

「母乳タンパク質に由来するペプチドの生理的機能」

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

協同研究者	国立予防衛生研究所食品衛生微生物部	小西 良子
	日本大学農獣医学部大学院博士課程後期	尹 崇燮
	韓国大田専門大学専任教授	柳 忠湖

要約；母乳タンパク質から蛋白分解酵素トリプシンおよびペプシンによって生成される分解物が有する抗毒中和作用及び抗菌活性について検討した。その結果、トリプシンおよびペプシン分解物の両者に非常に大きな分子量をもつマクロモレキュラグリコプロテインの残存が認められ、この糖タンパクには細胞溶解毒素の活性阻害が認められた。トリプシン分解物には、カゼインの分解物で糖を多量に含んでいるグリコマクロペプチドが生成されており、この糖ペプチドはコレラトキシンに対して抗毒中和効果を有していることがわかった。また、母乳のトリプシンおよびペプシン分解物の両者に食中毒菌である *Aeromonas hydrophila*, および *Bacillus cereus* に対して抗菌作用があることが見いだされた。

見出し語；グリコマクロペプチド(GMP, glycomacropetide)、マクロモレキュラグリコプロテイン(High-Mr glycoprotein)、コレラトキシン、抗毒中和効果、細胞溶解毒素活性阻害、

研究方法；1、乳タンパク質由来の糖プロテインおよびペプチドの分離・精製—ヒトマクロモレキュラグリコプロテイン(High-Mr glycoprotein)分画は、母乳から Shimizu らの方法¹⁾によって調製した。ヒトグリコマクロペプチド分画は、母乳からBezkorovaniny 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。

2、細胞溶解毒素への阻害活性—ヒトマクロモレキュラグリコプロテインおよびヒトグリコマクロペプチドをそれぞれ1 mg/mlの濃度にリン酸緩衝液—生理食

塩水(PBS)で溶解し、KANAGAWA haemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*(Sigma) 100 UNIT水溶液と等量になるように混合し2時間37℃でインキュベートした。その後、96穴マイクロプレートで、4%の新鮮家兎赤血球と順次希釈した混合液を等量加え2時間37℃で反応させ、4℃で一昼夜静置後、溶血度をOD550nmで測定した。

3、コレラトキシンへの抗毒素活性—ヒトグリコマクロペプチドのコレラトキシンへの抗毒素活性は、CHO細胞を用いた方法で行った。EagleMEM培地に継代したCHO細胞をトリプシン処理によりシャーレよりはがし1%ウシ胎児血清をふくむEagleMEM培地に約50,000/m¹になるようにし、Lab Tekのスライドチャンバーに500 cellsずつまき、すでに一定量のヒトグリコマクロペプチドとインキュベートしたコレラトキシンおよびコレラトキシンのみを加えた。37℃で5%CO₂インキュベーターで一晩培養した。その後細胞をギムザ染色液で固定し、コレラトキシンの作用で紡錘形になった細胞と、正常細胞の比率を求めた。

4、母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物の作成—母乳を3000rpm 15分遠心分離した後クリームを除き凍結乾燥した。1gの凍結乾燥品をそれぞれ50 mM Tris-HCl緩衝液および0.1 N HCl溶液に溶解し50 UNITのTrypsinおよび100 UNITのPepsinをそれぞれに加え、3時間37℃で反応させた。その後透析し凍結乾燥した。

5、抗菌活性の測定—母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物の食中毒菌に対する抗菌活性は、paper Disc法により行った。使用した食中毒菌は、*Aeromonas*

hydrophila, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. mimics* の8種類を用いた。

6、レクチンとの反応性—母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物の各成分のレクチンとの反応性は、ヒマメレクチン(RCA 120)及び小麦胚芽レクチン(Wheat germ)を用いたブロッティング法により行った。

結果：1、母乳のトリプシン及びペプシン分解物のSDS電気泳動パターン—母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物のSDS電気泳動パターン(5—20%)を図1に示した。母乳は、トリプシンによって低分子のものが、ペプシンによって高分子のものが分解を受けていることがわかった。

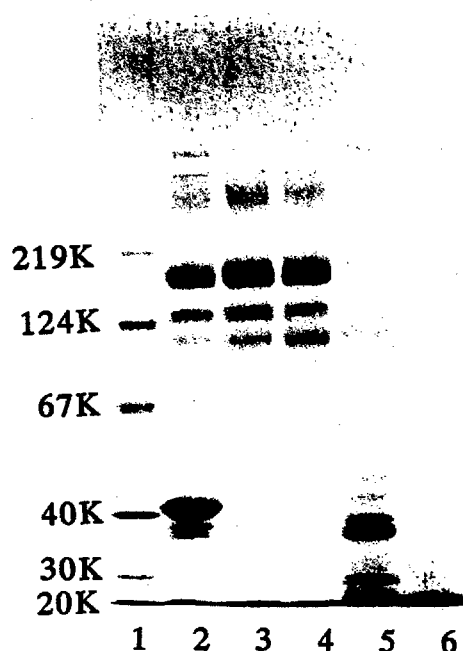


Fig.1 SDS-PAGE patterns of tryptic and peptic digestive milk proteins.

Samples loaded are molecular marker (lane 1), native milk protein (lane 2), tryptic digestive milk protein for 30 min (lane 3), tryptic digestive milk protein for 3 hr (lane 4), peptic digestive milk protein for 30 min (lane 5), peptic digestive milk protein for 30 min (lane 6).

2、レクチンとの反応性—母乳のトリプシン及びペプシン分解物に存在すると予想される糖タンパク質および糖ペプチドとしてマクロモレキュラグリコプロテインとグリコマクロペプチドが考えられるため、この2つの糖タンパク質及び糖ペプチドのレクチンとの反応性をみた(表1)。その結果マクロモレキュラグリコプロテインとグリコマクロペプチドとも、RCA 120および Wheat germ lectinの両者に反応性が認められた。RCA 120および Wheat germ lectinは、ムチン型糖鎖またはグルコースを認識することから、マクロモレキュラグリコプロテインとグリコマクロペプチドは、ムチン型糖鎖またはグルコースを有していることがわかった。つぎにトリプシン及びペプシン分解物中にマクロモレキュラグリコプロテインとグリコマクロペプチドが存在するかを RCA120との反応性で検出すると、トリプシン及びペプシン分解物の両者にマクロモレキュラグリコプロテインと同定されるバンドが検出された。また、トリプシン分解物には、グリコマクロペプチドと同定されるバンドが検出された(図2)。

Table 1. The reaction of High Mr glycoprotein and glycomacropeptide against various lectins.

	RCA 120	Wheat germ lectin
High Mr glycoprotein	+	+
glycomacropeptide	+	+

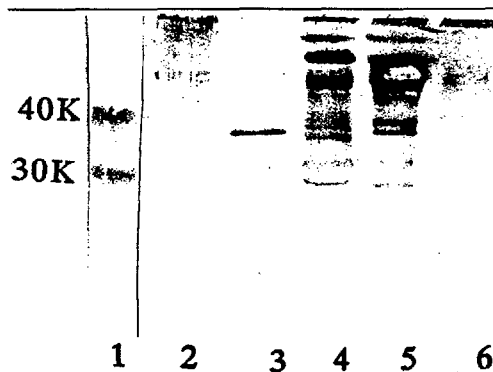


Fig.2 Rectin reaction (RCA 120) of native and digestive human milk proteins.

Samples loaded are molecular standard (lane 1), High Mr glycoprotein (lane 2), glycomacroprotein (lane 3), native milk protein (lane 4), tryptic digestive milk protein (lane 5), peptic digestive milk protein (lane 6).

3、トリプシン及びペプシン分解物中に含まれる糖タンパク及び糖ペプチドの細胞溶解毒素の活性阻害—マクロモレキュラグリコプロテインおよびマクログリコペプチドの細胞溶解毒素の活性阻害を調べた結果、KANAGAWA Hemolysinの家兎赤血球溶血作用を4倍程度阻害した。しかし、マクログリコペプチドにはその阻害活性は認められなかった(表2)。このことから、消化酵素での分解物中に残存しているマクロモレキュラグリコプロテインが腸管内で、食中毒細菌の産生する細胞溶解毒素の作用を阻害する働きをしていることが示唆された。

Table 2. The inhibitory effects of glycoprotein and glycopeptide on the hemolytic activity of KANAGAWA hemolysin

	The amount caused 50% lysis of a 2% RBC(unit)
Hemolysin only	1
plus High-Mr glycoprotein	4
plus glycomacropeptide	1

Note: Rabbit red blood cell were used in this experiment.

4、グリコマクロペプチドのコレラトキシンへの抗毒素作用—グリコマクロペプチドのコレラトキシンへの抗毒素作用は、CHO細胞を用いた方法で検討した。その結果、コレラトキシンのみをCHO細胞に暴露させたときには、5%程度しか正常細胞の形態をもった細胞が存在しなかったが、グリコマクロペプチドとインキュベートしたあとのコレラトキシンは、正常細胞の形態をもった細胞が25%も残存していた。このことからグリコマクロペプチドは、コレラトキシンのCHO細胞への結合を阻害することがわかった。このことは、コレラトキシンおよび大腸菌易熱性トキシンの腸管細胞への結合も阻害する可能性が高いことを示唆している。

5、母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物の食中毒菌に対する抗菌活性—母乳のトリプシン及び、ペプシン分解物の食中毒菌に対する抗菌活性をpaper disc法で調べた。

Table 3. Anti-bacterial activities of Digestive human milk

Species	Native Milk	Tryptic Milk	Peptic Milk
<i>A.hydrophila</i>	++	++	++
<i>B.cereus</i>	++	++	++
<i>E.coli</i>	+	-	-
<i>L.monocyto.</i>	-	-	-
<i>S.enteritidis</i>	+	+	-
<i>S.aureus</i>	+	+	-
<i>V.parahaemo.</i>	-	-	-
<i>V.mimics</i>	-	-	-

表3に示したように、*A.hydrophila* および*B.cereus*に対しては、トリプシン分解物及びペプシン分解物の両方に抗菌活性が残存していることが明らかになった。*S.enteritidis* および*S.aureus*に対しては、トリプシン分解物だけにその活性が残存していた。

考察；母乳中には、いろいろな生理機能を担ってい

るタンパク質を多く含んでいることが知られている。しかしそれらが消化酵素によって分解された場合に、あらたに生成される分解物の持つ生理機能についてはほとんど知られてはいない。そこで本研究では、生体の持つ消化酵素のうち、胃内及び腸内に存在するペプシン及びトリプシンを用いて母乳を分解させその分解物の生理活性を検討した。

最近、糖鎖のもつ生理作用が注目されていることから、母乳から生成された分解物のうち、糖鎖をもつタンパク質およびペプチドについてその抗毒素活性について検討してみた。母乳から生成されたトリプシン分解物およびペプシン分解物の両者から糖鎖をもつタンパク質として、高分子量のグリコプロテインが検出された。このグリコプロテインは、*Vibrio.parahaemolysin* が産生する KANAGAWA hemolysin という細胞溶解毒素の活性を阻害した。これは、グリコプロテインがもつムチン型糖鎖が KANAGAWA hemolysin に対する細胞側のレセプターとにており、このレセプターのアナログスとして働いたためと考えられた。また、カゼインから生成されるグリコマクロペプチドは、母乳のトリプシン分解物より検出された。このグリコマクロペプチドは、コレラトキシンの細胞への結合を阻害することが明らかになった。グリコマクロペプチドは、コレラトキシン及び大腸菌易熱性トキシンのレセプターであるガングリオシド 1 (GM1) と同様の糖鎖を有すると考えられることから³⁾、グリコプロテインと同様にガングリオシドのアナログスとして働いたと考えられた。これらの結果から、母乳のペプシン及びトリプシン分解物のなかには、抗毒素作用をもつ糖タンパク質及び糖ペプチドが生成されることが明らかになった。

また、母乳のペプシン及びトリプシン分解物中に食中毒細菌に対して抗菌作用を有するものがあるかを、8種類の食中毒細菌を用いて調べた。その結果 *A.hydrophila* および *B.cereus* に対するの抗菌活性が、分解する前の母乳と同等に、トリプシン及びペプシン分解物中にも認められた。さらに *S.enteritidis* および *S.aureus* に対するの母乳の抗菌活性は、トリプシン分解物中においても認められた。このことから消化酵素による分解物中にも多くの食中毒菌に対する抗菌活性をもつ成分が含まれていることがわかった。

以上の結果から、母乳が消化酵素により分解され生成される分解物には、新たに生成される糖ペプチドであるグリコマクロペプチドなど抗毒素作用および抗菌作用があり、乳児がさらされるであろう食中毒菌の暴

露から予防していることが示唆された。

文献 ; 1) M.Shimizu, et al., *Biochem. J.*, 233: 725-730, 1986.

2) Bezkorovainy, A. et al., *Am.J.Clin.Nutr.* 32:1428-1432, 1979.

3) Kawasaki, Y., et al., *Biosci.Biotech.Biochem.*, 56:195-198, 1992.



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;母乳タンパク質から蛋白分解酵素トリプシンおよびペプシンによって生成される分解物が有する抗毒中和作用及び抗菌活性について検討した。その結果、トリプシンおよびペプシン分解物の両者に非常に大きな分子量をもつマクロモレキュラグリコプロテインの残存が認められ、この糖タンパクには細胞溶解毒素の活性阻害が認められた。トリプシン分解物には、カゼインの分解物で糖を多量に含んでいるグリコマクロペプチドが生成されており、この糖ペプチドはコレラトキシンに対して抗毒中和効果を有していることがわかった。また、母乳のトリプシンおよびペプシン分解物の両者に食中毒菌である *Aeromonas hydrophila*, および *Bacillus cereus* に対して抗菌作用があることが見いだされた。