

# 乳蛋白を原料とした機能性ペプチドの開発

森永乳業（株）栄養科学研究所  
素材研究室 田村吉隆

古来より我が国では乳酸菌産物である醗酵をはじめとして、味噌、醤油、酒など、微生物醗酵を利用して食品を製造する文化を培ってきた。近年、さまざまな原料からの蛋白質分離技術、及び酵素の分離精製技術の発展により、蛋白質分解物『ペプチド』の開発と利用は新たな局面を迎えている。

ペプチドの機能については従来よりペプチドホルモンやペプチド性神経伝達物質などの生理活性が知られていたが、最近になり食品由来のペプチドが生体調節因子として働いている可能性が示唆されている。また、栄養学の分野でもペプチドの吸収性や生体利用性が蛋白質やアミノ酸混合物よりも優れていることが報告され、調製粉乳をはじめとする食品に応用されている。

本講では当社の研究により得られた知見を中心として、乳蛋白質を原料とした機能性ペプチドの開発及び利用状況について紹介したい。

## 1. ペプチドの機能特性

ペプチドとはアミノ酸がペプチド結合により2個以上100個以下程度結合したものであるが、ペプチドと蛋白質との間に明確な境があるわけではない。現在、工業的に生産されるペプチドとは蛋白質を酵素で分解したペプチド混合物、あるいはペプチド混合物から精製されるアミノ酸配列が一定の単一ペプチドであり、本講ではこれらをまとめて『ペプチド』と称している。ペプチド試薬の製造には合成法も導入されているが、大量生産が困難でありコストもかかることから、食品への応用は難しい。ペプチドは単なる蛋白質の部分消化物ではなく、次にあげるような様々な機能を持っている。

まず挙げられるのは栄養的機能である。ペプチドの吸収性と生体利用性は未消化の蛋白質と比較して高いばかりでなくアミノ酸混合物よりも優れていること、ペプチドとすることでアレルギーの原因となる蛋白質の抗原性を低減できると共に溶解度の低いチロシン、イソロイシン、シスチンなどの溶解性を高められること、アミノ酸混合液よりもペプチド溶液のほうが浸透圧を適性に保てることなどの理由から、ペプチドは一般食品や乳児用食品、経管経腸栄養への利用のみならず静脈栄養への利用も検討されている。

次に挙げられるのは生理活性と細菌・細胞増殖活性である。ペプチドは従来からペプチドホルモンやペプチド性神経伝達物質などの生理活性物質として体内で働いていることが知られていたが、最近、食品蛋白質の部分分解物から生理活性ペプチドが次々に報告されており（表1<sup>1)</sup>）、食品由来のペプチドもまた生体調節因子として働いている可能性が示唆されている。

表1 食品蛋白質由来の生理活性ペプチド

ペプチド名	由来
オピオイド関連ペプチド	乳蛋白、血液蛋白、小麦蛋白
カルシウム吸収促進ペプチド	乳蛋白
ACE* 阻害ペプチド	乳蛋白、魚肉蛋白、小麦蛋白、大豆蛋白
平滑筋作動性ペプチド	乳蛋白、血液蛋白
コレステロール吸収阻害ペプチド	乳蛋白、大豆蛋白
ファゴサイトシス促進ペプチド	乳蛋白、大豆蛋白
血小板凝集阻害ペプチド	乳蛋白
細胞増殖促進ペプチド	乳蛋白
抗菌ペプチド	乳蛋白、魚肉蛋白

\* アンジオテンシン転換酵素

また、蛋白質を分解したペプチドは細菌や細胞の生育のための窒素源（ペプトン）としても従来より使用されているが、このような培地素材としてのペプチドの機能もバイオテクノロジーの発展にともない重要となることは間違いない。

これらの機能以外にもペプチドには呈味性や組織適合性、物性改良特性などの機能が報告されており、今後、さまざまな分野での利用が期待される。ペプチドの機能と応用について図1に示す。

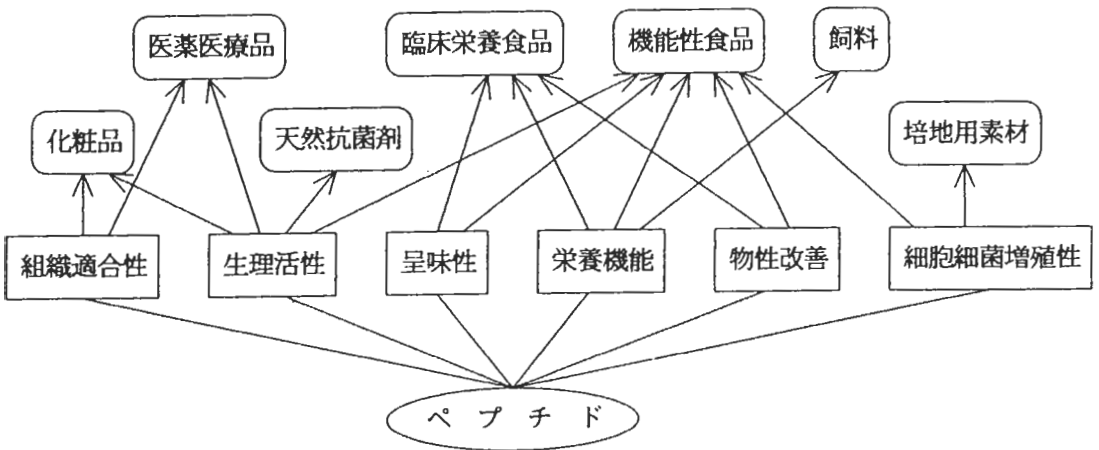


図1 ペプチドの機能と応用

## 2. 乳蛋白ペプチドの原料及び製造法

### 1) 乳蛋白質の特徴

ペプチド製造の原料としては、乳、卵、獣魚肉、血液などの蛋白質より製造される動物性ペプチド、大豆、小麦、米などの蛋白質より製造される植物性ペプチドに大別される。これら原料のうち乳のみが経口摂取される本来の食品として存

在しており、乳蛋白質は過剰摂取が問題となるリンの含有量が比較的少ない、分解したときに苦味や臭味を生じにくい、生体利用性を示すアミノ酸スコアが高い、分解によりさまざまな生理活性ペプチドを派生させ得るなど、いくつかの優れた特徴を有している。また、乳蛋白質は酪農産業の発展により品質や原料の供給が安定しているというメリットも有しており、工業的なペプチド生産の原料として最適であると言える。

## 2) 乳蛋白ペプチドの製造法と評価法

乳蛋白ペプチドの製造工程の概略を図2に示す。原料となる蛋白質は牛乳の主要蛋白質であるカゼイン、チーズ製造時の副産物である乳清（ホエー）を精製して得られる乳清蛋白質、或いは乳中に微量含まれるラクトフェリン等である。原料を溶解後、酵素分解後に除去することが困難な乳糖やミネラルなどの成分については必要に応じて分解前に除去し、pHや温度などの分解条件を設定した後、動物、植物、微生物由来の酵素を適宜組み合わせさせて酵素分解する。分解終了後、通常は加熱により酵素を失活する。酵素失活後の反応液を必要に応じて清澄化、あるいは分離精製し、殺菌、濃縮、乾燥してペプチド製品を得る。得られたペプチド製品を評価するためには、分解率の測定、一般組成、無機組成などの分析だけでは不十分であり、栄養学的側面からは風味や消化吸収性、アミノ酸組成、分子量分布、残存抗原性や免疫原性などの分析が、生理機能的側面からはターゲットにそった活性の評価が必要である。すなわちペプチド製品の開発には分析法の確立が不可欠である。一例として当社で用いているRIモニターによる分子量分布測定を図3に示す。本方法によりペプチド製品の分子量分布を分子量 $10^2$ から $10^5$ の広い範囲において正確に測定できる。

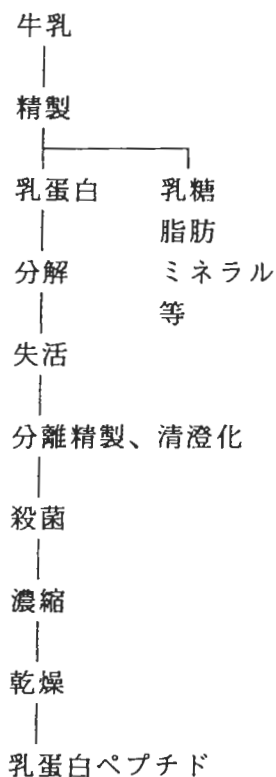


図2 製造工程概略

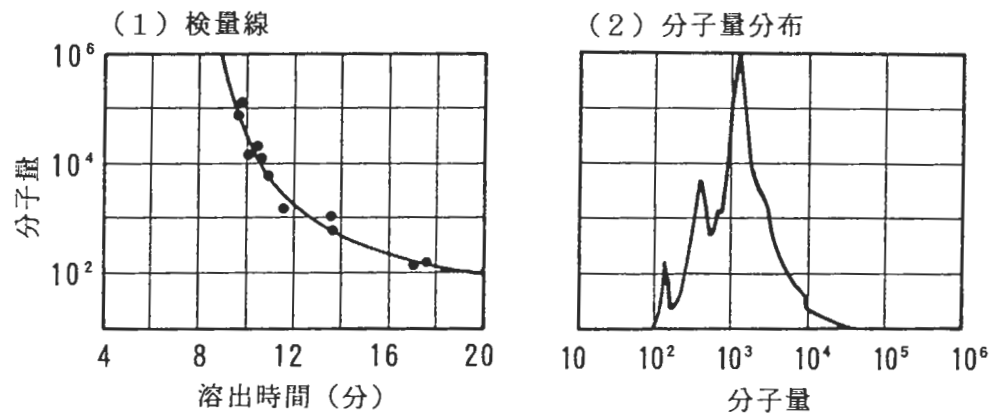


図3 栄養吸収ペプチドW-2010の分子量分布測定例

### 3. 乳蛋白を原料とした機能性ペプチドの開発と利用

機能性ペプチドの設計と開発には、望ましい機能を付加する、あるいは望ましくない機能を排除する、という二つのアプローチが考えられる。本講では前者の例として栄養的機能の向上をはじめとする機能性乳蛋白ペプチドの開発について、後者の例として乳蛋白ペプチドの免疫原性や抗原性の低減について、当社の研究により得られた知見を中心に紹介したい。

#### 1) 栄養吸収性と生体利用性の向上

##### 調製粉乳 L F - P への利用

我が国の育児用調製粉乳の蛋白濃度は、母乳蛋白質と牛乳蛋白質の利用性の相違を考慮し、母乳に比べて約50%高い濃度に調整されてきた。しかしながら消化吸収能の未熟な乳児の負担を軽減するためには、蛋白態窒素濃度を低減した吸収性の優れた窒素源の開発が望まれる。調製粉乳中の蛋白質の質的改善を図る目的で乳清蛋白ペプチド（現在の名称W-2010）を開発し、乳清蛋白質、乳清蛋白ペプチド、及びアミノ酸混合物の吸収性と栄養価とをモルモットを用いて比較した。結果の一部を図4に示す。乳清蛋白ペプチドは乳清蛋白質やアミノ酸混合物に比べて腸管からの吸収性が良く、さらに生体利用率を示す栄養価も高いことが示された<sup>2)</sup>。当社では乳清蛋白ペプチドをLP-Pドライミルクに利用することにより、調製粉乳中の窒素源の吸収性と生体利用率を向上させると共に、カゼイン/乳清蛋白質/非蛋白態窒素の比を母乳化させ、蛋白質濃度を負担の少ない濃度まで低減することにも成功している。吸収性に優れた乳蛋白ペプチドは調製粉乳への利用だけにとどまらず、トレーニングと食事による消化吸収のタイミングが特に重要とされるスポーツ栄養食品への利用、あるいは臨床栄養食品への応用が期待される。

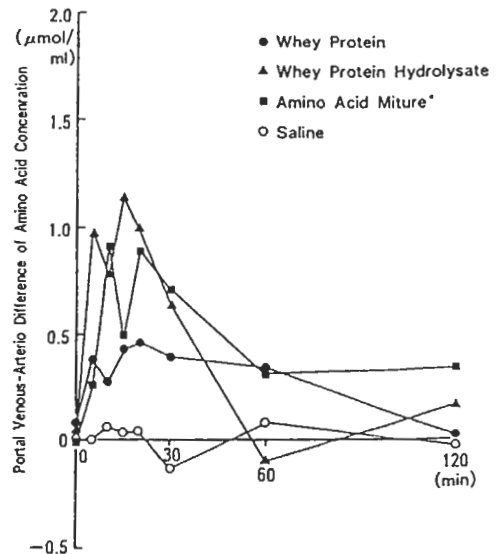


図4 アミノ酸の吸収速度

#### 2) 抗原性と免疫原性の低減

##### アレルギー児用ミルクMA-1への利用

食品アレルギーは、抗原となる食品蛋白質が腸管を透過することにより引き起こされる抗原抗体反応に起因する。牛乳蛋白質は優れた食品である反面、人にとっては異種蛋白であり、微量の乳蛋白を与えただけでアレルギーを発症する場合もある。従ってアレルギー低減化ペプチドの開発には、抗原性の除去技術の開発、

及び感度の高い抗原性試験法の確立が必須である。アレルギー児用の窒素源を開発する目的でカゼインを数種類の酵素で分解し、アミノ酸の遊離率が0.4、15、30、60%の4種類カゼインペプチドCH-A、B、C、Dを調製し、ペプチド中の残存抗原性をELISA抑制試験により測定した。結果を図5に示す。アミノ酸遊離率60%のペプチドCH-Dの抗原性は極めて低くカゼインの僅か $10^{-6}$ であった<sup>3)</sup>。当社はCH-D（現在の名称MA-Z）を利用してアレルギー児用ミルクMA-1を開発した。MA-1の投与により牛乳アレルギー症状が軽快すると共に、血清中の特異抗体も低減することが数多く報告されている。

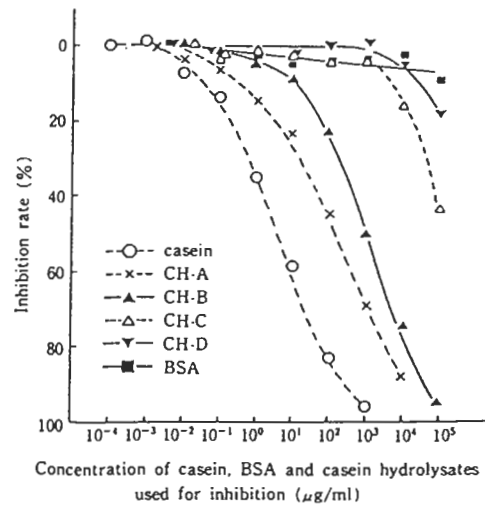


図5 カゼイン分解物の抗原性

牛乳アレルギー児用のミルクMA-1に使用されているペプチドMA-Zは、抗体との反応を実質的に消失させる段階まで徹底的に分解されているため、アレルギー治療用ミルクとしては極めて有効であるが、風味などの点が犠牲となっている。牛乳アレルギーを発症していない乳児に対する調製粉乳の窒素源としては、血清中に特異抗体を産生させない、すなわち経口感作されないレベルにまで分解した風味が良いペプチドを開発することは重要である。以上の目的のためにカゼイン及び乳清蛋白質を原料としてペプチドを開発し、モルモットを用いた感作実験を行った。経口投与による血清中の抗体産生が認められなかったカゼインペプチドと乳清蛋白ペプチドとを混合した乳蛋白ペプチド『MPH』を調製し、MPH及び他の抗原をモルモットの皮下に注射して感作し、各感作抗原に対する血清中のIgG含量をELISAで測定した。結果を図6に示す。MPH群では殆どIgG抗体は産生されず、コントロールとして用いた生理食塩水と同程度であった<sup>4)</sup>。以上の結果は、MPHを利用することにより、ある程度のアレルギーリスクをも考慮した一般乳児向けの調製粉乳が製造できる可能性を示唆している。

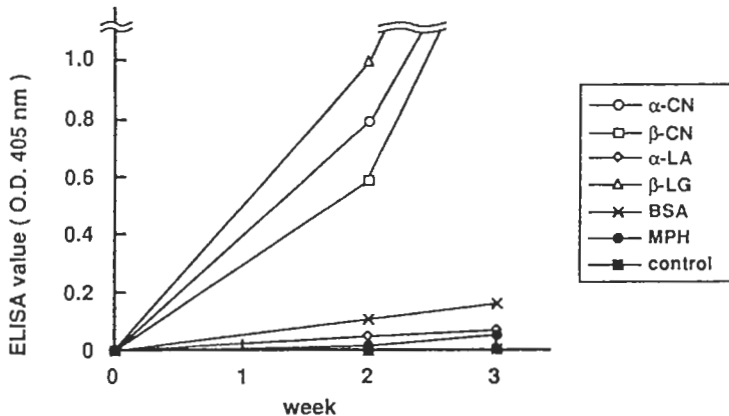


図6 感作抗原に対するIgG抗体産生量

### 3) コレステロール低減作用

動物性蛋白質は植物性蛋白質と比べて血中コレステロールを上昇させると報告されてきた。しかし最近、新生児の血中コレステロールは乳清蛋白質含量の高いミルクを与えた方が低くなるというデータが報告され、人では乳清蛋白質は血中コレステロールを低下させる可能性が示唆されている。乳清蛋白質及び乳清蛋白質ペプチドのコレステロール低減作用を検討する目的で、カゼイン、カゼインペプチド、乳清蛋白質、乳清蛋白質ペプチド、大豆蛋白質を窒素源とし、その他の組成は全く同一とした食餌を調製し、これら窒素源の血中コレステロールに与える影響をラットを用いて検討した。食餌にコレステロールを添加した系での結果の一部を図7に示す。乳清蛋白質及び乳清蛋白質ペプチド群は血中総コレステロール値がその他の群に比べて有意に低く、善玉コレステロールであるHDL値は顕著に高いことが確認され、この結果、総コレステロールとHDL値より計算される動脈硬化指数も顕著な低値を示した<sup>5)</sup>。アミノ酸組成を乳清蛋白質と同様にしたアミノ酸混合食ではこのような結果は得られないことから、本作用は乳清蛋白質のペプチド配列に起因するものと推定される。

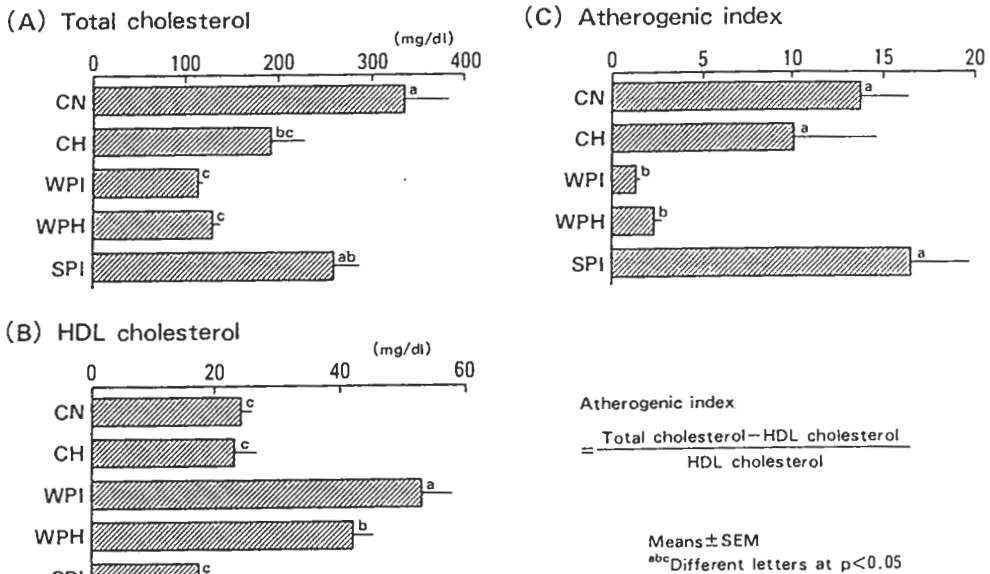


図7 各窒素源の血中コレステロール濃度に対する影響

### 4) 細胞増殖作用及びチロシナーゼ活性阻害作用

#### 化粧品素材セルシーズエクサの開発

乳は古代ローマの時代から入浴剤や化粧品として利用されており、乳成分が皮膚に良いことは経験的に認識されている。乳蛋白質の皮膚に対する機能を明らかにする目的で、カゼインを分解して調製したカゼインペプチド（現在の名称セルシーズエクサ）の皮膚細胞増殖に対する作用、及びチロシナーゼ活性阻害作用について検討した。セルシーズエクサの皮膚細胞増殖作用をトリチウム-チミジン取

定量で測定した結果、 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ の添加濃度において対照品（牛胎盤抽出物）に比較し、基底上皮細胞で1.6倍、コラーゲン産生繊維芽細胞で2倍程度の細胞増殖作用があることが確認された。また、メラニン産生細胞であるメラノサイトに対してはセルシーズエキサ $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の添加で細胞数相対値が0.7倍に減少すること、及び0.05%以上の添加濃度においてメラニン産生酵素であるチロシナーゼの活性を阻害することが確認された<sup>6)</sup>。以上の結果より、セルシーズエキサにはペプチド全般にわたる特徴である保湿効果に加えて、皮膚を活性化する細胞増殖効果、及びメラニン細胞に対する増殖抑制作用とチロシナーゼ活性阻害作用による美白効果を有することが示された。現在、セルシーズエキサは化粧品素材として利用されている。

### 5) ラクトフェリン分解物由来の抗菌ペプチド

#### ラクトフェリンの開発

ラクトフェリンは乳清中の微量蛋白質であり、感染防御因子として有害細菌の増殖を抑制する作用を有する。従来、この抗菌作用はラクトフェリンが鉄をキレート結合するために鉄要求性の高い細菌が増殖できなくなることに起因すると説明されてきたが、ラクトフェリンが直接的な殺菌作用をも有することが報告され、ラクトフェリンの抗菌作用は単なる鉄キレート作用だけでは説明できないことが明らかになった。ラクトフェリンの抗菌作用を解明する目的でラクトフェリンを分解し、抗菌活性について検討した結果、ラクトフェリンの酵素あるいは酸分解物からは非常に強い殺菌作用を持つペプチドが派生することが発見された<sup>7, 8)</sup>。ラクトフェリンの酵素分解物より単離された活性ペプチド（現在の名称ラクトフェリンB）のアミノ酸配列を図8に示す。

ラクトフェリンは大腸菌をはじめとする広範囲の菌種に対して $2 \mu\text{M}$ 程度の低濃度から抗菌作用を示す反面、有用菌であるビフィズス菌にはさほど抗菌作用を示さない<sup>9)</sup>。また、ラクトフェリンは院内感染で問題となっている抗生物質耐性菌MRSAに対しても抗菌作用を発揮することが確認された。現在、ラクトフェリン分解物及びラクトフェリンの応用について研究を進めている。

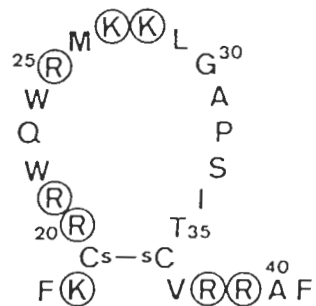


図8 ラクトフェリンBの構造

### 6) カルシウム可溶化能の向上

#### CPPの開発

厚生省の国民栄養調査によると各栄養素の中で唯一、推奨される所要量を満たしていないのがカルシウムであり、また、カゼイン由来のリンを含有したホスホペプチド（CPP）には、カルシウムの吸収を促進する効果が報告されている。食品に広く利用できるCPPの開発を目的として、カゼインを酵素分解、分離精製してCPP（現在の名称C-900）を調製し、Ca濃度 $5 \text{mM}$ 、P濃度 $10$

mM (Ca/P比0.5)における磷酸緩衝液中でのカルシウム可溶化能を測定した。添加した塩化カルシウムはCPP無添加の条件では磷酸カルシウムとなり沈殿するが、CPPを4mg/ml以上の濃度で添加することにより100%可溶化した。当社ではC-900を利用することにより、カルシウム吸収能を高めた乳飲料(体育会系牛乳)を開発している。

#### 4. 今後の課題

当社は乳児栄養を担うメーカーとして、風味や消化吸収性の向上、抗原性の低減、熱安定性や物性の改良、腸内細菌叢の改良など、主に食品に要求されるペプチドの開発を中心に研究を行ってきた。今後は食品分野への応用に加えて、様々な分野に利用し得るペプチドを開発してゆく考えである。また、工業的にペプチドを製造する場合、新規ペプチドの開発や機能性の解明と共に、品質を安定化する製造技術や迅速な分析技術の確立も重要である。ペプチド機能の解明、製造技術の確立、分析技術の確立の三項目をペプチド研究の柱にしたいと考えている。

食品蛋白質、特に乳蛋白質に由来するペプチドの機能性についてはここ数年で急速に研究が進んでおり、さらに工業的なペプチドの製造についても、酵素の固定化やバイオリアクターによる連続生産が盛んに研究されている。ペプチドは様々な可能性を持った魅力的な素材であり、食品や医薬品をはじめとする広範囲の分野での応用が期待される。機能性ペプチドの研究と利用が益々発展することを期待したい。

#### 参考文献

- 1) 吉川正明、千葉英雄：食品工業、33(4), 20, (1990)
- 2) 川瀬興三：酪農科学・食品の研究、39(6), A-283, (1990)
- 3) 川瀬興三、御子神隆：東邦医学界雑誌、35, 509, (1989)
- 4) 岩本洋ら：第46回日本栄養・食糧学会要旨集、p. 69, (1992)
- 5) 梶川幹夫ら：1991年度日本農芸化学会要旨集、p. 208, (1991)
- 6) 田村吉隆、福渡康夫：フレグランスジャーナル、19(6), 119, (1991)
- 7) H. Saito, et al: J. Dairy Sci. 74(11), 3727, (1991)
- 8) M. Tomita, et al: J. Dairy Sci. 74(12), 4137, (1991)
- 9) W. Bellamy, et al: J. Appl. Bacteriol. 73, 472, (1992)