乳中のタンパク質は、新生児、乳児の唯一の栄養源であるだけでなく、成長に欠くことのできない生体生理機能の活性化をうながす作用もあることが最近明らかにされた。しかし、タンパク質が消化分解される段階で生じるペプチドの生理的機能に関しては、ほとんど解明されていない。本研究で乳タンパク質由来ペプチドのモデルとして用いたグリコマクロペプチド（GMP）は牛乳からチーズを作るときに生じる副産物として発見された。このペプチドは、N-アセチルノイラミン酸を代表とする糖鎖を豊富に含んでいることから生理的機能を有することが期待されている。現にGMPではインフルエンザの赤血球凝集阻止効果、胃酸分泌抑制効果などが報告されている。本実験で使用したグリコマクロペプチドは牛乳および母乳カゼインから精製したもので、電気泳動的に単一バンドとして検出され、混入物がないことがわかった。また、BGMPではアミノ酸分析の結果すでに報告されているものと同一なものであることが確認された（表 1）。

まず、BGMPを用いてヒト由来上皮ガン細胞（HeLa細胞）およびサル由来腎臓ガン細胞（Vero細胞）への細胞増殖効果を見た結果、Vero細胞の増殖を弱いながらも抑制した。このことから、BGMPは、成長増強因子としてよりも細胞によっては抑制因子として働くことが分かった。次に、コレラトキシンの腸管水分貯溜への抑制効果をもて見ると、BGMPは、コレラトキシンとモル比4.3以上でその効果を發揮している。コレラトキシンは、5-6個のBサブユニットと1つのAサブユニットにより構成されており、腸管上皮細胞にあるレセプターと結合するのはBサブユニットといわれている。

BGMPとCTのモル比を考えると、BサブユニットにBGMPが結合して上皮細胞上のレセプターへの結合を阻害している可能性が考えられる。BGMPの有している糖鎖が、腸管上皮細胞にあるコレラトキシンのレセプターであるGM1とよく似ていることからBGMPがコレラトキシンの上皮細胞への結合を抑制することはCHO細胞を用いた *in vitro* で報告されていたがこの実験により *in vivo* でもコレラトキシンの細胞結合をブロックし、毒性の発現を抑制することが初めて明らかになった。

さらに免疫系をつかさどる重要な細胞であるリンパ球に対する機能をBGMP および HGMPの両者で検討してみた。最近の免疫学のめざましい発展により脾臓リンパ球は、リンパ節と同様に主に胸線由来のリンパ球で占められ、一方、腸管リンパ球は、胸線外由来のリンパ球で占められることが分かって来た。そこで、本研究では、2種の由来の異なるリンパ球を用いてそれぞれのペプチドに対する細胞増殖効果を見た。その結果、BGMP および HGMPともに脾臓リンパ球およびパイエル氏板リンパ球に対して細胞増殖効果が認められた。また、リンパ球の由来の違いによってBGMP および HGMPの反応性に違いが見られた。BGMPはPP細胞 およびSP細胞の両者に同様な細胞増殖効果があったが、HGMPはPP細胞よりもSP細胞の方への増殖促進効果が強かった。BGMP と HGMPでは、その糖含量に大きな差異があることからこの反応性の違いは、糖の影響と考えられるが今後検討する必要がある。以上のことから、本研究で乳タンパク質由来のペプチドとして用いたグリコマクロペプチドは、新生児、乳児の免疫細胞への増殖活性、抗毒作用を有していることが明らかになり、母乳中のタンパク質から生成されるペプチドが、生理活性機能を持つことが裏付けられた。

- 文献**；(1) Bezkorovainy, A., et al., *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1428-1432, 1979.  
 (2) Tanimoto, M., et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 140-141, 1992.  
 (3) Brignon G., Chtourou, A., and Ribadeau-Dumas, B., *FEBS Lett.*, 188: 48-54, 1985.  
 (4) Mercier, J.-C., Brignon and Ribadeau-Dumas, B., *Eur. J. Biochem.*, 35: 222-235, 1973.  
 (5) Frangakis, M. A., et al., *J. Immunol. Methods* 48: 33-44, 1982.  
 (6) McGhee, J. R., et al., *J. Exp. Med.* 149: 793, 1979.

- (7) Yasui, H., et al., *J. Dairy Sci.* 72:30-35, 1989.
- (8) Kawasaki, Y., et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 195-198, 1992.
- (9) Abo, T., *Biomed. Res.* 13:1-39, 1992.
- (10) Banderira, A., Itoharu, S., Bonneville, M., Burlen-Defra-anoux, O., Mota-Santos, T., Coutinho, A. & Tonegawa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:43-47, 1992.
- (11) Lai, C-Y., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 9:171, 1980.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約;乳タンパク質から蛋白分解酵素キモシンによって遊離される糖を含む親水性のペプチド(GMP、グリコマクロペプチド)を用いて、細胞増殖効果、リンパ球増殖効果および抗毒中和作用を検討した。その結果、HeLa 細胞の増殖効果は認められなかったが、Vero 細胞では増殖抑制効果がやや弱いながらも認められた。また、脾臓リンパ細胞(SP、splenic cells)および腸管バイエル氏板リンパ細胞(PP、Peyer'spatch cells)では、強い細胞増殖効果が認められた。抗毒中和効果では、コレラトキシンのもつ腸管内液体貯溜活性を阻害した。