



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on Cytotoxic Peptides Liberted from Milk Caseins Digested with Proteolytic Enzymes

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: MD. ABDUL, MATIN メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2581

氏 名 (本 国 籍)	MD. ABDUL MATIN (バングラデシュ人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 240 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 3 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Cytotoxic Peptides Liberated from Milk Caseins Digested with Proteolytic Enzymes (乳汁カゼインのプロテアーゼ消化により生じる 細胞傷害性ペプチドに関する研究)
審 査 委 員 会	主査 信州大学 教授 大 谷 元 副査 信州大学 教授 細 野 明 義 副査 岐阜大学 教授 金 丸 義 敬 副査 静岡大学 教授 森 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

乳汁は、哺乳類新生仔にとって最初の食物であり、栄養成分だけではなく様々な生理活性成分を含んでいる。特に、新生仔の生体防御機能は未熟であるために、乳汁には免疫グロブリン、ラクトフェリン、リゾチームなどの種々の感染防御成分が含まれることは古くからよく知られたところである。一方、近年、食品成分の持つ生体調節機能に関心がもたれるようになり、従来、アミノ酸の供給源としての役割が主体と考えられてきたカゼインにも様々な潜在的な生体調節活性があることが明らかにされつつある。それらカゼインの潜在的な生体調節活性の中でもカルシウム感受性カゼインのプロテアーゼ消化により生じるカゼインホスホペプチドやある種のペプチドは、カルシウムの吸収促進や血圧が上がるのを抑制することを目的とした特定保健用食品素材として厚生労働省から認可され、牛乳カゼインの新しい利用性を提案している。

免疫系は感染防御を始めとした哺乳類の生体防御系において重要な役割を担っていることは周知のところである。本学位論文申請者である Md. Abdul Matin 君の所属する研究室では、先に、牛乳 κ -カゼインの 106-169 域に相当する κ -カゼイノグリコマクロペプチド (以後、CGP と呼ぶ) がリンパ球の増殖や免疫グロブリンの産生を抑制することを見出し、その抑制メカニズムを明らかにした。

κ -カゼインはすべての哺乳類の乳汁に存在するということと、牛乳 CGP は免疫抑制作用を示すということから、Md. Abdul Matin 君は、“牛乳 CGP に見られた免疫抑制作用は

すべての乳汁の CGP に見られ、その免疫抑制作用は免疫系の未熟な哺乳類新生仔にとって抗炎症機能や抗アレルギー機能という生理的役割を担っている”という仮説を立て、その仮説を証明しようとしたのが本学位論文である。

Matin 論文は 5 章構成となっており、最初の章（第 1 章）では、乳汁タンパク質の一般の性質や生体防御機能、並びに κ -カゼインやそのペプチドフラグメントの生体調節機能など本研究の背景や意義について述べている。

続いて、第 2 章では、牛乳 CGP と同様の免疫抑制活性が人乳 CGP にも備わっていることを実験により明らかにしている。すなわち、人乳から調製した酸カゼインに人の胃のプロテアーゼであるペプシンを作用させ、人乳 CGP を調製し、そのペプチドはマウス脾臓リンパ球の増殖抑制作用や免疫グロブリン産生抑制作用があることを確認している。人乳 CGP のこのような免疫抑制作用は、“乳汁 CGP は免疫系の未熟な哺乳類新生仔にとって抗炎症機能や抗アレルギー機能という生理的役割を担っている”と言う彼の仮説を支持するものであると考察している。併せて第 2 章では、人乳 CGP は高濃度でヒト白血病患者の T-リンパ球を株化した Jurkat 細胞を含むリンパ球に対して、牛乳 CGP には見られない細胞傷害性を示すことを世界で始めて見出している。また、その細胞傷害はアポトーシスによるという根拠を示している。

人乳 CGP にはアポトーシス誘導能があるが牛乳 CGP にはないことから、牛乳 κ -カゼインにもアポトーシス誘導領域が CGP 域とは異なった領域に内蔵されているはずであるという仮説のもとに、第 3 章では、消化管内各種プロテアーゼを牛乳 κ -カゼインに作用させ、それら消化物から細胞傷害ペプチドの分離を試みている。その結果、牛乳 κ -カゼインのパラ- κ -カゼイン域の 17-21 残基に相当するペンタペプチド (FFSDK) を牛乳 κ -カゼインのリンパ球に対する細胞傷害領域と同定し、そのペプチドを κ -カゼシジンと命名している。また、 κ -カゼシジンは、ヒト白血病患者の T-リンパ球の株化細胞である Jurkat 細胞や B-リンパ球株化細胞である BALL 細胞および自分の細胞に傷害性を示すことを明らかにするとともに、それらの細胞傷害はアポトーシスであるという根拠を示している。さらに、 κ -カゼシジンは、哺乳類の細胞だけではなくブドウ状球菌、大腸菌、チフス菌などのグラム陽性及び陰性の細菌にも細胞傷害（抗菌性）を示すが、乳酸菌には示さないことを明らかにしている。

さらに、第 4 章では、 κ -カゼシジンの部分フラグメントを化学合成したものを用いて、細胞傷害や抗菌活性を発現するために必要な構造解析を行い、C-末端の Lys 残基や N-末端の 2 つの Phe 残基のうちの 1 つは、細胞傷害性や抗菌性の発現に不可欠であることを明らかにしている。

最後に第 5 章では、 κ -カゼインやそのプロテアーゼ消化により生じる免疫調節ペプチド、特に、本論文で見出した人乳 CGP や κ -カゼシジンの細胞傷害活性を中心に、それらの新生仔における生理的意義や利用性について考察を行い、総括している。

以上の成果は、 κ -カゼインは免疫系の未熟な哺乳類新生仔にとって抗炎症機能や抗アレルギー機能を担っているという仮説を支持するものであるとともに、細胞レベルや感染レベルでの生体防御において、 κ -カゼインは重要な役割を担っていることを示唆するものである。

免疫系は感染防御を始めとした哺乳類の生体防御系において重要な役割を担っていることは周知のところである。本学位論文申請者の所属する研究室では、先に、牛乳κ-カゼインの106-169域に相当するκ-カゼイノグリコマクロペプチドがリンパ球の増殖や免疫グロブリンの産生を抑制することを見出し、その抑制メカニズムを明らかにした。

κ-カゼインはすべての哺乳類の乳汁に存在するという事実と、牛乳κ-カゼイノグリコマクロペプチドは免疫抑制作用を示すということから、乳汁κ-カゼイノグリコマクロペプチドの免疫抑制作用は免疫系の未熟な哺乳類新生仔にとって抗炎症機能や抗アレルギー機能を担っているという仮説を立て、その仮説を証明しようとしたのがマチン論文である。

マチン論文の成果の中で、審査委員会が評価する事項として以下の6点をあげた。

(1) 人乳カゼインに人の胃のタンパク質消化酵素であるペプシンを作用させ、人乳κ-カゼイノグリコマクロペプチドを調製し、そのペプチドにも牛乳κ-カゼイノグリコマクロペプチドのようなリンパ球増殖抑制作用や免疫グロブリン産生抑制作用があることを確認し、当初の仮説を支持する結果を示した。

(2) 人乳κ-カゼイノグリコマクロペプチドは高濃度でヒト白血病患者のTリンパ球を株化した Jurkat 細胞を含むリンパ球に細胞傷害性を示すことを見出し、その細胞傷害はアポトーシスによるという根拠を示した。

(3) 牛乳κ-カゼイノグリコマクロペプチドにはアポトーシス誘導能はないことから、牛乳κ-カゼインにもアポトーシス誘導領域がκ-カゼイノグリコマクロペプチド域とは異なっていたところに存在するという考えのもとに、消化管内各種タンパク質消化酵素を牛乳κ-カゼインに作用させ、それら消化物から細胞傷害ペプチドの分離を試みた。その結果、牛乳κ-カゼインの17-21域に相当するペンタペプチド(FFSDK)を牛乳κ-カゼインのリンパ球に対する細胞傷害領域と同定し、そのペプチドにκ-カゼシジンと命名した。

(4) κ-カゼシジンは、ヒト白血病患者のTリンパ球の株化細胞である Jurkat 細胞やBリンパ球株化細胞である BALL 細胞および牛乳細胞に傷害性を示すことを明らかにするとともに、それらの細胞傷害はアポトーシスであるという根拠を示した。

(5) κ-カゼシジンは、ブドウ状球菌、大腸菌、チフス菌などのグラム陽性及び陰性の病原菌に抗菌性を示すが、乳酸菌には示さないことを示した。

(6) κ-カゼシジンの部分フラグメントを化学合成したものをを用いて、C-末端の Lys 残基やN-末端の2つの Phe 残基のうちの1つは、細胞傷害性や抗菌性の発現に不可欠であることを示し、活性発現に必要な構造について考察した。

以上の結果は、κ-カゼインは免疫系の未熟な哺乳類新生仔にとって抗炎症機能や抗アレルギー機能を担っているという仮説を支持するとともに、細胞レベルや感染レベルでの生体防御においてもκ-カゼインは重要な役割を担っていることを示唆するものである。

上述した論文成果と、以下のとおり基礎となる論文が整っていることから、マチン論文は岐阜大学大学院連合農学研究科の博士学位論文に値するものと判定した。

[学位論文の基礎となる論文]

1. Release of cytotoxic glycopeptides from human acid casein fraction by the action of stomach proteinases. *Milchwissenschaft*, 55: 6-10 (2000)

2. Isolation and characterization of a cytotoxic pentapeptide, κ -Casecidin, from bovine κ -casein digested with bovine trypsin. *Animal Science Journal*, 71: 197-207 (2000)
3. Cytotoxic and antibacterial activities of chemically synthesized κ -Casecidin and its partial peptide fragments. *Journal of Dairy Research*, 69: in press (2002)

[既発表学術論文]

1. Cytotoxic properties of α -lactalbumins toward mammalian cells. *Milchwissenschaft*, 56: 430-433 (2001)
2. Antimicrobial and cytotoxic peptides released from milk proteins by the action of mammalian gastrointestinal proteinases (Review). *Current Research Advances in Agricultural & Biological Chemistry*, pp.23-36 (2001)