



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

牛乳カゼインホスホペプチドのリンパ球増殖調節作用に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 畑, 勲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2484

氏名（国籍）	畑 勲（富山県）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農博甲第143号
学位授与年月日	平成11年3月15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	牛乳カゼインホスホペプチドのリンパ球増殖調節作用に関する研究
審査委員	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、哺乳類の新生仔が最初に口にする食物であり、新生仔の未熟な生理機能を補うための種々の生物活性成分を含んでいる。特に、新生仔の生体防御系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、リゾチームなどの顕在的感染防御タンパク質が含まれることは周知のところである。一方、近年、乳汁中の主要タンパク質であるカゼインの消化物から種々の生物活性ペプチドが分離されるに至り、カゼインは単にアミノ酸の供給源としての役割だけではなく、体調を調節する上でも機能しているものと考えられるようになった。畑論文は、脊椎動物の生体防御系において極めて重要であるにも関わらず、出生時は未発達な免疫系の発達を調節するペプチドを牛乳カゼインのプロテイナーゼ消化物を対象に、マウス脾臓細胞の培養系やウサギ腸管パイエル板細胞の培養系を用いて検索し、活性ペプチドの特性づけを行ったものである。

すなわち、畑論文は5章構成となっており、まず最初の章（第1章）においては、研究の背景や意義を述べている。

続いて第2章では、牛乳中の主要カゼイン成分である α s1-カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインに哺乳類消化管の主要プロテイナーゼであるペプシン、トリプシン、キモトリプシンおよびパンクレアチンを単独または連続で作用させ、それら消化物のマウス脾臓リンパ球の増殖に対する作用を調べ、トリプシンやパンクレアチンを作用させることにより、用いたすべてのカゼイン成分からマイトージェンで誘導されるマウス脾臓リンパ球の増殖を抑制するペプチドが生じることを示している。また、その抑制作用はウサギ腸管パイエル板リンパ球の増殖に対しても見られることを示している。パンクレアチンの主成

分の一つはトリプシンであることから、パンクレアチンの作用より抑制ペプチドが生じることについては、その中のトリプシンが作用したことによるものであろうと考察している。また、コンカナバリン A (ConA)の刺激により誘導される増殖に対する抑制ペプチドは、ConA の特性から考えて、免疫促進ペプチドである可能性を考察している。

そこで、第3章では、ConA で刺激したマウス脾臓細胞の増殖抑制活性を指標にして、増殖抑制活性の最も強かったトリプシン消化 α s1-カゼインから増殖抑制ペプチドの分離精製を試み、限外濾過分画、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーにより、高速液体クロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーにおいて単一ペプチドになるまで活性ペプチドを精製し、そのペプチドをアミノ酸シーケンサに供することにより、分離ペプチドは α s1-カゼインの59-79域に相当するホスホセリン集中域を含むペプチドであることを明らかにしている。また、分離ペプチドは、ConA 刺激マウス脾臓リンパ球やウサギパイエル板リンパ球の増殖を抑制するが、フィトヘマグルチニンやリポポリサッカライドで刺激したリンパ球の増殖に対しては促進し、市販マイトージェンを加えない場合はそれ自体がマイトージェン活性を示すことを明らかにしている。また、分離ペプチドは免疫グロブリンの生産を促進することも示している。さらに、分離ペプチドと同じホスホセリン集中域 (Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) を含む牛乳 β -カゼインの1-25域のペプチドにも分離ペプチドと同様の免疫賦活活性があることを示している。これらの結果に基づき、分離したペプチドのマイトージェン活性や免疫グロブリン生産促進のための活性中心は、ホスホセリン集中域である可能性が高いことを考察している。

カゼインホスホペプチドには従来からカルシウムの吸収促進効果があることが知られており、腸管からのカルシウムの吸収促進を目的とした特定保健用食品素材としてカゼインホスホペプチドは販売されている。そこで、第4章では市販のカゼインホスホペプチドにも分離ペプチドと同様の免疫賦活活性があることを示すととともに、プロテイナーゼやホスファターゼ処理に対するカゼインホスホペプチドのマイトージェン活性の抵抗性を調べることにより、カゼインホスホペプチドの免疫賦活活性は、カルシウム吸収促進活性と同じ活性中心、すなわちホスホセリン集中域によると結論している。

終章(第5章)においては、今回の実験系が牛乳とマウスのリンパ球、牛乳とウサギのリンパ球という自然界ではありえない組み合わせであったことに基づき、すべての動物の乳汁にはホスホセリン集中域を含むカゼインが含まれることや、それらホスホセリン集中域の構造は同じであることを文献的に示すことにより、哺乳類新生仔の免疫系における乳汁カゼインのホスホセリン集中域の生理的意義を考察している。また、従来からカルシウム吸収促進用食品素材として知られているカゼインホスホペプチドは、免疫系の賦活を目的とした食品素材としても利用できる可能性を述べることにより結んでいる。

審 査 結 果 の 要 旨

乳汁は、哺乳類新生仔が最初に口にする食物であり、動物種により差はあるが新生仔の一定期間において唯一の栄養源となる。乳汁中の主要タンパク質であるカゼインは、古くから優れたアミノ酸の供給源として知られてきたが、近年、カゼインには種々の潜在的体調調節活性があることが明らかにされつつある。畑論文は、牛乳カゼインに哺乳類の消化管内主要プロテイナーゼを作用させ、その消化物を対象に、リンパ球の増殖調節ペプチドをスクリーニングするとともに、その活性ペプチドの特性づけを行なったものである。畑論文における新知見は以下の点である。

- ① 牛乳中の主要カゼイン成分である α s1-カゼイン、 β -カゼインおよび κ -カゼインにトリプシンを直接作用させると、T-リンパ球マイトージェンであるコンカナバリン A (ConA) やフィトヘマグルチニン (PHA)、T-リンパ球依存性 B-リンパ球マイトージェンであるポークウイードマイトージェン (PWM) および T-リンパ球非依存性 B-リンパ球マイトージェンであるリポポリサッカライド (LPS) で誘導されるマウス脾臓リンパ球やウサギパイニル板リンパ球の増殖を抑制するペプチドが生産されることを明らかにした。
- ② ConA 刺激マウス脾臓リンパ球の増殖抑制活性を指標にして、トリプシン消化 α s1-カゼインから増殖抑制ペプチドの分離・精製を行い、そのアミノ酸配列を決定することにより、活性ペプチドは α s1-カゼインの 59-79 域のホスホセリン集中域を含むペプチドであることを明らかにした。
- ③ 分離ペプチドは、ConA 刺激リンパ球の増殖を抑制するが、PHA や LPS で刺激したリンパ球の増殖を促進し、市販のマイトージェンを加えない場合はそれ自体がマイトージェンになることを示した。また、分離ペプチドは免疫グロブリンの生産を促進することを示した。
- ④ 分離ペプチドとほぼ同じ構造のホスホセリン集中域を含む牛乳 β -カゼインの 1-25 域のペプチドにも分離ペプチドと同様の免疫賦活活性があることを示した。
- ⑤ カゼインホスホペプチドには従来からカルシウムの吸収促進効果があることが知られており、腸管からのカルシウムの吸収促進を目的とした特定保健用食品素材としてカゼインホスホペプチドは販売されているが、市販のカゼインホスホペプチドにも分離ペプチドと同様の免疫賦活活性があることを示した。
- ⑥ カゼインホスホペプチドの免疫賦活活性は、カルシウム吸収促進活性と同様に、哺乳類の消化管プロテイナーゼの作用に対して極めて安定であるが、ホスファターゼを作用させて脱リンすることにより消失することを示した。

以上の結果は、従来からカルシウム吸収促進用食品素材として知られているカゼインホスホペプチドには、新たな生物活性として、免疫グロブリンの産生や、ある種のリンパ球の増殖を誘導したり、促進したりする作用があることを明らかにしたものであり、高く評価できる。このことより、審査委員会は、畑論文を岐阜大学大学院連合農学研究科の博士学位論文に十分に値するものと判定した。

[学位論文の基礎となる学術論文]

1. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests
Journal of Dairy Research, 62(2): 339-348, 1995.
2. Identification of a phosphopeptide in bovine α s1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures
Journal of Dairy Research, 65(4): 569-578, 1998.
3. Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CPP-III, in cell cultures
Milchwissenschaft, 55: in press, 1999.