

学位論文の審査結果の要旨

本論文は、カゼインホスホペプチド（CPP）の免疫調節作用とリン酸化度の相関性を検討したものであり、CPPの抗ウィルス作用と抗アレルギー作用について検証した。その結果、CPPのサイトカイン産生調節作用はリン酸化度に依存しており、さらなるリン酸化を行うことで、抗ウィルス作用および抗アレルギー作用を増強させることが可能であることを見出した。

（１）本研究の背景と目的について

CPPは牛乳主要タンパク質のカゼインから酵素分解により得られる。CPPの機能性については、カルシウム吸収促進作用やIgA産生促進といった免疫促進作用が報告されており、CPPの機能性にはリン酸基の重要性が推測される。そこで本研究では、免疫調節作用として抗ウィルス性と抗アレルギー性について検証するとともに、高リン酸化CPPと脱リン酸化CPPを調製し、これらの効果を比較検討することで、免疫調節作用におけるリン酸化の重要性を明らかにすることを目的とした。

（２）高リン酸化CPPの抗ウィルス作用について

CPP-IIIを0.1 M ピロリン酸溶液（pH 4.0）に溶解後、凍結乾燥した粉末を85℃で5日間乾燥加熱することで、高リン酸化CPP（H-CPP）を得た。脱リン酸化CPP（D-CPP）はアルカリホスファターゼを用いて調製した。ノロウィルスの代替ウィルスであるネコカリシウィルスを用いてネコ腎由来株化細胞CRFK細胞の細胞生存率を指標に抗ウィルス作用を検討した。その結果、H-CPP添加により細胞生存率は増加することが示された。この際、抗ウィルス性サイトカインであるIFN- α およびIFN- β の発現が促進することを見出した。ウィルス感染時だけでなく、ウィルスを添加しない未感染時においても同様の効果が得られた。これらの効果はD-CPPにおいてCPPより低減したことから、CPPのサイトカイン発現促進作用においてリン酸基が重要な役割を担っていることを明らかにした。

（３）高リン酸化CPPの抗アレルギー作用について

OVA感作したBALB/cマウス（6週齢、雌）をコントロール群、CPP、H-CPPおよびD-CPP摂取群の4群に分けて実施した。コントロール群には通常飼料、各種CPP摂取群には0.05%の混餌飼料を6週間自由摂取させた。最終日に抗原チャレンジ試験を行い、アレルギースコアおよび体温変化を測定した。血清中の抗体価はELISA法により測定した。抗原チャレンジ試験の結果、コントロール群マウスの体温は抗原摂取により顕著に低下したのに対して、CPP、H-CPP摂取群のマウスでは体温の低下は認められなかった。一方、D-CPP摂取群では、コントロール群と同様の体温低下が認められた。CPP、H-CPP摂取群のアレルギースコアはコントロール群よりも低

く、D-CPP摂取群ではコントロール群と同程度であった。血清中IgE濃度においても上記と同様の傾向が示された。Th2型抗体であるIgG1濃度はCPP、H-CPP摂取群でコントロール群よりも低く、特にH-CPPにおいて顕著な低下が認められた。一方、Th1型抗体であるIgG2a濃度はCPPおよびH-CPP摂取群で増加し、D-CPP摂取群はコントロール群と同程度であった。次に、免疫寛容を司るTregの割合を測定した結果、H-CPP摂取群では、脾臓とパイエル板細胞の両方において顕著に増加することが示された。以上の結果より、OVA感作マウスにおいて、高リン酸化CPPはTreg分化促進を介して免疫寛容を誘導し、アレルギー症状を軽減することが示された。

以上のように、本研究では、牛乳カゼインホスホペプチドの抗ウィルス作用と抗アレルギー作用に関する詳細な研究が展開されており、化学修飾によるCPPの免疫調節作用の改善の可能性を示すとともに、発現機構に関する新たな知見を提示した。これらの研究成果は、申請者を筆頭著者として学術雑誌2報に掲載されており、要件（2編以上の筆頭著者論文）を満たしている。以上のことから、本論文は博士（農学）論文に値するものであるとの結論に達した。

公表主要論文名

- ・ Ntshepisa Lebetwa, Takakazu Mitani, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama. Role of phosphate groups on antiviral activity of casein phosphopeptides against feline calicivirus as a surrogate for norovirus. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 97 (6):1939-1944.
- ・ Ntshepisa Lebetwa, Yuta Suzuki, Sachi Tanaka, Soichiro Nakamura, Shigeru Katayama. Enhanced anti-allergic activity of milk casein phosphopeptide by additional phosphorylation in ovalbumin-sensitized mice. Molecules, 2019, 24 (4): 738.