



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳たんぱく質の消化性とその消化によって生成される生理活性ペプチドに関する研究
Author(s)	和田, 泰明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7020号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7020
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65641
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuaki_Wada.pdf



乳たんぱく質の消化性とその消化によって生成される
生理活性ペプチドに関する研究

和田 泰明

目次

		頁
第 1 章	序論	
1-1	乳および乳たんぱく質の役割	1
1-2	乳たんぱく質	1
1-3	牛乳・乳製品の加熱殺菌工程と乳たんぱく質の消化性	3
1-4	乳たんぱく質由来の生理活性ペプチド	4
1-5	本研究の目的	5
	図表	6
第 2 章	牛乳の加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造と その消化性に及ぼす影響	
2-1	緒言	13
2-2	材料と方法	13
2-3	結果	17
2-4	考察	19
2-5	小括	21
	図表	22
第 3 章	乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが 乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響	
3-1	緒言	38
3-2	材料と方法	38
3-3	結果	40
3-4	考察	42
3-5	小括	45
	図表	46
第 4 章	母乳における低温加熱殺菌処理の有無が消化を介して生成される 生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響	
4-1	緒言	63
4-2	材料と方法	64
4-3	結果	65
4-4	考察	65
4-5	小括	69
	図表	70
第 5 章	育児用ミルクにおける乳たんぱく質原料の違いが消化を介して生成される 生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響	
5-1	緒言	75
5-2	材料と方法	75

5-3	結果	77
5-4	考察	77
5-5	小括	79
	図表	80
第 6 章	仔ラット消化モデルによる母乳及び育児用ミルク中の乳たんぱく質の消化動態の解析	
6-1	緒言	87
6-2	材料と方法	87
6-3	結果	89
6-4	考察	91
6-5	小括	93
	図表	94
第 7 章	総括	
7-1	緒言	116
7-2	牛乳の加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響	116
7-3	乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響	117
7-4	母乳における低温加熱殺菌処理の有無が消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響	118
7-5	育児用ミルクにおける乳たんぱく質原料の違いが消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響	119
7-6	仔ラット消化モデルによる母乳及び育児用ミルク中の乳たんぱく質の消化動態の解析	119
7-7	結語	120
謝辞		121
引用文献		122

略号一覧

AB	antibacterial	抗菌
ACEi	angiotensin I-converting enzyme-inhibitory	アンジオテンシン I 転換酵素阻害
AH	antihypertensive	血圧降下
α -LA	α -lactalbumin	α -ラクトアルブミン
Ambic	ammonium bicarbonate	炭酸水素アンモニウム
AO	anti-oxidative	抗酸化
AT	anti-thrombotic	抗血栓
β -LG	β -lactoglobulin	β -ラクトグロブリン
Ch	charge	電荷
CML	<i>N</i> -carboxymethyl-lysine	<i>N</i> -カルボキシメチルリジン
CN	casein	カゼイン
CPP	caseinophosphopeptide	カゼインホスホペプチド
CPPh	CPP homologue	CPP ホモログ
dig	digestion	消化
DPP4i	dipeptidyl peptidase-4-inhibitory	ジペプチジル・ペプチダーゼ-4 阻害
eHIF	extensively-hydrolyzed infant formula	(たんぱく質) 高度分解物配合 IF
FDR	false discovery rate	偽陽性率
FL	fructosyl-lysine	フルクトシルリジン
HC	hypocholesterolemic	血清コレステロール低減化
HM	human milk	母乳
HTST	high-temperature short-time	高温短時間 (殺菌法)
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
Immuno	immuno-regulatory	免疫調節
IF	infant formula	育児用ミルク
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計
LF	lactoferrin	ラクトフェリン
LL	lactulosyl-lysine	ラクチュロシルリジン
MS	mass spectrometry	質量分析計
NPN	non-protein nitrogen	非たんぱく態窒素
NS	not significant	統計的有意差無し
OP	opioid	オピオイド
OPN	osteopontin	オステオポンチン
Pan	pancreatin	パンクレアチン
Past HM*	pasteurized human milk	加熱殺菌母乳
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PBST	PBS + 0.05% Tween-20	
Pep	pepsin	ペプシン

PEPi	prolyl-endopeptidase-inhibitory	プロリレントペプチダーゼ阻害
pHIF	partially-hydrolyzed infant formula	(たんぱく質)軽度分解物配合 IF
Plate UHT*	plate-type UHT milk	プレート式 UHT 殺菌牛乳
Plate HTST*	plate-type HTST milk	プレート式 HTST 殺菌牛乳
Raw	raw milk	生乳
Retort sterilized*	retort sterilized milk/formula	レトルト殺菌牛乳/経腸栄養剤
RT	retention time	保持時間
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide Gel	SDS-ホリアクリルアミドゲル電気泳動
sIF*	standard infant formula	通常の IF
Steam-Inf UHT *	steam-infusion UHT milk	スチーム・インフュージョン UHT 殺菌牛乳
Steam-Inj UHT*	steam-injection UHT milk/formula	スチーム・インジェクション UHT 殺菌牛乳/経腸栄養剤
TCA	trichloroacetic acid	トリクロロ酢酸
UHT	ultra-high-temperature	超高温(殺菌法)
unheated*	unheated formula	加熱処理していない経腸栄養剤 (調合液)
WP	whey protein	ホエイたんぱく質
2-ME	2-mercaptoethanol	2-メルカプトエタノール

*本研究で用いた、個々の乳試料を指す際に使用した略号

第1章 序論

1-1 乳および乳たんぱく質の役割

「乳」は、哺乳類の乳腺で作られ、新生児にとって唯一の栄養源となる白色の分泌液である。乳の組成は種によって大きく異なり (Table 1-1 [1])、また産後経時的に変化していくことから [2]、乳とはそれぞれの種や発達段階に応じた、児 (仔) にとって最適かつ十分な栄養源を含む完全栄養食であると考えられている。また乳、栄養源としての役割だけでなく、様々な免疫成分やホルモンを含んでいて、児に対して感染防御や消化管発達促進などにも寄与しているものと考えられている [3]。一方、ヒトは古くから良質な栄養源として他の哺乳類の乳、特に牛乳を摂取してきた。また、牛乳成分を利用した様々な乳製品が開発されており、特に乳たんぱく質は、その消化性とアミノ酸バランスが優れていることから、育児用ミルクや経腸栄養剤・流動食 (以下、経腸栄養剤) などの栄養組成物の主要原材料として広く用いられている [4, 5]。いずれも、乳児・成人の栄養所要量をもとに栄養成分組成が設計されており、前者は何らかの理由で母乳を得ることができない乳児にとっての母乳代替として、後者は加齢や疾病により咀嚼・嚥下による食事の摂食が困難となった病者にとっての食事の代替として、その生命を支える不可欠な役割を果たしている。

1-2 乳たんぱく質

乳たんぱく質はカゼイン (CN) とホエイたんぱく質 (WP) に大別される。CN はリンたんぱく質で、乳中では複数の CN のサブユニットと、リン酸イオン及びカルシウムイオンが会合して、「カゼインミセル」として存在している。等電点が pH 4.6 であるため、胃の中で凝集する性質を持っている [6]。また規則的な二次構造が少ないため、熱に対して安定である。一方 WP は、カゼインミセルに関与しない、乳清 (ホエイ) 中に溶存するたんぱく質である。カゼインとは反対に、熱による変性を受けやすい性質を持つ [7]。乳たんぱく質について、(ヒト) 母乳と牛乳で比較すると、CN/WP 比は前者が約 4:6 であるのに対し、後者では約 8:2 と大きく異なる (Table 1-2 [8])。また、それぞれの CN、WP を構成するたんぱく質の質及び量についても大きな違いがある。CN のサブユニットの構成は、母乳では β -CN が最も大きく、 α_{s1} -CN はほとんど含まれない。一方、牛乳では $\alpha_{s1/s2}$ -CN が最も大きな割合を占めている。WP については、母乳では α -ラクトアルブミン (α -LA) がもっとも多く含まれる WP であるのに対し、牛乳では母乳には存在しない β -ラクトグロブリン (β -LG) が最も豊富に含まれる WP である。その他の WP についても、母乳と牛乳との間に量的に大きな違いがある。それゆえ育児用ミルクにおいて、その多くが牛乳由来のたんぱく質を原料として用いているが、CN/WP 比が母乳の 4:6 に近くなるような配合に設計されている [4]。また、WP のたんぱく質を質的に母乳に近いものにすべく、母乳に豊富に含まれる α -LA やラクトフェリン (LF) を強化した育児用ミルクも開発されていて、またその有用性を検証した臨床試験も盛んに行われている [9-13]。本研究にかかる代表的な乳たんぱく質について、その栄養的役割と機能性を以下にまとめた。

1-2-1 カゼイン (CN)

上述の通り、CNは乳中でカゼインミセルとして存在している。また、豊富な量のリン酸カルシウムを含み、生体利用性の高いカルシウム源として児の骨形成に大きく寄与しているものと考えられる [14]。また、カゼインミセルを構成するサブユニットの1つである κ -CNは、ミセルの表面に存在するサブユニットで、そのC末端側は高度に糖鎖修飾を受けている [15]。この糖鎖は *Helicobacter pylori* などの病原菌と結合し、ヒトの腸管粘膜への病原菌の感染を防御する機能があると考えられている。

1-2-2 α -ラクトアルブミン (α -LA)

α -LAは、(ヒト)母乳に最も多く含まれるたんぱく質の1つであり、必須アミノ酸の供給源として児の成長と発達に寄与している [9, 10]。また、カルシウムイオンや亜鉛イオンと結合能があり、これらミネラルイオンの供給源としても寄与していることが示唆されている。また機能性としては、胃粘膜保護作用や [16]、 α -LAやその酵素分解物によるペプチドホルモン glucagon-like peptide-2 の分泌誘導などが報告されている [17]。 α -LAを強化された育児用ミルクで育てられた児の生長パターンは、母乳栄養児に近い生長パターンを示すといった有用性も報告されている [11]。

1-2-3 β -ラクトグロブリン (β -LG)

β -LGは、反芻動物の乳中には存在するが、霊長類や齧歯類には存在しないたんぱく質で、牛乳では最も多く含まれるWPである。 α -LA同様、必須アミノ酸を豊富に含んだ栄養価の高いたんぱく質であるとともに [18]、レチノールや脂肪酸の輸送体としても機能すると考えられている [19]。

1-2-4 ラクトフェリン (LF)

LFは、鉄結合能を持つ塩基性の糖タンパク質であり、抗菌・抗ウイルス活性を始め、細胞増殖・分化促進能、免疫調節作用、プレバイオティック作用などが報告されている、多機能性タンパク質である [20]。(ヒト)母乳では α -LAに次いで豊富に含まれるWPで [8]、児に対して感染防御や消化器官の発達などに寄与していると考えられている。LFが強化された育児用ミルクについても、児の感染予防などへの寄与が示唆されている [12, 13]。

1-2-5 オステオポンチン (OPN)

OPNは、高度にリン酸化修飾及び糖化修飾された酸性のWPで、児の未発達な腸管や免疫機能の成熟に関与するものと考えられている [21]。母乳に豊富に含まれていることから、近年、OPNを強化した育児用ミルクの治験が行われるようになった。OPNを強化した育児用ミルクを摂取した児では、その血中の必須アミノ酸やサイトカインのレベルが、通常の育児用ミルクを摂取した児と比べて、母乳栄養児の

レベルに近かったことが報告されている [22]。

1-3 牛乳・乳製品の加熱殺菌工程と乳たんぱく質の消化性

1-3-1 牛乳・乳製品の加熱殺菌工程

牛乳及び乳製品は、病原性微生物を死滅させて衛生的品質を確保すること、また一般微生物を殺菌しアルカリフォスファターゼやラクトペルオキシダーゼなどの酵素を失活させて保存性を高めることを目的に、加熱処理に供される。我が国における牛乳の殺菌条件は、食品衛生法に基づく厚生労働省令である「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（乳等省令）」によって「62～65℃ 度で 30 分間加熱殺菌するか、これと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌すること」と規定されている。我が国で市販されている牛乳で一般的に普及している殺菌方法は、高温短時間殺菌法（high-temperature short-time (HTST)法）と、超高温加熱法（ultra-high-temperature (UHT)法）である [23, 24]。HTST 法は、板の間に熱媒（熱湯・蒸気）と牛乳を交互に流すことで牛乳を加熱するプレート式殺菌器を使った間接加熱法（plate-type HTST process）で、通常 72-75℃ 程度で 15-20 秒間加熱保持する方法が用いられている。UHT 法では、プレート式殺菌器を使った間接加熱法に加えて（plate-type UHT process）、直接加熱法という方法も用いられていて、インフュージョン・ベッセルという蒸気を満たしたタンクに牛乳を吹き込んで加熱殺菌するスチーム・インフュージョン式 UHT 殺菌法（steam-infusion UHT process）と、牛乳を配管に通液させているところに蒸気を吹き込むスチーム・インジェクション式 UHT 殺菌法（steam-injection UHT process）があり、通常 135-140 °C 程度で 15-20 秒間加熱保持する方法が用いられている。育児用ミルクについては、我が国では乳等省令における「調製粉乳」に該当し、殺菌条件は規定されていないものの製品中の微生物数について規定されている。一般的な製法として、混合された原料を UHT 殺菌処理に供したのち、スプレー・ドライ乾燥機によって粉状に加工される。経腸栄養剤は、日本では法律上、医薬品タイプと食品タイプが存在する（前者が「経腸栄養剤」、後者が「流動食」と区別して呼ばれている）。いずれも乳たんぱく質を主要原料としている製品が多いが、それらの製品の殺菌条件などについては乳等省令では規定されていない。わが国で市販されている経腸栄養剤のほとんどは液状のもので、常温で数か月間保存することが可能な高い無菌性が求められている。そのため経腸栄養剤の製造に当たっては、原料を調合後、UHT 殺菌法を使って滅菌した液を無菌的に充填するか、レトルトパウチに充填した調合液をレトルト殺菌処理（retort sterilization; 通常 115-120 °C 程度で 20-30 分間の加熱保持）するという、2 種類の製造法が用いられている [24]。

1-3-2 加熱殺菌工程と乳たんぱく質の消化性

加熱殺菌工程は、牛乳・乳製品の衛生的品質と保存性の確保の上で不可欠なものである一方、栄養学的品質や機能性にも影響を及ぼす。例えば、牛乳中のビタミン C は加熱殺菌処理に伴い有意に減少し、その影響は HTST 殺菌法よりも UHT 法の方が大きく、また UHT 法の間でも直接加熱法よりも

間接加熱法の方が大きい [25]。また、乳中の生理活性たんぱく質である LF や免疫グロブリン G (IgG) は、加熱処理によって容易に変性を受け、その生理活性が損なわれる [26]。加熱処理はさらに、乳たんぱく質の栄養学的品質にも大きな影響を及ぼす。まず、豆類のたんぱく質でよく知られているように、熱変性によってたんぱく質の二次構造や高次構造が壊れることで、消化酵素がたんぱく質に作用しやすくなり、消化性は改善する [27]。その一方、牛乳・乳製品中の場合、加熱処理によってたんぱく質は共存する乳糖などの糖質と「メイラード反応」というアミノカルボニル反応を起こす [28]。たんぱく質のリジン残基のε位のアミノ基は糖化修飾を受けやすく、熱履歴に応じて初期メイラード反応産物である lactulosyl-lysine (LL) や fructosyl-lysine (FL) (Figure 1-1a & b)、後期メイラード反応産物である N^ε-carboxymethyl-lysine (CML) へと変換される (Figure 1-1c)。これらの修飾を受けた部位の近傍は構造的に嵩高くなり、たんぱく質への消化酵素への接触が物理的に阻害され、結果、たんぱく質の消化性は低下する [29, 30]。また、たんぱく質中のリジン残基は糖化修飾されることにより、たんぱく質合成のための基質として利用性が低下する [31]。さらに加熱処理は、リン酸化されたセリン残基やシステイン/シスチン残基におけるβ脱離反応を引き起こし、中間体物質である dehydroalanine の生成が進行する (Figure 1-1d)。この dehydroalanine はさらにリジン残基やシステイン残基と反応して、lysinoalanine や lanthionine という架橋構造が形成される (Figure 1-1e & f) [32]。これらの架橋構造もまた消化酵素による作用を阻害するため、たんぱく質の消化性は低下する。加熱処理はこれらの他にも、システイン残基やメチオニン残基の酸化を引き起こしてこれらのアミノ酸の生体利用性を低下させたり [33]、加熱処理に伴ってたんぱく質内・間で新たなジスルフィド結合が形成され、形成された複合体の一部は消化酵素に対して耐性を呈する [34]。上述の通り、育児用ミルクは乳児にとって、経腸栄養剤は病者、弱者にとっての唯一の栄養源となる場合があることから、加熱殺菌に伴う乳たんぱく質の栄養学的品質低下を抑制する意義は大きい。

1-4 乳たんぱく質由来の生理活性ペプチド

消化管内で乳たんぱく質が消化されることは、たんぱく質をアミノ酸源として利用する上で不可欠な過程である。一方、たんぱく質が消化される過程で生成されるペプチドの中には、様々な生理活性を有するものがあり、このような生理活性ペプチドはたんぱく質から切り出されて初めてその活性が発揮される [35]。すなわち消化管は、乳たんぱく質に潜在化している生理活性を顕在化させる役割も果たしているといえる。乳たんぱく質由来の生理活性ペプチドは、腸管内で直接その活性が発揮されるものと、腸管から吸収されて体内を循環し、作用部位まで到達してから機能するものとに分類することができる。前者としては、腸管でのカルシウムイオンの吸収を助けるカゼインホスホペプチド (ミネラルイオンの輸送体) や、腸管内で抗菌活性を発揮して感染防御に寄与するペプチド、プレバイオティックス効果を持ったペプチドなどが挙げられ、これらの機能が発揮される上で、それぞれのペプチド配列が消化酵素に対してある程度の耐性を有する必要がある。後者は、オピオイドペプチドや血圧降下ペプチド、免疫調節ペプチドなどが挙げられ、それぞれのペプチドや前駆体となる断片が消化管から吸収され、活性が失われるまでの分

解を受けずに作用部位まで到達することが、機能を発揮する上での要件となる。

1-5 本研究の目的

上述の通り、育児用ミルクは乳児にとって、また経腸栄養剤は病者・弱者にとっての食事代替として唯一の栄養源となることから、加熱殺菌工程が乳たんぱく質に及ぼす構造的あるいは栄養学的影響についての知見を広げ、製品中の乳たんぱく質の栄養学的品質の維持や向上に活用する意義は大きい。また乳児の発達過程の消化管では、たんぱく質に対して十分な消化能を発揮できず [36]、また腸管の透過性も高いことから [37]、腸管内で乳たんぱく質由来のペプチドが生成（残存）しやすく、またペプチドは体内に吸収されやすい環境であると考えられる。すなわち、乳たんぱく質由来の生理活性ペプチドは、乳児の生理機能に大きな影響を及ぼしている可能性がある。乳たんぱく質が生理活性ペプチドを介して及ぼす影響を解明する上で、生理活性ペプチドの生成パターンの解析は、その端緒を開くものと考えられる。近年、高精度の質量分析計（MS）が普及したことにより、たんぱく質中の修飾構造の部位特異的な同定や、複雑な試料中のペプチド配列の包括的解析が可能となった [38, 39]。

本研究では、牛乳・乳製品中のたんぱく質について、その「加熱殺菌工程に伴うたんぱく質中の修飾構造」、「たんぱく質消化性」、「たんぱく質の消化によって生成される生理活性ペプチド」についての検討を行うことにより、育児用ミルク・経腸栄養剤を栄養学的・生理学的に改良するための基盤となる知見を得ることを目的とした。具体的には、第2章では、牛乳の加工工程における加熱殺菌方法の違いが、乳たんぱく質中に形成される修飾構造とたんぱく質消化性に及ぼす影響について、検証を行った。第3章では、乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤の製造工程における加熱殺菌方法の違いが、乳たんぱく質中に形成される修飾構造とたんぱく質消化性に及ぼす影響について、検証を行った。第4章では、母乳と加熱殺菌母乳について、消化管内におけるたんぱく質消化を模した *in vitro* 試験に供し、乳たんぱく質に由来する生理活性ペプチドの生成パターンを比較した。母乳が母乳バンクからドナーミルクとして供される際、一般的に低温加熱殺菌処理（保持式殺菌器で 62.5 °C で 30 分間加熱）されることから、その影響を評価した試験である。第5章では、乳たんぱく質ベースの通常の育児用ミルクと、乳たんぱく質酵素分解物をベースとしたアレルギー疾患用ミルクについて、*in vitro* 消化試験を行い、生理活性ペプチドの生成パターンを比較した。第6章では、母乳および育児用ミルクについて、乳児を想定した仔ラットを使った *in vivo* 消化試験に供し、それぞれの消化性と消化を介して生成される生理活性ペプチドの生成パターンについて検証した。第7章では、本研究で得られた知見を総括した。本研究では、(ヒト)母乳中の主要たんぱく質として α -LA、LF、OPN、 α_{s1} -CN、 β -CN、および κ -CN を、牛乳中の主要たんぱく質として α -LA、 β -LG、 α_{s1} -CN、 α_{s2} -CN、 β -CN、および κ -CN を解析対象とした。それぞれのアミノ酸配列を Figure 1-2 および Figure 1-3 に示す。

Table 1-1 Average milk composition of Human, cow, goat, and sheep^a

	Human	Cow	Goat	Sheep
Fat (%)	4.0	3.6	3.8	7.9
Lactose (%)	6.9	4.7	4.1	4.9
Protein (%)	1.2	3.2	3.4	6.2
Energy (kcal/100 mL)	68	69	70	105
Calcium (mg/100 g)	33	122	134	193
Phosphorus (mg/100 g)	43	119	121	158
Vitamin A (IU/100 mL)	190	126	185	146
Vitamin D (IU/100 mL)	1.4	2.0	2.3	0.18 ^b

^aThe table is adapted from Ref. 1

^bμg/100 mL

Table 1-2 Protein composition of human and cow's milk^a

	<u>Human (g/L)</u>		<u>Cow (g/L)</u>
	Colostrum	Term Milk	Term Milk
Total Protein	11-32	9	34
CN	3.0-5.6	3.5-4.4	~30
α_{s1} -CN	(-)	(0.6)	(12-15)
α_{s2} -CN	(None)	(None)	(3-4)
β -CN	(2.6)	(2.7)	(9-11)
κ -CN	(1.2)	(0.9)	(3-4)
WP	4.3-11.1	5.3-6.6	~5.0
α -LA	(2.56)	(2-3)	1-1.5
β -LG	(None)	(None)	3-4
LF	5.0-7.0	1.0-2.0	0.01-0.1
OPN	1493 ^b	138 ^b	18 ^b

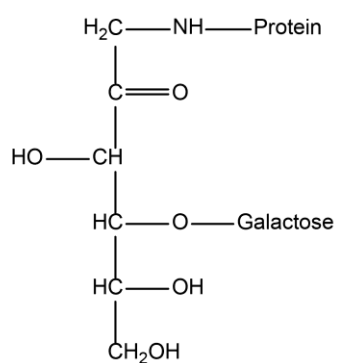
^aThe table is adapted from Ref. 8.

^bmg/L

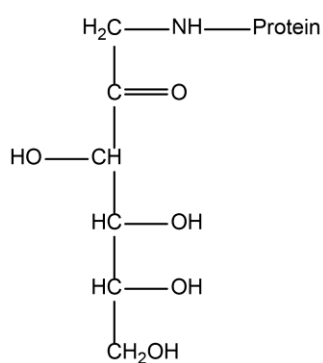
[Abbreviations]

CN, casein; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; LF, lactoferrin; OPN, osteopontin.

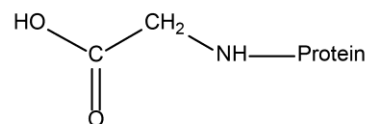
(a) Lactulosyl-lysine residue



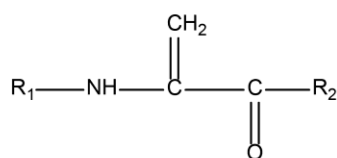
(b) Fructosyl-lysine residue



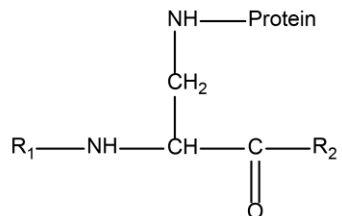
(c) *N*^ε-carboxymethyllysine residue



(d) Dehydroalanine residue



(e) Lysinoalanine residue



(f) Lanthionine residue

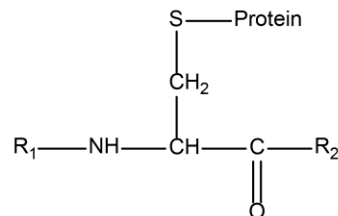


Figure 1-1 Chemical structures of heat-derived protein modifications. Lactulosyl-lysine (LL, a) residue and fructosyl-lysine (FF, b) residue are early Maillard reaction products, which are subsequently oxidized to *N*^ε-carboxymethyllysine (CML; c) residue as an advanced Maillard reaction product. Dehydroalanine residue (d) is the precursor of cross-linked products, lysinoalanine (e) and lanthionine (f) residues.

(a) α -Lactalbumin

KQFTKCELSQ ¹⁰	LLKDIDGYGG ²⁰	IALPELIC ³⁰	FHTSGYDTQA ⁴⁰	IVENNESTEY ⁵⁰	GLFQISNKLW ⁶⁰
CKSSQVPQSR ⁷⁰	NICDISCDKF ⁸⁰	LDDITDDIM ⁹⁰	CAKKILDIK ¹⁰⁰	IDYWLAHKAL ¹¹⁰	CTEKLEQWLC ¹²⁰
EKL					

(b) Lactoferrin

GRRRSVQWCA ¹⁰	VSQPEATKCF ²⁰	QWQRNMRKVR ³⁰	GPPVSCIKRD ⁴⁰	SPIQCIQAIA ⁵⁰	ENRADAVTLD ⁶⁰
GGFIYEAGLA ⁷⁰	PYKLRPVAE ⁸⁰	VYGTERTPRT ⁹⁰	HYYAVAVVKK ¹⁰⁰	GGSFQLNELQ ¹¹⁰	GLKSCHTGLR ¹²⁰
RTAGWNVPIG ¹³⁰	TLRPFLNWTG ¹⁴⁰	PPEPIEAAVA ¹⁵⁰	RFFSASCVP ¹⁶⁰	ADKGQFPNLC ¹⁷⁰	RLCAGTGENK ¹⁸⁰
CAFSSQEPYF ¹⁹⁰	SYSGAFKCLR ²⁰⁰	DGAGDVAFIR ²¹⁰	ESTVFEDLSD ²²⁰	EAERDEYELL ²³⁰	CPDNTRKPVD ²⁴⁰
KFKDCHLARV ²⁵⁰	PSHAVVARSV ²⁶⁰	NGKEDAIWNL ²⁷⁰	LRQAQEKFGK ²⁸⁰	DKSPKFQLFG ²⁹⁰	SPSGQKDLLF ³⁰⁰
KDSAIGFSRV ³¹⁰	PPRIDSGLYL ³²⁰	GSGYFTAIQN ³³⁰	LRKSEEEVAA ³⁴⁰	RRARVVWCAV ³⁵⁰	GEQELRKCNC ³⁶⁰
WSGLSEGSVT ³⁷⁰	CSSASTTDC ³⁸⁰	IALVLKGEAD ³⁹⁰	AMSLDGGYVY ⁴⁰⁰	TAGKCGLPV ⁴¹⁰	LAENYKSQQS ⁴²⁰
SDPDNPNCVDR ⁴³⁰	PVEGYLAVAV ⁴⁴⁰	VRRSDTSLTW ⁴⁵⁰	NSVKGKKSCH ⁴⁶⁰	TAVDRTAGWN ⁴⁷⁰	IPMGLLFNQ ⁴⁸⁰
GSCKFDEYFS ⁴⁹⁰	QSCAPGSDPR ⁵⁰⁰	SNLCALCIGD ⁵¹⁰	EQGENKCVPN ⁵²⁰	SNERYYYGTG ⁵³⁰	AFRCLAENAG ⁵⁴⁰
DVAFVKDVT ⁵⁵⁰	LQNTDGNNE ⁵⁶⁰	AWAKDLKLAD ⁵⁷⁰	FALLCLDGKR ⁵⁸⁰	KPVTEARSCH ⁵⁹⁰	LAMAPNHAVV ⁶⁰⁰
SRMDKVERLK ⁶¹⁰	QVLLHQQAKF ⁶²⁰	GRNGSDCPDK ⁶³⁰	FCLFQSETKN ⁶⁴⁰	LLFNDNTECL ⁶⁵⁰	ARLHGKTTYE ⁶⁶⁰
KYLGPPQYVAG ⁶⁷⁰	ITNLKKCSTS ⁶⁸⁰	PLLEACEFLR ⁶⁹⁰	K		

(c) Osteopontin

IPVKQADSGS ¹⁰	SEEKQLYNKY ²⁰	PDVATWLN ³⁰	DPSQKQNLLA ⁴⁰	PQNAVSSSEET ⁵⁰	NDFKQETLPS ⁶⁰
KSNESHDMMD ⁷⁰	DMDEDDDDH ⁸⁰	VDSQDSIDSN ⁹⁰	DSDDVDDTDD ¹⁰⁰	SHQSDSHHS ¹¹⁰	DESDELVTDF ¹²⁰
PTDLPATEVF ¹³⁰	TPVVPTVDY ¹⁴⁰	DGRGDSVY ¹⁵⁰	LRSKSKKFR ¹⁶⁰	PDIQYPDATD ¹⁷⁰	EDITSHMESE ¹⁸⁰
ELNGAYKAIP ¹⁹⁰	VAQDLNAPSD ²⁰⁰	WDSRGKDSYE ²¹⁰	TSQLDDQSAE ²²⁰	THSHKQSRLY ²³⁰	KRKANDESNE ²⁴⁰
HSDVIDSQEL ²⁵⁰	SKVSREFHSH ²⁶⁰	EFHSHEDMLV ²⁷⁰	VDPKSKEEDK ²⁸⁰	HLKFRISHEL ²⁹⁰	DSASSEVN

Figure 1-2 Amino acid sequences of major milk proteins in human milk. Sequences of α -lactalbumin (a), lactoferrin (b), osteopontin (c), α_{s1} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f), with the numbers of amino acid residues are shown.

(d) α_{s1} -Casein

RPKLPLRYPE ¹⁰	RLQNPSESSE ²⁰	PIPLESREEY ³⁰	MNGMNRQRNI ⁴⁰	LREKQTDEIK ⁵⁰	DTRNESTQNC ⁶⁰
VVAEPEKMES ⁷⁰	SISSSSEEMS ⁸⁰	LSKCAEQFCR ⁹⁰	LNEYNQLQLQ ¹⁰⁰	AAHAQEQRIR ¹¹⁰	MNENSHVQVP ¹²⁰
FQQLNQLAAY ¹³⁰	PYAVWYYPQI ¹⁴⁰	MQYVPFPPFS ¹⁵⁰	DISNPTAHEN ¹⁶⁰	YEKNNVMLQW ¹⁷⁰	

(e) β -Casein

RETIESLSSS ¹⁰	EESITEYKQK ²⁰	VEKVKHEDQQ ³⁰	QGEDEHQDKI ⁴⁰	YPSFQPQPLI ⁵⁰	YPFVEPIPYG ⁶⁰
FLPQNILPLA ⁷⁰	QPAVVLVPVQ ⁸⁰	PEIMEVPAKAK ⁹⁰	DTVYTKGRVM ¹⁰⁰	PVLKSPTIPF ¹¹⁰	FDPQIPKLTD ¹²⁰
LENLHLPLPL ¹³⁰	LQPLMQQVPQ ¹⁴⁰	PIPQTLALPP ¹⁵⁰	QPLWSVPQPK ¹⁶⁰	VLPIPQQVVP ¹⁷⁰	YPQRAVPVQA ¹⁸⁰
LLLNQELLN ¹⁹⁰	PTHQIYPVTQ ²⁰⁰	PLAPVHNPIIS ²¹⁰	V		

(f) κ -Casein

EVQNQKQPAC ¹⁰	HENDERPFYQ ²⁰	KTAPYVPMYY ³⁰	VPNSYPYYGT ⁴⁰	NLYQRRPAIA ⁵⁰	INNPYVPRTY ⁶⁰
YANPAVVRPH ⁷⁰	AQIPQRQYLP ⁸⁰	NSHPPTVVRR ⁹⁰	PNLHPSFIAI ¹⁰⁰	PPKKIQDKII ¹¹⁰	IPTINTIATV ¹²⁰
EPTPAPATEP ¹³⁰	TVDSVVTPEA ¹⁴⁰	FSESIITSTP ¹⁵⁰	ETTTVAVTTP ¹⁶⁰	TA	

Figure 1-2, continued. Sequences of α -lactalbumin (a), lactoferrin (b), osteopontin (c), α_{s1} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f), with the numbers of amino acid residues are shown.

(a) α -Lactalbumin

EQLTKCEVFR ¹⁰	ELKDLKGYGG ²⁰	VSLPEWVCTT ³⁰	FHTSGYDTQA ⁴⁰	IVQNNDSLEY ⁵⁰	GLFQINNKIW ⁶⁰
CKDDQNPHSS ⁷⁰	NICNISCDKF ⁸⁰	LDDDLTDDIM ⁹⁰	CVKKILDKVG ¹⁰⁰	INYWLAHKAL ¹¹⁰	CSEKLDQWLC ¹²⁰
EKL					

(b) β -Lactoglobulin

LIVTQTMKGL ¹⁰	DIQKVAGTWY ²⁰	SLAMAASDIS ³⁰	LLDAQSAPLR ⁴⁰	VYVEELKPTP ⁵⁰	EGDLEILLQK ⁶⁰
WENGCAQKK ⁷⁰	IIAEKTKIPA ⁸⁰	VFKIDALNEN ⁹⁰	KVLVLDTDYK ¹⁰⁰	KYLLFCMENS ¹¹⁰	AEPEQSLACQ ¹²⁰
CLVRTPEVDD ¹³⁰	EALEKFDKAL ¹⁴⁰	KALPMHIRLS ¹⁵⁰	FNPTQLEEQC ¹⁶⁰	HI	

(c) α_{s1} -Casein

RPKHPIKHQG ¹⁰	LPQEVNLNENL ²⁰	LRFFVAPFPE ³⁰	VFGKEKVNEL ⁴⁰	SKDIGSESTE ⁵⁰	DQAMEDIKQM ⁶⁰
EAESISSEE ⁷⁰	IVPNSVEQKH ⁸⁰	IQKEDVPSE ⁹⁰	YLGYLEQLLR ¹⁰⁰	LKKYKVPQLE ¹¹⁰	IVPNSAEERL ¹²⁰
HSMKEGIHAQ ¹³⁰	QKEPMIGVNQ ¹⁴⁰	ELAYFYPELF ¹⁵⁰	RQFYQLDAYP ¹⁶⁰	SGAWYYVPLG ¹⁷⁰	TQYTDAPSFS ¹⁸⁰
DIPNPIGSEN ¹⁹⁰	SEKTTMPLW				

(d) α_{s2} -Casein

KNTMEHVSSS ¹⁰	EESIISQETY ²⁰	KQEKMAINP ³⁰	SKENLCSTFC ⁴⁰	KEVVRNANEE ⁵⁰	EYSIGSSSEE ⁶⁰
SAEVATEEVK ⁷⁰	ITVDDKHYQK ⁸⁰	ALNEINQFYQ ⁹⁰	KFPQYLQYLY ¹⁰⁰	QGPIVLNPWD ¹¹⁰	QVKRNAVPIT ¹²⁰
PTLNREQLST ¹³⁰	SEENSKKTVD ¹⁴⁰	MESTEVFTKK ¹⁵⁰	TKLTEEEKNR ¹⁶⁰	LNFLKKISQR ¹⁷⁰	YQKFALPQYL ¹⁸⁰
KTVYQHQAAM ¹⁹⁰	KPWIQPKTKV ²⁰⁰	IPYVRYL			

Figure 1-3 Amino acid sequences of major milk proteins in infant formula. Sequences of α -lactalbumin (a), β -lactoglobulin (b), α_{s1} -casein (c), α_{s2} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f), with the numbers of amino acid residues are shown.

(e) β -Casein

RELEELNVPG ¹⁰	EIVESLSSSE ²⁰	ESITRINKKI ³⁰	EKFQSEEQQQ ⁴⁰	TEDELQDKIH ⁵⁰	PFAQTQSLVY ⁶⁰
PFPGPINSL ⁷⁰	PQNIPPLTQT ⁸⁰	PVVVPPFLQP ⁹⁰	EVMGVSKVKE ¹⁰⁰	AMAPKHKEMP ¹¹⁰	FPKYPVEPFT ¹²⁰
ESQSLTLTDV ¹³⁰	ENLHLPLPLL ¹⁴⁰	QSWMHQPHQP ¹⁵⁰	LPPTVMFPPQ ¹⁶⁰	SVLSLSQSKV ¹⁷⁰	LPVPQKAVPY ¹⁸⁰
PQRDMPIQAF ¹⁹⁰	LLYQEPVLGP ²⁰⁰	VRGPFPIIV			

(f) κ -Casein

QEQNQEQPIR ¹⁰	CEKDERFFSD ²⁰	KIAKYIPIQY ³⁰	VLSRYPSYGL ⁴⁰	NYQQQKPVAL ⁵⁰	INNQFLPYPY ⁶⁰
YAKPAAVRSP ⁷⁰	AQILQWQVLS ⁸⁰	NTVPAKSCQA ⁹⁰	QPTTMARHPH ¹⁰⁰	PHLSFMAIPP ¹¹⁰	KKNQDKTEIP ¹²⁰
TINTIASGEP ¹³⁰	TSTPTTEAVE ¹⁴⁰	STVATLEDSP ¹⁵⁰	EVIESPPEIN ¹⁶⁰	TVQVTSTAV	

Figure 1-3, continued. Sequences of α -lactalbumin (a), β -lactoglobulin (b), α_{s1} -casein (c), α_{s2} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f), with the numbers of amino acid residues are shown.

第2章 牛乳の加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響

2-1 緒言

市販されている牛乳は通常、微生物学的安全性の確保や賞味期限の延長を目的として、加熱処理がなされる。古典的な加熱殺菌方法として、72 °C で15秒間加熱するHTST殺菌法があり、このような処理がなされた牛乳は4 °C 下で数週間保存することができる。一方、我が国で現在最も普及しているのはUHT殺菌処理された牛乳が冷蔵で流通しているものであり、このような牛乳の場合、無菌充填を行えば常温で数か月間の賞味期限を担保することも可能である。また、海外で広く普及している液状の育児用ミルクや、海外だけでなく国内でも広く流通している液状の経腸栄養剤の場合、高い衛生性と常温での流通が求められることから、UHT殺菌処理された後に無菌充填されたものや、レトルト殺菌処理されたものが市販されている。一方、第1章で述べたとおり、加熱殺菌処理は乳たんぱく質の栄養学的品質に影響を及ぼす。すなわち、たんぱく質は熱変性によって消化性が高まる一方 [27]、加熱に伴うメイラード反応等の修飾反応の進行により、初期メイラード反応産物である LL や後期メイラード反応産物である CML [28]、或いは架橋構造である lysinoalanine や lanthionine といった構造が形成され [32]、消化酵素によるたんぱく質の消化が阻害される (第1章 Figure 1-1) [29, 30, 32]。また、加熱処理によって形成される新たなジスルフィド結合を介して生成される複合体の一部は、消化酵素に対して耐性を呈するものもある [34]。以上のことから、加熱殺菌工程に伴うたんぱく質中の修飾構造を同定・定量することは、牛乳や乳製品中の乳たんぱく質の栄養学的な品質管理の観点において重要と考えられる。近年の高精度な MS の普及により、乳たんぱく質中の修飾構造の解析が飛躍的に進んでいる一方、その結果が栄養学的に解釈されることは、これまでほとんどなかった。

本研究では、生乳を異なる加熱殺菌工程に供し、たんぱく質中に形成された修飾構造を比較するとともに、加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の消化性に及ぼす影響を評価することを目的とした。同一の生乳について、プレート式 HTST 殺菌法、3 種類の UHT 処理 (プレート式 UHT 殺菌法、スチーム・インフュージョン UHT 殺菌法、スチーム・インジェクション UHT 殺菌法)、またはレトルト殺菌法に供した。生乳と加熱処理した牛乳は、トリプシン処理に供した後、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に供して、主要たんぱく質における LL、CML および dehydroalanine の修飾部位を特定するとともに、生乳試料を基準とした修飾レベルの比較定量を行った。(本試験で用いた試験系は lysinoalanine や lanthionine といった架橋構造を直接測定することが出来ないため、それら前駆体であり、それらの架橋構造と同様にその量が熱履歴を反映することが報告されている dehydroalanine について、測定を行った [40]。) 牛乳試料はまた、*in vitro* および *in vivo* の消化試験に供し、たんぱく質消化性について比較を行った。

2-2 材料と方法

2-2-1 牛乳試料の調製

生乳の加熱殺菌処理は、森永乳業株式会社 (神奈川県座間市) のテストプラントにて行い、また加熱殺菌条件は同企業の製品に用いている条件を参考に設定した。本試験で用いた5種類の加熱殺菌方法の「保持温度・時間」、殺菌の強度を示す「F0 値」、およびそれぞれの殺菌条件が用いられている「牛乳・乳製品のタイプ」について、Table 2-1 に記す。F0 値とは、特定の耐熱性を有する細菌 (*Clostridium botulinum* の芽胞) に対して加熱殺菌工程が発揮する「殺菌効率・致死率」であり、それぞれの加熱殺菌工程中の全熱履歴 (昇温・降温プロセス) を基準温度 121.1°C で換算した際の加熱時

間（分）で表される [41]。加熱殺菌後の試料は、30 MPa の均質化処理を行った後、凍結乾燥した。生乳については、均質化処理を行わず、凍結乾燥に供した。

生乳及びレトルト殺菌牛乳については、同社分析センターにてたんぱく質、脂質、炭水化物、灰分、および水分含量を測定し、加熱殺菌前後で栄養成分組成が変化しないことを確認した (Table 2-2)。また同センターにて、全ての牛乳試料について、WP 変性度を算出した (Table 2-3) [42]。すなわち、凍結乾燥した牛乳試料 2 g を 20 mL の超純水で溶解したものを恒温水槽にセットし、37°C 下で 30 分間インキュベートした。次に、8g の塩化ナトリウムを添加後、さらに 37°C 下で 30 分間インキュベートし、CN と変性 WP を沈殿させた。試料を濾紙 (アドバンテック東洋、東京都、No. 2) に通液して得られた濾液 1 mL と 10 mL の酸性飽和食塩水 (飽和食塩水 2 L + 氷酢酸 4 mL) を混合して未変性 WP を白濁させた。その試料について、420 nm の吸光度を測定した。WP 変性度を生乳試料の吸光度 (A)、加熱殺菌処理した牛乳試料の吸光度 (B) から、WP 変性率を $(A - B)/A \times 100\%$ と定義し、算出した。

凍結乾燥した牛乳試料は全て、試験に供するまで 4°C 下で保存した。

2-2-2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

凍結乾燥した牛乳試料を超純水で溶解したものを、4°C 下で遠心分離 (8,500g、30 分) に供した後、浮上した脂肪層をスパチュラを使って除去した。遠心分離によって生じた沈殿は、上清部分とよく懸濁して分散させた。脂肪層を除去した試料のたんぱく質濃度を Bradford 法で測定した後 [43]、たんぱく質濃度が 7.5 g/L になるよう、超純水で希釈調製した。その後、Bio-Rad (Hercules, CA, USA) のシステムを用いて SDS-PAGE を行い、乳たんぱく質を分離した。各試料とも 15% のアクリルアミドゲルにたんぱく質量として 50 μ g を供し、150 V で 90 分間分離を行った。ゲルはその後、Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) で染色した。尚、電気泳動は、還元/非還元条件下 (2-メルカプトエタノール (2-ME) 添加有/無) の 2 種類の条件で行った。

2-2-3 プロテオミクス解析

プロテオミクス解析のための LC-MS/MS 分析は、カリフォルニア大学デービス校の Proteomics Core Facility で行い、たんぱく質の熱履歴に関わる LL、CML、および dehydroalanine の修飾部位の特定と、生乳試料を基準とした修飾レベルの比較定量を行った。またセリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化についても同様の測定を行った。

まず、乳たんぱく質のゲル内消化を既報の手法に則り行った [44, 45]。即ち、凍結乾燥試料を Fisher Optima Water (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) に溶解したものを 10% Novox Tris-glycine gel (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) に供して電気泳動を行い、たんぱく質をゲルに包埋した後、全てのバンドを含む部分を切り出した。切り出したゲルは 100% のアセトニトリルで脱水した後、10mM ジチオレイトール/100mM 炭酸水素アンモニウム (Ambic) を 56°C 下で 30 分間反応させてたんぱく質のジスルフィド結合を還元し、さらに 55mM ヨードアセトアミド/100mM Ambic を室温で 20 分間反応させてシステイン残基をアルキル化した。ゲルを 100mM Ambic で 2 回洗浄した後、遠心濃縮装置 SpeedVac (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) で乾燥させた。Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, , Madison, WI, USA) を酵素/たんぱく質比が 1/30 となるよう、50mM Ambic 下で添加してゲルを再び浸潤させた後、37°C で一晩インキュベートして、ペプチド断片を作製した。上清を回収する一方、ゲルの入ったチューブにペプチド抽出液として 60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸

を加え、ペプチド断片を超音波処理によって抽出し、遠心分離によって回収した。抽出液を回収していた上清と混合した後、SpeedVac で乾固させた。

次に、ペプチド断片を LC-MS/MS 分析に供した。液体クロマトグラフに Paradigm MG4 HPLC (Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA)を、質量分析には Q Exactive Orbitrap 質量分析計 (Thermo Scientific)を用いた。ペプチド断片 (トリプシン処理前のたんぱく質量で 10 μ g に相当)は ZORBAX 300SB C18 逆相トラップカートリッジ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)で脱塩処理した後、200 μ m $\times$ 150 mm Magic C18 AQ 逆相カラム (3 μ m, 200 Å; Michrom Bioresources)に供した。流速 2.0 μ L/min のもと、90 分間かけて溶離液 A (0.1% ギ酸)と B (100% アセトニトリル)の濃度勾配を変化させて、ペプチドを分離した。濃度勾配は、溶離液 B の濃度を 0 分から 70 分の間に 2%から 35%に上げ、70 分から 75 分では 35%から 80%に上げ、75 分から 77 分の間では 80%に一定に保ち、77 分から 78 分の間に 80%から 2%に下げ、最後の 78 分から 90 分の間は 2%の一定に保つ、というサイクルを用いた。イオン化スプレー電圧は 2.2 V、イオントランスファーキャピラリーの温度は 200°C に設定した。質量範囲は質量電荷比 (m/z) 300–1600 を測定した。MS/MS スペクトルは、ダイナミック・エクスクルーージョンを適用下でシグナル強度が上位 15 個の前駆イオンを選択し、高エネルギー衝突誘起解離 (HCD) を使ってプロダクトイオン発生させて取得した。

すべての MS/MS スペクトルから、解析ソフト X! Tandem (version TORNADO (2010.01.01.4), The GPM)を使ってペプチド配列の同定を行った。*Bos Taurus* (ウシ)のたんぱく質配列情報を Uniprot より取得し、その全配列、同数の逆向き配列、及び研究室由来の一般的な混入たんぱく質の配列 60 個に対して検索を行った。また、たんぱく質の消化パターンとして「トリプシン」を選択した。そして、ペプチド配列に含まれる修飾構造として、LL (+324.105647)、CML (+58.005479)、セリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化 (+79.966331)、及びセリン、システイン残基の dehydroalanine 化 (-18.010565, -33.987721)を探索し、またペプチド鎖 N 末端のアセチル化、N 末端の脱アミド、N 末端のピログルタミル化、システイン残基のヨードアセトアミド化、およびメチオニン、トリプトファン残基の酸化によるマス・シフトを想定した検索を行った。これらのペプチド配列と由来する親たんぱく質の同定についての妥当性は、解析ソフト Scaffold (version Scaffold_4.1.1, Proteome Software, Portland, OR, USA)を用いて判定し、false discovery rate (FDR)がペプチド同定レベルで 1.0%未満、たんぱく質同定レベルで 5.0%未満とした [46–48]。

目的の修飾構造を含んだペプチドについて、生乳試料を基準とした比較定量を行うため、まず LC 分析における各ペプチド配列の保持時間 (retention time (RT))の同定を解析ソフト Skyline (version 1.4.0.4421, MacCoss Lab, Department of Genome Science, University of Washington)を用いて行った。次に、信頼性の高いピークエリア値を算出するために、各ペプチドに由来するイオンについて、3 つのモノアイソトピック質量 (M , $M + 1$, $M + 2$)のマスキロマトグラムを解析ソフト Xcalibur (version 2.2. SP1.48, Thermo Scientific)を用いて描き、同定した RT における 3 つのピークエリア値を合算した。合算したピークエリア値は、それぞれのペプチドの親たんぱく質において同定されたスペクトルの数 (たんぱく質量と相関することが報告されている [49])で除することにより、試料間の標準化を行った。

2-2-4 *In vitro* 消化試験

凍結乾燥した牛乳試料を、上述の通りたんぱく質濃度が 7.5 g/L になるよう調製した後、人工胃内消化試験に供した [50]。小児の消化管は発達過程にあり [36]、胃内 pH は成人のそれよりも高いことを考慮して [51–55]、試料の pH を 1N の塩酸を用いて 2.0 (成人モデル)又は 4.0 (小児モデル)に調

整した [50]。その後、豚由来のペプシン (Sigma-Aldrich, Cat. P7000 (≥ 250 units/mg solid))の濃度が 2.0% (w/v) になるよう 1 mM の塩酸で溶解した後、ペプシン/試料中たんぱく質比が 1/12.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 5、10、15、及び 30 分間振盪した。30 分間の振盪後、1 M の重炭酸ナトリウムを用いて試料の pH を 7.0 に調整した。人工胃内消化試験に次いで、試料を人工腸内消化試験に供した。豚由来のパンクレアチン (Sigma-Aldrich, Cat. P7545 (4×USP))の濃度が 0.4% (w/v)になるよう 100 mM の重炭酸ナトリウムで調製した溶液を、パンクレアチン/試料中たんぱく質比が 1/62.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器 (New Brunswick Scientific)にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 5、10、30、および 60 分間振盪した。それぞれの振盪後、試料を恒温水槽にて 85°C で 3 分間加熱し、消化酵素を失活させた。人工消化処理を行った試料は、上述の方法で還元条件下での SDS-PAGE に供して、その消化性の評価を行った。

ペプシン処理を 30 分間、及びペプシン処理 30 分+パンクレアチン処理 60 分間行った試料については、Rudloff & Lönnerdal の方法を用いてたんぱく質消化率を算出した [56]。すなわち、消化前の牛乳試料中の全窒素含量 (A)、消化前の牛乳試料中の非たんぱく質態窒素 (non-protein nitrogen (NPN))含量 (B)、及び消化後の牛乳試料中の NPN 含量 (C)をケルダール法によって測定した後、たんぱく質消化率を「 $(C-B)/(A-B) \times 100\%$ 」と定義し、算出した。NPN は、各試料にトリクロロ酢酸 (TCA)を終濃度が 12% (w/v)となるように添加してたんぱく質沈殿を行った際に得られる、可溶性画分に含まれる窒素とした。

2-2-5 *In vivo* 消化試験

乳たんぱく質の消化性を *in vivo* で評価することを目的に、仔ラットを用いた動物試験を行った [50, 57]。動物試験は、American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care の認定機関である、カリフォルニア大学デービス校の動物実験委員会の承認を得て実施した。Sprague Dawley 母獣ラットと母獣 1 匹あたり 12 匹の同腹仔ラット (雄 6 匹 + 雌 6 匹)を Charles River (Wilmington, MA, USA)から購入した。実験施設への馴化後、14 日令において、仔ラットは母獣から 6 時間隔離して絶食させたのち、6 種類の牛乳試料のうち 1 種類をゾンデを使って強制投与した。牛乳試料は、たんぱく質濃度が 30 g/L に調製したものを、牛乳/体重比が 1/36 (v/w)となるよう強制投与した。投与後 0.5、1.0、または 2.0 時間後に、各仔ラットを二酸化炭素に暴露して安楽死させた後、解剖試験に供して胃および小腸の内容物を採取した。胃からは、内部に認められた白色の凝集物を回収した。また小腸は、均等な長さに 2 等分にしたのち、それぞれの内面をプロテアーゼインヒビター・カクテル (Sigma-Aldrich, P2714)を含んだ 0.2 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline (PBS)で 2 回洗浄し、洗浄液を小腸内容物として回収した。回収した小腸内容物は、解析まで -80°C で保存した。尚、各牛乳試料・タイムポイント毎に、雄 3 匹 + 雌 3 匹の仔ラットをランダムに割り付けた。

In vivo におけるたんぱく質消化性を評価することを目的に、小腸内容物を Western Blotting 法に供した。後述する通り、*in vitro* 消化試験において牛乳試料間の消化性の差は β -LG で最も顕著であったことから、ここでは β -LG の消化性について評価を行った。たんぱく質含量として 5 μ g を還元条件下で SDS-PAGE に供した後、Hybond ECL nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Pewaukee, WI, USA)にたんぱく質を転写した。転写後のメンブレンは、2% ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich)を含んだ PBS + 0.05% Tween-20 (PBST)に浸し、室温にて 45 分間振盪してブロッキングした。メンブレンは PBST で 3 回洗浄した後、一次抗体 rabbit anti-bovine β -LG antibody (Bethyl Laboratories,

Montgomery, TX, USA)をブロッキング液で 20,000 倍希釈した溶液中に浸し、室温にて 45 分間振盪した。メンブレンを再び PBST で 3 回洗浄した後、二次抗体 rabbit anti-goat IgG antibody (GE Healthcare)を 20,000 倍希釈した溶液に浸し、室温にて 45 分間振盪した。メンブレンを再び PBST で 3 回洗浄した後、 β -LG を Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)を用いて検出した。

2-2-6 統計解析

ケルダール法を用いたたんぱく質消化率、*in vivo* 消化試験における胃内容物量、および胃内容物 pH については、解析ソフト Prism 4 (version 4.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて Tukey-Kramer HSD test によって各牛乳試料間の多重比較を行い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

2-3 結果

2-3-1 乳たんぱく質の電気泳動

牛乳試料を SDS-PAGE に供し、バンドパターンを比較した (Figure 2-1)。レトルト殺菌牛乳では、他の牛乳試料と大きく異なり、還元・非還元条件いずれの場合もスミア状のバンドが分子量の広い範囲にわたって認められ、また主要乳たんぱく質である α -LA、 β -LG 及び CN のバンドは薄くなっていた。レトルト殺菌牛乳ほど顕著ではないものの、同様の傾向は 3 種類の UHT 殺菌牛乳でも、特に非還元条件下(たんぱく質のジスルフィド結合を切断しない)で SDS-PAGE を行った際に認められた。これらの結果から、プレート式 HTST 殺菌法はたんぱく質間の相互作用に顕著な影響を及ぼさない、UHT 殺菌法はたんぱく質間に新たなジスルフィド結合を形成させてたんぱく質の凝集を引き起こす、そしてレトルト殺菌法は新たなジスルフィド結合やその他の共有結合の形成を促進して大きなたんぱく質修飾を引き起こしていることが推察された。

2-3-2 プロテオミクス解析

生乳に対する加熱殺菌方法の違いが、たんぱく質消化性に関わる修飾構造の形成に及ぼす影響を比較することを目的に、牛乳試料を LC-MS/MS 分析に供し、LL、CML、および dehydroalanine についての修飾部位の特定と、生乳試料を基準とした修飾レベルの比較定量を行った。LL は、 α -LA、 β -LG および CN において同定されたすべての修飾部位において、レトルト殺菌牛乳のシグナルが最も高く、プレート殺菌 UHT 牛乳とスチーム・インジェクション殺菌牛乳がそれに続いた (Table 2-4)。同様に、 β -LG の Lys77 と CN で同定された全ての部位の CML は、レトルト殺菌牛乳でシグナル値が最も高く、プレート式 UHT 殺菌牛乳およびスチーム・インジェクション UHT 殺菌牛乳がそれに続いた (Table 2-5)。LL および CML による修飾が認められたペプチドの断片のうち、幾つかについては、修飾された Lys 残基の候補が複数想定されたため、部位の特定ができなかった。しかし、LL が CML の前駆体であること、修飾された Lys 残基にはトリプシンが作用できなくなることを考慮すると、複数の候補が想定された修飾部位のいくつかは、次のとおりであったと推察される。すなわち、 α_{s2} -CN の Lys76 または 80 における LL は Lys76 が、 β -LG の Lys47、69、または 70 における CML は Lys47 が、 α_{s1} -CN の Lys34 または 36 における CML は Lys36 が修飾部位であったと推察される (但し、 β -LG の Lys47、69、または 70 における CML は、他の多くの CML とは異なり加熱殺菌によって値は減少しており、検出されたスペクトルが誤って「 β -LG の Lys47、69、または 70 における CML」と特定された可能性もある)。この場合、 α_{s2} -CN の Lys152 と β -LG の Lys105 を除けば、全ての CML の修飾部位が LL が同定され

た部位と一致することとなる。しかしながら、マスキングマトグラムによるピークエリアの算出が出来なかったものの、修飾部位の特定に用いたソフトである Scaffold では、 α_{s2} -CN の Lys152 および β -LG の Lys105 においても CML が同定されていたことから、やはり LL が同定された部位では CML も形成されているものと考えられた。一方、LL や CML とは異なり、dehydroalanine は主要たんぱく質において僅か 3 箇所ではしか同定することができず、加熱殺菌方法の違いによる傾向も認められなかった (Table 2-6)。このことから、これら牛乳試料において、dehydroalanine の形成は僅かなものであると考えられた。

上述の修飾構造に加えて、CN は加熱処理によって脱リン酸化が進むことが知られていることから [58]、これら牛乳試料中の CN のリン酸修飾についても測定を行った (Table 2-7)。リン酸修飾は、 α_{s1} -CN、 α_{s2} -CN、 β -CN の 3 つの Ser 残基でマスキングマトグラムによるピークエリアの算出をすることができた。加熱殺菌した牛乳試料のシグナル値は生乳と比較して低いようであったが、ごく限られた程度の差であった。

2-3-3 乳たんぱく質の *in vitro* 消化試験

牛乳試料を人工消化試験に供した後、SDS-PAGE に供して、たんぱく質消化性の違いを検討した (Figure 2-2)。レトルト殺菌牛乳においては、他の牛乳試料と比べて、 α -LA、 β -LG 及び CN のバンドが速やかに消失したことから、これらのたんぱく質の消化性はレトルト殺菌処理によって向上したものと考えられた。UHT 殺菌処理した 3 種類の牛乳試料においても、 α -LA および β -LG のバンドについては、レトルト殺菌牛乳ほどではないが、同様の速やかな消失が認められた。また α -LA および β -LG のバンドが消失する速さから、UHT 殺菌牛乳においては、プレート式 UHT 殺菌牛乳、スチーム・インジェクション UHT 殺菌牛乳、スチーム・インフュージョン UHT 殺菌牛乳の順にたんぱく質消化性が高いようであった。一方、プレート式 HTST 殺菌牛乳においては、生乳と同じような電気泳動パターンを示しており、プレート式 HTST 殺菌処理はたんぱく質消化性に有意な影響を及ぼさないと考えられた。

ペプシン処理×30 分時点、及びペプシン×30 分+パンクレアチン処理×60 分時点における消化物について、TCA 沈殿法とケルダール法を用いて、たんぱく質消化率を算出した (Figure 2-3)。レトルト殺菌処理は全ての消化条件において、他の牛乳試料よりも高い消化率となった。しかしながら、SDS-PAGE の結果と必ずしも一致しないようであった。

2-3-4 乳たんぱく質の *in vivo* 消化試験

仔ラットに牛乳試料を強制経口投与し、一定時間後に解剖試験に供した (Figure 2-4)。胃の中に白色の凝集物が認められ、CN が酸沈殿したものであることが推察された。レトルト殺菌牛乳を投与した仔ラットにおいては、投与 0.5 時間後および 1 時間後における凝集物の量が、他の牛乳試料を投与した仔ラットと比べて少なく、特に投与 1.0 時間後においてプレート UHT 殺菌牛乳を投与された個体よりも有意に少なかった。投与 2.0 時間後では、牛乳試料の違いによる胃内容物量の差は認められなかった。強い加熱殺菌がカゼインの酸凝集能に負の影響を及ぼすことはこれまでも報告されており [59]、本試験におけるレトルト殺菌処理においても同様の現象が生じたものと考えられた。さらに、投与 2.0 時間後において、レトルト殺菌牛乳を投与した仔ラットの胃内容物の pH は、他の牛乳試料を投与された個体のそれより有意に低い値を示した。レトルト殺菌処理によってカゼインの酸凝集能は低下し、胃から速やかに排出されたことを反映しているものと考えられた。

小腸内容物を SDS-PAGE に供したところ、バンドパターンが複雑なため、たんぱく質の消化性を判断することが困難であった。そこで、Western Blotting 法を用いて評価を行うこととし、*in vitro* 消化

試験で最も牛乳試料間で消化性の違いを呈していた、 β -LG について、抗 β -LG 抗体を用いた Western Blotting を行った (Figure 2-5)。投与 0.5 時間後の上部小腸内容物については、生乳およびプレート式 HTST 殺菌牛乳投与群において、 β -LG の分子量である 18 kDa とそれよりも分子量の小さい位置に強いシグナルが認められたのに対し、3 種類の UHT 殺菌牛乳とレトルト殺菌牛乳を投与した群においては、18 kDa の位置にバンドが僅かに検出されるだけであった。プレート式 HTST 殺菌牛乳群においては、個体間でバンドパターンに差が認められた。後述の第 6 章における同様での試験でも個体間の差が認められており、乳たんぱく質の消化速度は速く、その消化動態を詳細に捉えるためには、より多くの時点での試料採取が必要であったと考えられた。投与 1.0 時間後の上部小腸内容物については、生乳投与群において依然として強いシグナルが認められた一方、他の群においてはシグナルは僅かに検出されるか、全く検出されなかった。投与 2.0 時間後の上部小腸内容物については、全ての群においてシグナルは検出されなかった。同様の試験を下部小腸から採取した内容物についても実施したが、シグナルが弱く、サンプル間の違いは評価できなかった。

2-4 考察

質量分析技術の進歩により、乳たんぱく質中の修飾構造の同定は飛躍的に進んだものの、その結果を栄養学的影響に関連づけた検討はほとんど行われてこなかった。本研究では、同一の生乳を原料に複数の加熱殺菌処理に供し、それぞれについてたんぱく質中の修飾構造についてのプロテオミクス技術を用いた部位の特定と比較定量、および *in vitro/vivo* 消化試験によるたんぱく質消化性についての評価を行った。

乳たんぱく質の修飾部位の特定、特に LL の特定については、プロテオミクス技術を用いた多くの研究がこれまで行われてきた。本研究ではまず、 α -LA においては LL の修飾部位として Lys98 のみが特定された。この Lys98 は、 α -LA が糖化修飾を受ける主要な部位として知られており、これまで UHT 殺菌牛乳や育児用ミルク中の α -LA においても修飾が確認されている [60-62]。 β -LG については、特定された 5 箇所全ての LL 修飾部位が、これまで報告されている、プレート式 HTST 殺菌牛乳、UHT 殺菌牛乳、あるいは育児用ミルクで特定された修飾部位と一致した [29, 60, 62]。このうち Lys47 は、反応性が高く糖化修飾を受けやすい部位として多くの報告がなされており [63, 64]、Meltretter らは様々な乳製品について、同部位の糖化修飾程度の比較定量を行っている [38]。CN については、 α _{s2}-CN の Lys199 を除いて全ての修飾部位が、これまで報告されている部位と一致していた。以上の通り、本研究で特定された糖化修飾部位のほとんどが、これまでの報告と一致しており、本研究で用いた手法の妥当性を支持する結果であると判断された [29, 62]。次に、生乳試料を基準とした修飾レベルの比較定量解析では、LL と CML は加熱処理されていない生乳でも検出されており、一見矛盾した結果であるように思われた。しかしながら、生乳や母乳中のたんぱく質においてこれらの修飾構造が存在することは他にも報告されており、乳たんぱく質の糖化反応は生体内でも起こるものと考えられていることから [65-67]、本試験の生乳試料で LL および CML が検出された結果も妥当なものであると判断された。本研究での修飾構造の定量解析は、生乳試料のシグナル値を基準とした、部位特異的な比較定量解析であるため、修飾部位間の修飾レベルの比較はすることはできない。しかし、LL および CML は、特定されたほとんどの修飾部位においてレトルト殺菌牛乳のシグナル値が最も高く、レトルト殺菌工程における緩やかな昇温/降温プロセスと、123°C で 8 分間という高温で長時間保持する厳しい加熱条件が、メイラード反応を著しく促進しているものと考えられた。レトルト殺菌牛乳と比較すると低いものの、3 種類の UHT 殺菌牛乳はプレート式 HTST 殺菌牛乳と比較して多くの修飾部位で高いシグナ

ル値が認めており、これら殺菌条件における高い保持温度による影響を反映しているものと考えられた。一方、スチーム・インフュージョン UHT 殺菌牛乳のシグナル値は、3 種類の UHT 殺菌牛乳の中では最も低い値を示す傾向であった。これは、単に保持温度が 3 種類の中で最も低かっただけでなく、殺菌の過程で牛乳が蒸気で希釈されることによってメイラード反応速度が抑えられている可能性も考えられた [68]。CML については、 α -LA において認められず、 β -LG おいては試料間でシグナル値に顕著な差は認められなかった。牛乳の CN/WP 比は約 8:2 と CN が圧倒的に多いことから、牛乳中の糖質が量的に多い CN と優先的に反応している可能性や、MS が糖化されたペプチドを同定するにあたり、量的に多い CN に由来するペプチドが優先的に同定されている可能性が考えられた。本研究では、生乳試料を基準とした修飾レベルの比較定量しか行っておらず、加熱殺菌に伴い、どの程度の Lys 残基が修飾を受けているかは測定していない。Payne-Botha & Bigwood は、生乳をオートクレーブで滅菌処理 (122-124°C で 20 分)すると、約 10%の Lys が損なわれることを報告している [69]。本研究のレトルト殺菌牛乳は、これよりも短い保持時間の処理がなされているため、数%程度の Lys 残基が修飾を受けているものと思われる。また、本試験におけるメイラード反応産物の比較定量の結果によると、多くの修飾部位でレトルト殺菌牛乳試料とそれ以外の牛乳試料との間には大きな差があり、レトルト殺菌処理以外の加熱方法による Lys 残基の修飾は 1%に満たないのではないかと予想される。

In vitro 消化物の電気泳動において、UHT 殺菌牛乳およびレトルト殺菌牛乳における主要な乳たんぱく質、特に β -LG のバンドが消失する速さが、他の牛乳試料と比較して速いことから、これらの殺菌処理によって乳たんぱく質の消化性は向上したものと判断された。また、UHT 殺菌牛乳およびレトルト殺菌牛乳における β -LG のバンドの速やかな消失は、*in vivo* 消化試験においても確認された。加熱処理が乳たんぱく質の消化性を促進する効果については、過去にも報告されている。Dupont らは、生乳、HTST 殺菌牛乳、およびオートクレーブ滅菌処理した牛乳について、たんぱく質の消化性を比較しており、滅菌された牛乳は生乳と比べて消化性が良好であったのに対し、HTST 殺菌牛乳は生乳と同じような消化性を示したことを報告している [70]。また、 β -LG についても加熱処理によって消化性が高まることが多く報告されている [34, 59, 71, 72]。加熱処理によるたんぱく質消化性の向上は、たんぱく質が熱変性を受けて高次構造が壊れ、消化酵素が作用しやすくなったためと考えられる。熱変性度の違いは、レトルト殺菌牛乳および UHT 殺菌牛乳の WP 変性度は生乳より低かったこと、およびレトルト殺菌牛乳の胃内凝集能が低下していたことが示しているものと思われた。

一方、ケルダール法を用いて乳たんぱく質の消化率を算出した場合においては、たんぱく質消化率の有意な差はほとんど認められなかった。同様の結果はこれまでも報告されており [73, 74]、また、加熱処理によってたんぱく質の消化性が向上する一方、一部のアミノ酸の利用性の低下や消化酵素に対して耐性を持った短い断片が消化されずに残存するといった、消化性に対する正と負の影響が同時に起こるという報告もなされている [70, 71]。第 1 章で言及した通り、乳たんぱく質は加熱処理によってメイラード反応産物や架橋構造などの形成が進み、これらが消化酵素によるたんぱく質への作用を阻害して、たんぱく質の消化性を低下させる。本研究では、LL の形成がレトルト殺菌牛乳で最も進行していて、それに次いで 3 種類の UHT 殺菌牛乳で進行していた。また、還元/非還元条件下で行った SDS-PAGE のバンドパターンから、3 種類の UHT 殺菌牛乳では新たなジスルフィド結合の形成が進んでおり、レトルト殺菌牛乳ではジスルフィド結合だけでなくそれ以外の共有結合の形成もたんぱく質間で進行していることが示されていた。即ち、熱変性によるたんぱく質消化性の改善は、これらの消化耐性に関わる化学修飾の形成によってある程度相殺されている可能性が考えられた。但し、ケルダール法を用いて算出したたんぱく質消化率が牛乳試料間でほとんど有意な差を示さなかったのは、加熱変

性はたんぱく質の消化性を改善するものの、人工消化試験において形成された短いペプチド断片が TCA 沈殿法で沈殿しないほど短い配列であったため、試料間の消化性の差として検出することが出来なかった可能性もある。Vyon らの報告によると、CN 由来のペプチド断片は 12% の TCA 溶液において、30 アミノ酸残基程度かそれよりも長いペプチドはほぼ 100% 沈殿するものの、20 アミノ酸残基程度の長さのものは配列によって溶解度が大きく異なり、10 アミノ酸残基程度かそれより短いものはほとんど沈殿しないようであり [75]、本研究で算出した消化率では、20-30 kDa より小さい画分の消化性について、十分な評価が出来ていない可能性があることを考慮しなければならない。

レトルト殺菌処理という厳しい加熱処理法を含め、本試験においては加熱殺菌処理による乳たんぱく質の消化性に対する明らかな負の影響は認められなかった。しかしながら、これまでの報告を精査してみると、加熱処理が乳たんぱく質の消化性に悪影響を及ぼしているのは、乳たんぱく質ベースの育児用ミルクや経腸栄養剤といった乳製品の場合が多いようである [56, 76-78]。これらの乳製品中の乳たんぱく質は一般的に、「たんぱく質原料」として加工される過程で加熱処理を受け、さらに「最終製品」として加工される過程でも加熱処理を受けることから、牛乳よりも厳しい熱履歴を経ているものであり、牛乳よりも糖化反応や架橋構造の形成などが進行しているものと考えられる。特にカゼイネイト原料（カゼインナトリウムやカゼインカルシウムなど）の場合、酸沈殿法によって CN 画分を分離した後、高温のアルカリ性水溶液を用いた中和工程に供され、それによって lysinoalanine や lanthionine の形成が促進される [32]。さらに、育児用ミルクや経腸栄養剤は常温で長期間保存されることがあるが、そのような製品中のたんぱく質においては上述の化学修飾がさらに進行している [79]。

2-5 小括

生乳を加熱殺菌処理、特に UHT 殺菌処理やレトルト殺菌処理に供することにより、乳たんぱく質は熱変性を受けてその消化性は改善した。一方、たんぱく質の消化性を低下させるような化学修飾の形成も進行し、それらが消化性の改善を一部相殺している可能性が認められた。これまで加熱殺菌工程が乳たんぱく質の消化性に及ぼす影響については、ポジティブな結果とネガティブな結果が混在して報告されていたが、本試験により、牛乳の製造工程（生乳を加熱殺菌）で用いられるプレート式 HTST 殺菌法やプレート式 UHT 殺菌法、スチーム・インフュージョン UHT 殺菌法は、乳たんぱく質の消化性に影響を及ぼさないか（プレート式 HTST 殺菌法）、消化性を改善する（UHT 殺菌法・レトルト殺菌法）ことを示すことが出来た。また、生乳中の乳たんぱく質と育児用ミルクや経腸栄養剤といった乳製品に用いられた乳たんぱく質の間には熱履歴に大きな差があることから、育児用ミルクや経腸栄養剤についても、本試験と同様の試験を行う必要があると判断された。

Table 2-1 Heat treatment of milk samples

Treatment	Holding Temp./Time	F ₀ Value	Reference Product ^a
Plate-type HTST process	73°C for 15 sec	0	Milk
Plate-type UHT process	140°C for 2 sec	2.6	Milk
Steam-infusion UHT process	135°C for 2 sec	0.8	Milk
Steam-injection UHT process	151°C for 4 sec	65	Liquid Enteral Formula
Retort Sterilization	123°C for 8 min	20	Liquid Enteral Formula

^aHeating conditions were set by reference to those of the manufacturer's commercial products.

Table 2-2 Nutrient composition of lyophilized raw and in-can sterilized milk

Component (g/100g)	Raw milk	Retort Sterilized milk
Protein	25.5	25.5
Fat	28.7	28.3
Carbohydrate	38.2	38.2
Ash	5.5	5.6
Water	2.1	2.4

Table 2-3 Ratio of denatured whey protein in milk samples

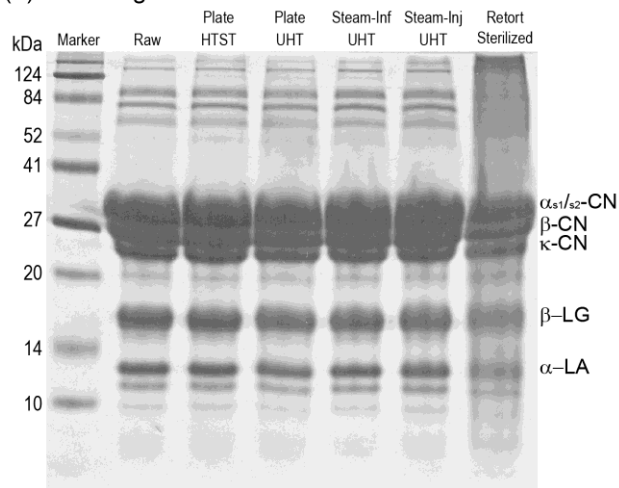
	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
Denatured WP (%)	8.9	82.7	46.3	75.9	88.6

Relative ratios of denatured WP are shown assuming that raw milk has no denatured WP (i.e., 0%).

[Abbreviations]

WP, whey protein; Plat HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj, steam-injection milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk.

(a) Reducing condition



(b) Non-reducing condition

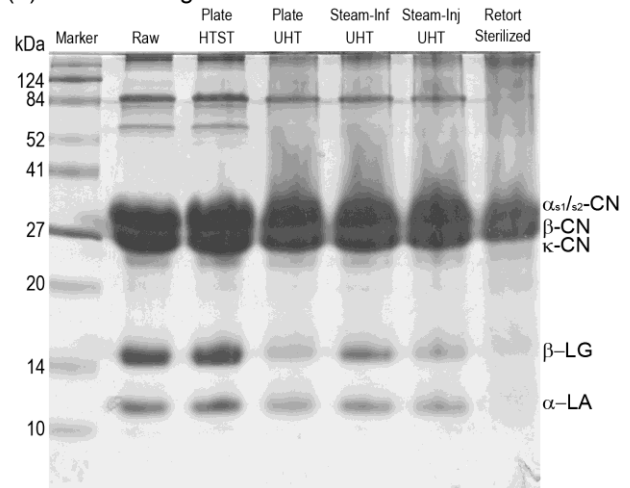


Figure 2-1. Electrophoresis of milk proteins. Milk samples were applied to SDS-PAGE analysis under reducing (a) and nonreducing (b) conditions. Fifty micrograms of protein was loaded onto a 15% gel, and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plat HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj, steam-injection milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; CN, casein; β -LG, β -lactoglobulin; α -LA, α -lactalbumin.

Table 2-4 Lactulosyl-lysine in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α -LA	95-108	Lys98	[3+]	1.1	3.0	2.4	3.7	9.8
			[4+]	0.9	2.1	1.4	2.4	6.0
β -LG	41-60	Lys47	[3+]	1.0	1.6	2.1	2.5	3.6
	76-83	Lys77	[2+]	1.4	4.4	2.0	5.5	16.5
	76-101	Lys83 or Lys91	[4+]	1.2	4.5	1.6	2.1	10.2
	84-101	Lys91	[3+]	1.1	1.7	1.6	2.0	2.4
	125-138	Lys135	[2+]	1.0	3.0	2.3	4.0	6.2
			[3+]	1.1	2.8	2.1	4.0	4.8
α_{S1} -CN	4-22	Lys7	[3+]	0.8	2.6	2.0	3.0	6.3
			[4+]	1.1	3.1	1.8	3.3	6.1
	35-42	Lys36	[2+]	1.2	2.7	2.4	3.8	13.7
	80-90	Lys83	[2+]	1.0	1.8	1.5	4.6	12.4
			[3+]	1.9	4.1	1.9	4.9	9.7
	104-119	Lys105	[2+]	1.8	26.9	5.6	46.2	505.3
			[3+]	2.6	5.6	2.0	7.7	62.3
	120-132	Lys124	[2+]	3.7	11.9	2.8	9.4	101.6
	125-151	Lys132	[2+]	1.5	3.9	1.6	4.9	19.8
			[3+]	2.1	5.4	2.3	5.3	24.0
α_{S2} -CN	25-41	Lys32	[2+]	0.5	3.1	1.5	3.2	17.1
			[3+]	0.6	2.4	1.3	3.1	21.2
	71-91	Lys76 or Lys 80	[3+]	1.1	4.1	1.7	4.3	10.1
			[4+]	1.2	3.5	1.7	3.6	8.5
	171-181	Lys173	[2+]	1.5	2.8	1.7	3.3	6.2
			[3+]	1.6	2.4	1.8	3.1	5.4
	174-188	Lys181	[2+]	1.6	3.9	2.4	3.3	8.0
			[3+]	1.2	2.5	1.6	2.9	4.9
			[4+]	1.5	2.3	1.6	2.5	4.0
	198-205	Lys199	[2+]	1.1	1.8	0.8	2.1	4.2
			[3+]	1.2	1.5	0.8	2.3	4.1

Milk samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing lactulosyl-lysine in milk proteins. Peak area values of the specific peptides are expressed as mean values (n=2); normalized to raw milk (i. e., all the values for raw milk are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk, Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk, Steam-Inj UHT, steam injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 2-4, continued

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
β -CN	170-183	Lys176	[2+]	0.9	1.4	1.1	1.5	5.8
			[3+]	1.1	1.5	1.0	2.1	4.5
κ -CN	22-34	Lys24	[2+]	1.9	5.6	4.1	6.1	12.1
			[3+]	2.0	4.9	3.5	5.2	11.3
	35-68	Lys46	[4+]	1.9	6.4	2.6	6.2	20.1
	69-97	Lys86	[3+]	1.0	4.1	3.3	4.7	34.7
			[4+]	1.6	4.7	2.3	3.8	31.1

Milk samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing lactullosyl-lysine in milk proteins. Peak area values of the specific peptides are expressed as mean values (n=2); normalized to raw milk (i. e., all the values for raw milk are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk, Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk, Steam-Inj UHT, steam injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 2-5 *N*^ε-carboxymethyl-lysine in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
β-LG	41-70	Lys47, Lys69, or Lys70	[3+]	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1
	76-83	Lys77	[2+]	0.9	1.2	0.1	2.7	3.9
			[3+]	2.2	3.0	0.4	6.9	11.2
	125-138	Lys135	[3+]	0.6	0.6	0.8	1.1	0.8
α _{S1} -CN	4-22	Lys7	[3+]	1.0 ^a	1.7	1.0	1.7	4.9
			[4+]	1.0 ^a	1.5	1.0	1.6	3.8
	23-36	Lys34 or Lys36	[3+]	22.1	68.7	18.9	63.8	552.0
	80-90	Lys83	[2+]	3.4	20.9	3.7	20.1	142.5
			[3+]	3.4	4.6	0.9	4.9	16.2
α _{S2} -CN	71-80	Lys76	[2+]	2.9	10.1	1.5	18.2	28.6
	151-160	Lys152	[2+]	1.2	0.8	1.2	2.1	8.2
	171-181	Lys173	[2+]	6.7	11.3	2.4	11.5	54.8
			[3+]	26.5	35.1	13.6	20.5	115.6
	198-205	Lys199	[2+]	2.7	9.0	1.1	3.4	55.0
β-CN	98-107	Lys105	[2+]	nd	nd	nd	nd	1.0 ^a
	170-183	Lys176	[2+]	4.3	10.8	2.9	6.6	77.6
			[3+]	2.3	3.4	1.8	2.9	15.6
κ-CN	22-34	Lys24	[2+]	0.9	1.8	2.6	4.1	20.0
			[3+]	0.8	1.2	1.3	3.2	8.7

Milk samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing lactulosyl-lysine in milk proteins. Peak area values of the specific peptides are expressed as mean values (n=2); normalized to raw milk (i. e., all the values for raw milk are 1.0.). ^aThe peak area value are normalized to other milk samples as those from raw milk was below detection limit.

[Abbreviations]

Ch, charge state; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk, Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk, Steam-Inj UHT, steam injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; β-LG, β-lactoglobulin; CN, casein.

Table 2-6 Dehydroalanine derivatives on Ser in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α_{S1} -CN	104-119	Ser115	[2+]	0.6	1.7	0.7	1.4	1.2
			[3+]	0.4	1.0	0.5	0.8	0.6
β -CN	33-48	Ser35	[2+]	0.3	0.6	0.3	0.3	0.3

Milk samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing dehydroalanine on Ser in milk proteins. Measured values of peak areas are shown (n=1); normalized to raw milk (i. e., all the values for raw milk are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk, Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk, Steam-Inj UHT, steam injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; CN, casein.

Table 2-7 Phosphorylation on Ser in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Plate HTST	Plate UHT	Steam-Inf UHT	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α_{S1} -CN	104-119	Ser115	[2+]	0.7	1.0	0.9	0.7	0.5
			[3+]	0.8	0.7	0.7	0.8	0.5
α_{S2} -CN	25-41	Ser31	[2+]	2.1	0.9	1.8	0.7	4.0
			[3+]	2.1	0.6	1.4	0.4	4.3
β -CN	33-48	Ser35	[2+]	0.9	0.7	1.0	0.8	0.7
			[3+]	0.8	0.6	1.1	0.7	0.6

Milk samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing phosphorylation on Ser in milk proteins. Measured values of peak areas are shown (n=1); normalized to raw milk (i. e., all the values for raw milk are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk, Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk, Steam-Inj UHT, steam injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk; CN, casein.

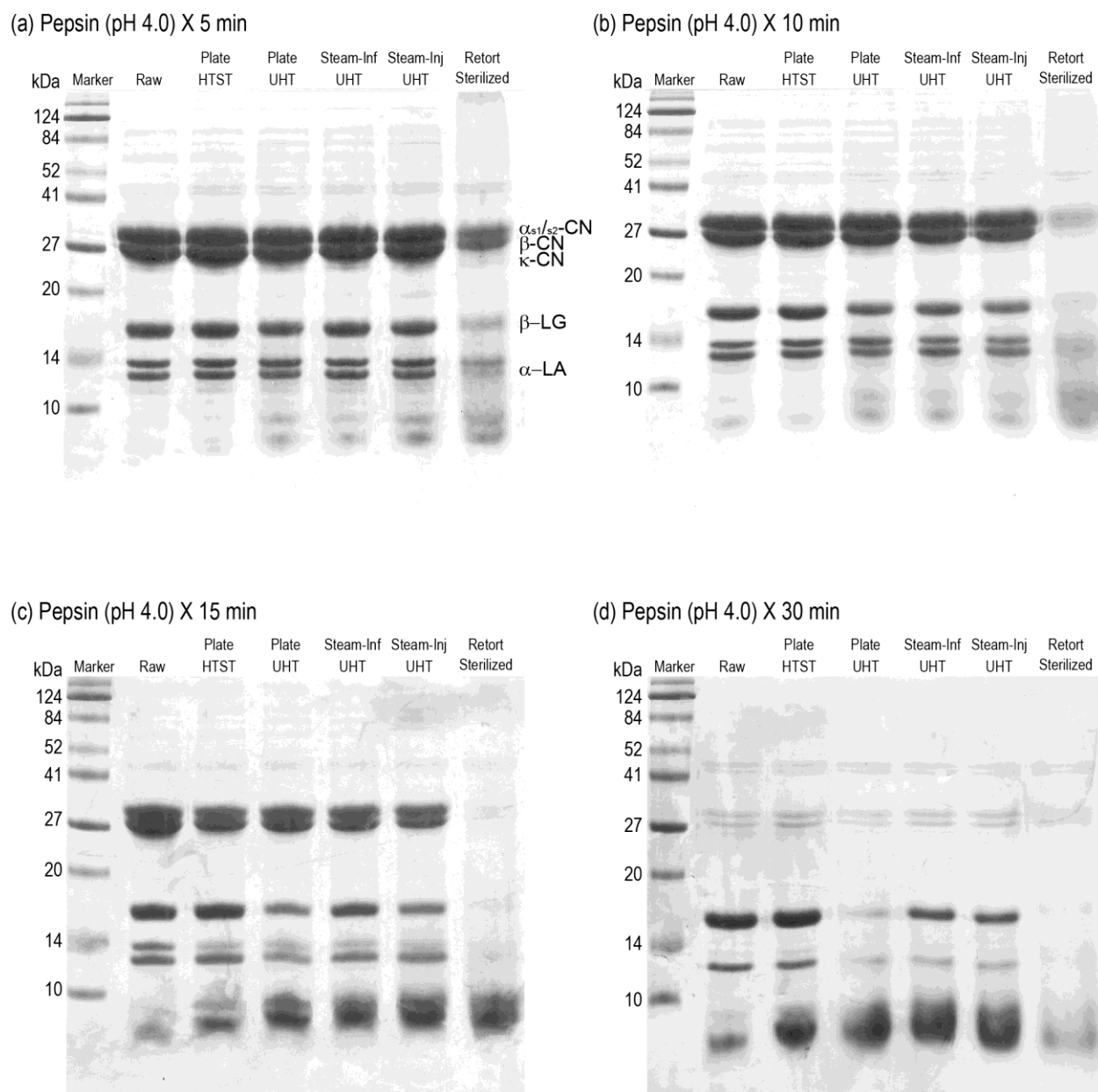
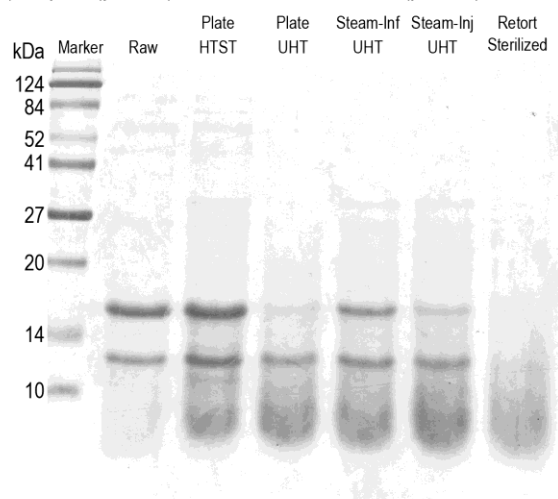


Figure 2-2 Electrophoresis of milk proteins after *in vitro* digestion. Milk samples were subjected to *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin for different time periods. Both infant (a-h) and adult (i-p) digestion conditions were simulated by adopting different pH values during the peptic digestion. Fifty micrograms of protein (before digestion) was loaded on 15% gel, and the gel was stained with Commassie Brilliant Blue R-250.

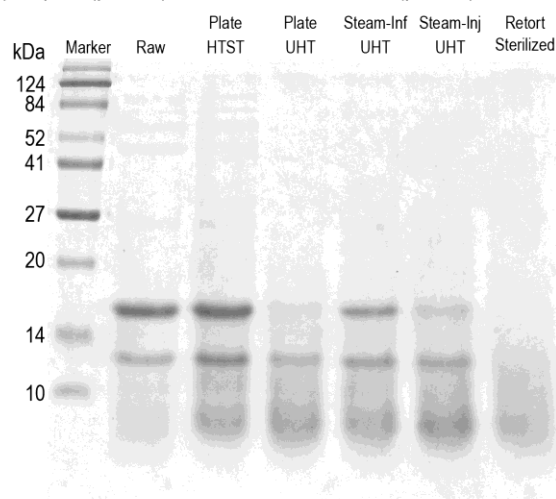
[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk.

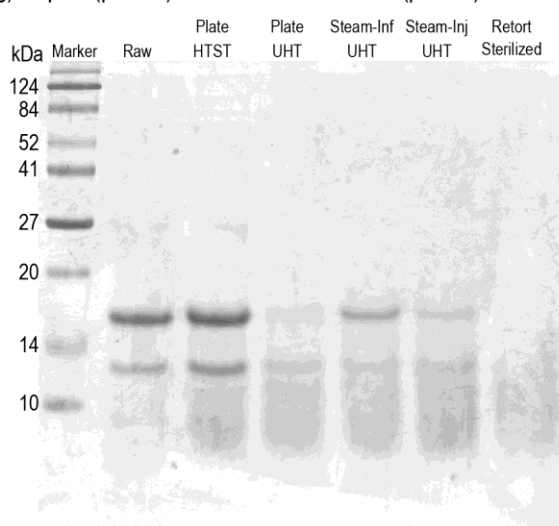
(e) Pepsin (pH 4.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 5 min



(f) Pepsin (pH 4.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 10 min



(g) Pepsin (pH 4.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 30 min



(h) Pepsin (pH 4.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 60 min

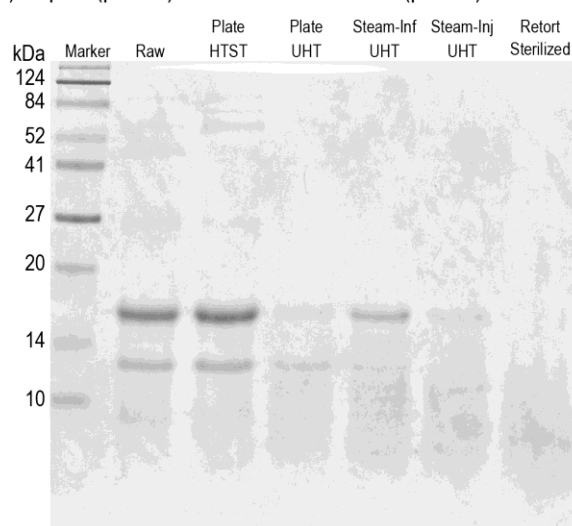
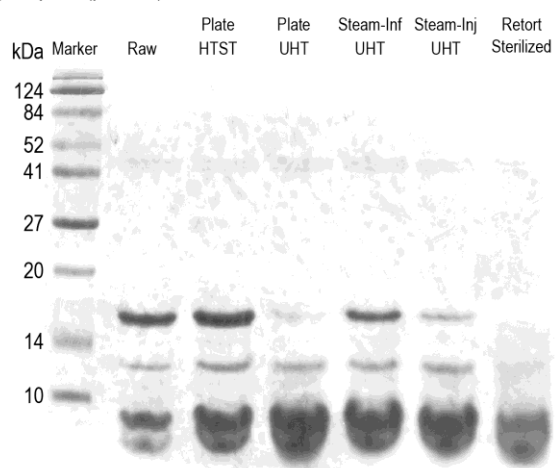


Figure 2-2, continued. Milk samples were subjected to *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin for different time periods. Both infant (a-h) and adult (i-p) digestion conditions were simulated by adopting different pH values during the peptic digestion. Fifty micrograms of protein (before digestion) was loaded on 15% gel, and the gel was stained with Commassie Brilliant Blue R-250.

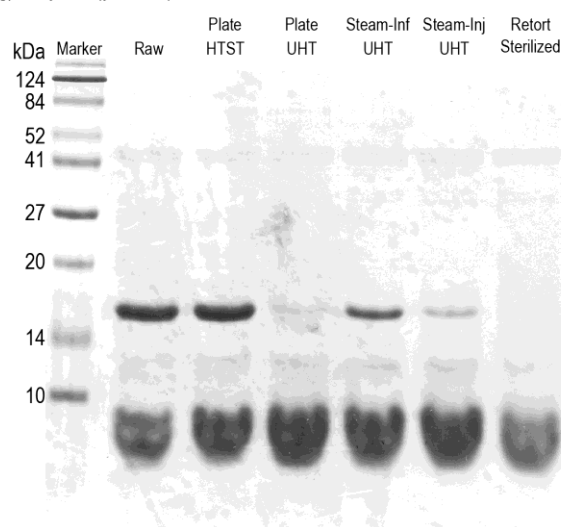
[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk.

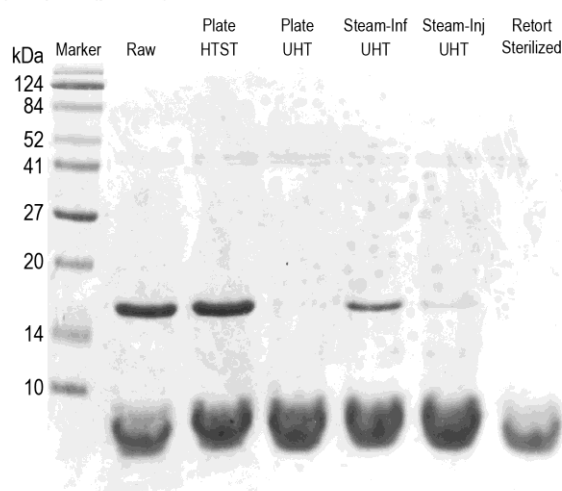
(i) Pepsin (pH 2.0) X 5 min



(j) Pepsin (pH 2.0) X 10 min



(k) Pepsin (pH 2.0) X 15 min



(l) Pepsin (pH 2.0) X 30 min

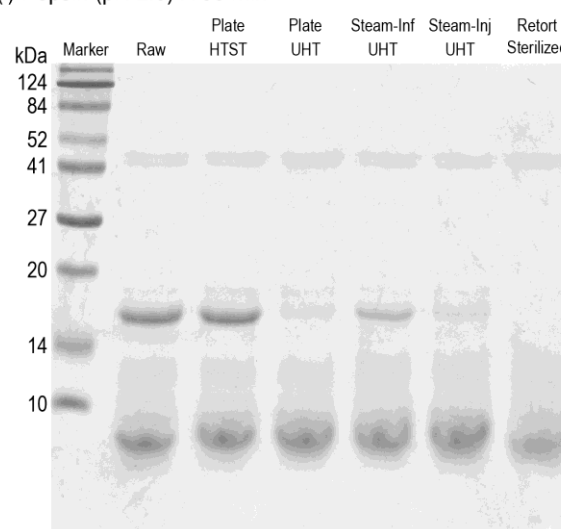
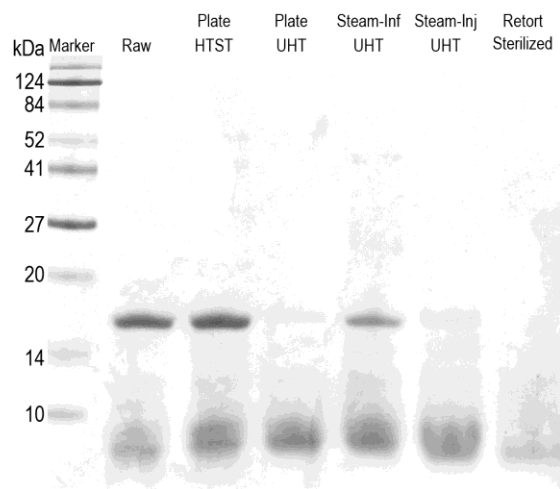


Figure 2-2, continued. Milk samples were subjected to *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin for different time periods. Both infant (a-h) and adult (i-p) digestion conditions were simulated by adopting different pH values during the peptic digestion. Fifty micrograms of protein (before digestion) was loaded on 15% gel, and the gel was stained with Commassie Brilliant Blue R-250.

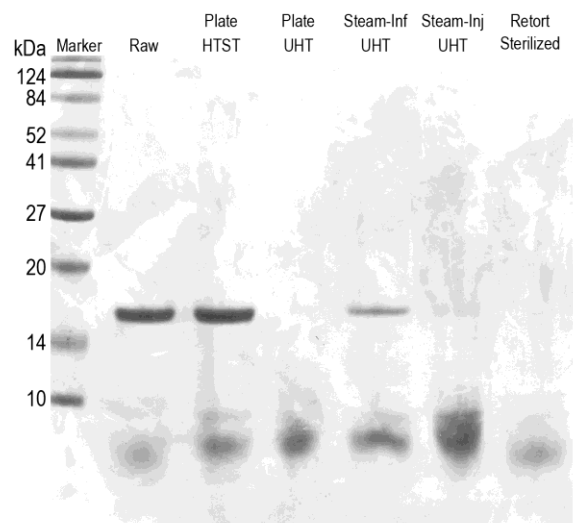
[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk.

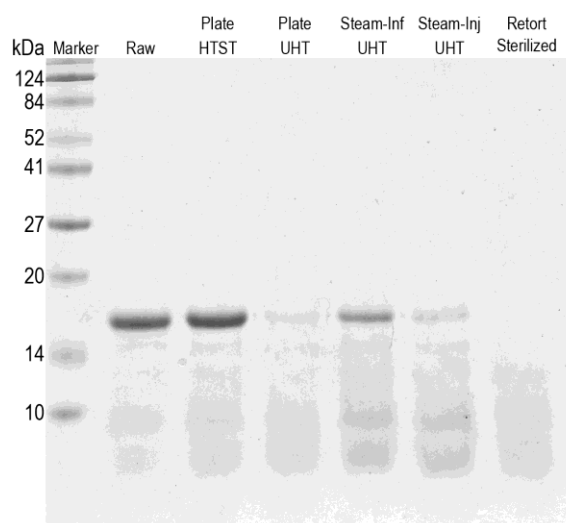
(m) Pepsin (pH 2.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 5 min



(n) Pepsin (pH 2.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 10 min



(o) Pepsin (pH 2.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 30 min



(p) Pepsin (pH 2.0) X 30 min + Pancreatin (pH 7.0) X 60 min

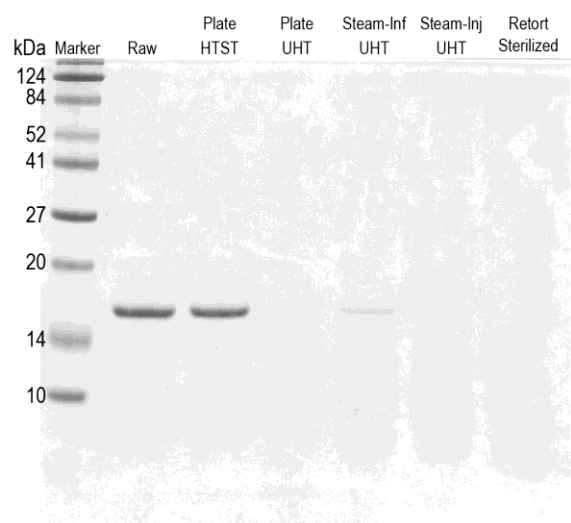


Figure 2-2, continued. Milk samples were subjected to *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin for different time periods. Both infant (a-h) and adult (i-p) digestion conditions were simulated by adopting different pH values during the peptic digestion. Fifty micrograms of protein (before digestion) was loaded on 15% gel, and the gel was stained with Commassie Brilliant Blue R-250.

[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plate HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk.

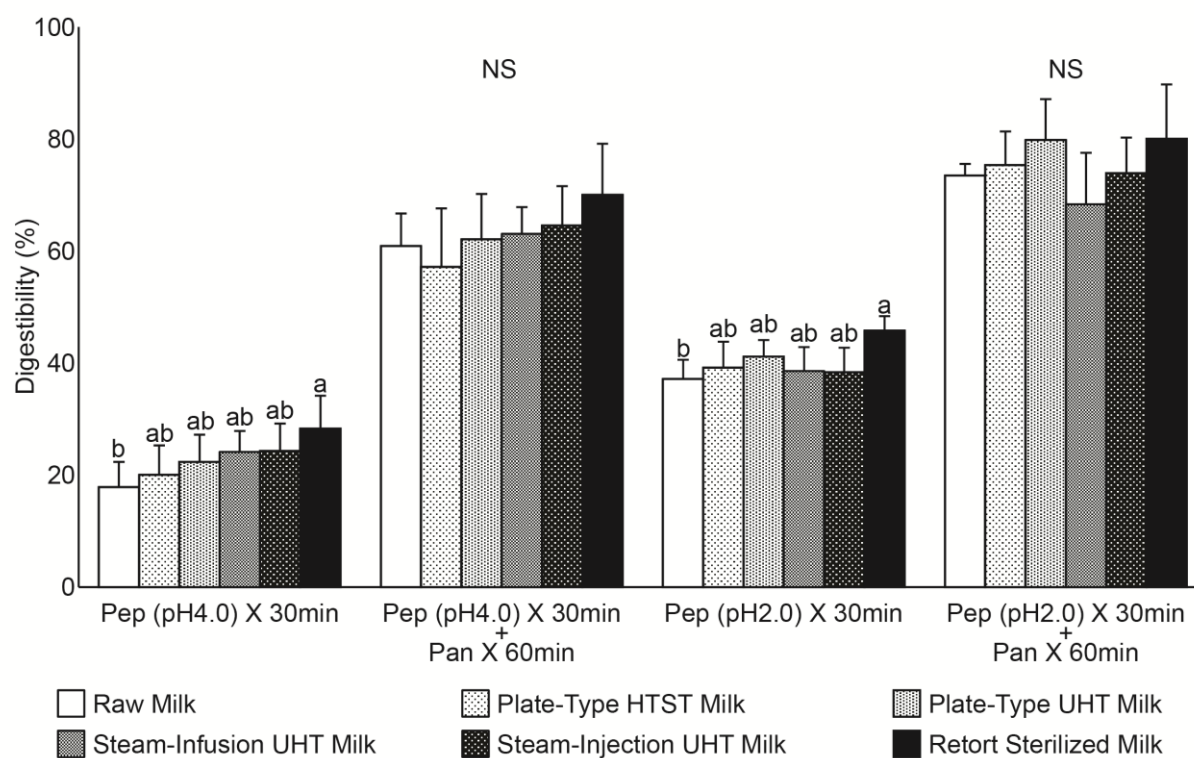
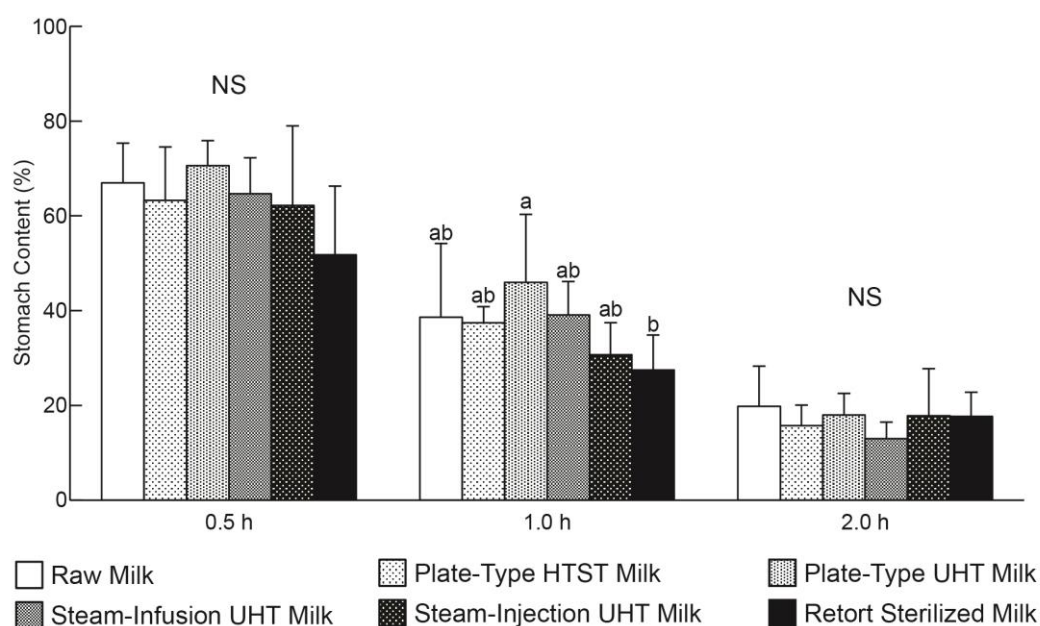


Figure 2-3 Protein digestibility of milk proteins after *in vitro* digestion. Protein digestibility was defined as the increase in NPN after *in vitro* digestion, which was determined by the combination of TCA precipitation and a Kjeldahl procedure. Each of the digestion and the subsequent procedures was conducted 6 times, and data are expressed as means $\pm$ SD. At each digestion condition, values with different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$).

[Abbreviations]

NS, not significant; Pep, pepsin; Pan, pancreatin

(a) Stomach Content Wet Weight



(b) Stomach Content pH

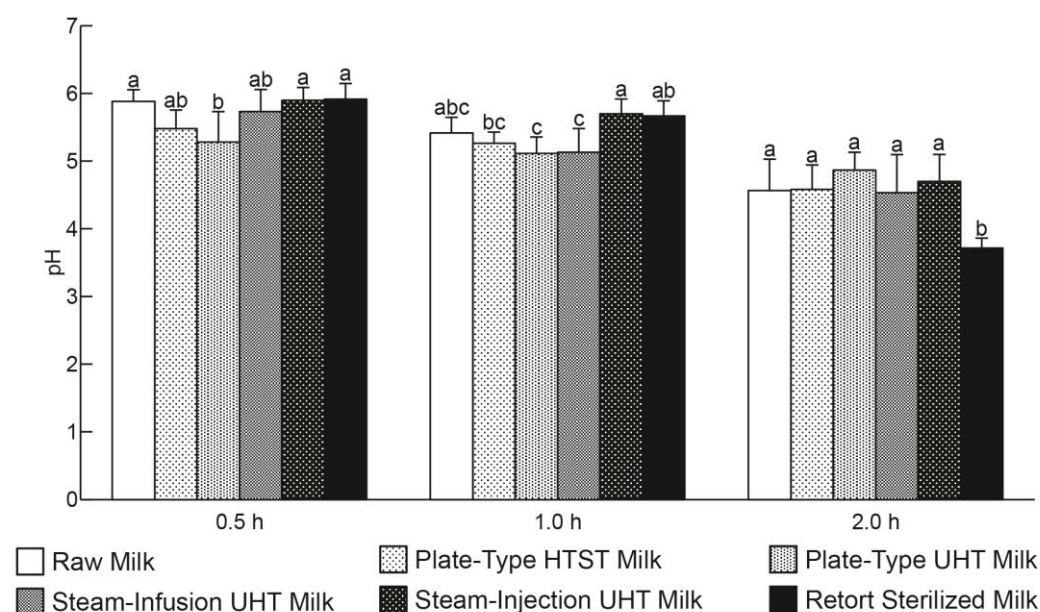


Figure 2-4 Stomach contents of suckling rat pups. Rat pups fed different milk samples were euthanized at 0.5 h, 1 h, and 2 h after intubation, and the stomach contents were obtained. Wet weight (a; expressed as stomach content weight/volume of milk administered (% w/v)) and pH of the aggregates (b) were measured, and data are expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$ males + 3 females). At each time point, values with different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$). NS denotes not significant.

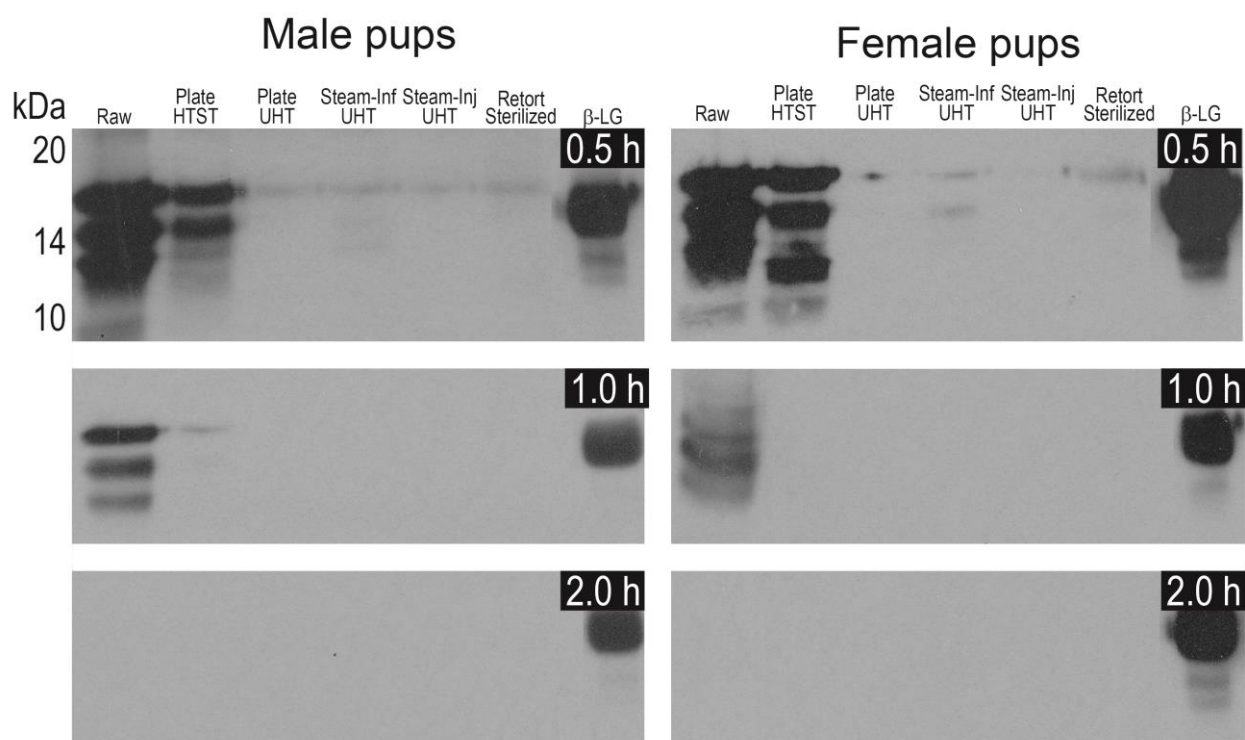


Figure 2-5 Western blotting of β -LG in upper small intestine perfusates from suckling rat pups. Rat pups fed different milk samples were euthanized at 0.5 h, 1.0 h, and 2.0 h after intubation, and the upper intestines were perfused with PBS containing protease inhibitor. Five micrograms of protein was loaded and β -LG was detected by Western blotting.

[Abbreviations]

Raw, raw milk; Plat HTST, plate-type HTST milk; Plate UHT, plate-type UHT milk; Steam-Inf UHT, steam-infusion UHT milk; Steam-Inj UHT, steam-injectin UHT milk; Retort Sterilized, retort sterilized milk, β -LG, β -lactoglobulin.

第3章 乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響

3-1 緒言

乳たんぱく質は、その消化性とアミノ酸バランスが優れていることから、育児用ミルクや経腸栄養剤など栄養組成物の主要原材料として広く用いられている。乳たんぱく質以外として、乳糖やマルトデキストリン、オリゴ糖などの炭水化物、植物油や魚油などの脂質を主要原材料とし、さらにビタミン、ミネラル源を添加して、乳児・成人の栄養要求量に適した組成に設計されている。育児用ミルクや経腸栄養剤の製造においては、これらの原料を混合した「調合液」を作製したのち、加熱殺菌工程に供される。我が国では、育児用ミルクは粉末状の製品である「調製粉乳」のみが法律で定義されていて、乳ベースの育児用ミルクは粉ミルクのみが流通している。一方欧米では、粉ミルクだけでなく液状の育児用ミルクも広く流通している。また経腸栄養剤の場合、日本国内で市販されている製品のほとんどが液状のものである。これらの液状の製品には、高い衛生性と常温での流通が求められていることから、UHT 殺菌法やレトルト殺菌法が用いられている。

2-1 でも言及したように、加熱殺菌が乳たんぱく質の及ぼす栄養学的影響については、これまで多くの報告がある。加熱処理によってまず、乳たんぱく質は変性を受け、たんぱく質の2次構造や高次構造が壊されることで消化酵素がたんぱく質に作用しやすくなり、その結果、消化性は向上する [27]。一方乳たんぱく質は、加熱処理に伴って多くの化学修飾を受ける (第1章 Figure 1-1) [28]。メイラード反応の進行によって、乳たんぱく質のリジン残基は糖化修飾を受け、これが消化酵素の乳たんぱく質への接触を阻害し、たんぱく質の消化性は低下する [29, 30]。また、生体は修飾を受けたリジン残基をアミノ酸合成に利用することができず、乳たんぱく質の生物価は低下する [31]。さらに、架橋構造である lysinoalanine や lanthionine の形成が進行し、これらの構造もたんぱく質の消化性を低下させる [32]。このように、乳たんぱく質の修飾構造を解析することは、乳たんぱく質の栄養性を評価する上で重要である。

第2章では、異なる加熱殺菌工程に供した牛乳中のたんぱく質について、プロテオミクス技術を用いた修飾構造の特定と、*in vitro/vivo* 消化試験によるたんぱく質の消化性の評価を行った。その結果、加熱処理によって牛乳中のたんぱく質は熱変性を受けて消化性は向上する一方、消化を阻害する化学修飾反応が同時に進行することにより、加熱変性による消化性に対する改善効果を一部相殺している可能性が認められた。一方、これまでの報告によると、加熱処理が乳たんぱく質の栄養性に及ぼす負の影響は、乳たんぱく質ベースの育児用ミルクや経腸栄養剤において、より顕著なようである [56, 76-78]。すなわち、牛乳の場合と上述の乳製品の場合とでは、同じ加熱殺菌処理に対して乳たんぱく質が受ける栄養学的影響は異なると考えられる。

本研究では、脱脂粉乳とカゼインナトリウムを乳たんぱく質原料とした経腸栄養剤を調合し、スチーム・インJECTION UHT 殺菌処理またはレトルト殺菌処理に供した。加熱殺菌処理を行っていないものを含めた3種類の経腸栄養剤について、第2章と同様のプロテオミクス解析と *in vitro/vivo* 消化試験に供し、その乳たんぱく質の修飾構造と消化性について検討した。

3-2 材料と方法

3-2-1 経腸栄養剤の調製

経腸栄養剤は、森永乳業株式会社のテストプラントにて作製した。同社が販売する製品の組成を参考に、脱脂粉乳 (ハイヒート)、カゼインナトリウム、植物油、マルトデキストリン、ビタミン、ミネラル、及び

乳化剤を原料として用いた。これにより、CN:WP 比は約 7:1 となる。これらの原料を混合した後、2 通りの加熱殺菌工程に供した。本試験で用いた 2 種類の加熱殺菌方法の「保持温度・時間」、および殺菌の強度を示す「F0 値」について、Table 3-1 に記した。加熱殺菌後の試料は、30 MPa の均質化処理を行った後、凍結乾燥した。非加熱前の調合液については、均質化処理を行わず、凍結乾燥に供した。非加熱試料の凍結乾燥品のたんぱく質、脂質、炭水化物、灰分、及び水分含量は、同社分析センターにて測定した (Table 3-2)。凍結乾燥試料は全て、試験に供するまで 4°C 下で保存した。

3-2-2 SDS-PAGE

凍結した経腸栄養剤試料を超純水で溶解し、4°C 下で遠心分離 (8,500g、30 分) に供した後、浮上した脂肪層をスパチュラを使って除去した。遠心分離によって生じた沈殿は、上清部分とよく懸濁して分散させた。脂肪層を除去した試料のたんぱく質濃度を Bradford 法で測定した後 [43]、たんぱく質濃度が 7.5 g/L になるよう、超純水で希釈調製した。その後、Bio-Rad のシステムを用いて SDS-PAGE を行い、乳たんぱく質を分離した。各試料ともたんぱく質量として 50 µg を Mini-PROTEAN TGX Any Kd ゲル (Bio-Rad) に供し、120 V で 50 分間分離を行った。ゲルはその後、Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad) で染色した。電気泳動は、還元 (2-ME 添加有り)/非還元 (2-ME 添加無し) 条件下の 2 種類の条件で行った。

3-2-3 プロテオミクス解析

プロテオミクス解析のための LC-MS/MS 分析は、2-2-3 の記載の方法に則り、カリフォルニア大学デービス校の Proteomics Core Facility で行い、上述の熱履歴やたんぱく質消化性に関わる修飾構造である LL (+324.105647)、FL (+162.052824)、CML (+58.005479)、セリン・シスチン残基の dehydroalanine 化 (-18.010565, -33.987721)、及びセリン・スレオニン・チロシン残基のリン酸化 (+79.966331) の修飾部位の特定と、加熱処理をしていない調合液を基準とした修飾レベルの比較定量を行った。

3-2-4 *In vitro* 消化試験

凍結乾燥した経腸栄養剤試料を、上述の通りたんぱく質濃度が 7.5 g/L になるよう調製した後、3-2-3 に記載の手法と同様の人工胃内消化試験に供した。試料の pH を 1N の塩酸を用いて 2.0 (成人モデル) 又は 4.0 (小児モデル) に調整した後、豚由来のペプシン (Sigma-Aldrich, Cat. P7000 (≥ 250 units/mg solid)) の濃度が 2.0% (w/v) になるよう 1 mM の塩酸で溶解した後、ペプシン/試料中たんぱく質比が 1/12.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪水槽 (ヤマト科学, 東京都) にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 30 分間振盪した。その後、1 M の重炭酸ナトリウムを用いて試料の pH を 7.0 に調整した。

人工胃内消化試験に次いで、試料を人工腸内消化試験に供した。豚由来のパンクレアチン (Sigma-Aldrich, Cat. P7545 (4×USP)) の濃度が 0.4% (w/v) になるよう 100 mM の重炭酸ナトリウムで調製した溶液を、パンクレアチン/試料中たんぱく質比が 1/62.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪水槽 (ヤマト科学) にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 60 および 240 分間振盪した。60 および 240 分間の振盪後、試料を 85°C にセットした恒温水槽に供して 3 分間加熱し、消化酵素を失活させた。人工消化処理を行った試料は、上述の方法で還元条件下での SDS-PAGE に供して、その消化性の評価を行った。また、ペプシン処理×30 分時点、およびペプシン×30 分+パンクレアチン処理×60 分時点の消化物については、Rudloff & Lönnerdal の方法に則り、また 2-2-4 で用いたケルダール法に替え、デュマ法 (Sumigraph NC-220F, 住化分析センター, 東京都) にてたんぱく質消化率を算出した。

3-2-5 *In vivo* 消化試験

経腸栄養剤中の乳たんぱく質の消化性を *in vivo* で評価することを目的に、2-2-5 の手法と同様の仔ラットを用いた動物試験を行った。動物試験は、森永乳業株式会社動物実験委員会の承認を得て実施した。Sprague Dawley 母獣ラットと母獣 1 匹あたり 10 匹の同腹仔ラット (雄 5 匹 + 雌 5 匹) を Charles River Japan (神奈川県横浜市) から購入した。実験施設への馴化後、14 日令において、仔ラットは母獣から 6 時間隔離して絶食させたのち、3 種類の栄養剤のうち 1 種類をゾンデを使って強制投与した。栄養剤は、たんぱく質濃度が 30 g/L に調製したものを、投与量/体重比が 1/36 (v/w) となるよう強制投与した。投与後 0.5、1.0、または 2.0 時間後に、各仔ラットを二酸化炭素に暴露して安楽死させた後、解剖試験に供した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムで処理した注射針を用いて心採血を行い、採取した血液は遠心分離 (1,700g、10 分) に供した。上清の血漿画分を回収し、解析まで -80°C で保存した。また、胃および小腸の内容物を採取した。胃からは、内部に認められた白色の凝集物を回収した。また小腸は、均等な長さに 2 等分にしたのち、それぞれの内面をプロテアーゼインヒビター・カクテル (Sigma-Aldrich, P2714) を含んだ 0.2 mL の PBS で 2 回洗浄し、洗浄液を小腸内容物として回収した。回収した小腸内容物は、解析まで -80°C で保存した。尚、各栄養剤試料・タイムポイント毎に、雄 3 匹 + 雌 3 匹の仔ラットをランダムに割り付けた。また、実験コントロールとして、雄 3 匹 + 雌 2 匹に対して栄養剤の強制投与を行わず、採血と小腸内容物の採取を行った。

In vivo におけるたんぱく質消化性を評価することを目的に、小腸内容物について β -LG 抗体を用いた Western Blotting を行った。たんぱく質含量として 5 μ g を SDS-PAGE に供した後、Trans-Blot Turbo PVDF メンブレン (Bio-Rad) にたんぱく質を転写した。転写後のメンブレンは、PBST に浸し、室温にて 45 分間振盪してブロッキングした。メンブレンは PBST で 3 回洗浄した後、一次抗体 rabbit anti-bovine β -LG antibody (Bethyl Laboratories) をブロッキング液で 20,000 倍希釈した溶液に浸し、室温にて 45 分間振盪した。メンブレンを再び PBST で 3 回洗浄した後、二次抗体 rabbit anti-goat IgG antibody (GE Healthcare) をブロッキング液で 20,000 倍希釈した溶液に浸し、室温にて 45 分間振盪した。メンブレンを再び PBST で 3 回洗浄した後、 β -LG を Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) を用いて検出した。

血漿試料については全アミノ酸分析に供し、その遊離アミノ酸濃度を測定した。各試料を等量の 10% TCA と混合後、4°C 下で遠心分離 (21,500g、30 分) に供し、上清を回収した。上清は 0.2 μ m 径の PVDF 膜 (Thomson Instrument Company, Oceanside, CA, USA) を用いて限外濾過した後、自動アミノ酸分析 L-8900 (日立製作所、東京都) に供して全アミノ酸分析を行った。

3-2-6 統計解析

デュマ法を用いたたんぱく質消化率、*in vivo* 消化試験における胃内容物量、胃内容物 pH、および血漿遊離アミノ酸濃度を群間比較を行うに当たっては、解析ソフト JMP software (version 5.1.1., SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて Tukey-Kramer HSD test による多重比較を行った。血漿遊離アミノ酸濃度について、各群における時点間の変動を比較するに当たっては、Student's t-test を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

3-3 結果

3-3-1 乳たんぱく質の電気泳動

経腸栄養剤試料を SDS-PAGE に供し、バンドパターンを比較した (Figure 3-1)。全ての試料にお

いて、還元・非還元条件下いずれの場合も、スミア状のバンドが分子量の広い範囲にわたって認められた。スミア状のバンドは、非還元条件下においては、全ての経腸栄養剤試料で 250 kDa 付近に濃く認められていたのに対し、還元条件下ではレトルト殺菌栄養剤においてのみ、250 kDa 付近の濃いスミアが認められた。またレトルト殺菌栄養剤では、他の 2 試料と比べて、主要な乳たんぱく質である α -LA、 β -LG 及び CN に相当するバンドが薄くなっていた。以上の結果から、経腸栄養剤に用いられたたんぱく質原料においては、加熱殺菌供する前からかなりの程度のたんぱく質間共有結合が形成されていて、レトルト殺菌処理によってジスルフィド結合以外の共有結合の形成が著しく進行したと考えられた。

3-3-2 プロテオミクス解析

経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが、たんぱく質消化性に関わる修飾構造の形成に及ぼす影響を比較することを目的に、経腸栄養剤試料および加熱処理していない調合液を LC-MS/MS 分析に供し、LL、CML、および dehydroalanine についての修飾部位の特定と、加熱処理していない調合液を基準とした修飾レベルの比較定量を行った。

まず本経腸栄養剤試料においては、脱脂粉乳やマルトデキストリンを原料としており、それらにはラクトースやグルコースが含まれていることから、初期メイラード反応産物として LL および FL を、後期メイラード反応産物として CML を測定した。これらの構造は、3 種類全ての経腸栄養剤試料において同定された。LL および FL は、加熱処理した 2 種類の経腸栄養剤の方が加熱殺菌処理をしていない試料よりもシグナル値が高い傾向であった (Table 3-3 および 3-4)。一方、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤とレトルト殺菌栄養剤との間に顕著な差は認められなかった。CML についても、加熱処理した 2 種類の経腸栄養剤の方が、加熱処理をしていないものよりもシグナル値が高い傾向であった (Table 3-5)。また、レトルト殺菌栄養剤の方がスチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤よりも高いシグナル値を示す傾向が認められた。

次に、架橋構造である lysinoalanine や lanthionine は本試験で用いた一斉解析法では測定することができないことから、その前駆体である Ser および Cys 残基における dehydroalanine について測定した (Table 3-6) [40]。加熱処理をしていない経腸栄養剤と比較して、加熱殺菌処理した 2 種類の経腸栄養剤では、dehydroalanine は高いシグナル値である傾向が確認された。加熱殺菌処理した 2 種類の間には、特に傾向は認められなかった。

さらに、熱履歴の指標としてセリン残基におけるリン酸化について測定を行った (Table 3-7) [58]。加熱処理をしていない経腸栄養剤と比較して、CN のリン酸化レベルはレトルト殺菌栄養剤で低下していた一方、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤においてはほぼ変化が認められなかった。以上のことから、CN の脱リン酸化反応はレトルト殺菌処理によって進行したと考えられた。

3-3-3 乳たんぱく質の *in vitro* 消化試験

経腸栄養剤試料を人工消化試験に供した後、SDS-PAGE に供して、たんぱく質消化性の違いを検討した。ペプシン処理 (人工胃内消化)においては、pH 2.0、4.0 のいずれの条件で反応を行った場合においても、レトルト殺菌栄養剤においては約 15-30 kDa のスミア状のバンドが消化されずに残る傾向が認められた (Figure 3-2)。その後、パンクレアチン処理 (人工腸内消化)を行っても、レトルト殺菌栄養剤で約 15-30 kDa に認められたスミア状のバンドは消化されにくく、反応時間を 240 分まで延長してもこのスミア状のバンドは残存していた。

ペプシン処理×30 分時点、及びペプシン×30 分+パンクレアチン処理×60 分時点における消化物について、TCA 沈殿法とデューマ法を用いて、たんぱく質消化率を算出した (Figure 3-3)。統計的な有意

差は認められなかったものの、いずれの消化条件においてもスチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤は最も高いたんぱく質消化率を示した。

3-3-4 乳たんぱく質の *in vivo* 消化試験

仔ラットに経腸栄養剤試料を強制経口投与し、一定時間後に解剖試験に供した。胃の中において、CN が酸沈殿したと思われる白色の凝集物が認められた (Figure 3-4)。その量は経時的に減少したものの、どの時点においても群間に有意な差は認められなかった。凝集物の pH も、群間で有意な差は認められず、僅かに経時的に低下するだけであった。

第 2 章と同様に、上部小腸から採取された内容物について、 β -LG の Western Blotting 試験を行った (Figure 3-5)。 β -LG の分子量である約 18 kDa の位置にシグナルが検出されず、 β -LG の分解物と考えられるシグナルが、 β -LG よりも小さい分子量の位置にバンド状あるいはスミア状に検出された。これらのシグナルは、経時的に弱くなる傾向が認められた。スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤投与群においては、他の栄養剤投与群と比較してシグナルが弱い傾向が認められたが、投与 2.0 時間後ではそのような傾向は認められなかった。次に、下部小腸から採取した内容物についても同様の解析を行った。シグナルは全てスミア状に検出され、また上部内容物の場合よりも弱いシグナルであったことから、 β -LG の分解が進行しているものと考えられた。投与 0.5 および 1.0 時間後において、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤群のシグナルは、他の栄養剤投与群と比べて弱い傾向であった。投与 2.0 時間後において、シグナルはほとんど検出されず、群間の違いは認められなかった。尚、市販の抗 CN 抗体を使った Western Blotting も行ったが、抗体が内容物に含まれるラット由来のたんぱく質とも反応してしまったため、CN の消化性を評価することは出来なかった。

乳たんぱく質の栄養学的品質をさらに評価することを目的に、アミノ酸の生体利用性を評価すべく、血漿中の遊離アミノ酸について分析を行った。総・必須アミノ酸レベル共に、投与 0-0.5 時間後においてその濃度は上昇、投与 0.5-1.0 時間後で低下し、投与 1.0-2.0 時間後では一定という傾向が認められ、特に投与 0.5-1.0 時間後の変化は、加熱処理していない調合液を投与された群およびレトルト殺菌栄養剤投与群においては、統計的に有意な低下であった (Figure 3-6)。加熱処理していない調合液を投与された群と比較して、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤、またはレトルト殺菌栄養剤投与群における、総・必須アミノ酸レベルの変動幅は小さかった。また投与 0.5 時間後においては、これらの群のほとんどのアミノ酸レベルは、加熱処理していない調合液を投与された群と比べて低い値を示しており、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤投与群のロイシンと、レトルト殺菌栄養剤投与群のイソロイシンのレベルは、加熱処理していない調合液を投与された群のそれらよりも有意に低い値であった (Table 3-8)。たんぱく質の糖化修飾のターゲットとなるリジンの濃度もまた、加熱処理していない調合液を投与された群で最も高い値を示したが、他の 2 群間と比較して統計的有意な差ではなかった。

3-4 考察

育児用ミルクや経腸栄養剤中の乳たんぱく質について、その修飾構造と消化性との関係を明らかにすることを目的に、乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤を 2 種類の加熱殺菌工程に供し、これらと加熱前の調合液について、第 2 章で牛乳試料に対して行ったものと同様の解析を行った。

3 種類の経腸栄養剤をたんぱく質電気泳動に供したところ、レトルト殺菌栄養剤では濃いスミア状のバンドが分子量の広い範囲にわたって認められ、また主要な乳たんぱく質に相当するバンドが薄くなっていたのに対し、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤は加熱処理していない調合液と同様のバンドパターンを呈した。このことから、レトルト殺菌処理によってたんぱく質間の相互作用が進行する一方、

スチーム・インジェクション UHT 殺菌処理は際立った影響を及ぼさないものと考えられた。この結果は、第2章で牛乳試料を解析した際の、レトルト殺菌法、スチームインジェクション UHT 殺菌法ともに、乳たんぱく質間の相互作用を促進したという結果（但し、レトルト殺菌法の方が影響は大きかった）とは相反する。牛乳と経腸栄養剤との場合で異なる結果が認められた原因の一つとして、経腸栄養剤で用いた乳たんぱく質原料は、原料として加工される際に加熱殺菌工程を経たり、また常温で数か月間原料として保管されたりしており、そのような熱履歴によってたんぱく質が修飾を受けていた可能性が考えられる。特にカゼイネイト原料（カゼインナトリウムやカゼインカルシウムなど）の場合、酸沈殿法によって CN 画分を分離した後、高温のアルカリ性水溶液を用いた中和工程に供されることにより、メイラード反応産物や架橋構造の形成が進行することが報告されている [80, 81]。本章の経腸栄養剤の解析と第2章の牛乳との解析は同時に行ったものではないため、結果の比較には注意が必要だが、プロテオミクス解析で dehydroalanine が同定された部位の数は、生乳と比べて加熱処理していない経腸栄養剤の方がはるかに多かった。このように、本試験で調製した経腸栄養剤中の乳たんぱく質は、生乳中のたんぱく質には存在しない（あるいは少ない）たんぱく質間の共有結合が原料の段階で相当量存在していて、そのような相互作用が潜在的に存在している故に、スチーム・インジェクション UHT 殺菌処理によって新たに形成された共有結合が、電気泳動によって検出されにくかったものと推察された。

プロテオミクス解析の結果から、スチーム・インジェクション UHT 殺菌法、レトルト殺菌法ともに乳たんぱく質のメイラード反応を促進し、また CML が特定された多くの部位においてレトルト殺菌栄養剤のシグナル値が最も高い値であることから、特にレトルト殺菌処理法によって CML の形成が著しく進行することが、推察された。即ち、レトルト殺菌法の方がスチーム・インジェクション UHT 殺菌法よりもメイラード反応を促進する殺菌法であり、同殺菌法の緩やかな昇温/降温プロセスと 123°C という高温で 8 分間も保持するという厳しい加熱条件に起因するものと考えられた。さらに、CN は加熱処理によって脱リン酸化が進むことが知られており [58]、本試験でも CN のリン酸化レベルは、加熱処理していない調合液と比較して、レトルト殺菌栄養剤で低下した一方、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤ではほぼ変化しなかったことが確認された。この結果も、レトルト殺菌法の加熱条件の厳しさを反映しているものと考えられた。Birlouez-Argon らによる、レトルト殺菌タイプの育児用ミルクの方が UHT 殺菌タイプのミルクよりも CML の含量が高かったという報告も [82]、レトルト殺菌法の方が UHT 殺菌法よりも厳しい加熱方法であるということを支持していた。一方、CML の形成や脱リン酸化反応の進行と異なり、LL、FL、および dehydroalanine の形成は、スチーム・インジェクション UHT 殺菌法、レトルト殺菌法いずれの場合でも進行していたものの、これら殺菌法の違いによる差は小さく、また一貫した傾向は確認されなかった。LL、FL は CML の前駆体であり [28]、dehydroalanine は架橋構造である lysinoalanine や lanthionine の前駆体である [32]。Rufián-Henare らによると、WP およびラクトース/マルトデキストリンをリン酸緩衝液に溶かした溶液を 140°C で加熱した場合、乳たんぱく質の糖化が経時的に進む一方、ある一定時間を過ぎると糖化産物は減少したことから、長時間の加熱によって一旦形成された FL などの初期メイラード反応産物が CML などの後期メイラード反応産物に変換したものと結論付けていた [83]。また van Boekel によると、 β -CN を溶かした溶液を 110–120°C で加熱すると dehydroalanine の形成が経時的に進行するが、130°C 以上で加熱し続けた場合では、dehydroalanine はある一定レベルに達するとそれ以上形成されないことを報告していて、dehydroalanine の新規形成と架橋構造への変換が同時に起こっていることを示唆していた [40]。即ち、LL や FL、dehydroalanine などの量は、必ずしも加熱強度と比例しないものであると考えられた。

In vitro 消化試験で得られた消化物を電気泳動試験に供した結果から、レトルト殺菌栄養剤においては約 15–30 kDa のスミア状のバンドが消化されずに残る傾向が認められ、レトルト殺菌栄養剤に含ま

れる乳たんぱく質にはペプシン/パンクレアチンに対して消化耐性を有した複合体が形成されたものと考えられた。また、TCA 沈殿とデユマ法によって算出したたんぱく質消化率は、統計的に有意でないものの、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤で最も高かった一方、レトルト殺菌栄養剤の消化率は加熱処理していない調合液と同程度であった。同様に、*in vivo* 消化物の β -LG の Western Blotting の結果で、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤投与群における β -LG に由来するシグナルは、加熱処理していない調合液やレトルト殺菌栄養剤と比較して弱かったことから、 β -LG の消化性はスチーム・インジェクション UHT 殺菌法によって向上したものと推察された。これらの結果から、既報で言及されている通り [56]、UHT 殺菌法の方がレトルト殺菌法よりもたんぱく質の消化性に対してネガティブな影響が小さい殺菌法であると思われる。すなわち、スチーム・インジェクション UHT 殺菌法、レトルト殺菌法ともに、乳たんぱく質を変性させて消化性を高めているものの、後者の方が前者よりもたんぱく質消化性に負の影響を及ぼす修飾構造の形成が進行していて、熱変性による効果を大きく相殺しているものと考えられた。

In vivo 消化試験では、アミノ酸の生体利用性を評価すべく、血漿中の遊離アミノ酸レベルの分析も行った。スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤投与群、レトルト殺菌栄養剤投与群ともに、血中総・必須アミノ酸レベルは、加熱処理をしていない調合液を投与された群と比べて低く推移する傾向があり、特に投与 0.5 時間後におけるスチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤投与群の Leu のレベルと、投与 0.5 時間後におけるレトルト殺菌栄養剤投与群の Ile のレベルは、調合液投与群のそれらと比較して、有意に低かった。同様の傾向は、統計的に有意でないものの、その他のほぼすべてのアミノ酸で認められたことから、加熱殺菌処理によって特定のアミノ酸が修飾を受けたことによる影響よりも、たんぱく質全体としての消化性が低下しているものと推察された。想定されることとして、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤およびレトルト殺菌栄養剤の消化物には消化耐性を持った非常に短いペプチド断片が含まれていること、またそれらは電気泳動では短すぎて検出されず、12% の TCA でも沈殿しないため、本章の試験系ではその影響を考慮されていない要素であることが推察された。但し、本試験のアミノ酸利用性の評価は栄養剤投与後の限られた時点で行ってならず、より詳細な検討が必要である。また、本研究では架橋構造である lysinoalanine や lanthionine は技術的な限界から測定を行ってならず、この点においても結果の解釈に留意しなければならない。しかしながら、プロテオミクス解析の結果から、加熱殺菌方法で処理した栄養剤では CML の形成や脱リン酸化反応が進行しており、Cattaneo らが言及しているように [80]、加熱殺菌処理によってたんぱく質が修飾(ダメージ)を受け、消化性が低下していることは十分ありうる。

乳たんぱく質の組成や実験系の違いがあるものの、本章の結果と第 2 章の牛乳試料の解析結果の比較したところ、本試験の経腸栄養剤の方が牛乳試料よりもたんぱく質消化性が低いことが示唆された。本試験では、3 種類の経腸栄養剤の *in vitro* 試験におけるたんぱく質消化率を TCA 沈殿法とデユマ法を用いて算出した。第 2 章でも、生乳、スチーム・インジェクション UHT 殺菌牛乳およびレトルト殺菌牛乳について、TCA 沈殿法とケルダール法を用いて消化率を算出して、生乳と加熱処理していない調合液、スチーム・インジェクション UHT 殺菌牛乳と同殺菌栄養剤、およびレトルト殺菌牛乳と同殺菌栄養剤について、消化率をそれぞれ比較すると、栄養剤の消化率の方が生乳/牛乳のそれらよりも低い値であった。本章の *in vivo* 消化試験では、仔ラットの胃内から経腸栄養剤中の CN に由来すると考えられる凝集物が採取された。その胃内凝集物の重量や pH は、第 2 章の牛乳試料の試験で同様に回収された胃内凝集物と比較して、その経時変化は緩やかなものであり、このことは経腸栄養剤中の乳たんぱく質が牛乳のそれよりも消化性が低く、それゆえ胃排出速度も遅いことを間接的に示唆するものと考えられた。さらに *in vitro* 試験の消化物をたんぱく質電気泳動に供した結果で、第 2 章ではスチーム・インジェクション UHT 殺菌法、レトルト殺菌法いずれも生乳中のたんぱく質の消化性を改善した結果であったのに対し、

本章ではスチーム・インジェクション UHT 殺菌法だけが消化性を改善しているようで、レトルト殺菌法ではたんぱく質消化性に負の影響を及ぼす修飾構造の形成が進行して、熱変性による効果は大きく相殺している可能性が認められた。牛乳と経腸栄養剤中の乳たんぱく質消化性の違いはこれまでも報告されていることであり [56, 78]、上述の通り経腸栄養剤中のたんぱく質は既に原料加工の段階でダメージを受け、さらに最終製品として加工される際に加熱処理を受けた結果、たんぱく質消化性が低下しているものと考えられた [80, 81]。

3-5 小括

以上のことから、乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤では、その製造工程の加熱殺菌処理により、たんぱく質修飾が進行しており、たんぱく質消化性やアミノ酸の生体利用性が低下している可能性が明らかになった。また第 2 章との比較から、加熱によるたんぱく質への栄養学的にマイナスな影響は、牛乳の場合よりも経腸栄養剤の場合で顕著であることが考えられた。レトルト殺菌法はスチームインジェクション殺菌法よりもたんぱく質修飾の促進と消化性の低下に及ぼす影響が大きかった一方、いずれもアミノ酸の生体利用性を同程度低下させていることが示唆された。但し、本試験で用いた UHT 殺菌法やレトルト殺菌法の条件は一企業の経腸栄養剤の製品で用いられているものに過ぎず、本試験の結論を他の同様の製品に適用することは必ずしも適切でないかもしれない。しかしながら、熱履歴の少ない CN や WP 原料を使用し、またレトルト殺菌法よりも UHT 殺菌法を採用することによって、たんぱく質消化性の観点から経腸栄養剤を改善することができることが、本試験によって示すことができたものとする。

Table 3-1 Heat treatment of milk-based liquid enteral formulas

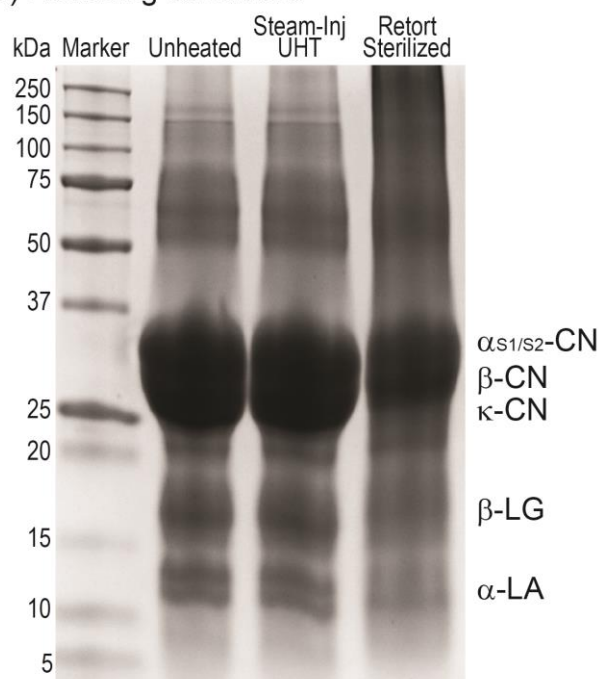
Treatment	Holding Temp./Time	F ₀ Value
Steam-injection UHT process	151°C for 4 sec	65
Retort Sterilization	123°C for 8 min	20

Heating conditions were set by reference to those of the manufacturer's commercial enteral formulas.

Table 3-2 Nutrient composition of lyophilized enteral formulas

Component	g/ 100g
Protein	18.1
Fat	12.3
Carbohydrate	65.5
Ash	3.2
Water	0.9

(a) Reducing conditions



(b) Non-reducing conditions

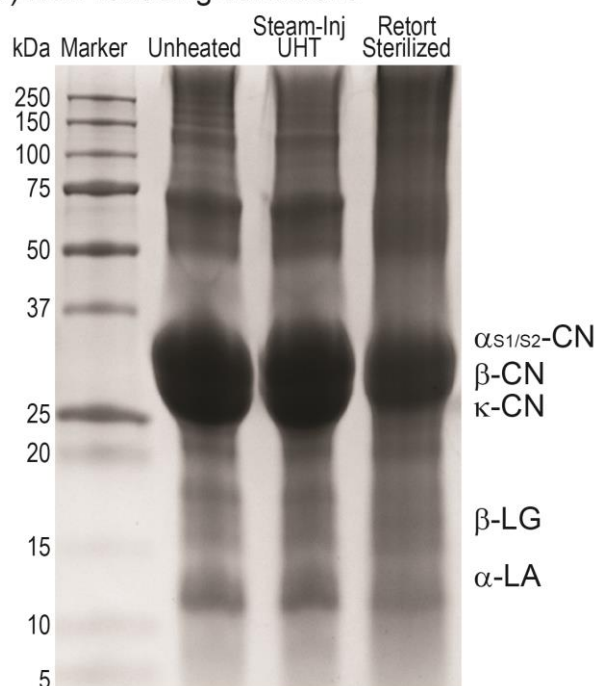


Figure 3-1 Electrophoresis of proteins in milk-based enteral formulas. Formula samples were applied to SDS-PAGE analysis under reducing (a) and non-reducing (b) conditions. Fifty micrograms of protein was loaded on a gel, and the gel was stained with Bio-Safe Coomassie Stain.

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; CN, casein; β -LG, β -lactoglobulin; α -LA, α -lactalbumin.

Table 3-3 Lactulosyl-lysine in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α -LA	59-79	Lys62	[3+]	0.9	1.3
			[4+]	1.0	1.6
	109-122	Lys114	[2+]	1.1	0.8
			[3+]	0.8	0.7
β -LG	1-14	Lys8	[2+]	2.2	1.0
			[3+]	6.5	2.9
	41-60	Lys47	[3+]	9.4	6.1
	76-83	Lys77	[3+]	1.1	0.9
	76-91	Lys83	[2+]	1.0	0.3
			[3+]	0.7	0.4
			[4+]	0.9	0.5
	78-91	Lys83	[3+]	2.3	1.8
	84-101	Lys91	[3+]	1.0	0.4
			[4+]	1.1	0.6
	125-138	Lys135	[2+]	1.4	0.8
			[3+]	1.1	0.7
	139-148	Lys141	[2+]	3.6	1.8
α_{s1} -CN	3-22	Lys7	[4+]	6.0	30.3
	35-42	Lys36	[2+]	1.2	1.5
			[3+]	1.8	1.7
	80-90	Lys83	[2+]	1.8	1.1
			[3+]	2.2	0.8
	104-119	Lys105	[2+]	4.2	14.8
			[3+]	2.1	8.1
	122-132	Lys124	[2+]	1.6	1.7

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing lactulosyl-lysine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.). ^aPeak area values are normalized to steam-injection UHT formula as those of unheated formula were below detection limit.

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 3-3, continued

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α_{s2} -CN	22-32	Lys24	[3+]	2.4	1.7
	25-41	Lys32	[3+]	1.9	0.9
	151-160	Lys152	[3+]	1.5	1.3
	171-181	Lys173	[2+]	2.5	2.4
			[3+]	6.1	5.7
	172-181	Lys173	[2+]	2.3	0.8
	198-205	Lys199	[2+]	1.4	1.3
			[3+]	1.2	1.2
β -CN	170-183	Lys176	[2+]	1.5	2.1
			[3+]	1.6	2.2
κ -CN	22-34	Lys24	[2+]	1.0 ^a	1.1 ^a
			[3+]	1.0 ^a	1.0 ^a
	61-68	Lys63	[2+]	1.8	2.0
	69-97	Lys86	[3+]	5.9	2.2

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing lactulosyl-lysine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.). ^aPeak area values are normalized to steam-injection UHT formula as those of unheated formula were below detection limit.

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 3-4 Fructosyl-lysine in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
β -LG	1-14	Lys8	[2+]	2.1	0.5
	40-60	Lys47	[3+]	4.4	3.8
	41-60	Lys47	[3+]	2.7	2.7
α_{s1} -CN	3-22	Lys3 & Lys7	[4+]	6.2	29.8
	4-22	Lys7	[3+]	3.3	3.0
	6-22	Lys7	[2+]	3.3	1.6
	80-90	Lys83	[2+]	1.4	2.1
			[3+]	1.7	2.1
	104-119	Lys105	[2+]	1.0 ^a	5.4 ^a
			[3+]	1.0 ^a	0.9 ^a
α_{s2} -CN	120-132	Lys124	[3+]	2.4	1.6
			[4+]	1.4	1.0
	79-91	Lys80	[2+]	6.0	2.4
	113-125	Lys113	[2+]	23.5	14.5
β -CN	151-160	Lys152	[3+]	1.6	1.2
	198-205	Lys199	[2+]	5.8	1.2
β -CN	170-183	Lys176	[2+]	20.4	22.5
κ -CN	22-34	Lys24	[3+]	2.3	7.6
			[4+]	3.0	15.0
	23-34	Lys24	[2+]	3.1	1.9

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing fructosyl-lysine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.). ^aPeak area values are normalized to steam-injection UHT formula as those of unheated formula were below detection limit.

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 3-5 *N*^ε-carboxymethyllysine in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α -LA	1-10	Lys5	[2+]	0.7	0.8
	59-79	Lys62	[3+]	0.9	0.5
β -LG	1-14	Lys8	[2+]	1.8	1.8
	125-138	Lys135	[3+]	0.8	0.5
α _{s1} -CN	4-22	Lys7	[3+]	3.4	5.1
			[4+]	2.3	2.6
	23-36	Lys34	[2+]	25.1	81.6
			[3+]	32.8	72.0
	80-90	Lys83	[2+]	0.7	0.6
			[3+]	1.0	0.8
α _{s2} -CN	120-132	Lys124	[2+]	1.4	2.4
			[3+]	1.8	2.1
	33-45	Lys41	[2+]	2.2	3.1
			[3+]	2.0	2.6
	171-181	Lys173	[2+]	2.1	4.7
	198-205	Lys199	[2+]	1.9	3.5
β -CN	168-176	Lys169	[3+]	0.8	5.1
	170-183	Lys176	[2+]	1.8	2.3
			[3+]	1.4	1.1
κ -CN	22-34	Lys24	[2+]	2.6	4.0

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing *N*^ε-carboxymethyllysine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 3-6 Dehydroalanine derivatives on Ser and Cys residues in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α -LA	63-79	Ser69	[2+]	1.2	0.6
	63-79	Cys77	[3+]	2.8	5.7
β -LG	145-162	Ser150	[2+]	0.8	0.4
α_{s1} -CN	80-90	Ser88	[2+]	3.4	2.2
			[3+]	4.6	2.8
	106-119	Ser115	[2+]	3.3	2.5
α_{s2} -CN	25-41	Ser31	[2+]	1.7	1.1
	33-45	Cys36	[2+]	0.6	1.2
			[3+]	1.4	2.4
β -CN	168-176	Ser168	[3+]	3.2	4.3
κ -CN	64-86	Ser69	[2+]	0.7	0.4
	69-81	Ser80	[2+]	1.2	0.6

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing dehydroalanine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 3-7 Phosphorylation of Ser in milk proteins

Protein	Residue	Amino Acid	Ch	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
α_{s1} -CN	35-58	Se41, 46 & 48	[3+]	1.2	0.4
	37-58	Ser41, 46 & 48	[2+]	0.9	0.3
			[3+]	0.8	0.3
	43-58	Ser46 & 48	[2+]	1.7	0.7
	103-119	Ser115	[3+]	1.0	0.5
	104-119	Ser115	[2+]	1.4	0.7
			[3+]	1.4	0.7
α_{s2} -CN	25-41	Ser31	[2+]	1.2	0.3
			[3+]	1.3	0.3
	126-137	Ser129 & 131	[2+]	1.1	0.5
			[3+]	1.5	0.6
	137-150	Ser143	[2+]	1.2	0.2
	138-149	Ser143	[2+]	1.1	0.5
β -CN	30-48	Ser35	[2+]	0.7	0.4
			[3+]	1.2	0.9

Formula samples were treated with trypsin, followed by LC-MS/MS analysis for identifying and semi-quantifying tryptic peptides containing phosphoserine in milk proteins. Peak area values are normalized to unheated formula (i. e., all the values for unheated formula are 1.0.).

[Abbreviations]

Ch, charge state; Steam-Inj UHT, steam injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

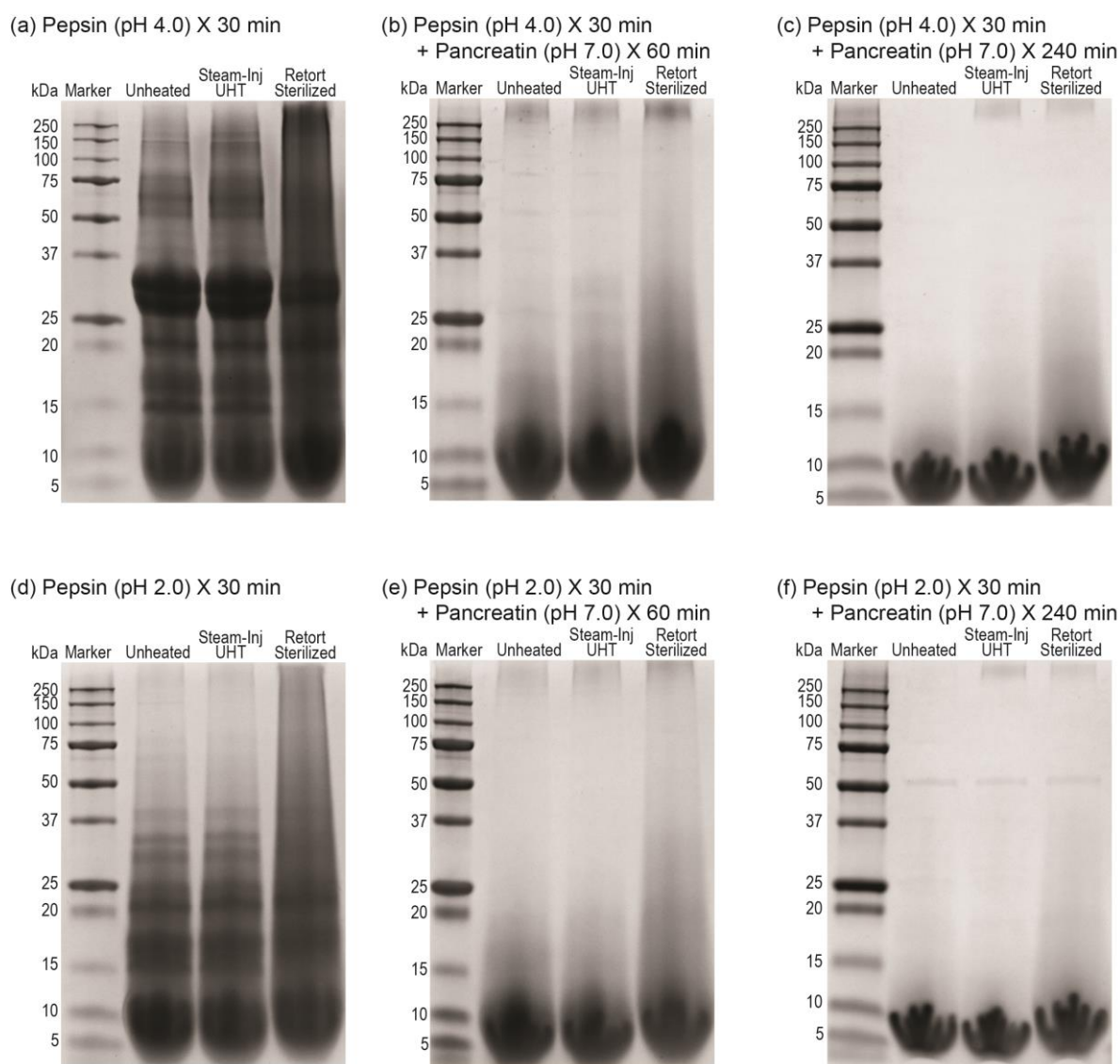


Figure 3-2 Electrophoresis of proteins in milk-based enteral formulas after *in vitro* digestion. Formula samples were subjected to *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin. Both infant (a-c) and adult (d-f) digestion conditions were simulated by adopting different pH values during the peptic digestion. Fifty micrograms of protein (before digestion) was loaded on a gel, and the gel was stained with Bio-Safe Coomassie Stain.

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula.

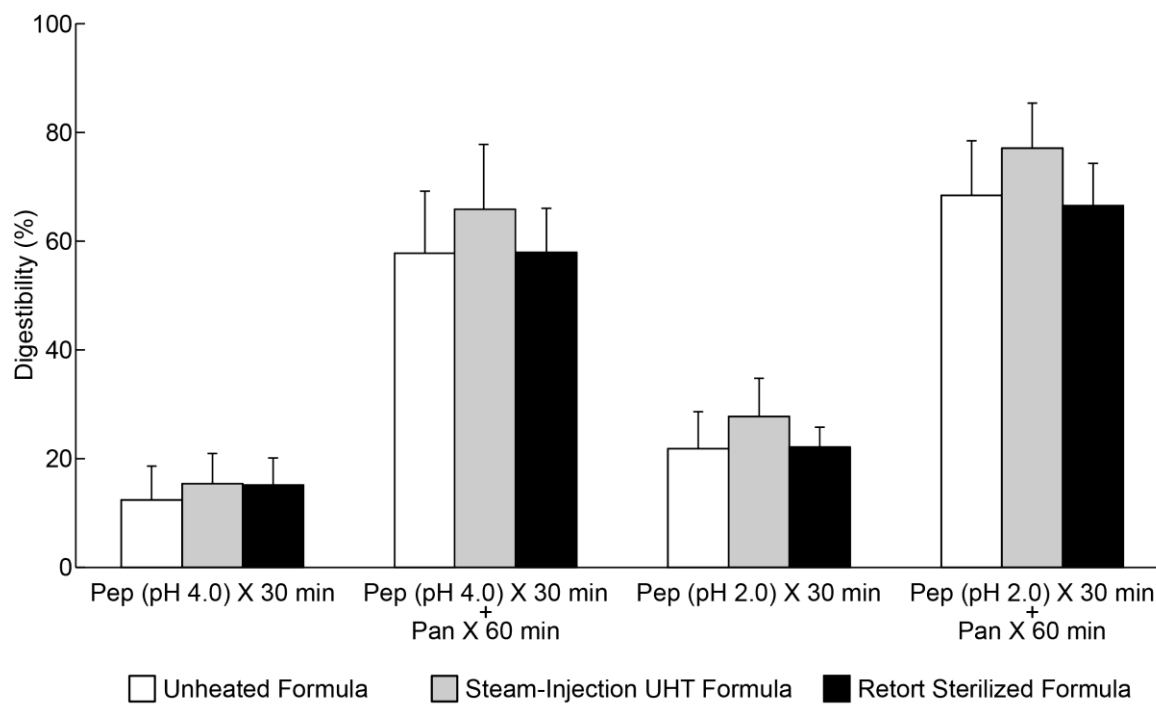
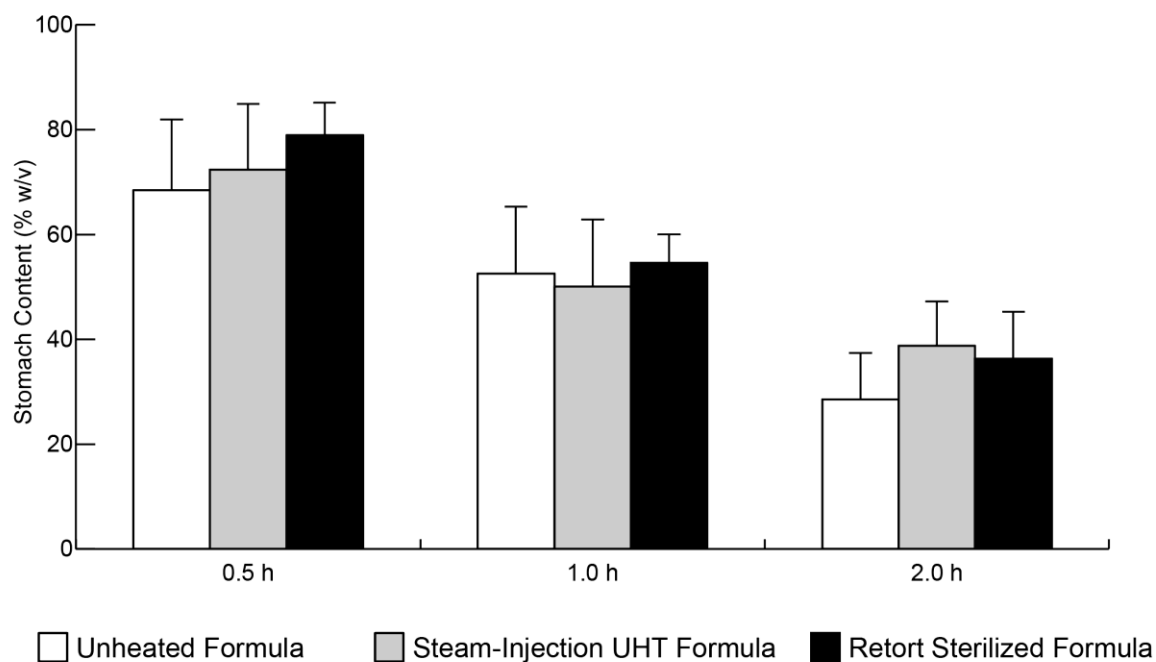


Figure 3-3 Digestibility of proteins in milk-based enteral formulas after *in vitro* digestion. Protein digestibility was defined as the increase in NPN after *in vitro* digestion, which was determined by a combination of TCA precipitation and a Dumas method. Each of the digestion and the subsequent procedures was conducted 6 times. No significant difference was observed among the formulas for the same digestion conditions. Pep and Pan denote pepsin and pancreatin, respectively.

(a) Stomach Content Wet Weight



(b) Stomach Content pH

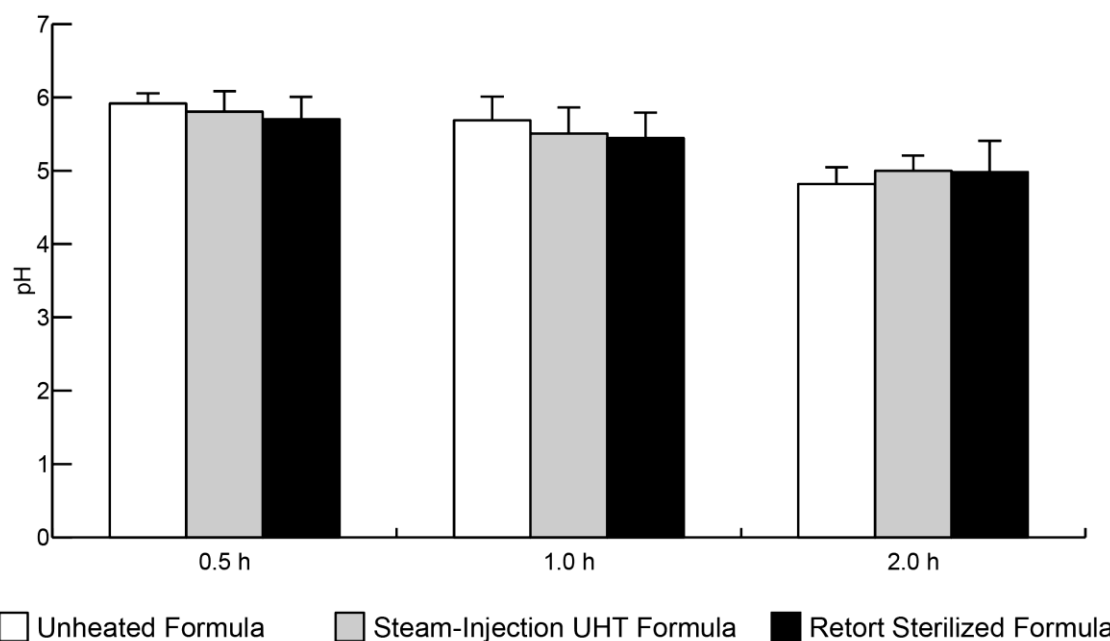
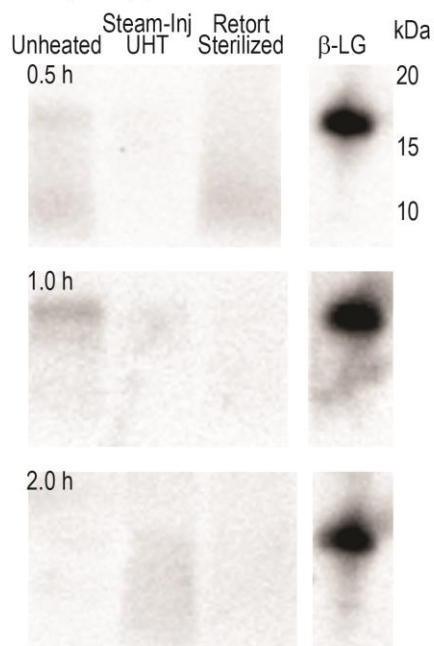
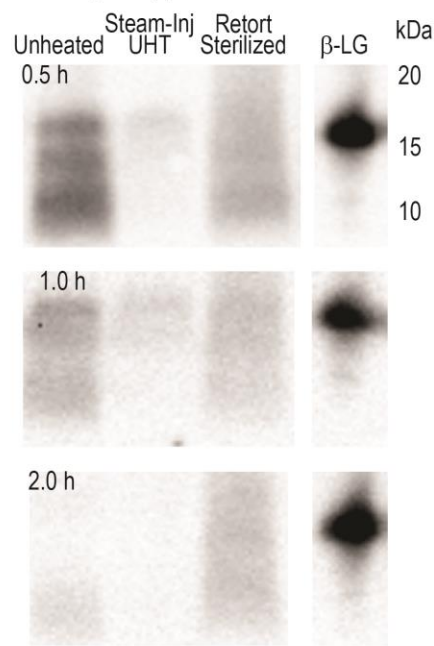


Figure 3-4 Stomach in stomach of suckling rat pups. Rat pups fed different formula samples were euthanized at 0.5 h, 1 h, and 2 h after intubation, and coagulates in the stomach were obtained. Wet Weight (a; expressed as stomach content weight/volume of formula administered (% w/v)) and pH of the aggregates (b) were measured, and data are expressed as means $\pm$ SD (n = 3 males + 3 females). No significant difference was observed among the formula-fed pups any time point.

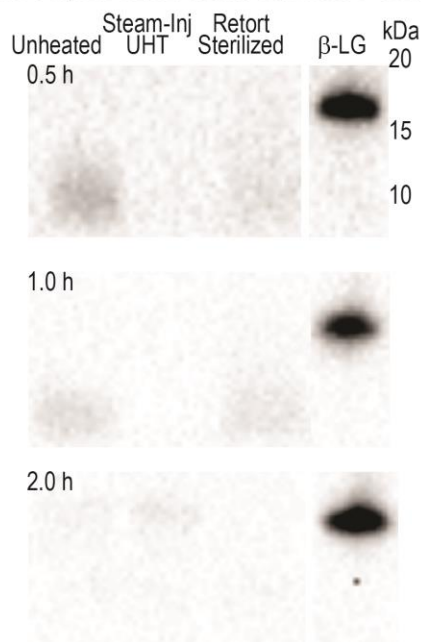
(a) Male Pups: Upper Small Intestine Perfusate



(b) Female Pups: Upper Small Intestine Perfusate



(c) Male Pups: Lower Small Intestine Perfusate



(d) Female Pups: Lower Small Intestine Perfusate

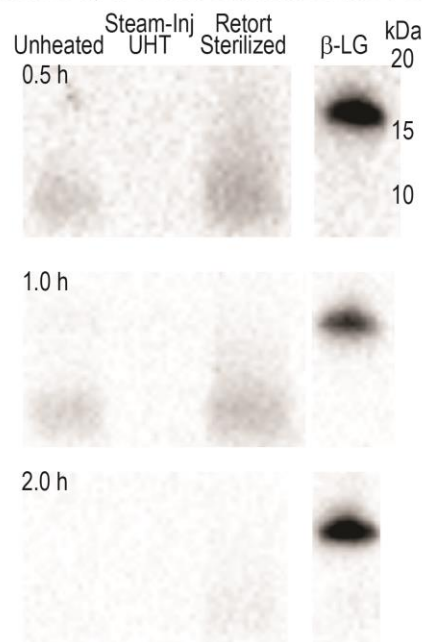
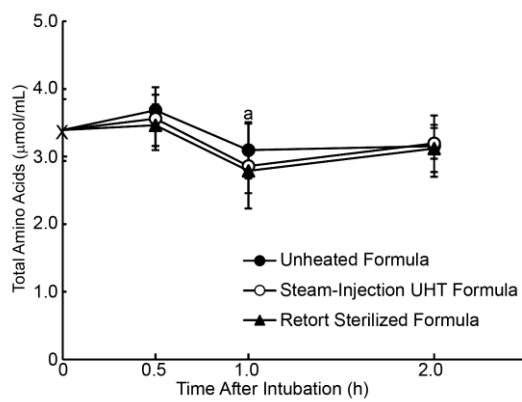


Figure 3-5 Western blotting of β -LG in upper/lower small intestine perfusates from suckling rat pups. Rat pups fed different formula samples were euthanized at 0.5 h, 1.0 h, and 2.0 h after intubation, and the upper intestines (a) and lower intestines (b) were perfused with PBS containing protease inhibitor. Five micrograms of protein was loaded and β -LG was detected by Western blotting.

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula; β -LG, β -lactoglobulin.

(a) Total Amino Acids



(b) Essential Amino Acids

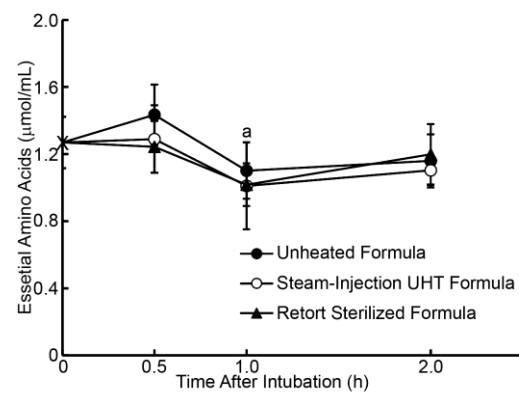


Figure 3-6 Plasma total and essential amino acid concentration in suckling rat pups. Rat pups fed different milk samples were euthanized at 0.5 h, 1.0 h, and 2.0 h after intubation, and blood was collected by cardiac puncture. Plasma was separated by centrifugation, and applied to amino acid analysis. Total and essential amino acid levels are expressed as means $\pm$ SD ($n = 3$ males + 3 females) except for baseline, where it is shown as means $\pm$ SD ($n = 3$ male + 2 female pups). No significant difference was observed among the formula-fed pups at any time point. ^a $P < 0.05$ (0.5 h vs 1.0 h, for unheated and retort sterilized formula-fed pups, respectively).

Table 3-8 Mean concentration of plasma amino acids of suckling rat pups

Baseline (μmol/mL)		0.5 h (μmol/mL)		
		Unheated	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
Essential				
Val	0.143 ± 0.025	0.168 ± 0.014	0.146 ± 0.030	0.139 ± 0.020
Leu	0.118 ± 0.030	0.126 ± 0.020 ^a	0.097 ± 0.023 ^b	0.104 ± 0.013 ^a
Ile	0.079 ± 0.016	0.088 ± 0.009 ^a	0.074 ± 0.018 ^a	0.069 ± 0.008 ^b
Lys	0.422 ± 0.028	0.479 ± 0.104	0.425 ± 0.062	0.393 ± 0.071
Met	0.049 ± 0.008	0.054 ± 0.003	0.054 ± 0.009	0.057 ± 0.005
Phe	0.073 ± 0.008	0.085 ± 0.016	0.072 ± 0.020	0.081 ± 0.010
Trp	0.059 ± 0.013	0.075 ± 0.009	0.067 ± 0.013	0.082 ± 0.022
His	0.113 ± 0.023	0.126 ± 0.015	0.117 ± 0.013	0.114 ± 0.017
Thr	0.214 ± 0.032	0.234 ± 0.028	0.239 ± 0.044	0.204 ± 0.022
Non-essential				
Tyr	0.229 ± 0.072	0.254 ± 0.060	0.233 ± 0.044	0.228 ± 0.069
Asp	0.017 ± 0.006	0.014 ± 0.003	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.002
Asn	0.057 ± 0.022	0.059 ± 0.007	0.057 ± 0.012	0.057 ± 0.009
Ser	0.270 ± 0.043	0.256 ± 0.031	0.286 ± 0.007	0.251 ± 0.049
Glu	0.117 ± 0.021	0.110 ± 0.018	0.118 ± 0.022	0.118 ± 0.018
Gln	0.538 ± 0.131	0.600 ± 0.079	0.545 ± 0.104	0.592 ± 0.053
Pro	0.087 ± 0.025	0.105 ± 0.007	0.121 ± 0.020	0.100 ± 0.016
Gly	0.384 ± 0.108	0.334 ± 0.039	0.385 ± 0.083	0.344 ± 0.044
Ala	0.256 ± 0.051	0.324 ± 0.038	0.342 ± 0.054	0.356 ± 0.056
Arg	0.167 ± 0.023	0.193 ± 0.056	0.169 ± 0.032	0.159 ± 0.020

Three-letter codes are used for all the amino acids. Note that cysteine (measured as cystine) were below detection limit in all the plasma samples. Amino acid levels are expressed as means ± SD (n = 3 male + 3 female pups, except for baseline (n = 3 male + 2 female pups)). At each time point, values with different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$).

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula.

Table 3-8, continued

	1.0 h (μmol/mL)		
	Unheated	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
Essential			
Val	0.119 ± 0.017	0.115 ± 0.031	0.109 ± 0.010
Leu	0.069 ± 0.008	0.074 ± 0.028	0.063 ± 0.006
Ile	0.052 ± 0.007	0.055 ± 0.018	0.051 ± 0.006
Lys	0.350 ± 0.058	0.326 ± 0.092	0.334 ± 0.069
Met	0.048 ± 0.009	0.043 ± 0.009	0.045 ± 0.006
Phe	0.073 ± 0.016	0.061 ± 0.024	0.062 ± 0.013
Trp	0.071 ± 0.017	0.055 ± 0.019	0.062 ± 0.013
His	0.112 ± 0.018	0.100 ± 0.013	0.102 ± 0.016
Thr	0.206 ± 0.040	0.182 ± 0.041	0.189 ± 0.030
Non-essential			
Tyr	0.233 ± 0.052	0.180 ± 0.040	0.188 ± 0.058
Asp	0.012 ± 0.001	0.017 ± 0.007	0.012 ± 0.002
Asn	0.044 ± 0.008	0.044 ± 0.010	0.042 ± 0.007
Ser	0.240 ± 0.027	0.226 ± 0.040	0.214 ± 0.035
Glu	0.115 ± 0.014	0.129 ± 0.038	0.107 ± 0.011
Gln	0.467 ± 0.062	0.437 ± 0.096	0.429 ± 0.054
Pro	0.084 ± 0.018	0.079 ± 0.015	0.073 ± 0.012
Gly	0.372 ± 0.081	0.319 ± 0.073	0.326 ± 0.054
Ala	0.288 ± 0.049	0.273 ± 0.062	0.244 ± 0.029
Arg	0.136 ± 0.014	0.143 ± 0.040	0.134 ± 0.014

Three-letter codes are used for all the amino acids. Note that cysteine (measured as cystine) were below detection limit in all the plasma samples. Amino acid levels are expressed as means ± SD (n = 3 male + 3 female pups, except for baseline (n = 3 male + 2 female pups)). At each time point, values with different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$).

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula.

Table 3-8, continued

	2.0 h (μmol/mL)		
	Unheated	Steam-Inj UHT	Retort Sterilized
Essential			
Val	0.130 ± 0.019	0.119 ± 0.021	0.131 ± 0.023
Leu	0.085 ± 0.012	0.081 ± 0.015	0.090 ± 0.022
Ile	0.064 ± 0.007	0.059 ± 0.011	0.067 ± 0.010
Lys	0.364 ± 0.085	0.330 ± 0.040	0.407 ± 0.112
Met	0.054 ± 0.008	0.052 ± 0.007	0.054 ± 0.009
Phe	0.087 ± 0.013	0.079 ± 0.009	0.089 ± 0.022
Trp	0.078 ± 0.016	0.069 ± 0.015	0.065 ± 0.007
His	0.107 ± 0.016	0.124 ± 0.023	0.106 ± 0.009
Thr	0.191 ± 0.037	0.191 ± 0.032	0.190 ± 0.023
Non-essential			
Tyr	0.210 ± 0.039	0.216 ± 0.037	0.196 ± 0.036
Asp	0.016 ± 0.004	0.014 ± 0.004	0.016 ± 0.006
Asn	0.051 ± 0.008	0.048 ± 0.005	0.049 ± 0.010
Ser	0.241 ± 0.072	0.247 ± 0.030	0.224 ± 0.031
Glu	0.105 ± 0.020	0.126 ± 0.017	0.115 ± 0.017
Gln	0.499 ± 0.044	0.467 ± 0.068	0.479 ± 0.082
Pro	0.078 ± 0.016	0.072 ± 0.011	0.071 ± 0.013
Gly	0.387 ± 0.112	0.498 ± 0.208	0.366 ± 0.064
Ala	0.272 ± 0.047	0.275 ± 0.070	0.260 ± 0.056
Arg	0.132 ± 0.021	0.128 ± 0.016	0.143 ± 0.024

Three-letter codes are used for all the amino acids. Note that cysteine (measured as cystine) were below detection limit in all the plasma samples. Amino acid levels are expressed as means ± SD (n = 3 male + 3 female pups, except for baseline (n = 3 male + 2 female pups)). At each time point, values with different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$).

[Abbreviations]

Unheated, unheated formula; Steam-Inj UHT, steam-injection UHT formula; Retort Sterilized, retort sterilized formula.

第4章 母乳における低温加熱殺菌処理の有無が消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響

4-1 緒言

母乳は、児がその誕生から数か月間の間、すこやかに成長と発達を遂げる上で最も適した栄養源と考えられている。母乳には、生体利用性の高い栄養素と様々な生理活性物質が含まれていて、乳児の成長や発達、健康に大きく貢献している。近年の研究により、母乳栄養は将来におけるメタボリックシンドローム等の発症リスクを低減する可能性が報告されている [84-86]。母親の母乳が足りない際、児には一般的には育児用ミルクか、あるいは母乳バンクから提供されるドナーミルクが適用されるが、母乳には児に対する感染防御や消化管発達促進などにも寄与する免疫成分や成長ホルモンが含まれていることから、ハイリスク児には育児用ミルクよりドナーミルクの方が望ましいとされる [87]。ドナーミルクは一般的に、母乳を介した細菌やウイルス感染を防ぐ目的で、保持式殺菌器で 62.5 °C で 30 分間加熱する低温加熱殺菌処理に供される。また、新生児集中治療室に収容されている極低出生体重児は、母乳中のサイトメガロウイルスに非常に感染しやすいことから、実母の母乳が低温加熱殺菌に供されてから与えられている [88, 89]。しかしながら、低温加熱殺菌処理は母乳中の多くの栄養素や生理活性物質に負の影響を及ぼす。例えば、低温加熱殺菌処理は bile salt-activated lipase を失活させ、母乳中の脂質の利用性を低下させて乳児の生育が阻害される可能性がある [89]。また、低温加熱殺菌処理は母乳中の抗酸化物質であるビタミン C や E の含量を低下させるため、乳児が酸化ストレスを受けやすくなる可能性が懸念される [90]。さらに、乳中の免疫成分である免疫グロブリン A や LF、ホルモンであるアディポネクチンやインスリンの量も加熱殺菌処理によって低下することから、母乳が本来備えている感染防御能や消化管発達促進効果も損なわれているものと考えられている [91, 92]。

母乳中のたんぱく質は、必須アミノ酸の供給源としての役割だけでなく、様々な生理機能を発揮して、児の健康に寄与しているものと考えられている [93]。生理活性の一部は生理活性ペプチドとして、摂取した乳たんぱく質が消化管内にて酵素分解を受け、また小腸から吸収されたもの場合はさらに血中のペプチダーゼによる分解を受けて、生理活性ペプチドが切り出されることで初めては発揮される [35]。加熱殺菌処理が乳たんぱく質の消化性に影響を及ぼすことはよく知られているものの、母乳の低温加熱殺菌が生理活性ペプチドの生成パターンに影響を及ぼすかどうかについては、明らかになっていない。本研究では、母乳と加熱殺菌処理した母乳とで、消化によって乳たんぱく質から生成される生理活性ペプチドのパターンが異なるかどうかについて、検討することを目的とした。母乳及び加熱母乳を *in vitro* 消化試験に供した後、消化物を LC-MS/MS 分析に供してペプチド配列を同定した。その後、 α -LA、LF、OPN、及び CN に由来する生理活性ペプチドが含まれるかどうか、生理活性ペプチドのデータベースを用いて検索を行った。

4-2 材料と方法

4-2-1 母乳試料の入手と低温加熱殺菌処理

本試験はカリフォルニア大学デービス校の治験審査委員会の承認を得て実施した。母乳 (human milk (HM))は、1名の産婦からインフォームド・コンセントを得て、提供を受けた。複数の妊娠期間から採取された試料を1つにまとめ、 -30°C 下で保存した。HMの一部については、低温加熱殺菌に供した。即ち、凍結保存していたものを室温下に移して解凍した後、 62.5°C の恒温水槽に供して、30分間インキュベートした。この加熱母乳 (pasteurized human milk (past HM))についても、その後の解析まで -30°C 下で保存した。

4-2-2 *In vitro* 消化試験

HM 及び past HM について、 4°C 下で遠心分離 (8,500g、30分) に供した後、浮上した脂肪層をスパチュラを使って除去した。その後、以下の人工消化試験に供した。試料の pH を 1N の塩酸を用いて 4.0 に調整した後、豚由来のペプシン (Sigma-Aldrich, Cat. P7000 (≥ 250 units/mg solid)) の濃度が 2.0% (w/v) になるよう 1 mM の塩酸で溶解した後、ペプシン/試料中たんぱく質比が 1/12.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器 (New Brunswick Scientific) にセットし、 37°C 下、140 rpm の条件で 15 分間振盪した。その後、1 M の重炭酸ナトリウムを用いて試料の pH を 7.0 に調整した。次に、豚由来のパンクレアチン (Sigma-Aldrich) の濃度が 0.4% (w/v) になるよう 100 mM の重炭酸ナトリウムで調製した溶液を、パンクレアチン/試料中たんぱく質比が 1/62.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器 (New Brunswick Scientific) にセットし、 37°C 下、140 rpm の条件で 5 分間振盪した。その後、試料を 85°C にセットした恒温水槽で 3 分間加熱し、消化酵素を失活させた。

4-2-3 ペプチドミクス解析

ペプチドミクス解析のための LC-MS/MS 分析は、2-2-3 の記載の方法と同様の方法を用いて、カリフォルニア大学デービス校の Proteomics Core Facility で行った。人工消化した HM、人工消化した past HM、及び消化処理しなかった HM を 10 kDa フィルター (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて限外濾過した後、Aspire Chromatography Tip (Thermo Scientific) に供して固層抽出を行った。次に、脱塩されたペプチド画分を LC-MS/MS 分析に供した。液体クロマトグラフに Easy-nLC II HPLC (Thermo Scientific) を、質量分析には Q Exactive Orbitrap 質量分析計 (Thermo Scientific) を用いた。カラムは $100\ \mu\text{m} \times 25\ \text{mm}$ Magic C18 逆相トラップカラム ($5\ \mu\text{m}$ 100Å) と、 $75\ \mu\text{m} \times 150\ \text{mm}$ Magic C18 逆相カラム ($3\ \mu\text{m}$, 200 Å; Michrom Bioresources 社) を用い、流速 300 nL/min のもと、60 分間かけて溶離液 A (0.1% ギ酸) と B (100% アセトニトリル) の濃度勾配を変化させて、ペプチドの分離を行った。濃度勾配は、溶離液 B の濃度を 0 分から 45 分の間に 5% から 35% に上げ、45 分から 50 分では 35% から 80% に上げ、50 分から 51 分の間では 80% に一定に保ち、51 分から 52 分の間に 80% から 5% に下げ、最後の 52 分から 60 分の間は 5%

の一定に保つ、というサイクルを用いた。

すべての MS/MS スペクトルから、解析ソフト Scaffold (version Scaffold_4.2.1, Proteome Software) と Sequest(Proteome Discover, version 1.1, Thermo Scientific)を使ってペプチド配列の同定を行った。*Homo Sapiens* のたんぱく質配列情報を Uniprot より取得し、その全配列、同数の逆向き配列、及び研究室由来の一般的な混入たんぱく質の配列 60 個に対して検索を行った。また、たんぱく質の消化パターンとして「非特異的消化」パターンを選択した。そして、ペプチド配列に含まれる修飾構造として、セリン、スレオニン、チロシン残基のリン酸化、N 末の脱アミド、N 末のピログルタミル化、及びメチオニン、トリプトファン残基の酸化によるマス・シフトを想定した検索を行った。。これらのペプチド配列の妥当性の判定は、FDR がペプチド同定レベルで 1.0%未満とした [46-48]。

同定された CN、 α -LA、LF、及び OPN に由来するペプチド配列について、生理活性ペプチドのデータベースである「BIOPEP」を用い [94]、それぞれの配列が既知の生理活性ペプチドであるかどうか、照合を行った。照合の結果はさらに、それぞれ文献検索を行い、生理活性ペプチドであることの確認を行った。

4-3 結果

母乳中にはもともと乳たんぱく質由来のペプチド断片が存在することが報告されていることから [95, 96]、バックグラウンドとしてまず、人工消化処理をしていない HM について測定を行った。乳たんぱく質に由来するペプチドが多く同定され、 β -CN に由来するペプチドが最も多く、 β -CN が母乳中に最も豊富に含まれる CN サブユニットであり、また β -CN が母乳中の消化酵素であるプラスミンに対する感受性が高いことを反映しているものと考えられた (Figure 4-1)。生理活性ペプチドは、2 種類のカゼインホスホペプチド、オピオイドペプチド、あるいはその前駆体となると思われる配列、及び抗菌ペプチドである (Table 4-1) [95, 97-112]。

HM と past HM を人工消化試験に供したものを LC-MS/MS 分析に供したところ、より多くの種類のペプチドが同定された。 β -CN の結果で示した通り、乳たんぱく質は、HM と past HM とでほぼ同様の消化パターンを示した (Figure 4-2)。また、含まれる既知の生理活性ペプチドのパターンも同様のものであった (Table 4-1)。生理活性としては、アンジオテンシン I 転換酵素 (ACE) 阻害活性、抗酸化能、免疫調節調節などの活性があると報告されているペプチドが同定された。

また本試験では、多機能たんぱく質であり、乳児の免疫機能にも関わっているとされる OPN についても [21]、解析を行った。しかし、OPN から同定されたペプチドで、既知の生理活性ペプチド配列と一致するものは認められなかった。

4-4 考察

低温加熱殺菌処理は、母乳を介した病原菌の感染を防ぐことを目的に、ドナーミルクや極低出生

体重児の実母の母乳に対して広く適用されている手法である。一方、低温加熱殺菌処理に伴う母乳中の脂質の生体利用性の低下や、ビタミン群の分解、生理活性物質の失活など [89-92]、それらが本当に児の生育に影響を及ぼしているかについては疑問が残るものの [113]、これらの負の影響が懸念される。本研究では低温加熱殺菌に伴う「リスクと効果」をさらに評価することを目的に、乳たんぱく質から消化を介して放出される生理活性ペプチドのパターンについて、HM と past HM とで比較を行った。

生理活性ペプチドの放出パターンは、HM と past HM とで概ね同じパターンを示したことから、2 試料間に認められた違いは実験誤差に由来するものであり、低温加熱殺菌処理は生理活性ペプチドの放出パターンに有意な影響を及ぼさないと判断された。既報や第 2 章で、低温加熱殺菌処理牛乳やプレート式 HTST 殺菌牛乳が生乳と同等のたんぱく質消化性であったことも、本試験で導き出された結論を支持しているものと考えられた。しかしながら、本試験で用いたペプチドミクス解析手法は、5-20 アミノ酸残基程度の長さのペプチドを同定するのに適した手法で、より短いペプチド鎖については、逆相カラムで保持されにくく、また MS/MS のフラグメンテーションも十分得られないことから、同定が困難である [114]。よって本研究では、低温加熱殺菌処理が 2-4 アミノ酸残基程度の非常に短い生理活性ペプチドの生成に対して影響を及ぼしたかどうかについては、評価が出来ていない。

主要乳たんぱく質それぞれに由来する生理活性ペプチドについて、以下に述べる。

[β -CN 由来の生理活性ペプチド]

母乳中では CN よりも WP の方が大きな割合を占めるものの、CN は母乳においても主要なたんぱく質であり、また β -CN はその中で最も多く含まれ [8]、消化を介して多様な生理活性ペプチドを生成することが報告されている [35]。

人工消化処理をしていない HM では、4 種類の生理活性ペプチド (1-18, 1-23, 51-59, 185-211 位) が同定され、それらの配列は人工消化に供した HM および past HM においても同定された。51-59 位由来の配列以外は、母乳中に存在していたことがこれまでも報告されている [95, 96]。1-18 及び 1-23 位に由来する配列は、“acid motif”と呼ばれる SerP-SerP-SerP-Glu-Glu という特徴的な配列を有していることから、ヒト由来のものでカゼインホスホペプチドとして機能するペプチドと考えられる [35, 95]。51-59 位に由来するペプチドは、消化管機能の発達や学習・記憶能力の発達への関与が想定される関わりとされる [115, 116]、 β -カゾモルフィン (51-54, 51-55, 51-57, 51-58 位) を含む配列である [100]。51-59 位由来の配列には、オピオイド活性を発揮するための配列が N 末端側に保存されていることから、刷子縁膜や血中のペプチダーゼによってさらなる消化を受けてオピオイドペプチドを放出する前駆体として機能しているか、或いはこの配列自体がオピオイド活性を発揮しているものと推察される。またこの 51-59 位に由来する配列は、プロリルエンドペプチダーゼ活性を阻害することが *in vitro* の試験で確認されていて、同酵素の基質となるバソプレシンの分解抑制を介して学習や記憶能力の向上に寄与する可能性が示唆されている [99, 117]。51-59 位に由来する配列は人工消化試験に供した HM および past HM でも確認

されている一方、それよりも短い 52-59, 53-59, 54-59 位に由来する配列などは人工消化した HM および past HM においてのみ同定されていて、それらの配列についてもプロリルエンドペプチダーゼ阻害能や免疫調節機能を発揮することが知られている [99, 101]。これらの短い配列は、未消化の β -CN または 51-59 位由来のペプチドから消化を介して初めて放出され、機能を発揮するものと推察された。185-211 位に由来するペプチドは抗菌活性を有することが報告されている配列である [106]。この配列も人工消化処理に供した past HM で検出されたことから(但し、HM の消化物からは検出されなかった)、消化管内で消化耐性を発揮して、病原菌に対して感染予防効果を発揮していることが推察された。

人工消化処理によって、 β -CN から様々な種類の生理活性ペプチドが放出された。消化管における吸収性や生体内における安定性、生体内における機能性について数多くの報告がされているものとして、124-129/125-129 位に由来する LHLPLP/HLPLP が挙げられる。これらの配列は、牛乳を摂取した成人の十二指腸で形成されていること [118]、また同ペプチドを経口摂取したラットにおいて、ペプチドが吸収されて血中に移行し、血圧降下作用を発揮したことが報告されている [104]。乳児において、このような ACE 阻害/血圧降下ペプチドがどのような役割を果たしているかについては明らかになっていない。しかし、低出生体重児においては ACE 活性が高いことが報告されており [119]、乳たんぱく質由来の ACE 阻害/血圧降下ペプチドが心血管の発達や将来の心血管疾患に対して何らかの影響を及ぼしている可能性は十分にあると考えられる。また β -CN からは、数多くの抗酸化ペプチドの放出が確認された (50-53, 154-160, 167-173, および 206-209 位 [98, 107])。これらの抗酸化ペプチドが生体内でどのように機能しているかについては検証がなされていないが、酸化ストレスに起因する疾患から乳児を保護していることが期待される。

[α_{s1} -CN 由来の生理活性ペプチド]

母乳中の α_{s1} -CN 含量は非常に低く [8]、これまで α_{s1} -CN に由来する生理活性ペプチドについてはほとんど研究されてこなかった。 α_{s1} -CN に由来する生理活性ペプチドとして、8-11, 136-143 及び 164-170 位に由来する ACE 阻害ペプチドが報告されている [108]。本研究ではそれらの配列を含む、あるいは一部の配列と重複しているペプチドである 5-11, 136-142 及び 160-170 位に由来するペプチドが同定されていて、これらのペプチドによる ACE 阻害活性の発揮や、あるいは ACE 阻害ペプチドの前駆体として機能していることが示唆された。

[κ -CN 由来の生理活性ペプチド]

κ -CN は C 末が糖化されたたんぱく質で、乳中でカゼインミセルを安定させる役割を果たしている [15]。またこの糖化された部位には、プレバイオティクス効果や感染予防効果があると考えられている。本研究では、 κ -CN に由来するペプチドで、既知の生理活性ペプチドと一致する配列のものを同定することは出来なかった。しかしながら、100-103 および 101-104 位に由来するペプチドは、Pro-Pro-Lys という配

列を含んでおり、この配列はウシのκ-CN に由来する配列で抗血栓作用が報告されている Met-Ala-Pro-Pro-Lys と相同性が高いことから [120]、Pro-Pro-Lys にも抗血栓作用があるのではないかと考えられている [109]。本試験で同定された 100-103 および 101-104 位に由来する配列にも同様の活性を有する可能性がある。

[α-LA 由来の生理活性ペプチド]

WP は母乳中のたんぱく質の約 60%を占め、そのうちα-LA の割合が最も高い [8]。α-LA のペプチド鎖は必須アミノ酸を豊富に含むことから、乳児の急速な成長を支える重要なたんぱく質源であると考えられている [9, 10]。一方で、α-LA に由来する生理活性ペプチドについてもこれまで報告があり、本研究では人工消化処理に供した HM および past HM から、ACE 阻害活性が確認されている 104-108 位に由来する配列が同定された [110]。この配列は 5 章で報告する、牛乳たんぱく質ベースの育児用ミルクの *in vitro* 消化試験においても同定されたことから、同配列は消化耐性を有し、生体内で生理活性を発揮している可能性がある。

[LF 由来の生理活性ペプチド]

LF もまた母乳中で豊富に含まれる WP である [8]。LF 自体、様々な健康促進効果があることが確認されている一方、抗菌ペプチドであるラクトフェリシンやプレバイオティクス効果を有したペプチドなど、様々な生理活性ペプチドが消化を介して生成されることが報告されている [35]。しかしながら、本研究ではこれらのペプチドの形成は確認することが出来ず、分子内のジスルフィド結合がこれらの配列の同定を阻害している可能性が考えられた。本研究では、565-572、565-573、566-571 位由来の配列が同定されていて、それらにはサケや大豆たんぱく質から同定された ACE 阻害ペプチド (566-568 及び 571-573 位) や抗酸化ペプチド (569-571 位) の配列が含まれる [111, 112]。しかしながら、これらのペプチドが生体内で効果を発揮するかどうかについての検証は報告されておらず、生物学的に意義のある配列であるかどうかは不明である。

[OPN 由来の生理活性ペプチド]

OPN は、その配列の多くの部位で糖化修飾やリン酸化修飾を受けているたんぱく質で、免疫調節など多くの機能を有するたんぱく質として知られていて、母乳中には比較的多く存在する [21]。一方、OPN に由来する生理活性ペプチドについては今日まで報告されず、今回の試験でも OPN に由来する既知の配列を持った生理活性ペプチドは認められなかった。

人工消化処理していない HM に OPN に由来するペプチドは存在していて、結果の詳細は示さなかったが、それらのうちかなりの数のペプチドが人工消化後で同定されなくなった。一方、人工消化後に同定されたペプチドの多くは、HM および past HM との間で大きな差は認められなかった。また、42-153

位に由来するペプチドは全く検出されず、この結果は Dallas らが行った母乳のペプチドミクス解析の結果と一致した [96]。この 42-153 位に由来するペプチドが同定されなかったのは、人工消化処理によって放出されたペプチドのうち、糖化修飾を受けているペプチドは糖鎖構造の情報がないため、本試験で用いたペプチドミクス解析手法では、それらの配列を同定することが出来なかったものと考えられる。OPN は、その糖鎖修飾の違いによって生理活性が異なることが報告されていることから、乳中における生理学的役割の解明のためには OPN の糖鎖構造の同定は必須と考えられる [21]。また、42-153 位の領域は、糖鎖修飾によって消化酵素が接近することが出来ず、消化耐性を有しているため、ペプチドの放出が確認できなかった可能性もある。

4-5 小括

本試験で解析した母乳試料は、わずか 1 人の母親から提供されたものではあるものの、その低温加熱殺菌処理は、消化を介した乳たんぱく質由来の生理活性ペプチドの生成に明確な影響を及ぼしていないことが示された。本研究で同定された配列は、乳児の成長と発達、そして健康に大きく寄与していることが示唆された。しかしながら、本結論の証明には生理活性ペプチドの生成パターンに係る *in vivo* の検討や、同定された生理活性ペプチドのうち、どの配列が乳児にとって生理学的に有効であるかの臨床学的検討など、さらなる知見の収集に努める必要がある。

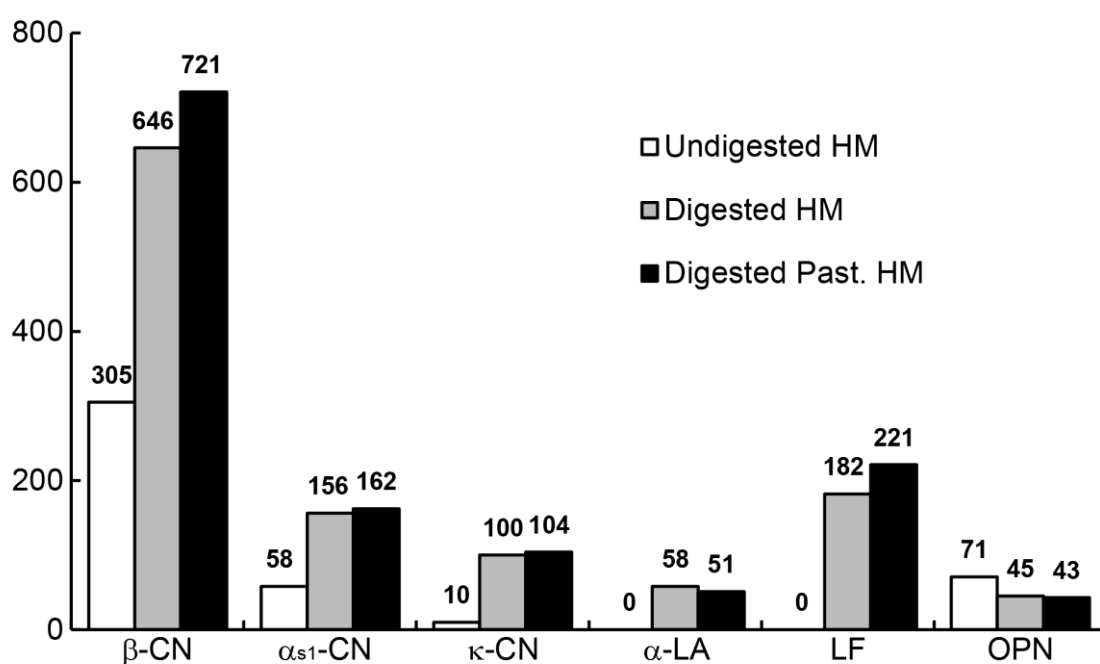


Figure 4-1 Number of peptides derived from major human milk proteins. Peptides counts from major milk proteins are shown.

[Abbreviations]

HM, human milk; Past, pasteurized; CN, casein; α-LA, α-lactalbumin; LF, lactoferrin; OPN, osteopontin.

Table 4-1 Bioactive peptides released from proteins in human milk and pasteurized human milk

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Human Milk			Ref.
				(-)Past (-) Dig	(-)Past (+) Dig	(+)Past (+) Dig	
β -CN	1-18	RETIESLSSEESITEYK	CPPh (1-18)	Y	Y	Y	[95]
	1-23	RETIESLSSEESITEYKQKVEK	CPPh (1-23)	Y	Y	Y	[95]
	48-52	PLIYP	ACEi (48-52)	N	Y	N	[97]
	50-53	IYPF	AO PEPi (50-53)	N	Y	Y	[98] [99]
	50-58	IYPFVEPIP	PEPi (50-58) OP (51-58, etc.)	N	Y	Y	[99] [100]
	51-59	<u>YPFVEPIPY</u>	PEPi (50-58) OP (51-58, etc.)	Y	Y	Y	[99] [100]
	52-59	PFVEPIPY	PEPi (52- 59)	N	Y	Y	[99]
	53-59	FVEPIPY	PEPi (53-59) Immuno (54-59)	N	N	Y	[99] [101]
	54-59	VEPIPY	Immuno (54-59)	N	N	Y	[101]
	54-60	VEPIPYG	Immuno (54-59)	N	N	Y	[101]
	56-59	PIPY	PEPi (56-59)	N	Y	Y	[99]
	105-117	SPTIPFFDPQIPK	Immuno (105-117)	N	Y	Y	[102]
	121-131	LENLHLPLPLL	PEPi (121-131) ACEi (125-129, etc.)	N	Y	Y	[103] [97] [104]
	122-129	<u>ENLHLPLP</u>	ACEi (125-129)	N	Y	Y	[97] [104]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP homologues, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated. The letter highlighted in gray (S) was reported for an amino acid substitution (to Q) in Ref. 102.

[Abbreviations]

CPPh, caseinophosphopeptide homologue; ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory; AB, antibacterial; AT, antithrombotic; past, pasteurization; dig, digestion.

Table 4-1, continued

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Human Milk			Ref.
				(-)Past (-) Dig	(-)Past (+) Dig	(+)Past (+) Dig	
β -CN	122-131	ENLHLPLPLL	PEPi (122-131) ACEi (125-129, etc.)	N	Y	Y	[103] [97] [104]
	123-132	<u>NLHLPLPLLQ</u>	PEPi (122-131) ACEi (125-129, etc.)	N	Y	Y	[103] [97] [104]
	125-130	HLPLPL	ACEi (125-129) PEPi (125-130)	N	N	Y	[104] [105]
	154-160	WSVPQPK	AO (154-160)	N	Y	Y	[98]
	167-173	QVVPYPQ	AO (167-173)	N	Y	Y	[98]
	185-211	<i>QELLNP^STHQIYPVTQPLAPVHNPI^SV</i>	AB (185-211)	Y	N	Y	[106]
	206-209	HNPI	AO (206-209)	N	Y	N	[107]
α_{s1} -CN	5-11	<u>PLRYP^SER</u>	ACEi (8-11)	N	Y	N	[108]
	136-142	<u>YYPQIMQ</u>	ACEi (136-143)	N	Y	Y	[108]
	160-170	<u>NYEKNNV^SMLQW</u>	ACEi (164-170)	N	Y	N	[108]
κ -CN	100-103	<u>IPPK</u>	AT (101-103)	N	Y	Y	[109]
	101-104	<u>PPKK</u>	AT (101-103)	N	Y	Y	[109]
α -LA	51-59	<u>GLFQISNK</u>	Immuno (51-53)	N	Y	Y	[101]
	104-108	WLAHK	ACEi (104-108)	N	Y	Y	[110]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP homologues, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated. The letter highlighted in gray (**S**) was reported for an amino acid substitution (to Q) in Ref. 102.

[Abbreviations]

CPPh, caseinophosphopeptide homologue; ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory; AB, antibacterial; AT, antithrombotic; past, pasteurization; dig, digestion.

Table 4-1, continued

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Human Milk			Ref.
				(-)Past (-) Dig	(-)Past (+) Dig	(+)Past (+) Dig	
LF	565-572	<u>DLKLADFA</u>	ACEi (566-568) AO (569-571)	N	Y	Y	[111] [112]
	565-573	<u>DLKLADFAL</u>	ACEi (566-568) ACEi (571-573) AO(569-571)	N	Y	N	[111] [112]
	566-571	<u>LKLADF</u>	ACEi (566-568) AO (569-571)	N	Y	Y	[111] [112]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP homologues, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated. The letter highlighted in gray (**S**) was reported for an amino acid substitution (to Q) in Ref. 102.

[Abbreviations]

CPPh, caseinophosphopeptide homologue; ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory; AB, antibacterial; AT, antithrombotic; past, pasteurization; dig, digestion.

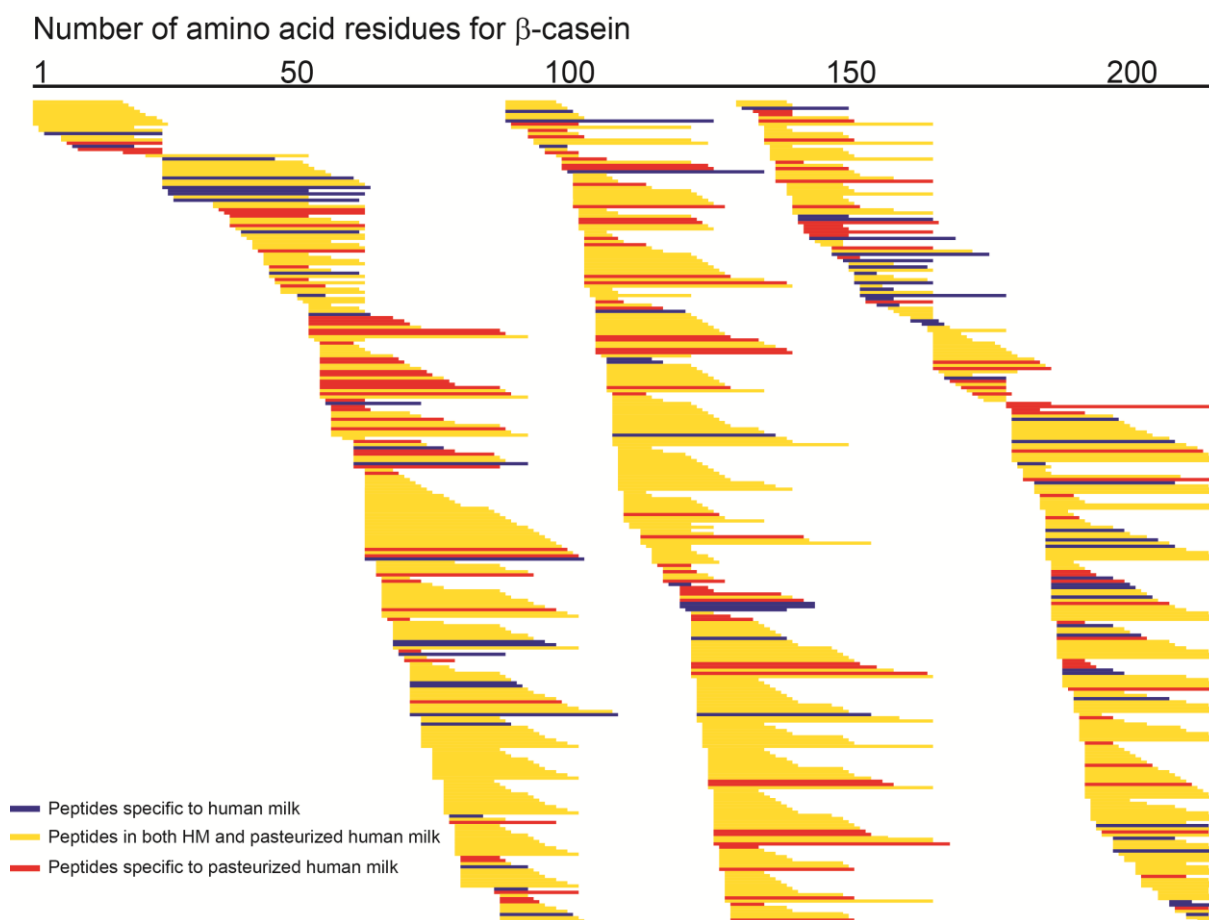


Figure 4-2 Digestive patterns for β -casein in human and pasteurized human milk. Sequences of β -casein-derived peptides released from human milk and pasteurized human milk were compared after *in vitro* digestion. The top line bar with numbers represents the whole β -CN sequence with amino acid residue numbers.

第5章 育児用ミルクにおける乳たんぱく質原料の違いが消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響

5-1 緒言

育児用ミルクは母乳の代替として用いられるものであり、多くの育児用ミルクでは栄養学的に良質なたんぱく質である乳たんぱく質が原料に用いられている。しかしながら、牛乳アレルギーを持つ児に対しては、乳たんぱく質の加水分解を原料とした育児用ミルク(アレルギー疾患用ミルク)が適用される [4]。また近年では、消化管疾患の治療や牛乳アレルギーの予防を目的に、牛乳アレルギーを持っていない児に対してもアレルギー疾患用ミルクが用いられることが増えてきている。アレルギー疾患用ミルクに用いられる乳たんぱく質原料は、食品加工で広く利用されているアラカーゼやプロナーゼ、パパイイン、ヒト消化酵素として有しているトリプシンやキモトリプシンなどを用いて調製された、軽度/高度たんぱく質分解物である [121]。たんぱく質の消化の程度や生成されるペプチドのパターンは、消化酵素の組み合わせや、消化時間、温度、酵素/乳たんぱく質比によって大きく影響される [121]。すなわち、工業的分解を受けた乳たんぱく質は、未処理の乳たんぱく質と比べて、消化管での消化のされ方が異なり、また生成されるペプチドのパターンも異なるものと考えられる。そして、消化管内で生成される生理活性ペプチドのパターンも、育児用ミルクとアレルギー疾患用ミルクとでは異なることが推察される。これまで、消化管内で形成される生理活性ペプチドについて、育児用ミルクとアレルギー疾患用ミルクとを比較した報告はない。

本研究では、育児用ミルクとアレルギー疾患用ミルクとで消化によって乳たんぱく質から形成される生理活性ペプチドのパターンが異なるかどうかについて、検討することを目的とした。通常の育児用ミルク、CN 高度分解物を配合したミルク、及び WP 低度分解物を配合したミルクについて、人工消化試験に供した後、消化物を LC-MS/MS 分析に供してペプチド配列を同定した。その後、 α -LA、 β -LG、及び CN に由来する生理活性ペプチドが含まれるかどうか、生理活性ペプチドのデータベースを用いて検索を行った。

5-2 材料と方法

5-2-1 育児用ミルク

本試験では、米国内で市販されている粉ミルクである、通常の育児用ミルク (CN + WP ベース; Similac Advance, Abbott Nutrition, Abbott Park, IL, USA)、CN 高度分解物配合ミルク (Similac ExpertCare Alimentum, Abbott Nutrition)、及び WP 軽度分解物配合ミルク (Gerber Good Start Gentle, Nestlé Infant Nutrition, Florham Park, NJ, USA) を用いた。本章でこれらのミルクについて述べる際は、以下、sIF (standard infant formula), eHIF (extensively-hydrolyzed infant formula), pHIF (partially-hydrolyzed infant formula)と略すこととする。それぞれの製品パッケージに記載の容量で溶解した際のたんぱく質、脂質、および炭水化物含量を Table 5-1 に示す。

eHIF および pHIF については、たんぱく質原料として乳たんぱく質の酵素分解物を配合していることから、その分解度を確かめることを目的に、ゲル浸透クロマトグラフィー（島津製作所、京都市）によるペプチドの分子量分布の測定を森永乳業株式会社素材応用研究所にて行った。育児用ミルクを溶離液（50 mM ギ酸/20 mM 塩化ナトリウム）にたんぱく質濃度が 0.1 %となるよう溶解したものを、4°C 下で遠心分離（8,500g、30 分）に供した後、浮上した脂肪層をスパチュラを使って除去した。その後、0.20 μ m 径のフィルター（Millipore）に供して限外濾過した後、クロマトグラフィーに供した。カラムは、460 μ m $\times$ 200 mm polyhydroxymethyl aspartamide カラム（5 μ m, 200Å; Poly LC, Columbia, MD, USA）と 460 μ m $\times$ 200 mm polyhydroxymethyl aspartamide カラム（5 μ m, 300Å; Poly LC）を用い、流速 500 μ L/min のもと上述の溶離液を一定濃度に保ち、20 分間かけてペプチドの分離を行った。210 nm の吸光度を測定して、ペプチドを検出した。分子量算出のための参照として、グルタミン（分子量 146; 協和発酵キリン、東京都）、メチオニン（分子量 149; 協和発酵キリン）、エンケファリナミド（分子量 588; Bachem, Basel, Switzerland）、オキシシトシン（分子量 1007; Bachem）、バシトラシン（分子量 1,427; Sigma-Aldrich）、インスリン（分子量 5,740; 和光純薬工業、大阪市）、リボヌクレアーゼ A（分子量 13,700; Pharmacia, Uppsala, Sweden）、キモトリプシンノーゲン A（分子量 25,000, 和光純薬工業）、オボアルブミン（FW 43,000; 太陽化学、三重県四日市市）、ラクトペルオキシダーゼ（分子量 93,000, Sigma-Aldrich）、および免疫グロブリン G（分子量 160,000, Sigma-Aldrich）を用いた。得られたクロマトグラムについて、解析ソフト LCsolution（version 1.25, 島津製作所）を使って分子量分布を解析した（Table 5-2）。

5-2-2 *In vitro* 消化試験

育児用ミルクをパッケージに記載の容量の MilliQ 水で溶解した後、4°C 下で遠心分離（8,500g、30 分）に供し、浮上した脂肪層をスパチュラを使って除去した。その後、以下の人工消化試験に供した。試料の pH を 1N の塩酸を用いて 4.0 に調整した後、豚由来のペプシン（Sigma-Aldrich）の濃度が 2.0%（w/v）になるよう 1 mM の塩酸で溶解した後、ペプシン/試料中たんぱく質比が 1/12.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器（New Brunswick Scientific）にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 15 分間振盪した。その後、1 M の重炭酸ナトリウムを用いて試料の pH を 7.0 に調整した。次に、豚由来のパンクレアチン（Sigma-Aldrich）の濃度が 0.4%（w/v）になるよう 100 mM の重炭酸ナトリウムで調製した溶液を、パンクレアチン/試料中たんぱく質比が 1/62.5 となるように試料に添加した。その後、試料を恒温振盪器（New Brunswick Scientific 社）にセットし、37°C 下、140 rpm の条件で 5 分間振盪した。その後、試料を 85°C にセットした恒温水槽で 3 分間加熱し、消化酵素を失活させた。

5-2-3 ペプチドミクス解析

ペプチドミクス解析のための LC-MS/MS 分析は、4-2-3 に記載の手法に則り、カリフォルニア大学デービス校の Proteomics Core Facility で行った。尚、ペプチド配列の同定に当たっては、*Bos Taurus*

(ウシ)のたんぱく質配列情報を Uniprot より取得し、その全配列、同数の逆向き配列、及び研究室由来の一般的な混入たんぱく質の配列 60 個に対して検索を行った。

5-3 結果

たんぱく質源として乳たんぱく質の酵素分解物を配合している eHIF および pHIF について、まずバックグラウンドとして、人工消化処理をしていない試料中に含まれるペプチドの同定を行った (Table 5-3)。eHIF では、その製品の原材料表示の通り、CN に由来するペプチドのみ同定された [101, 103-105, 110, 122-134]。一方 pHIF では、原材料表示と異なり、WP に由来するペプチドだけでなく CN に由来するペプチドも同定されており、原料で使われた WP では CN が分離されきれていなかったものと推察された。eHIF ではたった 5 種類の CN に由来する生理活性ペプチドしか同定できなかったのに対し、pHIF では、CN 由来の生理活性ペプチドは 17 種類同定されており、前者にはたんぱく質高度分解物が、後者には軽度分解物が配合されていることを反映しているものと推察された。eHIF で同定された 5 種類のペプチドは、人工消化処理を行った後でも全て同定された。一方、pHIF で同定された 25 種類のペプチドのうち、人工消化処理後でも同定されたのは 16 種類に留まった。以上の結果から、高度分解物中のペプチドは消化耐性の高い配列だけが分解されずに残っていたのに対し、軽度分解物中では消化に対して耐性を有するペプチドとそうでないペプチドが混在していたものと、推察された。

3 種類の育児用ミルクを人工消化試験に供したところ、様々なタイプの生理活性ペプチドが同定された (Table 5-4) [101, 103-105, 110, 122-129, 131, 133-149]。同定された 57 の生理活性ペプチドのうち、sIF から最も多い 39 種類が、次いで pHIF から 27 種類、eHIF からは 9 種類の生理活性ペプチドが確認された。これらの生理活性ペプチドのうち、 α_s1 -CN の 23-34 位、及び β -CN の 134-138 位に由来する ACE 阻害や、 β -CN の 60-63 位及び 60-64 位に由来するオピオイドペプチドは、生体における吸収性や生体内での生理活性について、広範にわたって研究が行われている。

5-4 考察

本試験では、通常の CN+WP ベースの育児用ミルク (sIF)、CN 高度分解物配合ミルク (eHIF)、および WP 軽度分解物配合ミルク (pHIF) の 3 種類の育児用ミルクを人工消化試験に供し、乳たんぱく質に由来する生理活性ペプチドの生成パターンを比較した。sIF において最も多くの生理活性ペプチドが同定されたことから、乳たんぱく質のアミノ酸配列に含まれている生理活性ペプチドの多くは、工業的加水分解によって損なわれてしまうことが確認され、抗菌ペプチド、免疫調節ペプチド、及び抗酸化ペプチドでそれが顕著であった。一方、いくつかの生理活性ペプチドについては、たんぱく質分解物配合ミルクにおいてむしろ形成されやすい傾向が認められ、 β -LG に由来する生理活性ペプチド、および β -CN の 60-70 位に由来する生理活性ペプチドでそれは顕著であった。第 2 章および第 3 章で示した通り、 β -LG は消化酵素に対して高い耐性を有したたんぱく質であり、また β -CN の 60-70 位は疎水性が高く、たんぱ

く質分解酵素が作用しにくい部位である [101]。すなわち、 β -LG や β -CN は工業的加水分解を受けて断片化されることによって、本来消化されづらい部位に消化酵素が接近しやすくなり、その結果、生理活性ペプチドの形成が促進されたものと推察される。

本研究の人工消化処理では、ペプシンとパンクレアチンという消化管内で分泌される消化酵素しか用いておらず、消化管の刷子縁膜上のペプチダーゼや血中のペプチダーゼについては考慮していない試験系である。そのため、ACE 阻害ペプチドやオピオイドペプチドなど、生体内に吸収されてから機能すると考えられる生理活性ペプチドの生体内での安定性を評価する上では不十分な試験系と考えられる。しかしながら、本研究で同定された、 α_{s2} -CN の 23-34 位 及び β -CN の 133-138 位に由来する 2 種類の ACE 阻害ペプチドと [104, 139]、 β -CN の 71-75 位に由来する血清コレステロール低減化ペプチドは [135]、それらペプチドの経口摂取によって生理活性を発揮することがラットを用いた試験で確認されている。特に β -CN の 133-138 位に由来するペプチド (LHLPLP) とその分解物である HLPLP については、4-4 で言及した通り、牛乳を摂取した成人の十二指腸で形成されていること [118]、また同ペプチドを経口摂取したラットにおいて、ペプチドが吸収されて血中に移行し、血圧降下作用を発揮したことが報告されている [104]。さらに、オピオイドペプチドである β -カゾモルフィン [131]、血中ではそれよりも分子量の大きい前駆体として存在することが、ウシやイヌの新生児に牛乳を摂取させた試験にて確認されており [150, 151]、本試験で同定された β -カゾモルフィンを含んだ長い断片 (59-67、59-68、及び 60-68 位) もまた消化管から吸収され、 β -カゾモルフィンの前駆体として機能している可能性がある。4-4 で考察した通り、乳児における ACE 阻害ペプチドやオピオイドペプチドの役割は明らかになっていないものの、前者は将来における心血管疾患発症への関与が [119]、後者は消化管機能や学習・記憶能力の発達への関与が想定される [115, 116]。但し、オピオイドペプチドについては、乳児の無呼吸症候群や精神発達の遅延との関与を示唆する報告もある [152]。

本章の結果と、第 4 章の母乳についての検討結果とを比較してみると、両者で共通していた生理活性ペプチドに関する配列は、 α -LA に由来する ACE 阻害ペプチド WLAHK と [110]、 β -CN に由来する ACE 阻害ペプチド/PEP 阻害ペプチドを含んだ配列である HLPLPL だけであった [104, 105]。また、母乳たんぱく質と育児用ミルクで使われている牛乳たんぱく質とでは、そのアミノ酸配列にある程度の相天性があることから、消化を介して放出される生理活性ペプチドにおいても相天性の高いものが同定されている。例えば、 β -CN の "strategic zone" と呼ばれる領域に由来する β -カゾモルフィン (母乳: 51-58 位, 育児用ミルク: 60-68 位) や免疫調節ペプチド (母乳: 54-59 位, 育児用ミルク: 63-68 位)、 κ -CN に由来する抗血栓作用を有するペプチド (母乳: 100-103 位及び 100-104 位, 育児用ミルク: 106-111 位及び 106-112 位) などである。しかしながら、相天性が高く同様の生理活性をもつ配列同士であっても、生体利用性や活性強度が異なる可能性があり、その結果、生体内で同じように機能をしているとは限らない。さらに、育児用ミルクには母乳には存在しない β -LG が主要たんぱく質の一つとして含まれており、 β -LG からジペプチジル・ペプチダーゼ-4 (dipeptidyl peptidase-4 (DPP4)) 阻害活性や血清コレステロール低減

化効果といった、母乳では認められなかった生理活性を有するペプチドが同定されている。このように、母乳と育児用ミルクとでは生理活性ペプチドのパターンはかなり異なり、母乳と育児用ミルクとの間には、「生理活性ペプチド」という観点では未だ大きな差異があるといえる。

5-5 小括

通常の育児用ミルクと、たんぱく質分解物配合ミルクとでは、人工消化処理を介して放出される生理活性ペプチドのパターンに大きな違いが認められ、異なるタイプの育児用ミルクを摂取する乳児の間では、生理活性ペプチドから受ける影響も異なることが示唆された。しかし、同定されたほとんどの生理活性ペプチドについて、生体内でどのように機能しているかについての知見は乏しく、また乳児に対してどのように作用しているかは明らかになっていない。また、本試験で用いた人工消化試験法は、胃内 pH の経時変化や、CN と WP との間の胃排出速度の違いなどを反映していない、単純化した「静的」な消化試験法である。それゆえ、十分な検討のもとに実験条件を選択しているものの、本試験の人工消化と実際の生体内での消化とでは未だ乖離があることは否めない。さらに、本試験で用いた育児用ミルクは、市場で販売されているものをランダムに選択したものであり、特にたんぱく質分解物配合ミルクのたんぱく質の分解度は、製品一つ一つ異なることから、本試験で認められた結果を単純に同様の製品に当てはめることは性急といえる。今後、動物試験や臨床試験を通して、どの生理活性ペプチドが乳児にとって重要な役割を果たしているものなのか、明らかにしていくことが必要である。

Table 5-1 Nutrient composition of infant formulas^a

Component (g/100 mL)	sIF	eHIF	pHIF
Protein	1.3	1.8	1.5
Fat	3.6	3.6	3.4
Carbohydrate	6.9	6.6	7.6

^aThe table is adapted from product labelings.

[Abbreviations]

sIF, standard infant formula; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-2 Molecular size distribution of peptides in hydrolyzed infant formulas

Molecular Weight	eHIF (%)	pHIF (%)
< 200	39.40	7.29
201-500	42.20	26.86
501-1,000	14.03	20.12
1,001-1,200	2.17	10.84
1,201-2,000	1.96	15.16
2,001-3,500	0.24	12.69
3,501-5,000	0.00	3.91
5,001-10,000	0.00	2.39
10,001-20,000	0.00	0.55
20,001-50,000	0.00	0.18
> 50,000	0.00	0.00

[Abbreviations]

eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-3 Bioactive peptides present in undigested hydrolyzed infant formulas

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Infant Formulas		Ref.
				eHIF	pHIF	
α -LA	76-80	<u>SCDKF</u>	AB (61-65/75-80)	N	(Y)	[122]
	104-108	WLAHK	ACEi (104-108)	N	Y	[110]
β -LG	15-20	VAGTWY	AB (15-20)	N	Y	[123]
	78-82	IPAVF	DPP4i (78-82)	N	Y	[124]
	78-83	IPAVFK	AB (78-83)	N	(Y)	[123]
			DPP4i (78-83)			[124]
	92-100	VLVLDTDYK	AB (92-100)	N	Y	[123]
	102-105	YLLF	OP (102-105)	N	Y	[125]
α_{s1} -CN	142-148	ALPMHIR	ACEi (142-148)	N	Y	[126]
α_{s1} -CN	91-97	YLGYLEQ	Anxiolytic (91-97)	N	(Y)	[127]
	91-100	YLGYLEQLLR	Anxiolytic(91-100, etc)	N	(Y)	[127]
α_{s2} -CN	174-179	FALPQY	ACEi (174-179 or 181)	N	(Y)	[128]
			AO (174-181)			[129]
α_{s2} -CN	174-181	FALPQYLK	ACEi (174-181)	N	(Y)	[128]
			AO (174-181)			[129]
β -CN	1-25	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	CPP (1-25)	N	(Y)	[130]
	59-66	VYFPFGPI	PEPi (59-66)	N	Y	[105]
	59-67	VYFPFGPIP	PEPi (59-66 or 67)	N	Y	[105]
	59-68	<u>VYFPFGPIP</u> N	PEPi (59-66 or 67)	N	Y	[105]
	60-63	YFPF	OP (60-64)	Y	N	[131]
	60-65	YFPFGP	OP (60-64, etc)	Y	N	[131]
	60-68	YFPFGPIP N	OP (60-64, etc)	N	Y	[131]
			ACEi (60-68)			[132]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated.

[Abbreviations]

AB, antibacterial; ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; DPP4i, dipeptidyl peptidase-4-inhibitory; OP, opioid; AO, anti-oxidative; CPP, caseinophosphopeptide; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; immuno, immuno-regulatory; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-3, continued

Parental Protein	Residue	Sequence	Function ^b	Infant Formulas		Ref.
				eHIF	pHIF	
β -CN	63-68	PGIPN	Immuno (63-68)	Y	Y	[101]
	132-139	<u>NLHLPLPL</u>	ACEi (133, or 134-138) PEPi (134-139)	N	(Y)	[104] [105]
	132-140	NLHLPLPL	ACEi (133, or 134-138) PEPi (132-140, and 134-139)	N	Y	[104] [105] [103]
	133-139	<u>LHLPLPL</u>	ACEi (133, or 134-138)	N	Y	[104] [105]
	134-138	HLPLP	ACEi (134-138)	Y	N	[104]
	134-139	HLPLPL	ACEi (134-138) PEPi (134-139)	N	Y	[104] [105]
	170-176	VLPVPQK	AO (170-176)	N	Y	[133]
	177-183	AVPYPQR	AO (177-183)	N	(Y)	[133]
	193-201	<u>YQEPVLGPV</u>	AO (193-196)	Y	N	[134]
	193-202	<u>YQEPVLGPVR</u>	AO (193-196)	N	Y	[134]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated.

[Abbreviations]

AB, antibacterial; ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; DPP4i, dipeptidyl peptidase-4-inhibitory; OP, opioid; AO, anti-oxidative; CPP, caseinophosphopeptide; PEPi, prolyl-endoropeptidase-inhibitory; immuno, immuno-regulatory; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-4 Bioactive peptides in *in vitro* digested infant formulas

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Infant Formulas			Ref.
				sIF	eHIF	pHIF	
α -LA	104-108	WLAHK	ACEi (104-108)	Y	N	Y	[110]
	109-114	ALCSEK	AB (17-31/109-114)	N	N	Y	[122]
β -LG	15-20	VAGTWY	AB (15-20)	N	N	Y	[123]
	25-40	AASDISLLDAQSAPLR	AB (25-40)	N	N	Y	[123]
	71-75	IIAEK	HC (71-75)	N	N	Y	[135]
	78-82	IPAVF	DPP4i (78-82)	N	N	Y	[124]
	92-100	VLVLDTDYK	AB (92-100)	N	N	Y	[123]
	102-105	YLLF	OP (102-105)	N	N	Y	[125]
	142-148	ALPMHIR	ACEi (142-148)	N	N	Y	[126]
α_{s1} -CN	1-7	RPKHPIK	AB (1-7)	Y	N	N	[136]
	1-27	<u>RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAP</u>	Immuno (1-23)	Y	N	N	[137]
	4-14	<u>HPIKHQGLPQE</u>	AB (6-14)	Y	N	N	[138]
	10-16	<u>GLPQEV</u> L	AB (10-14)	N	N	Y	[137]
	23-34	FFVAPFPEVFGK	ACEi (23-34)	Y	N	Y	[139]
	91-96	YLGYLE	OP (91-96)	N	N	Y	[140]
	91-97	YLGYLEQ	Anxiolytic (91-97)	Y	N	N	[127]
	143-149	AYFYPEL	ACEi (143-149)	Y	N	Y	[141]
	144-149	YFYPEL	AO (144-146 or 149)	Y	N	N	[142]
	146-149	YPEL	AO (146-149)	Y	N	N	[142]
	157-164	DAYPSGAW	ACEi (157-164)	Y	N	Y	[143]
	180-193	SDIPNPIGSENSEK	AB (180-193)	Y	Y	Y	[138]
α_{s2} -CN	25-32	NMAINPSK	ACEi (25-32)	Y	N	N	[128]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated.

[Abbreviations]

ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AB, antibacterial; HC, hypcholesterolemic; DPP4i, dipeptidyl peptidase-4-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory. AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; AT, antithrombotic; sIF, standard infant formula; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-4, continued

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Infant Formulas			Ref.
				sIF	eHIF	pHIF	
α_{s2} -CN	174-182	<u>FALPQYLKT</u>	ACEi (174-181)	Y	N	N	[128]
			AO (174-181)				[129]
β -CN	49-56	IHPFAQTQ	PEPi (49-56)	Y	N	N	[105]
	59-66	VYPFPGPI	PEPi (59-66)	Y	Y	Y	[105]
	59-67	VYPFPGPIP	PEPi (59-66 or 67)	N	Y	Y	[105]
	59-68	<u>VYPFPGPIP</u> N	PEPi (59-66 or 67)	Y	Y	Y	[105]
	60-63	YPFP	OP (60-64, etc)	N	Y	N	[131]
	60-65	YPFPGP	OP (60-64, etc)	N	Y	N	[131]
	60-68	YPFPGPIP N	OP (60-64, etc)	N	Y	Y	[131]
			ACEi (60-68)				[132]
	63-68	PGPIP N	Immuno (63-68)	N	Y	Y	[101]
	98-105	VKEAMAPK	AO (98-105)	Y	N	N	[133]
	129-138	DVEN <u>LHLPLP</u>	ACEi (133, or 134-138)	N	N	Y	[104]
	130-139	<u>VENLHLPLPL</u>	ACEi (133, or 134-138)	Y	N	Y	[104]
			PEPi (131-140, 134-139)				[103] [105]
	130-142	<u>VENLHLPLPL</u> QS	ACEi (133, or 134-138)	Y	N	N	[104]
			PEPi (131-140, 134-139)				[103] [105]
	132-139	<u>NLHLPLPL</u>	ACEi (133, or 134-138) PEPi (134-139)	Y	N	Y	[104] [105]
	133-138	LHLPLP	ACEi (133, or 134-138)	N	N	Y	[104]
	133-139	<u>LHLPLPL</u>	ACEi (133, or 134-138)	Y	N	Y	[104]
			PEPi (134-139)				[105]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated.

[Abbreviations]

ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AB, antibacterial; HC, hypcholesterolemic; DPP4i, dipeptidyl peptidase-4-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory. AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; AT, antithrombotic; sIF, standard infant formula; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

Table 5-4, continued

Parental Protein	Residue	Sequence	Function	Infant Formulas			Ref.
				sIF	eHIF	pHIF	
β -CN	134-138	HLPLP	ACEi (133, or 134-138)	N	Y	N	[104]
	134-139	HLPLPL	ACEi (134-138) PEPi (134-139)	Y	N	Y	[104] [105]
	169-176	KVLPVPQK	AO (169-176)	Y	N	N	[133]
	170-176	VLPVPQK	AO (170-176)	Y	N	Y	[133]
	191-209	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	ACEi (191-209) Immuno (191-193, 192 or 193-209)	Y	N	N	[144] [145] [146]
	192-209	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	Immuno (192 or 193-209)	Y	N	N	[146]
	193-197	<u>YQEPV</u>	AO (193-196)	Y	N	N	[134]
	193-209	YQEPVLGPVRGPFPIIV	Immuno (193-209) AB (193-207)	Y	N	N	[146] [149]
κ -CN	18-24	FSDKIAK	AB (18-24)	Y	N	N	[148]
	25-30	YIPIQY	ACEi (25-30)	Y	N	N	[147]
	31-39	<u>VLSRYP</u> SYG	OP Antagonist (33-38)	Y	N	N	[131]
	33-40	<u>SRYP</u> SYGL	OP Antagonist (33-38)	Y	N	N	[131]
	35-41	YPSYGLN	OP Antagonist (35-41)	Y	N	N	[131]
	42-49	YYQQKPVA	AB (42-49)	Y	N	N	[148]
	56-60	LPYPY	ACEi (56-60)	Y	N	N	[147]
	61-75	YAKPAAVRSPAQILQ	AB (64-75)	Y	N	N	[148]
	106-111	<u>MAIPPK</u>	AT (106-111)	Y	N	N	[120]
	106-112	<u>MAIPPKK</u>	AT (106-116)	Y	N	N	[120]
	162-169	VQVTSTAV	AB (162-169)	Y	N	N	[148]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. As for the amino acid sequence of CPP, letters in italic represent the “acid motif” whose serine residues are phosphorylated.

[Abbreviations]

ACEi, angiotensin I-converting enzyme-inhibitory; AB, antibacterial; HC, hypcholesterolemic; DPP4i, dipeptidyl peptidase-4-inhibitory; OP, opioid; immuno, immuno-regulatory. AO, anti-oxidative; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; AT, antithrombotic; sIF, standard infant formula; eHIF, extensively-hydrolyzed infant formula; pHIF, partially-hydrolyzed infant formula.

第6章 仔ラット消化モデルによる母乳及び育児用ミルク中の乳たんぱく質の消化動態の解析

6-1 緒言

母乳は、児がその誕生から数か月間の間における最も適した栄養源である。また、育児用ミルクは何らかの理由で母乳を得ることができない乳児にとっての母乳代替として用いられる。育児用ミルクの組成は、母乳の栄養組成により近いものになるよう、またそれを摂取した乳児の成長や発達が母乳栄養児と近いものになるよう、これまで改良が行われてきている。第1章で述べた通り、育児用ミルク中の乳たんぱく質についてはまず、CN/WP比を牛乳の8:2から母乳の4:6に近づけた設計がなされている[8]。また、母乳に豊富に含まれている α -LAやLFは、アミノ酸バランスに優れ、また児の健康に寄与する生理活性を持ったたんぱく質であることから、牛乳由来の α -LAやLFを強化した育児用ミルクも開発されている[11, 12]。近年では、育児用ミルクをさらに「母乳化」するための試みとして、同じく母乳中に豊富に含まれるOPNについての研究が盛んになってきており、牛乳由来のOPNを強化した育児用ミルクの臨床試験も行われている[22]。

第4章および第5章でも検討を行ったように、乳たんぱく質は消化管で消化酵素の作用を受けて、さまざまな生理活性ペプチドが生成される。乳児の消化管は発達段階にあり[37]、摂取した乳たんぱく質を効率よく消化できないことから[36]、乳たんぱく質由来の生理活性ペプチドは消化管内で消化されずに比較的残りやすいと考えられる。すなわち、乳児の発達・成長の過程で、乳たんぱく質由来の生理活性ペプチドは大きく影響を及ぼしているものと推察される。第4章および第5章では、乳たんぱく質から放出される生理活性ペプチドの形成パターンについて *in vitro* の試験系を用いて検討を行った。このような *in vitro* の試験系を用いた報告が多い一方、*in vivo* の試験系を用いたものは、母乳栄養児の胃内容物の吸引物を解析した報告や[39]、育児用ミルクを与えた仔ブタの小腸内容物を解析した報告など[153]、未だわずかな報告しかない。特に、ヒトの乳児の小腸内容物を採取することは、倫理上および技術上困難である。

本研究では、乳たんぱく質から放出される生理活性ペプチドの生成パターンを *in vivo* の試験系で評価することを目的に、第2章および第3章で用いた、仔ラットモデルを用いた試験を行った。仔ラットに母乳あるいは通常の育児用ミルクを経口投与した後、小腸内容物を回収し、それらをLC-MS/MS分析に供して、それぞれの乳たんぱく質の消化性を配列レベルで評価するとともに、既知の生理活性ペプチドの生成パターンを評価した。

6-2 材料と方法

6-2-1 母乳と育児用ミルク

4-2-1に記載の通り、母乳(human milk (HM))はカリフォルニア大学デービス校の治験審査委員会の承認のもと、1名の産婦からインフォームド・コンセントを得て、提供を受けた。複数の妊娠期間から採

取された試料を 1 つにまとめ、 -30°C 下で保存した。また育児用ミルクは、第 5 章でも用いた Abbott Nutrition 社の通常の育児用ミルクである Similac Advance (Abbott Nutrition)を用いた。育児用ミルク (standard infant formula (sIF))は、パッケージに記載の容量の MilliQ 水で溶解した後、試験に用いた。本章で、解析した母乳試料および育児用ミルクを言及する際は、それぞれ HM (human milk)、sIF (standard infant formula)と略することとする。

6-2-2 *In vivo* 消化試験

*In vivo*における HM 及び sIF 中の乳たんぱく質の消化性と生成される生理活性ペプチドのパターンを評価することを目的に、2-2-5 と同様の仔ラットを用いた動物試験を行った。動物試験は、カリフォルニア大学デービス校の動物実験委員会の承認を得て実施した。Sprague Dawley 母獣ラット 1 匹と 12 匹の同腹仔ラット (雄 6 匹 + 雌 6 匹)を Charles River 社から購入した。実験施設への馴化後、14 日令に、仔ラットは母獣から 6 時間隔離して絶食させた。まず 6 匹の仔ラットに対し、母乳/体重比が 1/36 (v/w)となるように、HM をゾンデを使って強制投与した。投与後 0.5 時間後 (#1 & 2)、1.0 時間後 (#3 & 4)、または 2.0 時間後 (#5 & 6)に、各仔ラットを二酸化炭素に暴露して安楽死させた後、解剖試験に供して小腸の内容物を採取した。小腸を均等な長さに 2 等分にして、それぞれを上部及び下部小腸とし、それぞれの内面をプロテアーゼインヒビター・カクテル (Sigma-Aldrich, P2714)を含んだ 0.1 mL の PBS で洗浄し、洗浄液を小腸内容物として回収した。HM と同様に、4 匹の仔ラットに対し、育児用ミルク/体重比が 1/36 (v/w)となるように、sIF をゾンデを使って強制投与した。投与後 0.5 時間後 (#7 & 8)または 1.0 時間後 (#9 & 10)に、解剖試験に供して小腸の内容物を採取した。回収した小腸内容物は、解析まで -80°C で保存した。残りの 2 匹の仔ラット (#11 & 12)は実験コントロールとして、強制投与を行わず解剖試験に供し、小腸内容物を回収した。(HM の試料としての希少性を重要視し、投与後 2.0 時間の試料採取は HM に対してのみ行った。しかし、#5 の小腸内容物は、採取後の誤操作により解析に供することが出来なかった。)

回収した全ての小腸内容物は、解析まで -80°C で保存した。

6-2-3 ペプチドミクス解析

ペプチドミクス解析のための LC-MS/MS 分析は、4-2-3 に記載の手法を少し改変し、カリフォルニア大学デービス校の Proteomics Core Facility で行った。本章の試料については、第 2 章で実施したように、ジスルフィド結合を還元化処理と続くシステイン残基のアルキル化処理を行って、ペプチド間のジスルフィド結合を切断してから LC-MS/MS 分析に供した。すべての MS/MS スペクトルから、解析ソフト Myrimatch (version 2.2.140)と IDPicker (version 3.1.9288) を使ってペプチド配列の同定を行った [154, 155]。 *Homo sapiens*、*Bos Taurus* (ウシ)、および *Rattus norvegicus* のたんぱく質配列情報を Uniprot より取得し、その全配列、同数の逆向き配列、及び研究室由来の一般的な混入たんぱく質の配列 60 個に対して検索を行った。また、たんぱく質の消化パターンとして「非特異的消化」パターンを選択した。そして、

ペプチド配列に含まれる修飾構造として、システイン残基のヨードアセトアミド化、及びメチオニン残基の酸化をによるマス・シフトを想定した検索を行った。これらのペプチド配列の妥当性の判定は、FDR がペプチド同定レベルで 1%とした。

同定された α -LA、 β -LG、LF、OPN、および CN に由来するペプチド配列について、生理活性ペプチドのデータベースである「BIOPEP」を用い [94]、それぞれの配列が既知の生理活性ペプチドであるかどうか、照合を行った。照合結果はさらに、それぞれ文献検索を行い、生理活性ペプチドであることの確認を行った。

同定されたペプチド配列の中には、未知の生理活性ペプチドで、乳児の発達や健康に関わっているものがあることが想定される。未知の生理活性ペプチドの候補となる配列を選択することを目的に、同定された全ての配列を「PeptideRanker」の検索に供し [156]、それぞれの配列が生理活性を有するかどうかの評価を行った。PeptideRanker とは、人工ニューラルネットワークをベースとしたサーバーで、BIOPEP などの複数のデータベースに登録されている既知の生理活性ペプチドの配列情報を用いて、各配列が「生理活性ペプチドである／ではない」を機械学習させたものである。入力したペプチド配列に対し、「生理活性を有する可能性」の予測を 0～1 のスコアで評価する。本研究では、「生理活性を有する」という判定基準を、同サーバーのデフォルト値である「スコア 0.5 以上」とした。

6-3 結果

6-3-1 乳たんぱく質の消化性とペプチドの放出パターン

HM または sIF を強制経口投与した仔ラットから回収した内容物について LC-MS/MS 分析を行い、それぞれの主要たんぱく質に由来するペプチドの同定を行った。母乳については α -LA、LF、OPN および CN に由来するペプチドを、育児用ミルクについては α -LA、 β -LG および CN に由来するペプチドを解析対象とした。また、強制経口投与を行わなかった 2 個体 (#11 & 12)の小腸内容物を解析し、上記のたんぱく質に由来するペプチドが同定されていないことを確認した。上部小腸と下部小腸で同定されたペプチド数を Figure 6-1 に示す。HM および sIF とも、同定されたペプチドの数は、投与後 0.5 および 1.0 時間において上部小腸の方が下部小腸よりも多かった。HM については、投与後 2.0 時間時点でも小腸内容物を採取したが、上記のたんぱく質に由来する配列は同定されなかった。これら同定されたペプチドについて、それぞれが由来するたんぱく質配列に対するマッピングを行った (Figure 6-2 および 6-3)。HM において、 α -LA および β -CN ではその全配列の広い領域 (α -LA の 81.3%、 β -CN の 72.0%に相当) からペプチドが同定されたのに対し、それ以外の母乳たんぱく質ではごく限られた領域からしかペプチドは同定されなかった (Figure 6-2)。同様に sIF については、 β -LG および β -CN ではその全配列の広い領域 (β -LG の 81.2%、 β -CN の 72.7%に相当) からペプチドが同定されたのに対し、それ以外のたんぱく質では限られた領域からしかペプチドは同定されなかった (Figure 6-3)。また、これら 4 つのたんぱく質では、特定の領域に由来するペプチドが集中している傾向が認められた (HM の β -CN の 70-93 位、sIF の

β -LG の 39-55 位、および sIF の β -CN の 57-96 位と 145-161 位; Figure 6-2 および 6-3)。さらに、Figure 6-1 で示したように、下部小腸から同定されたペプチドの数は非常に限られているものの、下部小腸で同定されたペプチドは全て、上部小腸の場合と同じ特定の領域に由来するものであった。同様の結果は、同定されたペプチドの数は少ないながらも、sIF の α_{s2} -CN にも当てはまるようであった (Figure 6-3)。

HM および sIF の、ターゲットとしたたんぱく質の消化性をさらに検証するべく、同定されたペプチドの分子量分布を調べた (Figure 6-4 および 6-5)。HM を投与した仔ラットの上部小腸から採取した内容物において、 α -LA に由来するペプチドの種類は投与 1.0 時間後よりも 0.5 時間後の方が多く、ほとんどのペプチドは 800-1,600 kDa の範囲に分布していた一方、 β -CN に由来するペプチドの数は投与 1.0 時間後の方が多く、また α -LA の場合よりも少し高分子量側の 1,000-1,800 kDa に分布が集中していた (Figure 6-4)。一方、同様の傾向は、sIF にも認められたものの、HM の場合ほど顕著ではなかった (Figure 6-5)。すなわち、sIF における α -LA や β -LG に由来するペプチドは、その同定数に経時的変化が認められなかったものの、800-1,600 kDa を中心に分布しているのに対し、sIF における β -CN に由来するペプチドは、その種類は投与 0.5 時間後よりも 1.0 時間後の方が多く、また WP に由来するペプチドよりも少し高分子量側に分布が集中していた。下部小腸の内容物から同定されたペプチドについては、同定された数が僅かであるものの、HM・sIF ともに、分子量が大きい傾向が認められた。

6-3-2 乳たんぱく質の生理活性ペプチド

本試験で同定された、HM および sIF のたんぱく質に由来するペプチド配列について、既知の生理活性ペプチドの配列との照合を行った (Table 6-1 および 6-2)。本試験で同定されたペプチドのうち、既知の生理活性ペプチドの配列と合致したものは Table 6-1 および 6-2 で太字で示した僅か 8 つのペプチドだけであった。そこで結果をさらに精査して、既知の生理活性ペプチドを含む配列、および既知の生理活性ペプチドの配列と 75% 以上一致するペプチドを選び出した。HM に由来するペプチドは、血圧降下作用、抗酸化作用、抗血栓作用、DPP4 阻害作用、免疫調節作用、オピオイド作用、およびプロリルエンドペプチダーゼ阻害作用といった活性を持つペプチドと関連する配列が認められた [98-100, 102, 104, 107, 142, 157-165]。sIF に由来するペプチドは、鎮痛作用、抗菌作用、血圧降下作用、抗酸化作用、抗血栓作用、DPP4 阻害作用、血清コレステロール低減作用、免疫調節作用、オピオイド、プロリルエンドペプチダーゼ阻害作用、血管弛緩作用といった活性を持つペプチドと関連する配列が認められた [105, 120, 122-125, 131, 132, 134, 135, 145, 146, 148, 149, 157, 159, 163, 165-175]。

同定されたペプチド配列の中には、未知の生理活性ペプチドで、乳児の発達や健康に関わっているものがあることが想定される。未知の生理活性ペプチドの候補となる配列を選択することを目的に、同定された全ての配列を「PeptideRanker」の検索に供した [156]。まず、Table 6-1 および 6-2 で示した、既知の生理活性ペプチドの配列と合致した太字で記載の 8 本のペプチドのうち、6 本についてはスコアは 0.50 以上 (「生理活性がある」という判定のデフォルト値) であった。一方、Table 6-1 および 6-2 のそれ以

外のペプチドのスコアについては、特に傾向は認められず、スコアが 0.50 以下のペプチドも多かった。よって PeptideRanker は、「生理活性ペプチドを含むペプチド」や「生理活性ペプチドと配列が一部合致するペプチド」よりも、「その配列自体が生理活性を持つペプチド」に対して高いスコアを付与するサーバーであることが考えられた。既知の生理活性ペプチドと関連のない配列で、PeptideRanker によるスコアが 0.5 以上であったものを Table 6-3 及び 6-4 に示す。HM 由来の 32 のペプチドと sIF 由来の 34 のペプチドが、0.50 以上のスコアであった。

6-4 考察

本試験では、母乳および育児用ミルク中のたんぱく質が乳児の消化管内でどのように消化され、またどのような生理活性ペプチドが生成されるのかを検証することを目的に、仔ラットモデルを用いた *in vivo* での消化試験により評価を行った。

本試験で解析対象とした主要な乳たんぱく質のうち、HM および sIF ともに最も多く同定されたのは β -CN に由来するペプチドであり、また β -CN に由来するペプチドは HM よりも sIF から多く同定された。ヒトとウシの β -CN の配列には 50%以上の相同性があるものの、両者のリン酸化修飾の程度がかなり異なるため、胃内での凝集の状態やそれに伴うたんぱく質消化性にも大きな違いがある [176]。sIF の方が HM よりも β -CN に由来するペプチドは多く同定されたのは、sIF 中の β -CN の方が HM よりも消化性が悪いことを反映しているのかもしれない。次に、HM、sIF のいずれを投与した場合においても、下部小腸で特定されたペプチドの数はごく僅かであったことから、乳たんぱく質は胃や上部小腸においてほとんど消化されてしまい、本試験で同定できる長さを維持して下部小腸に到達することはほとんどないと考えられた。一方、それに関わらず下部小腸で同定されたペプチドは、下部小腸において非常に多くの種類のペプチド配列の放出が確認された領域と一致していた（HM では β -CN の 70-92 位、sIF では β -LG の 39-55 位、および β -CN の 57-96 位と 145-161 位に由来するものであった）。このことから、下部小腸にある程度の長さをもって到達することができるペプチドは、消化酵素に対して耐性を持った領域に由来していることが示唆された。特にウシ β -CN の 57-96 位については、脱脂乳やブルーチーズの人工消化試験やウシ CN を摂取した成人の小腸回収物中においても、消化耐性が報告されている [118, 177, 178]。上述の部位のうち、 β -LG の 39-55 位以外は、Pro 残基の占める割合が大きいアミノ酸配列から成る領域であり、それゆえ消化酵素に対して耐性を示しているものと考えられた。さらに、下部小腸で同定されたペプチドが比較的長い配列であることも、これらの配列が消化されづらく、長さを維持したまま小腸の末端側まで到達したものと推察された。但し、本試験では限られた数の仔ラットしか解析しておらず、また同時点における 2 個体の結果の間もばらつきが大きかった。想定されることとして、乳たんぱく質に由来するペプチドが消化される速度が速いため、本試験で設定したタイムポイントだけではその消化動態を十分に捉えることが出来なかった可能性がある。よって、より詳細な乳たんぱく質の消化動態を追う上では、より多くの時点での試料採取が必要なのかもしれない。

HM、sIF いずれかを投与された仔ラットの上部小腸において、投与 1.0 時間後の方が 0.5 時間後よりも β -CN に由来するペプチドが多く同定された。一方、HM 中の α -LA に由来するペプチドについては 0.5 時間後の方が多く同定され、また sIF 中の α -LA や β -LG については、このような経時的変化は認められなかった。これらの結果は、CN が胃内で凝集することによって胃排出速度が遅くなることを反映しているものと考えられ、同様の結果は、Boutrou らによる牛乳たんぱく質を摂取したヒト成人の空腸回収物の解析結果とも一致する [118]。一方で、本研究では β -CN に由来するペプチドの方が WP に由来するペプチドよりも分子量が大きい傾向であったのに対し、Boutrou らは逆の結果を報告していた。彼らはその結果について CN の方が WP よりも消化されやすいことに起因すると考察していて、これについては第 2 章の牛乳たんぱく質の人工消化試験の結果も支持するところである。本研究では 600 kDa 以下短いペプチド鎖をほとんど同定できなかったのに対し、Boutrou らの報告では 450-750 kD のペプチドを多く同定していたことから、本研究と Boutrou らの報告との間に認められた同定されたペプチドの分子量分布の違いは、ペプチドミクスの手法の違いに起因するものかもしれない。

本試験で同定された生理活性ペプチドの数は、第 4 章および第 5 章における *in vitro* での消化試験で同定されたものと比較して僅かであった。本研究で同定された多くの生理活性ペプチドについて、その生体内における役割は明らかにされていない。しかし、 β -CN 由来のオピオイドペプチドである β -カゾモルフィンと血圧降下ペプチドである HLPLP については、第 4 章および第 5 章においても同定されており、その消化管における吸収性や生体内における安定性、生体における機能性について数多く報告されており [104]、乳児の成長や健康に影響を及ぼしている可能性がある。 β -カゾモルフィンとそれを含んだ配列は、本研究では HM および sIF を投与した仔ラットの上部小腸において同定されており（HM: 48-58 位に含まれる配列で投与 1.0 時間後にて検出; sIF: 60-66 位に相当する配列で投与 0.5 および 1.0 時間後にて検出）、またこれまでも牛乳を摂取した成人の胃内容物や小腸内容物においてもその生成が確認されている [39, 118]。 β -CN 由来の血圧降下ペプチド HLPLP を含んだ配列もまた、本研究では HM および sIF を投与した仔ラットの上部小腸において同定されており（HM: 120-129 位に含まれる配列で投与 0.5 および 1.0 時間後にて検出; sIF: 128-138 に含まれる配列で投与 0.5 および 1.0 時間後にて検出）、また上述の牛乳を摂取した成人の胃内容物や小腸内容物においても確認されている [118]。さらに、他の研究報告との比較から言及すべきペプチドとして、ヒト β -CN の 105-117 位に由来する免疫調節ペプチド（投与 1.0 時間後に上部小腸にて検出）が挙げられる。同配列はこれまでも、母乳栄養児の胃内容物や（消化前の）母乳中に存在が確認されている [39, 96]。しかしながら、同配列の機能性はマウス由来の BALB/3T3 細胞を用いたアッセイでしか評価しておらず、またそのアッセイに用いたペプチド配列には 1 アミノ酸置換が含まれていた [102]。本試験で同定されたヒト β -CN の 105-117 位に由来するペプチドが同様の生理活性を持ち、そして生体内で生理学的役割を果たしているかどうかについては、さらなる検討が必要である。

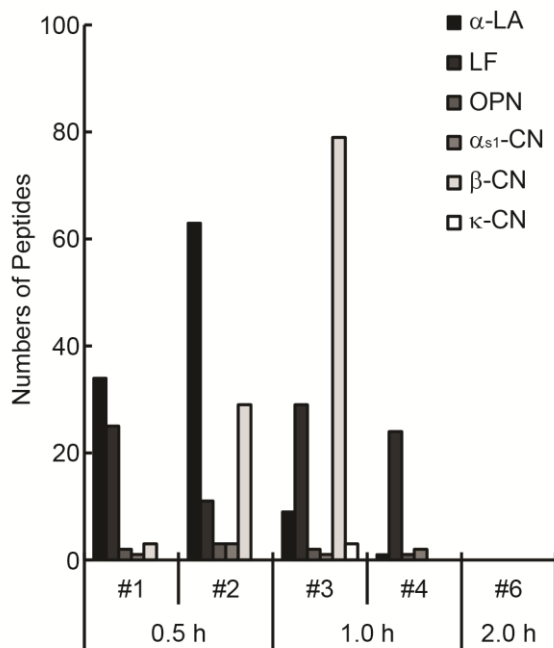
本研究で同定された HM 由来の 34 のペプチドと sIF 由来の 32 のペプチドには、これまで生理活

性があることが報告されていないものの、PeptideRanker によるスコアが 0.50 以上であり、何らかの生理活性があることが予測された [156]。6-3 で示した通り、PeptideRanker は生理活性ペプチドを含んだり生理活性ペプチドと配列が一部重複するペプチドについて予測するよりも、その配列自体が生理活性ペプチドであるものを予測することに適したサーバーのようである。よって、これらの配列の化学合成ペプチドを作製し、*in vitro* の系で生理活性を探索することは理にかなっていると考えられる。PeptideRanker の判定結果からはどのような生理活性を有しているかは予測できないものの、消化管発達の発達や未熟児に多く見受けられる消化管疾患の予防に寄与すると考えられる、オピオイドペプチドや DPP4 阻害活性をもった配列の探索を行うことが、小児栄養の観点から重要と考えており、今後の検討課題としたい。

6-5 小括

本研究では小規模ではあるが、母乳および育児用ミルク中の乳たんぱく質が生体内でどのように消化され、またどのような生理活性ペプチドを放出するかについて、乳児を模した仔ラットモデルを用いて示した。一部のペプチドの生成は乳たんぱく質中の特定の領域に集中しており、それらの領域が消化酵素に対する耐性を持った領域であることが考えられた。また、既知の生理活性ペプチドの形成が確認され、それらが乳児の成長や健康に関わっている可能性が考えられた。

(a) Upper Small Intestine of HM-fed Pups



(b) Lower Small Intestine of HM-fed Pups

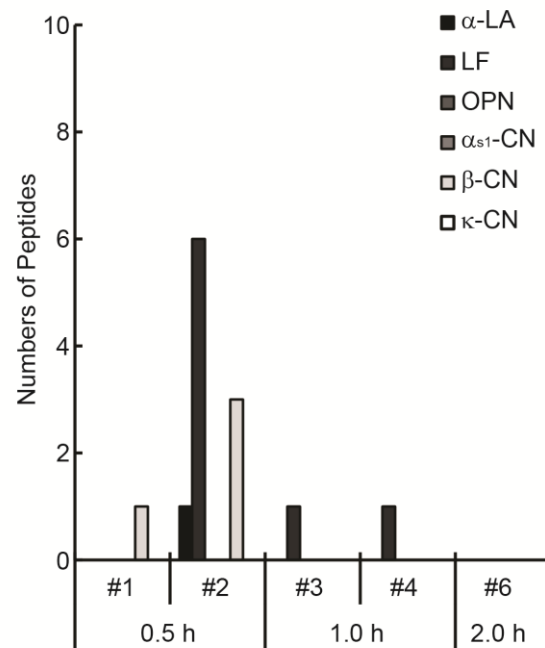
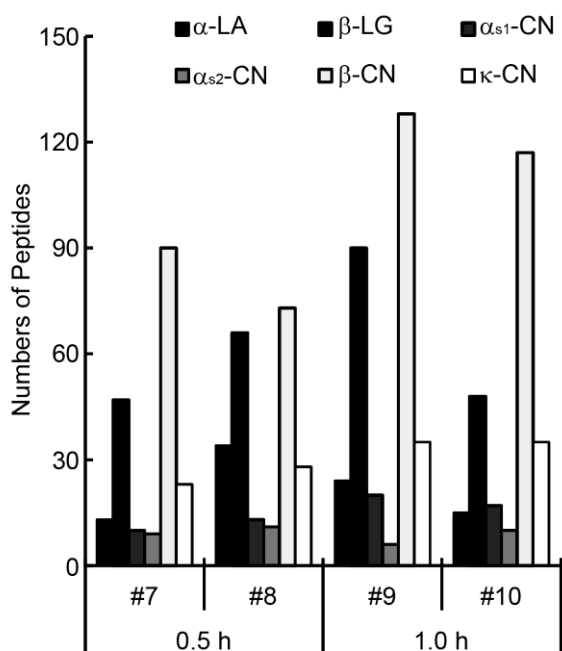


Figure 6-1 Numbers of peptides derived from human milk (HM) and standard infant formula (sIF) in the small intestine of suckling rat pups. Suckling rat pups were fed HM/sIF, digesta were obtained from the upper and lower small intestine, and peptides derived from major milk proteins were targeted (HM: a and b; IF: c and d). Two pups were assigned at 0.5 h or 1.0 h after intubation with HM/IF. Two pup were also assigned at 2.0 h after intubation with HM, but samples obtained from 1 pup (#5) could not be analyzed because of a laboratory error. Numbers of the peptides identified in individual animals are shown.

[Abbreviations] α-LA, α-lactalbumin; LF, lactoferrin; OPN, osteopontin; CN, casein; β-LG, β-lactoglobulin.

(c) Upper Small Intestine of sIF-fed Pups



(d) Lower Small Intestine of sIF-fed Pups

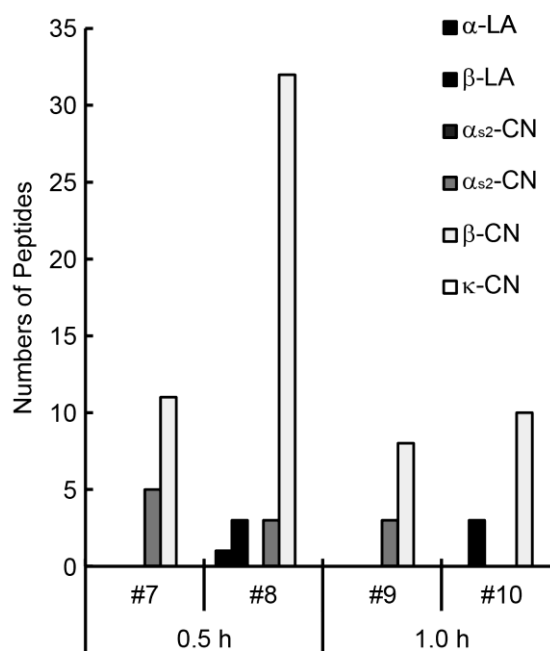


Figure 6-1, continued. Suckling rat pups were fed HM/sIF, digesta were obtained from the upper and lower small intestine, and peptides derived from major milk proteins were targeted (HM: a and b; IF: c and d). Two pups were assigned at 0.5 h or 1.0 h after intubation with HM/IF. Two pup were also assigned at 2.0 h after intubation with HM, but samples obtained from 1 pup (#5) could not be analyzed because of a laboratory error. Numbers of the peptides identified in individual animals are shown.

[Abbreviations] α-LA, α-lactalbumin; LF, lactoferrin; OPN, osteopontin; CN, casein; β-LG, β-lactoglobulin.

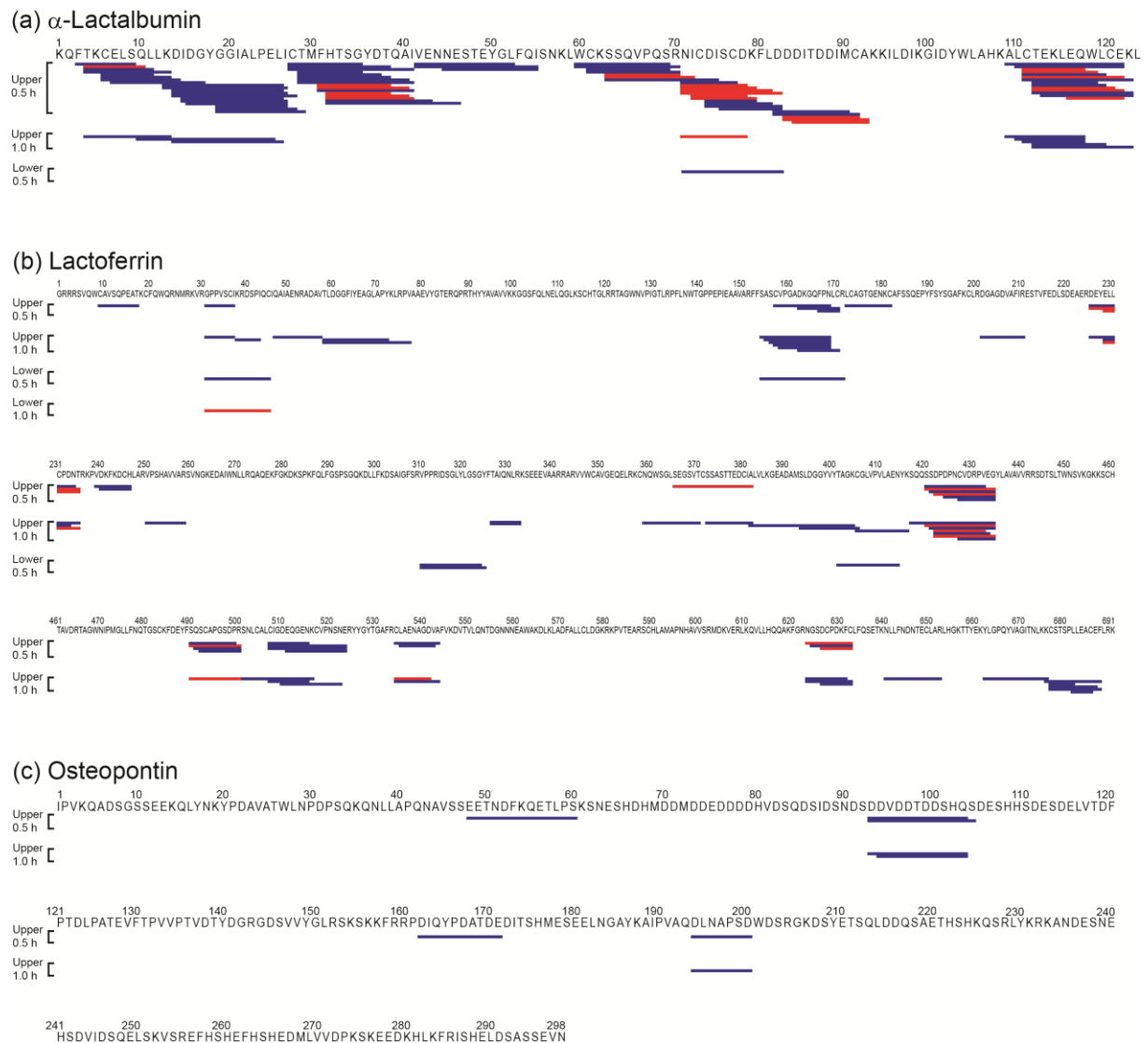
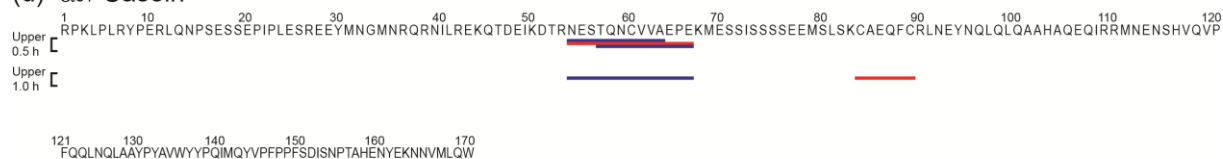
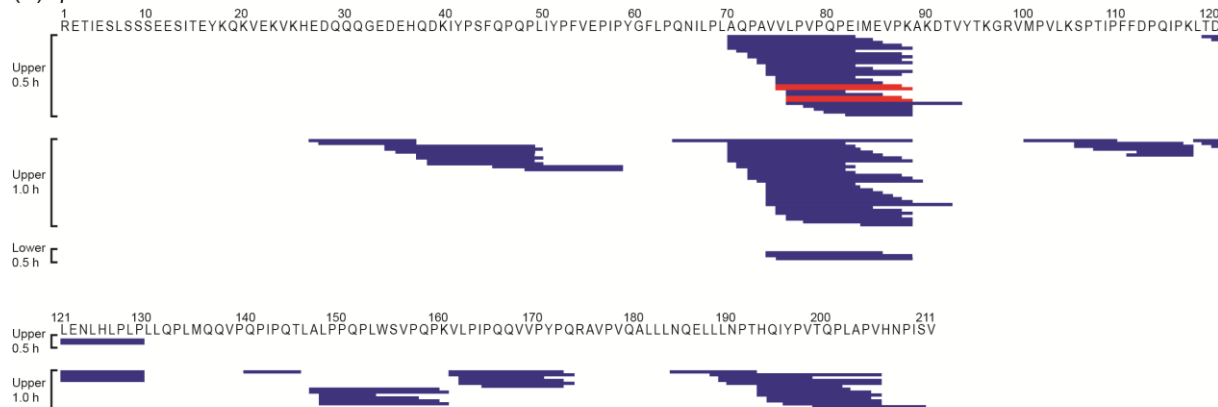


Figure 6-2 Diagrams of peptides derived from human milk (HM) in the small intestine of suckling rat pups. Peptides of HM-derived peptides were mapped along the entire sequences of parental proteins such as α -lactalbumin (a), lactoferrin (b), osteopontin (c), α_{s1} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f). Red and blue bars indicate peptides identified in both animals and only 1 animal, respectively.

(d) α_{s1} -Casein



(e) β -Casein



(f) κ -Casein



Figure 6-2, continued. Peptides of HM-derived peptides were mapped along the entire sequences of parental proteins such as α -lactalbumin (a), lactoferrin (b), osteopontin (c), α_{s1} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f). Red and blue bars indicate peptides identified in both animals and only 1 animal, respectively.

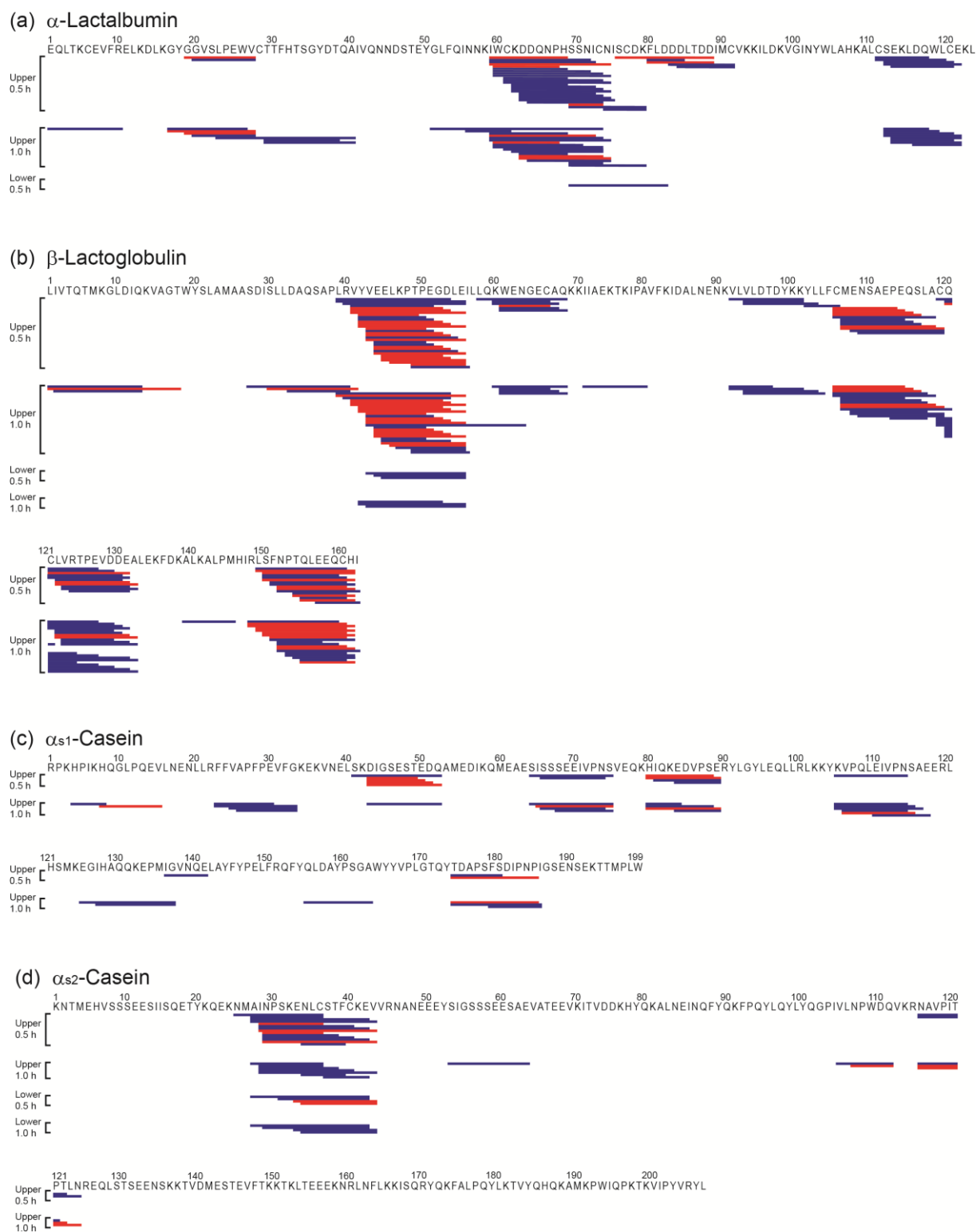
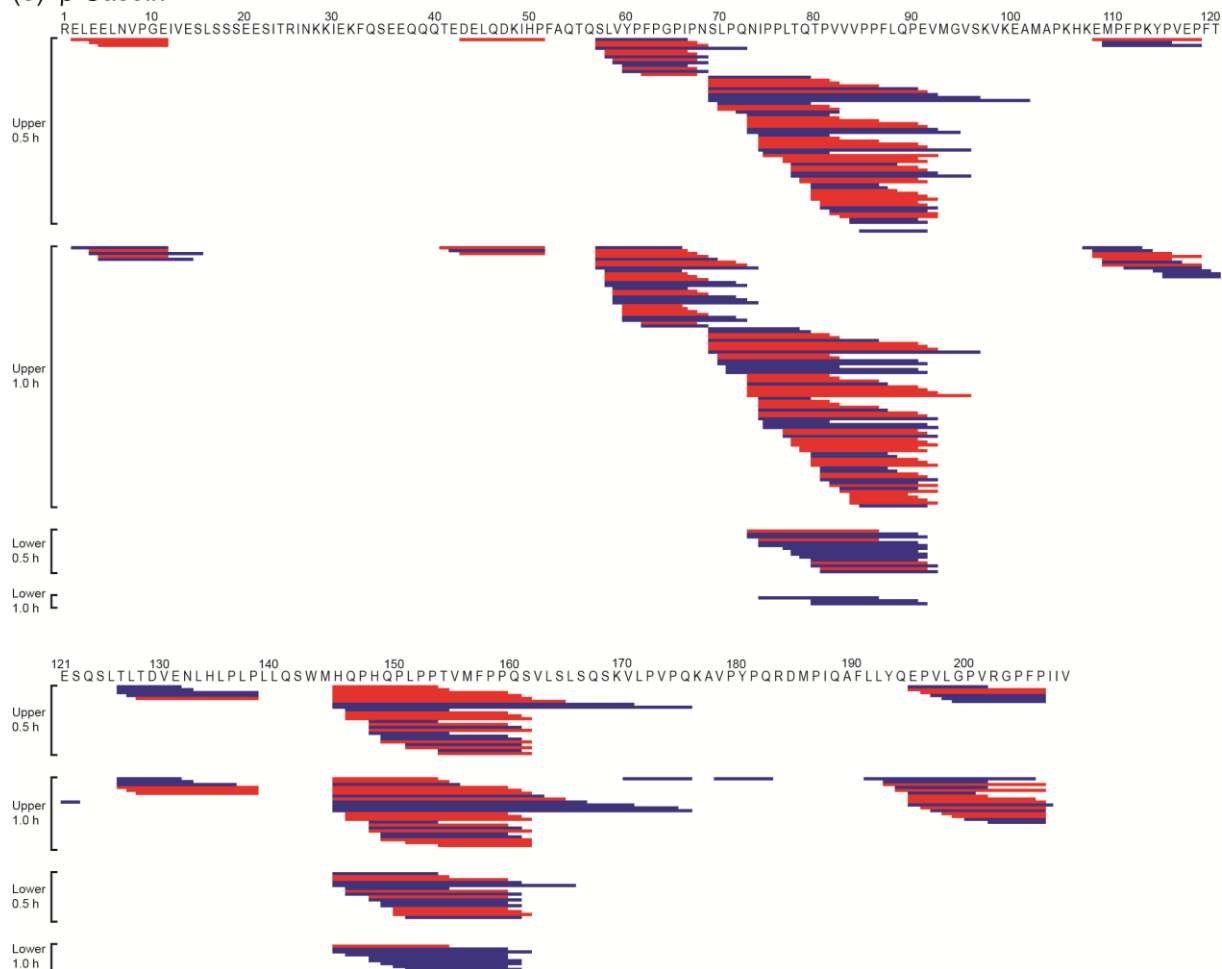


Figure 6-3 Diagrams of peptides derived from standard infant formula (sIF) in the small intestine of suckling rat pups. sIF-derived peptides were mapped along the entire sequences of parental proteins such as α -lactalbumin (a), β -lactoglobulin (b), α_{s1} -casein (c), α_{s2} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f). Red and blue bars indicate peptides identified in both animals and only 1 animal, respectively.

(e) β -Casein



(f) κ -Casein

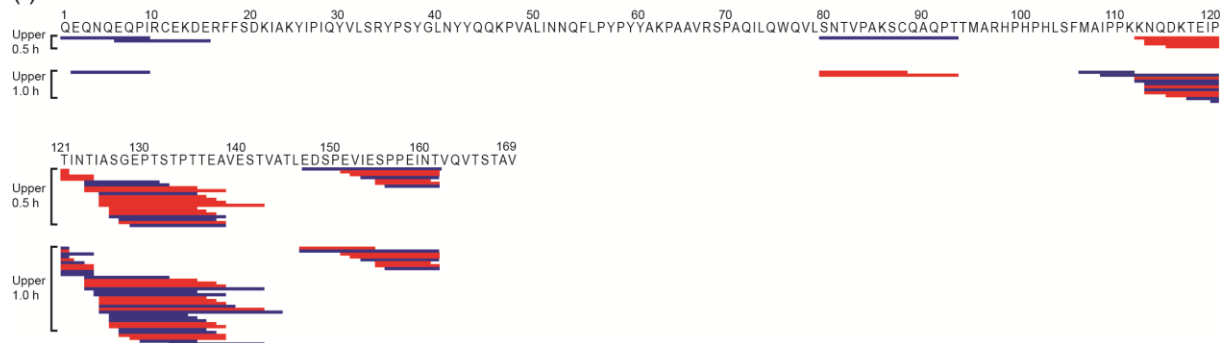
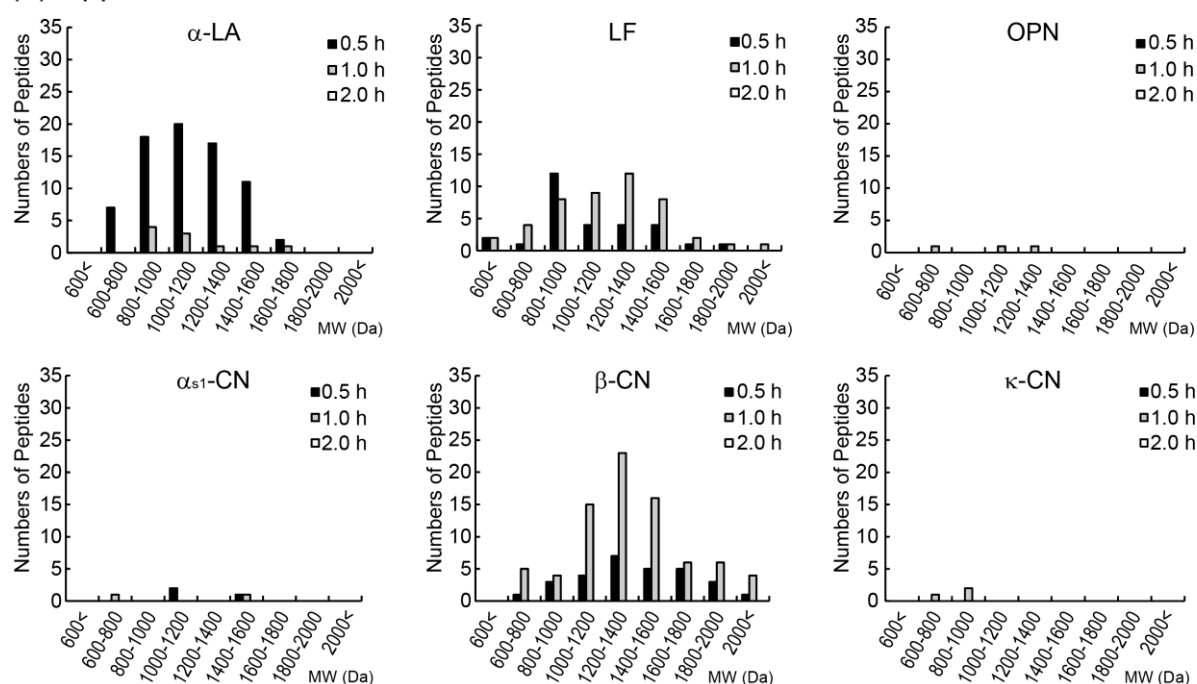


Figure 6-3, continued. sIF-derived peptides were mapped along the entire sequences of parental proteins such as α -lactalbumin (a), β -lactoglobulin (b), α_{s1} -casein (c), α_{s2} -casein (d), β -casein (e), and κ -casein (f). Red and blue bars indicate peptides identified in both animals and only 1 animal, respectively.

(a) Upper Small Intestine



(b) Lower Small Intestine

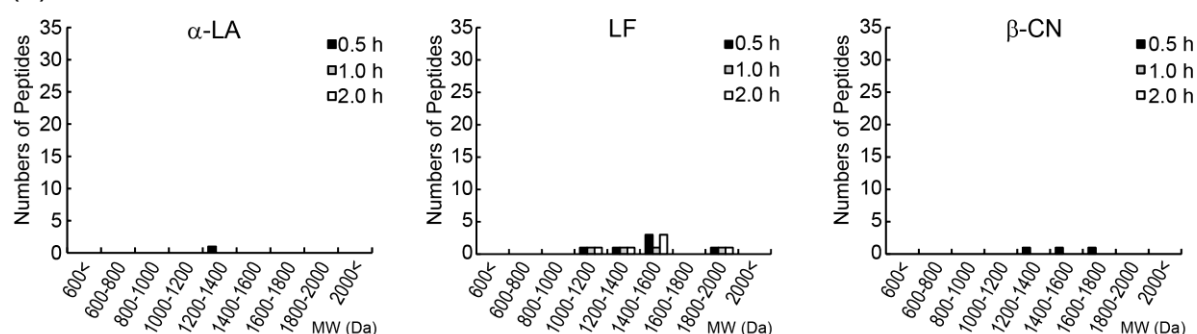
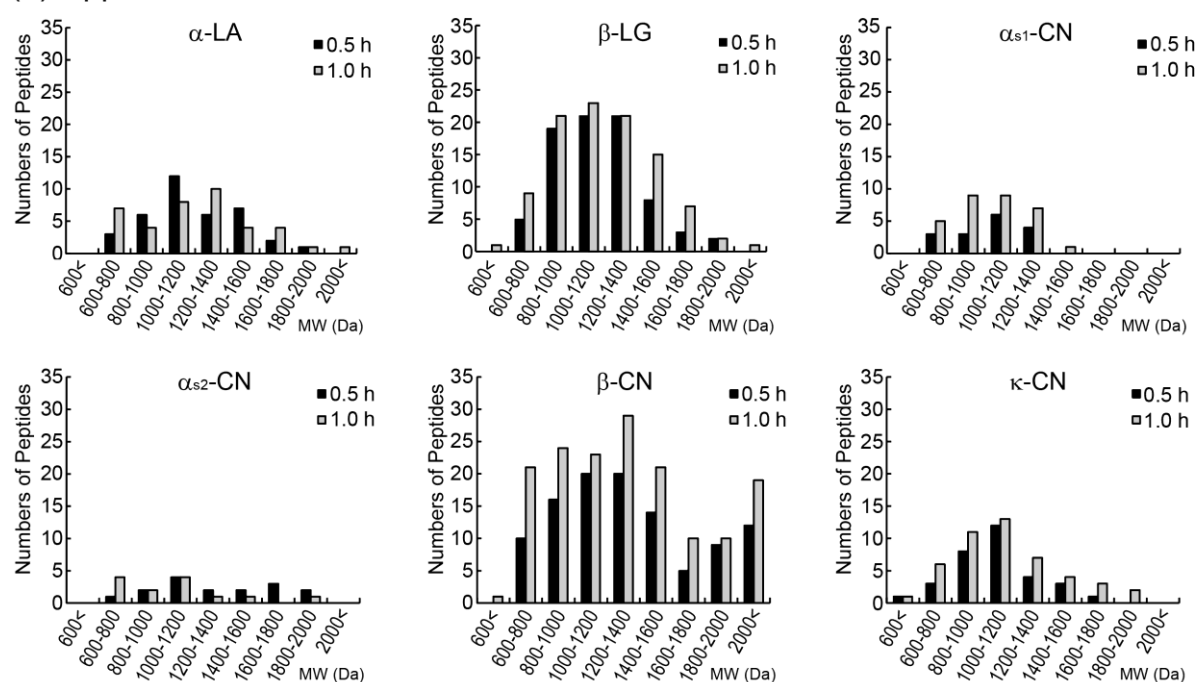


Figure 6-4 Molecular weight distributions of peptides derived from human milk (HM) in the small intestine of suckling rat pups. HM-derived peptides were classified according to their molecular weights, and numbers of peptides derived from major milk proteins in the upper (a) and lower (b) small intestine, are shown at respective time points. Peptides are counted in case they were identified in at least 1 animal.

[Abbreviations] α -LA, a-lactalbumin; LF, lactoferrin; OPN, osteopontin; CN, casein.

(a) Upper Small Intestine



(b) Lower Small Intestine

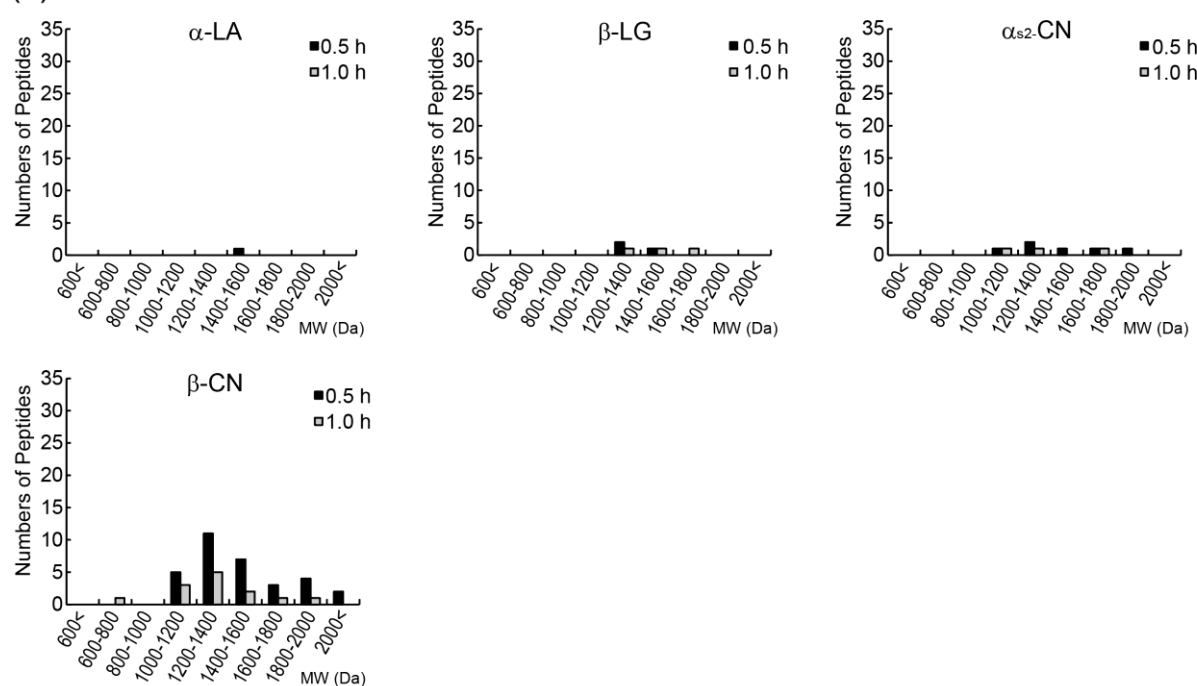


Figure 6-5 Molecular weight distributions of peptides derived from standard infant formula (sIF) in the small intestine of suckling rat pups. sIF-derived peptides were classified according to their molecular weights, and numbers of peptides derived from major milk proteins, identified in the upper (a) and lower (b) small intestine, are shown at respective time points. Peptides are counted in case they were identified in at least 1 animal.

[Abbreviations] α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 6-1 Human milk-derived bioactive peptides in the small intestine of suckling rat pups

Parental Protein	Residues	Sequence	Bioactivity	Peptide Ranker	Upper Intestine			Ref
					0.5 h	1.0 h	2.0 h	
α -LA	14-26	DIDGYGGIAL <u>PEL</u>	Immuno (18-20) AO (24-26)	0.39	Y	Y	N	[157] [142]
	44-55	NESTEY <u>GLFQI</u>	OP (50-53) Immuno (51-53)	0.10	Y	Y	N	[158] [159]
LF	31-45	<u>GPPV</u> SCIKRDSPIQC	AO (31-33) AT (38-41)	0.72	N	N	N	[160] [161]
	38-43	<u>KRDSPI</u>	AT (38-41)	0.22	N	Y	N	[161]
	58-77	TLDGGFIYEAGLAPYK <u>LRPV</u>	AH (72-77, etc)	0.50	N	Y	N	[162]
	310-324	<u>VPPRID</u> SGLYLGSY	AH (310-312) Immuno (317-319)	0.54	N	N	N	[163] [159]
β -CN	38-49	DKI <u>YPSF</u> QPQPL	OP (41-44)	0.63	N	Y	N	[164]
	48-58	<u>PLIYPFVEPIP</u>	PEPi (49-57, etc) AO (50-53) OP (51-55, etc)	0.56	N	Y	N	[99] [98] [100]
	64-88	QNIL <u>PLA</u> QPAVVLPVPQPEIMEVPK	DPP4i (67-69)	0.12	N	Y	N	[165]
	105-117	S <u>PTIPFFDPQIPK</u>	Immuno (105-117)	0.67	N	Y	N	[102]
	120-129	DLENL <u>HLPLP</u>	AH (125-129, etc) DPP4i (126-128)	0.45	Y	Y	N	[104] [165]
	148-160	<u>LPPQPLWSVPQPK</u>	AO (154-160)	0.81	N	Y	N	[98]
	161-173	<u>VLPIPQQVVPYPQ</u>	AO (167-173, etc)	0.23	N	Y	N	[98] [107]
	169-173	<u>VPYPQ</u>	AO (169-173, etc)	0.42	N	Y	N	[107]
	193-204	<u>HQIYPVTQPLAP</u>	AO (193-198)	0.24	N	Y	N	[98]
κ -CN	52-58	<u>NNPYVPR</u>	AO (53-58)	0.59	N	Y	N	[107]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. In case a known bioactive peptide is included/overlapped by several sequences, only one is represented. Among ACE-inhibitory peptides, peptides that showed antihypertensive effects *in vivo* are selected. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides. Bold letters indicate that the entire sequence matches that of a bioactive peptide. The letter highlighted in gray (**S**) was reported for an amino acid substitution (to Q) in Ref. 102.

[Abbreviations] Immuno, immuno-regulatory; AO, anti-oxidative; OP, opioid; AT, anti-thrombotic; AH, antihypertensive; DPP4i, dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory; PEPi, prolyl-endopeptidase-inhibitory; α -LA, α -lactalbumin; LF, lactoferrin; CN, casein.

Table 6-1, continued

Parental Protein	Residues	Sequence ^b	Bioactivity ^c	Peptide Ranker	Lower Intestine			Ref
					0.5 h	1.0 h	2.0 h	
α -LA	14-26	DIDGYGGIALPEL	Immuno (18-20) AO (24-26)	0.39	N	N	N	[157] [142]
	44-55	NESTEYGLFQI	OP (50-53) Immuno (51-53)	0.10	N	N	N	[158] [159]
LF	31-45	GPPVSCIKRDSPIQC	AO (31-33) AT (38-41)	0.72	Y	Y	N	[160] [161]
	38-43	KRDSPI	AT (38-41)	0.22	N	N	N	[161]
	58-77	TLDGGFIYEAGLAPYKLRPV	AH (72-77, etc)	0.50	N	N	N	[162]
	310-324	VPPRIDSGLYLGSGY	AH (310-312) Immuno (317-319)	0.54	Y	N	N	[163] [159]
β -CN	37-49	DKIYPSEFQPQPL	OP (41-44)	0.63	N	N	N	[164]
	48-58	PLIYPFVEPIP	PEPi (49-57, etc) AO (50-53) OP (51-55, etc)	0.56	N	N	N	[99] [98] [100]
	64-88	QNILPLAQPAVVLPVPQPEIMEVPK	DPP4i (67-69)	0.12	N	N	N	[165]
	105-117	SPTIPFFDPQIPK	Immuno (105-117)	0.67	N	N	N	[102]
	120-129	DLENLHLPLP	AH (125-129, etc) DPP4i (126-128)	0.45	N	N	N	[104] [165]
	148-160	LPPQPLWSVPQPK	AO (154-160)	0.81	N	N	N	[98]
	161-173	VLPIPQQVVPYPQ	AO (167-173, etc)	0.23	N	N	N	[98] [107]
	169-173	VPYPQ	AO (169-173, etc)	0.42	N	N	N	[107]
	193-204	HQIYPVTQPLAP	AO (193-198)	0.24	N	N	N	[98]
κ -CN	52-58	NNPYVPR	AO (53-58)	0.59	N	N	N	[107]

Table 6-2 Standard infant formula-derived bioactive peptides in the small intestine of suckling rat pups

Parental Protein	Residues	Sequence	Bioactivity	Peptide Ranker	Upper Intestine		Ref
					0.5 h	1.0 h	
α -LA	1-10	<u>E</u> QLTKCEVFR	AB (1-5)	0.18	N	Y	[122]
	17-24	<u>G</u> YGGVSLP	Immuno (18-20)	0.36	N	Y	[157]
	51-73	<u>G</u> LEQINNKIWCKDDQNPSSNIC	Immuno (51-53)	0.39	N	Y	[159]
	60-73	<u>W</u> CKDDQNPSSNIC	DPP4i (60-69) AB (61-68/75-80)	0.65	Y	Y	[166] [122]
	61-68	CKDDQNP <u>H</u>	AB (61-68/75-80)	0.29	Y	N	[122]
	69-82	SSNICN <u>I</u> SCDKFLD	AB (61-68/75-80)	0.63	N	N	[122]
β -LG	27-40	<u>S</u> DISLLDAQSAPLR	AB (25-40)	0.53	N	Y	[123]
	42-49	YVEEL <u>K</u> PT	Analgesic (47-49)	0.08	Y	N	[167]
	45-55	<u>E</u> LKPTPEGDL <u>E</u>	DPP4i (46-54)	0.18	Y	Y	[168]
	71-80	<u>I</u> IAEKTKIPA	HC (71-75)	0.11	N	Y	[135]
	92-101	VLVLDTDYKK	AB (92-100, 101) DPP4i (92-100)	0.11	Y	Y	[123] [124]
	102-106	<u>Y</u> LLFC	OP (102-105)	0.89	Y	N	[125]
α_{s1} -CN	65-75	<u>I</u> SSSEEIVPNS	Vasoactive (66-68)	0.11	N	Y	[169]
α_{s2} -CN	53-63	<u>S</u> IGSSSEESAE	Vasoactive (56-58)	0.07	N	Y	[169]
	115-124	<u>N</u> AVPITPTLN	DPP4i (117-123,etc)	0.25	Y	Y	[170]
β -CN	59-66	VYFPGP I	AH (59-61, 64) PEPi (59-66, 67) OP (60-67, etc.) Immuno (63-65)	0.85	Y	Y	[171] [105] [131] [172]
	60-66	YFPGP I	OP (60-66, etc.) Immuno (63-65)	0.92	Y	Y	[131] [172]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. In case a known bioactive peptide is included/overlapped by several sequences, only one is represented. Among ACE-inhibitory peptides, peptides that showed antihypertensive effects *in vivo* are selected. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides.

[Abbreviations]

AB, antibacterial; Immuno, immuno-regulatory; DPP4i, dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory; HC, hypocholesterolemic; OP, opioid; AH, antihypertensive; PEPi, prolyl-endorphin-inhibitory; AT, anti-thrombotic; α -LA, α -lactalbumin; β -LG, β -lactoglobulin; CN, casein.

Table 6-2, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Bioactivity	Peptide Ranker	Lower Intestine		Ref
					0.5 h	1.0 h	
α -LA	1-10	<u>E</u> QLT <u>K</u> CEVFR	AB (1-5)	0.18	N	N	[122]
	17-24	G <u>Y</u> G <u>G</u> VSLP	Immuno (18-20)	0.36	N	N	[157]
	51-73	GLEQINNKIWCKDDQNPHSSNIC	Immuno (51-53)	0.39	N	N	[159]
	60-73	WCKDDQNPHSSNIC	DPP4i (60-69) AB (61-68/75-80)	0.65	N	N	[166] [122]
	61-68	CKDDQNPH	AB (61-68/75-80)	0.29	N	N	[122]
	69-82	SSNICN <u>I</u> SCDKFLD	AB (61-68/75-80)	0.63	Y	N	[122]
β -LG	27-40	<u>S</u> DISLLDAQSAPLR	AB (25-40)	0.53	N	N	[123]
	42-49	YVEEL <u>K</u> PT	Analgesic (47-49)	0.08	N	N	[167]
	45-55	<u>E</u> LKPTPEGDL <u>E</u>	DPP4i (46-54)	0.18	Y	N	[168]
	71-80	<u>I</u> IAEKTKIPA	HC (71-75)	0.11	N	N	[135]
	92-101	VLVLDTDYKK	AB (92-100, 101) DPP4i (92-100)	0.11	N	N	[123] [124]
	102-106	<u>Y</u> LLFC	OP (102-105)	0.89	N	N	[125]
α_{s1} -CN	65-75	<u>I</u> SS <u>S</u> EEIVPNS	Vasoactive (66-68)	0.11	N	N	[169]
α_{s2} -CN	53-63	SIG <u>S</u> SS <u>E</u> ESAE	Vasoactive (56-58)	0.07	N	N	[169]
	115-124	NAV <u>P</u> ITPTLN	DPP4i (117-123, etc.)	0.25	N	N	[170]
β -CN	59-66	VYFPGP I	AH (59-61, 64) PEPi (59-66, 67) OP (60-67, etc.) Immuno (63-65)	0.85	N	N	[171] [105] [131] [172]
	60-66	YFPGP I	OP (60-66, etc.) Immuno (63-65)	0.92	N	N	[131] [172]

Table 6-2, continued

Parental Protein	Residues	Sequence ^b	Bioactivity ^c	Peptide Ranker	Upper Intestine		Ref
					0.5 h	1.0 h	
β-CN	60-68	YFPGPIPN	AH (60-68) OP (60-67, etc.) DPPi (60-68, etc) Immuno (63- 68, etc)	0.82	Y	Y	[132] [131] [170] [131] [172]
	62-68	FPGPIPN	DPPi (62-68) Immuno (63- 68, etc)	0.89	N	Y	[170] [131] [172]
	69-79	<u>SLPQNIPPL</u> TQ	DPP4i (70-77, etc) AH (74-76)	0.42	Y	Y	[170] [163]
	82-90	<u>VVVPPFL</u> QP	Immuno (82-84) AH (84-86)	0.43	N	Y	[173] [163]
	128-138	TDVEN <u>LHLPL</u> P	AH (133-138, etc.) DPP4i (135-137)	0.24	Y	Y	[107] [165]
	145-175	HQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQS <u>KVLPVPQ</u>	AH (169-175)	0.05	Y	Y	[174]
	178-182	VPYPQ	AO (178-182)	0.42	N	Y	[166]
	191-205	<u>LLYQEPVLGPVRGPF</u>	Immuno (191-193, etc.) AO (193-196, etc.) AB (193-207) DPP4i (197-200)	0.56	N	Y	[145] [146] [134] [149] [175]
κ-CN	106-111	MAIPPK	AT (106-111)	0.59	N	Y	[120]
	112-121	<u>KNQDKTEIPT</u>	AT (112-116) AB (118-121)	0.09	Y	Y	[120] [148]

Sequences for known bioactive peptides, or that include and/or largely overlap (> 75% of coverage) known bioactive peptides are selected. In case a known bioactive peptide is included/overlapped by several sequences, only one is represented. Among ACE-inhibitory peptides, peptides that showed antihypertensive effects *in vivo* are selected. Letters underlined indicate sequences of known bioactive peptides.

[Abbreviations] AB, antibacterial; Immuno, immuno-regulatory; DPP4i, dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory; HC, hypocholesterolemic; OP, opioid; AH, antihypertensive; PEPi, prolyl-endoropeptidase-inhibitory; AT, anti-thrombotic; α-LA, α-lactalbumin; β-LG, β-lactoglobulin; CN, casein.

Table 6-2, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Bioactivity	Peptide Ranker	Lower Intestine		Ref
					0.5 h	1.0 h	
β -CN	60-68	YFPGPIPN	AH (60-68) OP (60-67, etc.) DPPi (60-68, etc) Immuno (63- 68, etc)	0.82	N	N	[132] [131] [170] [131] [172]
	62-68	FPGPIPN	DPPi (62-68) Immuno (63-65),	0.89	N	N	[170] [131] [172]
	69-79	<u>SLPQNIPPLTQ</u>	DPP4i (70-77, etc) AH (74-76)	0.42	N	N	[170] [163]
	82-90	<u>VVVPPFLQP</u>	Immuno (82-84) AH (84-86)	0.43	N	N	[173] [163]
	128-138	<u>TDVENLHLPLP</u>	AH (133-138, etc.) DPP4i (135-137)	0.24	N	N	[107] [165]
	145-175	HQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQS <u>KVLPVPQ</u>	AH (169-175)	0.05	N	N	[174]
	178-182	VPYPQ	AO (178-182)	0.42	N	N	[166]
	191-205	<u>LLYQEPVLGPVRGPF</u>	Immuno (191-193, etc) AO (193-196, etc) AB (193-207) DPP4i (197-200)	0.56	N	N	[145] [146] [134] [149] [175]
κ -CN	106-111	MAIPPK	AT (106-111)	0.59	N	N	[120]
	112-121	<u>KNQDKTEIPT</u>	AT (112-116) AB (118-121)	0.09	N	N	[120] [148]

Table 6-3 Human milk-derived peptides in the small intestine of suckling rat pups with PeptideRanker Scores ≥ 0.50

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Upper Intestine		
				0.5 h	1 h	2 h
α -LA	76-81	SCDKFL	0.66	N	Y	N
	76-82	SCDKFLD	0.66	Y	N	N
	83-91	DDITDDIMC	0.50	Y	N	N
	109-121	ALCTEKLQWLCE	0.52	N	Y	N
LF	31-36	GPPVSC	0.57	Y	Y	N
	154-168	SASCVPGADKGQFPN	0.66	N	Y	N
	154-171	SASCVPGADKGQFPNLCR	0.85	N	N	N
	155-168	ASCVPGADKGQFPN	0.63	N	Y	N
	156-168	SCVPGADKGQFPN	0.64	N	Y	N
	157-168	CVPGADKGQFPN	0.62	Y	Y	N
	158-168	VPGADKGQFPN	0.52	N	Y	N
	162-170	DKGQFPNLC	0.79	Y	Y	N
	166-170	FPNLC	0.93	Y	N	N
	201-210	DGAGDVAFIR	0.64	N	Y	N
	420-432	SSDPDPNCVDRPV	0.65	N	Y	N
	420-434	SSDPDPNCVDRPVEG	0.53	Y	Y	N
	421-434	SDPDPNCVDRPVEG	0.50	Y	Y	N
	422-432	DPDPNCVDRPV	0.55	N	Y	N
	490-500	SQSCAPGSDPR	0.58	Y	Y	N
	491-500	QSCAPGSDPR	0.60	Y	N	N
	492-500	SCAPGSDPR	0.68	Y	N	N
	623-631	NGSDCPDKF	0.78	N	Y	N
	623-632	NGSDCPDKFC	0.84	Y	Y	N
	624-632	GSDCPDKFC	0.91	Y	N	N
	626-632	DCPDKFC	0.92	Y	Y	N
	676-688	KCSTSPLLEACEF	0.57	N	Y	N
	677-682	CSTSPL	0.53	N	Y	N
	677-688	CSTSPLLEACEF	0.64	N	Y	N

Peptides that are not relevant to known bioactive peptides are selected.

Table 6-3, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Lower Intestine		
				0.5 h	1 h	2 h
α -LA	76-81	SCDKFL	0.66	N	N	N
	76-82	SCDKFLD	0.66	N	N	N
	83-91	DDITDDIMC	0.50	N	N	N
	109-121	ALCTEKLEQWLCE	0.52	N	N	N
LF	31-36	GPPVSC	0.57	N	N	N
	154-168	SASCVPGADKGQFPN	0.66	N	N	N
	154-171	SASCVPGADKGQFPNLCR	0.85	Y	N	N
	155-168	ASCVPGADKGQFPN	0.63	N	N	N
	156-168	SCVPGADKGQFPN	0.64	N	N	N
	157-168	CVPGADKGQFPN	0.62	N	N	N
	158-168	VPADKGQFPN	0.52	N	N	N
	162-170	DKGQFPNLC	0.79	N	N	N
	166-170	FPNLC	0.93	N	N	N
	201-210	DGAGDVAFIR	0.64	N	N	N
	420-432	SSDPDPNCVDRPV	0.65	N	N	N
	420-434	SSDPDPNCVDRPVEG	0.53	N	N	N
	421-434	SDPDPNCVDRPVEG	0.50	N	N	N
	422-432	DPDPNCVDRPV	0.55	N	N	N
	490-500	SQSCAPGSDPR	0.58	N	N	N
	491-500	QSCAPGSDPR	0.60	N	N	N
	492-500	SCAPGSDPR	0.68	N	N	N
	623-631	NGSDCPDKF	0.78	N	N	N
	623-632	NGSDCPDKFC	0.84	N	N	N
	624-632	GSDCPDKFC	0.91	N	N	N
	626-632	DCPDKFC	0.92	N	N	N
	676-688	KCSTSPILLEACEF	0.57	N	N	N
	677-682	CSTSPIL	0.53	N	N	N
	677-688	CSTSPILLEACEF	0.64	N	N	N

Table 6-3, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Upper Intestine		
				0.5 h	1 h	2 h
α_{s1} -CN	84-89	CAEQFC	0.67	N	Y	N
	144-156	VPFPPFSDISNPT	0.55	N	Y	N
β -CN	111-117	FDPQIPK	0.74	N	Y	N
κ -CN	79-85	LPNSHPP	0.52	N	Y	N

Peptides that are not relevant to known bioactive peptides are selected.

Table 6-3, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Lower Intestine		
				0.5 h	1 h	2 h
α_{s1} -CN	84-89	CAEQFC	0.67	N	N	N
	144-156	VPFPPFSDISNPT	0.55	N	N	N
β -CN	111-117	FDPQIPK	0.74	N	N	N
κ -CN	79-85	LPNSHPP	0.52	N	N	N

Table 6-4 Standard infant formula-derived peptides in the small intestine of suckling rat pups with PeptideRanker Scores ≥ 0.50

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Upper Intestine	
				0.5 h	1 h
α -LA	19-27	GGVSLPEWV	0.60	Y	Y
	56-61	NNKIWC	0.73	N	Y
	63-75	DDQNPSSNICNI	0.50	Y	N
	84-91	DLTDDIMC	0.53	Y	Y
	111-119	CSEKLDQWL	0.59	Y	N
	112-120	SEKLDQWLC	0.66	Y	Y
	113-120	EKLDQWLC	0.59	Y	Y
	116-121	DQWLCE	0.63	N	Y
β -LG	33-40	DAQSAPLR	0.59	N	Y
	94-106	VLDTDYKKYLLFC	0.58	N	Y
	119-124	CQCLVR	0.55	N	Y
α_{S1} -CN	26-33	APFPEVFG	0.86	N	Y
	178-186	FSDIPNPI	0.69	N	Y
α_{S2} -CN	27-42	AINPSKENLCSTFCKE	0.67	Y	N
	27-43	AINPSKENLCSTFCKEV	0.66	Y	N
	28-40	INPSKENLCSTFC	0.75	Y	Y
	28-42	INPSKENLCSTFCKE	0.64	Y	N
	28-43	INPSKENLCSTFCKEV	0.62	Y	Y
	29-40	NPSKENLCSTFC	0.72	Y	N
	29-42	NPSKENLCSTFCKE	0.61	Y	N
	29-43	NPSKENLCSTFCKEV	0.58	Y	N
	31-42	SKENLCSTFCKE	0.53	N	N
	34-40	NLCSTFC	0.74	Y	Y
β -CN	107-111	NPWDQ	0.68	N	Y
	85-91	PPFLQPE	0.67	Y	Y
	107-112	KEMPPFP	0.81	N	Y
	108-113	EMPPFK	0.77	N	Y
	108-115	EMPPFKYP	0.73	N	Y
	109-115	MPFPKYP	0.88	Y	Y

Peptides that are not relevant to known bioactive peptides are selected.

Table 6-4, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Lower Intestine	
				0.5 h	1 h
α -LA	19-27	GGVSLPEWV	0.60	N	N
	56-61	NNKIWC	0.73	N	N
	63-75	DDQNPSSNICNI	0.50	N	N
	84-91	DLTDDIMC	0.53	N	Y
	111-119	CSEKLDQWL	0.59	N	N
	112-120	SEKLDQWLC	0.66	N	N
	113-120	EKLDQWLC	0.59	N	N
	116-121	DQWLCE	0.63	N	N
β -LG	33-40	DAQSAPLR	0.59	N	N
	94-106	VLDTDYKKYLLFC	0.58	N	N
	119-124	CQCLVR	0.55	N	N
α_{S1} -CN	26-33	APFPEVFG	0.86	N	N
	178-186	FSDIPNPI	0.69	N	N
α_{S2} -CN	27-42	AINPSKENLCSTFCKE	0.67	Y	Y
	27-43	AINPSKENLCSTFCKEV	0.66	N	N
	28-40	INPSKENLCSTFC	0.75	N	N
	28-42	INPSKENLCSTFCKE	0.64	N	N
	28-43	INPSKENLCSTFCKEV	0.62	N	N
	29-40	NPSKENLCSTFC	0.72	N	N
	29-42	NPSKENLCSTFCKE	0.61	Y	N
	29-43	NPSKENLCSTFCKEV	0.58	N	N
	31-42	SKENLCSTFCKE	0.53	Y	N
	34-40	NLCSTFC	0.74	N	N
β -CN	107-111	NPWDQ	0.68	Y	Y
	85-91	PPFLQPE	0.67	N	N
	107-112	KEMFPF	0.81	N	N
	108-113	EMPFPK	0.77	N	N
	108-115	EMPFPKYP	0.73	N	N
	109-115	MPFPKYP	0.88	N	N

Table 6-4, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Upper Intestine	
				0.5 h	1 h
β -CN	109-116	MPFPKYPV	0.75	N	Y
	109-118	MPFPKYPVEP	0.53	Y	Y
	111-118	FPKYPVEP	0.52	N	Y
	200-206	PVRGPFP	0.84	N	Y
	202-206	RGFPF	0.96	N	Y

Peptides that are not relevant to known bioactive peptides are selected.

Table 6-4, continued

Parental Protein	Residues	Sequence	Peptide Ranker	Lower Intestine	
				0.5 h	1 h
β -CN	109-116	MPFPKYPV	0.75	N	N
	109-118	MPFPKYPVEP	0.53	N	N
	111-118	FPKYPVEP	0.52	N	N
	200-206	PVRGPFP	0.84	N	N
	202-206	RGFPF	0.96	N	N

第7章 総括

7-1 緒言

母乳は乳児が摂取する最も適した栄養源である。育児用ミルクは乳児にとっての母乳代替であり、また経腸栄養剤は病者・弱者にとっての通常の食事の代替となる。育児用ミルク・経腸栄養剤では、たんぱく質源として牛乳由来の乳たんぱく質が広く用いられている。一方、(ヒト)母乳中のたんぱく質と牛乳中のたんぱく質との間には、アミノ酸配列にかなりの相動性が認められるものの、そのたんぱく質の組成比だけでなく、消化性も大きく異なる。また、育児用ミルクや経腸栄養剤の製造工程における加熱殺菌工程は、たんぱく質の消化性に影響を及ぼす。よって、これらの製品を「たんぱく質」の観点から栄養学的・生理学的に改良する余地は大いにある。

本研究では、乳たんぱく質の「消化性」と「消化を介した生理活性ペプチド」に着目し、牛乳の加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響(第2章)、経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響(第3章)、母乳中のたんぱく質から消化を介して放出される生理活性ペプチドのパターン(第4章および第6章)、および育児用ミルク中のたんぱく質から消化を介して放出される生理活性ペプチドのパターン(第5章および第6章)について、検討を行った。以下に得られた結果を要約し、総括する。

7-2 牛乳の加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響

加熱殺菌工程の違いが、乳たんぱく質の構造と消化性にどのように異なる影響を及ぼすかについて、まず、工業的な熱処理を受けていない生乳が加熱処理されて製造される牛乳について、検討を行った。生乳を牛乳の加熱殺菌法で用いられるプレート式HTST殺菌処理、プレート式UHT殺菌処理およびスチーム・インフュージョン UHT 殺菌処理と、経腸栄養剤の加熱殺菌法として用いられているスチーム・インジェクション UHT 殺菌処理およびレトルト殺菌処理に供したものについて、以下の結果を得た。

- 1) 牛乳試料をたんぱく質電気泳動に供した結果、牛乳中の主要たんぱく質である α -LA、 β -LG および CN に由来するバンドは、レトルト殺菌牛乳において薄く検出され、一方でスミア状のバンドが分子量の広い範囲にわたって認められた。程度は小さいものの、同様の傾向が3種類のUHT殺菌牛乳においても認められた。
- 2) プロテオミクス解析の結果、メイラード反応産物であるLLおよびCMLのシグナル値は、主要たんぱく質中の同定されたほとんどの修飾部位において、レトルト殺菌牛乳で最も高く、次いで3種類のUHT殺菌牛乳においても高かった。
- 3) 牛乳試料を *in vitro/vivo* 消化して得た消化物をたんぱく質電気泳動に供したところ、レトルト殺菌処理やUHT殺菌処理により、乳たんぱく質、特に β -LGの消化性が向上することが確認された。

またレトルト殺菌処理の方が UHT 殺菌処理よりも乳たんぱく質の消化性を改善する効果が大きかった。

- 4) 一方、*in vitro* 消化試験によって得た消化物について、TCA 沈殿法とケルダール法を用いて算出したたんぱく質消化率については、試料間における有意な差はほとんど認められなかった。

これまで加熱殺菌工程が乳たんぱく質の消化性に及ぼす影響については、ポジティブな結果とネガティブな結果が混在して報告されていたが、以上の結果から、牛乳の加工工程における加熱殺菌処理は、乳たんぱく質の消化性に影響を及ぼさないか（プレート式 HTST 殺菌法）、消化性を改善する（UHT 殺菌法・レトルト殺菌法）ことを示すことが出来た。その機序として、熱変性によって乳たんぱく質の立体構造が壊れ、消化酵素による作用を受けやすくなることが考えられた。一方、強い加熱殺菌処理に伴い、乳たんぱく質中に LL や CML といったメイラード反応産物による修飾が進み、消化性の改善が一部相殺されている可能性が考えられた。

7-3 乳たんぱく質ベースの経腸栄養剤の製造における加熱殺菌方法の違いが乳たんぱく質の修飾構造とその消化性に及ぼす影響

加熱殺菌工程の違いが、乳たんぱく質の構造と消化性にどのように異なる影響を及ぼすかについて、次に、既に工業的な熱処理を受けている乳たんぱく質原料を加熱殺菌工程に供して製造される乳製品について、検討を行った。乳原料として脱脂粉乳およびカゼインナトリウムを用いて経腸栄養剤を調合し、それをスチーム・インジェクション UHT 殺菌処理およびレトルト殺菌処理に供したもののについて、以下の結果を得た。

- 1) 2 種類の経腸栄養剤および加熱処理をしていない調合液を SDS-PAGE に供したところ、全ての試料においてスミア状のバンドが認められ、特にレトルト殺菌処理した栄養剤において顕著であった。また、レトルト殺菌処理した栄養剤においては、スミア状のバンドが分子量の広い範囲にわたって認められた。またレトルト殺菌栄養剤では、加熱処理していない調合液やスチーム・インジェクション殺菌栄養剤と比較して、主要な乳たんぱく質である α -LA、 β -LG および CN に相当するバンドが薄くなっていた。
- 2) プロテオミクス解析の結果、主要たんぱく質中の同定されたほとんどの修飾部位において、CML のシグナル値はレトルト殺菌栄養剤の方がスチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤よりも高かった。また、レトルト殺菌栄養剤中の CN の方がスチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤よりも、脱リン酸化反応が進行している傾向であった。
- 3) 経腸栄養剤を *in vitro/vivo* 消化して得た消化物をたんぱく質電気泳動に供した結果から、スチーム・インジェクション UHT 殺菌処理により、栄養剤中の乳たんぱく質、特に β -LG の消化性が向上することが確認された。一方、レトルト殺菌栄養剤では、このような改善効果が認められなかつ

た。

- 4) *In vitro* 消化試験によって得た消化物について TCA 沈殿法とデュマ法を用いて算出したたんぱく質消化率についても、統計学的有意な差ではないが、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤の方がレトルト殺菌栄養剤や加熱処理していない調合液よりも高い消化率であった。
- 5) 一方、*in vivo* 消化試験において仔ラットから採取した血漿中の遊離アミノ酸濃度を測定したところ、加熱処理していない調合液を投与された群と比較して、スチーム・インジェクション UHT 殺菌栄養剤およびレトルト殺菌栄養剤投与群では、必須アミノ酸レベルは低く推移し、投与 0.5 時間後の Leu および Ile については、有意差が認められた。

以上の結果から、乳原料から加熱殺菌工程を経て製造される経腸栄養剤においては、スチーム・インジェクション UHT 殺菌処理によってたんぱく質の消化性が向上したのに対し、レトルト殺菌処理では改善効果が認められなかった。これらの強い加熱殺菌処理は、乳原料中の乳たんぱく質は変性させて消化性を改善しているものの、レトルト殺菌処理はたんぱく質の修飾反応を著しく進行させ、それにより消化性の改善効果が大きく相殺されているものと考えられた。但し、いずれの加熱殺菌処理方法もアミノ酸の生体利用性を低下させることを示唆する結果も得られた。熱履歴の少ない CN や WP 原料を使用し、またレトルト殺菌法よりも UHT 殺菌法を採用することによって、たんぱく質消化性の観点から経腸栄養剤を改善することができる可能性を示すことができた。

7-4 母乳における低温加熱殺菌処理の有無が消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響

母乳とドナーミルクとで、消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに違いがあるかどうかを *in vitro* での消化試験系によって検討を行った。母乳、およびドナーミルクを想定して加熱殺菌処理した母乳を *in vitro* 消化試験に供した後、消化物中の主要乳たんぱく質に由来するペプチド配列を同定すべく、LC-MS/MS 分析を行った。乳たんぱく質に由来する生理活性ペプチドの生成パターンについて、以下の結果を得た。

- 1) 人工消化処理前の母乳中には、 β -CN に由来する生理活性ペプチドであるウシ由来のカゼインホスホペプチドと相同性の高い 2 種類の配列、1 種類のオピオイドペプチドと想定される、あるいはその前駆体となると思われる配列、および 1 種類の抗菌ペプチドが同定され、これらの配列は *in vitro* での消化試験に供した後でも、分解されずに同定された。
- 2) 母乳および加熱殺菌母乳を *in vitro* での消化試験に供した結果、生理活性ペプチドの放出パターンは、母乳試料と加熱母乳試料とで概ね同じパターンであった。
- 3) 消化後に生成されるペプチドとして、ACE 阻害ペプチド、抗酸化ペプチド、免疫調節ペプチドなど、さまざまな生理活性が報告されているペプチドが同定された。

以上の結果から、母乳および加熱殺菌母乳中のたんぱく質は、同等の消化性を示し、生成される生理活性ペプチドのパターンにも大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。

7-5 育児用ミルクにおける乳たんぱく質原料の違いが消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに及ぼす影響

乳たんぱく質をベースとした通常の育児用ミルクと、乳たんぱく質酵素分解物をベースとしたアレルギー疾患用ミルクとで、消化を介して生成される生理活性ペプチドのパターンに違いがあるかどうかについて、*in vitro*での消化試験系によって検討を行った。通常の CN+WP ベースの育児用ミルク、CN 高度分解物配合ミルク、および WP 軽度分解物配合ミルクの 3 種類の育児用ミルクを *in vitro* 消化試験に供した後、主要乳たんぱく質に由来するペプチド配列を同定すべく、LC-MS/MS 分析を行った。乳たんぱく質に由来する生理活性ペプチドの生成パターンについて、以下の結果を得た。

- 1) 3 種類の育児用ミルクを *in vitro* での消化試験に供した結果、CN+WP ベースの通常の育児用ミルクにおいて最も多くの生理活性ペプチドが同定され、抗菌ペプチド、免疫調節ペプチド、及び抗酸化ペプチドが生成しやすい傾向であった。
- 2) 一方、いくつかの生理活性ペプチドについては、むしろたんぱく質分解物配合ミルクにおいて形成されやすく、 β -LG および β -CN の 60-70 位に由来する DPP4 阻害ペプチドや血清コレステロール低減化ペプチド、オピオイドペプチドが生成しやすい傾向であった。

以上の結果から、乳たんぱく質のアミノ酸配列に含まれている生理活性ペプチドの多くは、工業的加水分解によって損なわれることが明らかになった。一方、工業的加水分解によって、本来消化されづらい部位へ消化酵素が接近しやすくなり、その結果、それらの部位からの生理活性ペプチドの生成を促進するものと考えられた。

7-6 仔ラット消化モデルによる母乳及び育児用ミルク中の乳たんぱく質の消化動態の解析

母乳および育児用ミルク中の乳タンパク質が消化管においてどのように消化され、またどのような生理活性ペプチドを生成するかについて、*in vivo*での消化試験系によって検討を行った。仔ラットに母乳および通常の CN+WP ベースの育児用ミルクを投与した後、一定時間後に小腸内容物を採取した。消化物中の主要乳たんぱく質に由来するペプチド配列を同定すべく、LC-MS/MS 分析を行い、以下の結果を得た。

- 1) 母乳を投与された仔ラットの上部小腸からは主に α -LA および β -CN に由来するペプチドが同定され、また育児用ミルクを投与された仔ラットの上部小腸からは主に β -LG および β -CN に由来するペプチドが同定された。またこれらのペプチドは、それぞれのたんぱく質の全配列のうち、広い

領域から放出されたものであった。仔ラットの下部小腸からは、乳たんぱく質由来のペプチドはほとんど検出されなかった。

- 2) 上述の 4 つのたんぱく質に由来するペプチドの生成は、特定の領域（母乳中の β -CN の 70-93 位、育児用ミルク中の β -LG の 39-55 位、および育児用ミルク中の β -CN の 57-96 位と 145-161 位）に集中していた。また、下部小腸で同定された配列もこれらの領域に由来するものであった。
- 3) 同定された生理活性ペプチドのうち、消化管から生体内への吸収が確認されているものとして、 β -CN に由来するオピオイドペプチドや血圧降下ペプチドが確認された。
- 4) 「PeptideRanker」を用いた検索結果から、母乳由来の 34 のペプチドと育児用ミルク由来の 32 のペプチドには、何らかの生理活性があることが予測された。

以上の結果から、乳たんぱく質に由来するペプチドは、上部小腸においてはある程度の長さを維持して存在する一方、下部小腸においてはほとんどが本試験系では同定することができない短いペプチド鎖に分解されることが明らかになった。一方、一部のペプチドは消化酵素に対する耐性を持っており、下部小腸にまで達することが出来ることが分かった。そして、オピオイドペプチドや血圧降下ペプチドが乳児の成長や健康に関わっている可能性が考えられた。

7-7 結語

本研究では、乳たんぱく質が加熱殺菌工程によって受ける栄養学的影響について検討を行い、牛乳の加工工程で生乳が加熱処理される場合と、液状経腸栄養剤の製造工程で乳たんぱく質原料を含んだ調合液が加熱処理される場合とでは、栄養学的な影響が異なることを示した。また、母乳および育児用ミルク中の乳たんぱく質から消化を介して生成される生理活性ペプチドについての比較検討を行い、母乳、育児用ミルクそれぞれにおける生理活性ペプチドの生成パターンを *in vitro/vivo* の試験系で示した。しかし、生理活性ペプチドについては、そのほとんどは、生体内でどのような機能し、また乳児に対してどのような役割をしているかは明らかになっていない。今後、動物試験や臨床試験を通して、どの生理活性ペプチドが乳児にとって重要な役割を果たしているものなのか、明らかにしていきたい。また、第 6 章で示したとおり、母乳由来の 34 のペプチドと育児用ミルク由来の 32 のペプチドには何らかの生理活性を有する可能性があることから、どの配列にどのような生理活性があるかについても明らかにしていきたい。

本研究で得られた結果が、乳たんぱく質研究の発展に貢献するだけでなく、育児用ミルク・経腸栄養剤といった食事代替品の栄養学的・生理学的改良に裨益する基盤的知見となることを期待したい。

謝辞

北海道大学農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野 食品栄養学研究室 原博教授には、本論文作成の機会を与えていただくとともに、纏めから審査に渡し、終始懇切なるご指導とご高閲を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

北海道大学農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野の川端潤教授、比良徹講師には、ご多忙にも関わらず本論文の審査をお引き受けくださり、また大変有益なご助言とご高閲を賜りました。深く感謝申し上げます。

カリフォルニア大学デービス校 Department of Nutrition の Bo Lönnerdal 教授には、研究方針や実験計画、結果の解釈、学術論文の作成と、本研究の全般に渡りまして、多大なご指導とご助言を賜りました。謹んで感謝の意を表します。

カリフォルニア大学デービス校 ゲノムセンター Proteomic Core Facility の Brett Phinney 博士、Darren Weber 氏には、プロテオミクス/ペプチドミクス解析に関する実験計画や LC-MS/MS 分析の実施、データ解析、学術論文の作成に関しまして、多大なご指導とご助言を賜りました。心よりお礼申し上げます。

森永乳業株式会社 栄養科学研究所（現健康栄養科学研究所）の宮崎桂介氏、橋本潤一氏、矢吹博芳氏、早川結樹氏には、本研究で解析した牛乳試料、経腸栄養剤試料の製造にご尽力くださいました。謹んで感謝の意を表します。

本研究につきまして、深いご理解とご支援を与えてくださいました、同社 大野晃名誉会長、宮原道夫代表取締役社長、高瀬光徳顧問、大川禎一郎常務取締役、武田安弘健康栄養科学研究所長に謹んで感謝の意を表します。さらに、同健康栄養科学研究所 清水隆司栄養機能研究部長、古谷篤クリニカル食品開発部長、和泉裕久博士には、本研究の実施や本論文の作成にあたりまして、多大なるご理解とご協力を賜りました。深く感謝申し上げます。

そのほかにも、ここにお名前を記すことのできなかった多くの方々のご支援やご協力のもと、本研究を実施し、本論文をまとめることが出来ました。改めまして、関係者の方々に謹んでお礼申し上げます。

最後に、これまで陰ながら研究生活を支えてくれた父母と妻に心から感謝いたします。

2017 年 3 月 和田 泰明

引用文献

- [1] Pereira PC. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 2014;30(6):619-27.
- [2] Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(1):49-74.
- [3] Lönnerdal B. Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health*. 2013;49 Suppl 1:1-7.
- [4] Lönnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *Am J Clin Nutr*. 2014;99(3):712S-7S.
- [5] Chen Y, Peterson SJ. Enteral nutrition formulas: which formula is right for your adult patient? *Nutr Clin Pract*. 2009;24(3):344-55.
- [6] Fox PF, Brodtkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *Int Dairy J*. 2008;18(7):677-84.
- [7] Wijayanti HB, Bansal N, Deeth HC. Stability of whey proteins during thermal processing: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014;13(6):1235-51.
- [8] Chatterton DE, Nguyen DN, Bering SB, Sangild PT. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(8):1730-47.
- [9] Lien EL. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(6):1555S-8S.
- [10] Kelleher SL, Chatterton D, Nielsen K, Lönnerdal B. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(5):1261-8.
- [11] Trabulsi J, Capeding R, Lebumfacil J, Ramanujam K, Feng P, McSweeney S, et al. Effect of an α -lactalbumin-enriched infant formula with lower protein on growth. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(2):167-74.
- [12] King JC, Jr., Cummings GE, Guo N, Trivedi L, Readmond BX, Keane V, et al. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(2):245-51.
- [13] Chen K, Chai L, Li H, Zhang Y, Xie HM, Shang J, et al. Effect of bovine lactoferrin from iron-fortified formulas on diarrhea and respiratory tract infections of weaned infants in a randomized controlled trial. *Nutrition*. 2016;32(2):222-7.

- [14] Sato R, Noguchi T, Naito H. Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1986;32(1):67-76.
- [15] Strömqvist M, Falk P, Bergstrom S, Hansson L, Lönnerdal B, Normark S, et al. Human milk κ -casein and inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucosa. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1995;21(3):288-96.
- [16] Ushida Y, Shimokawa Y, Toida T, Matsui H, Takase M. Bovine α -lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric mucosa. *J Dairy Sci*. 2007;90(2):541-6.
- [17] Izumi H, Ishizuka S, Inafune A, Hira T, Ozawa K, Shimizu T, et al. α -Lactalbumin hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-2 secretion and small intestinal growth in suckling rats. *J Nutr*. 2009;139(7):1322-7.
- [18] Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, et al. Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition*. 2007;23(4):323-31.
- [19] Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci*. 2004;87(4):785-96.
- [20] Lönnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(3):293-7.
- [21] Jiang R, Lönnerdal B. Biological roles of milk osteopontin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016;19(3):214-9.
- [22] Lönnerdal B, Kvistgaard AS, Peerson JM, Donovan SM, Peng YM. Growth, Nutrition, and Cytokine Response of Breast-fed Infants and Infants Fed Formula With Added Bovine Osteopontin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(4):650-7.
- [23] Douglas FW, Jr., Greenberg R, Farrell HM, Jr., Edmondson LF. Effects of ultra-high-temperature pasteurization on milk proteins. *J Agric Food Chem*. 1981;29(1):11-5.
- [24] Gedam K, Prasad R, Vijay VK. The Study on UHT Processing of Milk: A Versatile Option for Rural Sector. *World J Dairy Food Sci*. 2007;2(2):49-53.
- [25] Lindmark-Månsson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*. 2000;84 Suppl 1:S103-10.
- [26] Elagamy EI. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chem*. 2000;68(2):227–32.
- [27] Kakade ML, Evans RJ. Chemical and enzymatic determinations of available lysine in raw and heated navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Can J Biochem*. 1966;44:648-50.

- [28] Van Boekel MAJS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 1998;62(4):403-14.
- [29] Marvin LF, Parisod V, Fay LB, Guy PA. Characterization of lactosylated proteins of infant formula powders using two-dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. *Electrophoresis.* 2002;23(15):2505-12.
- [30] Rérat A, Calmes R, Vaissade P, Finot PA. Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur J Nutr.* 2002;41(1):1-11.
- [31] Finot PA, Magnenat E. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog Food Nutr Sci.* 1981;5(1-6):193-207.
- [32] Friedman M. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *J Agric Food Chem.* 1999;47(4):1295-319.
- [33] Rutherford SM, Moughan PJ. Available versus digestible dietary amino acids. *Br J Nutr.* 2012;108 Suppl 2:S298-305.
- [34] Peram MR, Loveday SM, Ye A, Singh H. *In vitro* gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin. *J Dairy Sci.* 2013;96(1):63-74.
- [35] Wada Y, Lönnerdal B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. *J Nutr Biochem.* 2014;25(5):503-14.
- [36] Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr.* 2010;156(2 Suppl):S26-30.
- [37] Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1995;21(4):383-6.
- [38] Meltretter J, Becker CM, Pischetsrieder M. Identification and site-specific relative quantification of beta-lactoglobulin modifications in heated milk and dairy products. *J Agric Food Chem.* 2008;56(13):5165-71.
- [39] Dallas DC, Guerrero A, Khaldi N, Borghese R, Bhandari A, Underwood MA, et al. A peptidomic analysis of human milk digestion in the infant stomach reveals protein-specific degradation patterns. *J Nutr.* 2014;144(6):815-20.
- [40] Van Boekel MAJS. Heat-induced deamidation, dephosphorylation and breakdown of caseinate. *Int Dairy J.* 1999;9(3-6):237-41.
- [41] Smout C, Banadda NE, Van Loey AML, Hendrickx MEG. Nonuniformity in lethality and quality in thermal process optimization: a case study on color degradation of green peas. *J Food Sci.* 2003;68(2):545-50.

- [42] Harland HA, Ashworth US. A rapid method for estimation of whey proteins as an indication of baking quality of nonfat dry-milk solids. *Food Res.* 1947;12(3):247-51.
- [43] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;7(72):248-54.
- [44] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68(5):850-8.
- [45] Alvarado R, Tran D, Ching B, Phinney BS. A comparative study of in-gel digestions using microwave and pressure-accelerated technologies. *J Biomol Tech.* 2010;21(3):148-55.
- [46] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem.* 2002;74(20):5383-92.
- [47] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75(17):4646-58.
- [48] Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol.* 2010;604:55-71.
- [49] Liu H, Sadygov RG, Yates Jr. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2004;76(14):4193-201.
- [50] Jou MY, Du X, Hotz C, Lönnerdal B. Biofortification of rice with zinc: assessment of the relative bioavailability of zinc in a Caco-2 cell model and suckling rat pups. *J Agric Food Chem.* 2012;60(14):3650-7.
- [51] Armand M, Hamosh M, Mehta NR, Angelus PA, Philpott JR, Henderson TR, et al. Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant. *Pediatr Res.* 1996;40(3):429-37.
- [52] Simonian HP, Vo L, Doma S, Fisher RS, Parkman HP. Regional postprandial differences in pH within the stomach and gastroesophageal junction. *Dig Dis Sci.* 2005;50(12):2276-85.
- [53] Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res.* 2006;23(1):165-76.
- [54] Fredrikzon B, Hernell O. Role of feeding on lipase activity in gastric contents. *Acta Paediatr Scand.* 1977;66(4):479-84.
- [55] Fink CS, Hamosh P, Hamosh M. Fat digestion in the stomach: stability of lingual lipase in the gastric environment. *Pediatr Res.* 1984;18(3):248-54.

- [56] Rudloff S, Lönnerdal B. Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1992;15(1):25-33.
- [57] Lönnerdal B, Mendoza C, Brown KH, Rutger JN, Raboy V. Zinc absorption from low phytic acid genotypes of maize (*Zea mays* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.), and Rice (*Oryza sativa* L.) assessed in a suckling rat pup model. *J Agric Food Chem.* 2011;59(9):4755-62.
- [58] Singh H. Heat stability of milk. *Int J Dairy Technol.* 2004;57(2-3):111–9.
- [59] Scanff P, Savalle B, Miranda G, Pelissier JP, Guilloteau P, Toullec R. *In vivo* gastric digestion of milk proteins. Effect of technological treatments. *J Agric Food Chem.* 1990;38(8):1623-9.
- [60] Siciliano R, Rega B, Amoresano A, Pucci P. Modern mass spectrometric methodologies in monitoring milk quality. *Anal Chem.* 2000;72(2):408-15.
- [61] Lund MN, Olsen K, Sørensen J, Skibsted LH. Kinetics and mechanism of lactosylation of α -lactalbumin. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):2095-102.
- [62] Arena S, Renzone G, Novi G, Paffetti A, Bernardini G, Santucci A, et al. Modern proteomic methodologies for the characterization of lactosylation protein targets in milk. *Proteomics.* 2010;10(19):3414-34.
- [63] Fogliano V, Monti SM, Visconti A, Randazzo G, Facchiano AM, Colonna G, et al. Identification of a β -lactoglobulin lactosylation site. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1388(2):295-304.
- [64] Leonil J, Molle D, Fauquant J, Maubois JL, Pearce RJ, Bouhallab S. Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl β -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *J Dairy Sci.* 1997;80(10):2270-81.
- [65] Ahmed N, Mirshekar-Syahkal B, Kennish L, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49(7):691-9.
- [66] Pereda J, Ferragut V, Quevedo JM, Guamis B, Trujillo AJ. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized milk. *Food Hydrocolloids.* 2009;23(7):1974-9.
- [67] Dittrich R, Hoffmann I, Stahl P, Müller A, Beckmann MW, Pischetsrieder M. Concentrations of N^{ϵ} -carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *J Agric Food Chem.* 2006;54(18):6924-8.
- [68] Nangpal A, Reuter H. Reference diagram for furosine content in UHT milk. *Kieler Milchw Forsch.* 1990;42(1):77-86.

- [69] Payne-Botha S, Bigwood EJ. Amino-acid content of raw and heat-sterilized cow's milk. *Br J Nutr.* 1959;13:385-9.
- [70] Dupont D, Mandalari G, Mollé D, Jardin J, Rolet-Répécaud O, Duboz G, et al. Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(11):1677-89.
- [71] Desrosiers T, Bergeron G, Savoie L. Effect of heat treatments on *in vitro* digestibility of delactosed whey protein as determined by the digestion cell technique. *J Food Sci.* 1987;52(6):1525-8.
- [72] Kitabatake N, Kinekawa Y. Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem.* 1998;46(12):4917-23.
- [73] alKanhil HA, al-Othman AA, Hewedi FM. Changes in protein nutritional quality in fresh and recombined ultra high temperature treated milk during storage. *Int J Food Sci Nutr.* 2001;52(6):509-14.
- [74] Lacroix M, Léonil J, Bos C, Henry G, Airinei G, Fauquant J, et al. Heat markers and quality indexes of industrially heat-treated [^{15}N] milk protein measured in rats. *J Agric Food Chem.* 2006;54(4):1508–17.
- [75] Yvon M, Chabanet C, Pélissier JP. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism. *Int J Pept Protein Res.* 1989;34(3):166-76.
- [76] Sarwar G, Peace RW, Botting HG. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats. *Am J Clin Nutr.* 1989;49(5):806-13.
- [77] Sarwar G, Peace RW. The protein quality of some enteral products is inferior to that of casein as assessed by rat growth methods and digestibility-corrected amino acid scores. *J Nutr.* 1994;124(11):2223-32.
- [78] Rutherford SM, Moughan PJ. Digestible reactive lysine in selected milk-based products. *J Dairy Sci.* 2005;88(1):40-8.
- [79] Ford JE, Hurrell RF, Finot PA. Storage of milk powders under adverse conditions. 2. Influence on the content of water-soluble vitamins. *Br J Nutr.* 1983;49(3):355-64.
- [80] Cattaneo S, Masotti F, Pellegrino L. Liquid infant formulas: technological tools for limiting heat damage. *J Agric Food Chem.* 2009;57(22):10689-94.
- [81] Friedman M, Zahnley JC, Masters PM. Relationship between *in vitro* digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids. *J Food Sci.* 1981;46(1):127-34.
- [82] Birlouez-Aragon I, Pischetsrieder M, Leclère J, Morales FJ, Hasenkopf K, Kientsch-Engel R, et al. Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.* 2004;87(2):253-9.

- [83] Rufián-Henares J, García-Villanova B, Guerra-Hernández E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J Agric Food Chem*. 2004;52(17):5354–8.
- [84] Owen CG, Whincup PH, Gilg JA, Cook DG. Effect of breast feeding in infancy on blood pressure in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003;327(7425):1189-95.
- [85] Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics*. 2005;115(5):1367-77.
- [86] Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(5):1043-54.
- [87] Tully DB, Jones F, Tully MR. Donor milk: what's in it and what's not. *J Hum Lact*. 2001;17(2):152-5.
- [88] Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I, Goelz R, et al. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res*. 2004;56(4):529-35.
- [89] Andersson Y, Sävman K, Bläckberg L, Hernell O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. *Acta Paediatr*. 2007;96(10):1445-9.
- [90] Moltó-Puigmartí C, Permanyer M, Castellote AI, López-Sabater MC. Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chem*. 2011;124(3):697-702.
- [91] Akinbi H, Meinzen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R, et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(3):347-52.
- [92] Ley SH, Hanley AJ, Stone D, O'Connor DL. Effects of pasteurization on adiponectin and insulin concentrations in donor human milk. *Pediatr Res*. 2011;70(3):278-81.
- [93] Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(6):1537S-43S.
- [94] Dziuba J, Minkiewicz P, Nałecz D, Iwaniak A. Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung*. 1999;43(3):190-5.
- [95] Ferranti P, Traisci MV, Picariello G, Nasi A, Boschi V, Siervo M, et al. Casein proteolysis in human milk: tracing the pattern of casein breakdown and the formation of potential bioactive peptides. *J Dairy Res*. 2004;71(1):74-87.

- [96] Dallas DC, Guerrero A, Khaldi N, Castillo PA, Martin WF, Smilowitz JT, et al. Extensive *in vivo* human milk peptidomics reveals specific proteolysis yielding protective antimicrobial peptides. *J Proteome Res*. 2013;12(5):2295-304.
- [97] Kohmura M, Nio N, Ariyoshi Y. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of various β -caseins. *Agric Biol Chem*. 1990;54(4):1101-2.
- [98] Hernández-Ledesma B, Quirós A, Amigo L, Recio R. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int Dairy J*. 2007;17(1):42-9.
- [99] Asano M, Nio N, Ariyoshi Y. Inhibition of prolyl endopeptidase by synthetic peptide fragments of human β -casein. *Agric Biol Chem*. 1991;55(3):825-8.
- [100] Koch G, Wiedemann K, Teschemacher H. Opioid activities of human β -casomorphins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1985;331(4):351-4.
- [101] Migliore-Samour D, Jollès P. Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia*. 1988;44(3):188-93.
- [102] Azuma N, Nagaune S, Ishino Y, Mori H, Kaminoagawa S, Kunio Yamauchi K. DNA-synthesis stimulating peptides from human β -casein. *Agric Biol Chem*. 1989;53(10):2631-4.
- [103] Juillerat-Jeanneret L, Robert MC, Juillerat MA. Peptides from *Lactobacillus* hydrolysates of bovine milk caseins inhibit prolyl-peptidases of human colon cells. *J Agric Food Chem*. 2011;59(1):370-7.
- [104] Sánchez-Rivera L, Ares I, Miralles B, Gómez-Ruiz JÁ, Recio I, Martínez-Larrañaga MR, et al. Bioavailability and kinetics of the antihypertensive casein-derived peptide HLPLP in rats. *J Agric Food Chem*. 2014;62(49):11869-75.
- [105] Asano M, Nio N, Ariyoshi Y. Inhibition of prolyl endopeptidase by synthetic β -casein peptides and their derivatives with a C-terminal prolinol or prolinal. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1992;56(6):976-7.
- [106] Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, Fox PF, Monnet V, Gobbetti M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(9):5297-305.
- [107] Tsopmo A, Romanowski A, Banda L, Lavoie JC, Jenssens H, Friel JK. Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chem*. 2011;126(3):1138-43.
- [108] Kim YK, Yoon S, Yu DY, Lönnerdal B, Chung BH. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{s1} -casein expressed in *Escherichia coli*. *J Dairy Res*. 1999;66(3):431-9.

- [109] Hernández-Ledesma B, Miralles B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *J Sci Food Agric*. 2005;85(6):1041-8.
- [110] Pihlanto-Leppälä A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res*. 2000;67(1):53-64.
- [111] Ukeda H, Matsuda H, Osajima K, Matsufuji H, Matsui T, Osajima Y. Peptides from peptic hydrolysate of heated sardine meat that inhibit angiotensin I converting enzyme. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 1992;66(1):25-9.
- [112] Yokomizo A, Takenaka Y, Takenaka T. Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein. *Food Sci Technol Res*. 2002;8(4):357-9.
- [113] Cossey V, Vanhole C, Eerdekens A, Rayyan M, Fieuws S, Schuermans A. Pasteurization of mother's own milk for preterm infants does not reduce the incidence of late-onset sepsis. *Neonatology*. 2013;103(3):170-6.
- [114] Panchaud A, Affolter M, Kussmann M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. *J Proteomics*. 2012;75(12):3546-59.
- [115] Zoghbi S, Trompette A, Claustre J, El Homsy M, Garzon J, Jourdan G, et al. β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1105-13.
- [116] Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, Matsumura E. Effects of systemic administration of β -casomorphin-5 on learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol*. 2006;530(1-2):81-7.
- [117] Yoshimoto T, Kado K, Matsubara F, Koriyama N, Kaneto H, Tsura D. Specific inhibitors for prolyl endopeptidase and their anti-amnesic effect.
- [118] Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei G, Marsset-Baglieri A, et al. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(6):1314-23.
- [119] Forsyth JS, Reilly J, Fraser CG, Struthers AD. Angiotensin converting enzyme activity in infancy is related to birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004;89(5):F442-F4.
- [120] Jollès P, Lévy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillessen D TA, Dunn FW, Caen JP. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *Eur J Biochem*. 1986;158(2):379-82.
- [121] Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci Technol*. 2013;93(3):211-23.

- [122] Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426(3):439-48.
- [123] Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1526(2):131-40.
- [124] Silveira ST, Martínez-Maqueda D, Recio I, Hernández-Ledesma B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in beta-lactoglobulin. *Food Chem*. 2013;141(2):1072-7.
- [125] Martínez-Maqueda D, Miralles B, Ramos M, Recio I. Effect of β -lactoglobulin hydrolysate and β -lactorphan on intestinal mucin secretion and gene expression in human goblet cells. *Food Res Int*. 2013;54(1):1287-91.
- [126] Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett*. 1997;402(2-3):99-101.
- [127] Cakir-Kiefer C, Miclo L, Balandras F, Dary A, Soligot C, Le Roux Y. Transport across Caco-2 cell monolayer and sensitivity to hydrolysis of two anxiolytic peptides from α_{s1} -casein, α -casozepine, and α_{s1} -casein-f91-97: effect of bile salts. *J Agric Food Chem*. 2011;59(22):11956-65.
- [128] Tauzin J, Miclo L, Gaillard JL. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{s2} -casein. *FEBS Lett*. 2002;531(2):369-74.
- [129] López-Expósito I, Quirós A, Amigo L, Recio I. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Lait*. 2007;87(4-5):241-9.
- [130] FitzGerald RJ. Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int Dairy J*. 1998;8(5-6):451-7.
- [131] Meisel H, Frister H, Schlimme E. Biologically active peptides in milk proteins. *Z Ernährungswiss*. 1989;28(4):267-78.
- [132] Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci*. 2000;83(7):1434-40.
- [133] Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem*. 2001;49(1):295-302.
- [134] Silva SV, Pihlanto A, Malcata FX. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *J Dairy Sci*. 2006;89(9):3336-44.

- [135] Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(1):11-7.
- [136] Rizzello CG, Losito I, Gobetti M, Carbonara T, De Bari MD, Zambonin PG. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *J Dairy Sci*. 2005;88(7):2348-60.
- [137] Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol*. 1996;34(1):131-45.
- [138] Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C. Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2260-4.
- [139] Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiwa H, Sugai R, Murakami U, et al. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol C*. 1990;96(2):367-71.
- [140] Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry*. 1983;22(19):4567-73.
- [141] Stuknytė M, Cattaneo S, Masotti F, De Noni I. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following *in vitro* static gastrointestinal digestion. *Food Chem*. 2015;168:27-33.
- [142] Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem*. 2000;11(3):128-31.
- [143] Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J*. 1998;8(4):325-31.
- [144] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci*. 1994;77(4):917-22.
- [145] Berthou J, Migliore-Samour D, Lifchitz A, Delettré J, Floc'h F, Jollès P. Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett*. 1987;218(1):55-8.
- [146] Coste M, Rochet V, Léonil J, Mollé D, Bouhallab S, Tomé D. Identification of C-terminal peptides of bovine beta-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol Lett*. 1992;33(1):41-6.
- [147] Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*. 2007;28(22):4202-11.
- [148] López-Expósito I, Minervini F, Amigo L, Recio I. Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *J Food Prot*. 2006;69(12):2992-7.

- [149] Almaas H, Eriksen E, Sekse C, Comi I, Flengsrud R, Holm H, et al. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *Br J Nutr.* 2011;106(6):896-905.
- [150] Singh M, Rosen CL, Chang KJ, Haddad GG. Plasma β -casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr Res.* 1989;26(1):34-8.
- [151] Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhauser R, Bostedt H. Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul Pept.* 1985;12(3):223-30.
- [152] Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides.* 2003;24(6):937-43.
- [153] Bouzerzour K, Morgan F, Cuinet I, Bonhomme C, Jardin J, Le Huërou-Luron I, et al. *In vivo* digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *Br J Nutr.* 2012;108(12):2105-14.
- [154] Tabb DL, Fernando CG, Chambers MC. MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis. *J Proteome Res.* 2007;6(2):654-61.
- [155] Ma ZQ, Dasari S, Chambers MC, Litton MD, Sobecki SM, Zimmerman LJ, et al. IDPicker 2.0: Improved protein assembly with high discrimination peptide identification filtering. *J Proteome Res.* 2009;8(8):3872-81.
- [156] Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, Shields DC. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. *PLoS One.* 2012;7(10):e45012.
- [157] Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 1996;383(1-2):18-20.
- [158] Antila P, Paakkari I, Järvinen A, Mattila MJ, Laukkanen M, Pihlanto-Leppälä A, et al. Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int Dairy J.* 1991;1(4):215-29.
- [159] Migliore-Samour D, Roch-Arveiller M, Tissot M, Jazziri M, Keddad K, Giroud JP, et al. Effects of tripeptides derived from milk proteins on polymorphonuclear oxidative and phosphoinositide metabolisms. *Biochem Pharmacol.* 1992;44(4):673-80.
- [160] Chi C, Wang B, Wang Y, Zhang B, Shang-Gui Deng S. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *J Funct Foods.* 2015;12:1-10.

- [161] Mazoyer E, Lévy-Toledano S, Rendu F, Hermant L, Lu H, Fiat AM, et al. KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur J Biochem.* 1990;194(1):43-9.
- [162] García-Tejedor A, Sánchez-Rivera L, Castelló-Ruiz M, Recio I, Salom JB, Manzanares P. Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: gastrointestinal stability profile and *in vivo* angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. *J Agric Food Chem.* 2014;62(7):1609-16.
- [163] Boelsma E, Kloek J. Lactotripeptides and antihypertensive effects: a critical review. *Br J Nutr.* 2009;101(6):776-86.
- [164] Yoshikawa M, Tani F, Yoshimura T, Chiba H. Opioid peptides from milk proteins. *Agric Biol Chem.* 1986;50(9):2419-21.
- [165] Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis. *Food Chem.* 2014;145:845-52.
- [166] Lacroix IM, Li-Chan EC. Peptide array on cellulose support--a screening tool to identify peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity within the sequence of α -lactalbumin. *Int J Mol Sci.* 2014;15(11):20846-58.
- [167] Caliendo G, Greco G, Grieco P, Perissutti E, Santagada V, Ialenti A, et al. Synthesis and antinociceptive activity of peptides related to interleukin-1 β 193–195 Lys-Pro-Thr. *Biopolymers.* 1996;40(5):479-84.
- [168] Lacroix IM, Li-Chan EC. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides.* 2014;54:39-48.
- [169] Ringseis R, Matthes B, Lehmann V, Becker K, Schops R, Ulbrich-Hofmann R, et al. Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1721(1-3):89-97.
- [170] Uenishi H, Kabuki T, Seto Y, Serizawa A, Nakajima H. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *Int Dairy J.* 2012;22(1):24-30.
- [171] Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci.* 1998;81(12):3131-8.
- [172] O'Reilly PJ, Hardison MT, Jackson PL, Xu X, Snelgrove RJ, Gaggar A, et al. Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen. *J Neuroimmunol.* 2009;217(1-2):51-4.
- [173] Lee HJ, Wang NX, Shao Y, Zheng JJ. Identification of tripeptides recognized by the PDZ domain of Dishevelled. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(4):1701-8.

- [174] Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 1996;79(8):1316-21.
- [175] Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J Funct Foods.* 2013;5(4):1909-17.
- [176] Liu D, Wang Y, Yu Y, Hu J, Lu N, Regenstein JM, et al. Effects of enzymatic dephosphorylation on infant *in vitro* gastrointestinal digestibility of milk protein concentrate. *Food Chem.* 2016;197(Pt A):891-9.
- [177] Sánchez-Rivera L, Ménard O, Recio I, Dupont D. Peptide mapping during dynamic gastric digestion of heated and unheated skimmed milk powder. 77. 2015;2(132-139).
- [178] Sánchez-Rivera L, Diezhandino I, Gómez-Ruiz JÁ, Fresno JM, Miralles B, Recio I. Peptidomic study of Spanish blue cheese (Valdeon) and changes after simulated gastrointestinal digestion. *Electrophoresis.* 2014;35(11):1627-36.