# 食品の新しい生体制御機能検索系の開発

野　口　　忠（東京大学農学部助教授）

〔研究目的〕

近年，食品のもつ未知の生体制御機能のいくつかが，新しいバイオテクノロジーの方法によって明らかにされてきている。例えば，乳タンパク質の1つであるカゼインから消化過程で生成するペプチドであるカゼインホスホペプチドは，食餌中のカルシウムの吸収を促進することが明らかにされている。これは，従来の食品の概念では説明できない新しい機能と言うことができる。このような状況に鑑み，本研究では，食品の新しい機能を検索するための系を積極的に開発しようとした。

生体の機能は無数といってよいほどである。従って，それらを支え，また促進し，抑制するという食品の機能検索系の可能性も無数といってよいであろう。そこで，本研究では，この無数とも言える機能の中から，肝臓のソマトメジンC分泌能力，および上皮成長因子-インスリンによる肝細胞のDNA合成促進能力を取り上げ，これらの肝機能に影響を与える物質の検索系の開発が可能であるかを明らかにしようとした。

〔方　法〕

初代培養肝細胞によるソマトメジンCの分泌

肝細胞の分離と初代培養は既報の方法によって行った[1]。細胞は3.5cmの培養皿で培養した。培地は，特に断らない限り，WilliamsのE培地（以下WE）を用いた。単離した肝細胞を，10%のウシ胎児血清を含むWEで24時間培養した後，以後24時間ごとに血清を含まないWEに交換した。細胞分離3日後に培地を交換した時点から，培地に分泌されるソマトメジンC量をラジオイムノアッセイ法（ヒト-ソマトメジンCアッセイキット――栄研化学）によって定量した。

インスリンおよび上皮成長因子（Epidermal Growth Factor, 以下 EGF）による初代培養肝細胞のDNA合成誘導

上述の方法によって得た単離3日後の初代培養肝細胞にEGFを100ng/m$l$の濃度で添加し，DNA合成を誘導し，20時間後に$^3$H-チミジン1$\mu$Ciを培地に添加して，DNA合成を測定した。

〔結　果〕

1.　初代培養肝細胞によるソマトメジンCの分泌

**図1**に示したように，初代培養肝細胞は，培地に，ソマトメジンCを分泌する能力を有していることを認めた。

**図2**には，そのソマトメジンCの分泌に及ぼすインスリンの影響を示した。インスリンは低濃度では，ソマトメジンCの分泌を促進し，高濃度では分泌を抑制する傾向を示した。

さらに，**図3**には，合成副腎皮質ホルモン（グルココルチコイド）であるデキサメタゾンの，ソマトメジンC分泌におよぼす影響を示した。このホルモンは，ソマトメジンC分泌に促進的であると言えよう。

2.　EGFによる初代培養肝細胞のDNA合成誘導

**図4**に，EGFによる初代培養肝細胞のDNA合成の誘導の時間経過を示した。図に明らかなように，培地にEGFを添加すると，約12時間後から

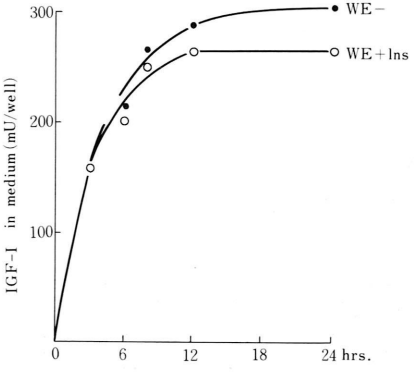


**図1**　初代培養肝細胞によるソマトメジンCの分泌
培養した細胞の培地を交換すると，細胞から急速にソマトメジンCが分泌され培地に蓄積することがわかる。

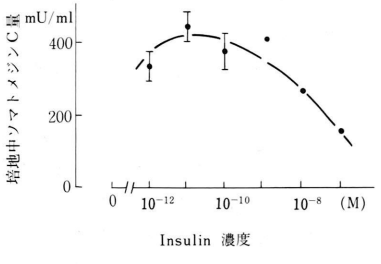


**図2**　初代培養肝細胞によるソマトメジンC分泌に及ぼすインスリンの影響

DNA 合成が始まり，22～24 時間後には，最大の DNA 合成に至る。

**図5** には，この DNA 合成に対するベスタチンの影響を示した。ベスタチン（**図6** に構造を示した）は，微生物起源のアミノペプチダーゼインヒビターで，従来は DNA 合成の阻害効果は知られていなかった物質である。

〔本研究の意義と応用に関する考察〕

初代培養肝細胞は，多くの肝機能を生体中の活

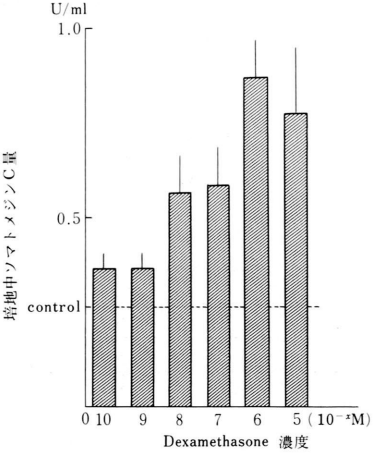


**図3**　初代培養肝細胞によるソマトメジンC分泌に及ぼす合成副腎皮質ホルモン，デキサメタゾンの影響

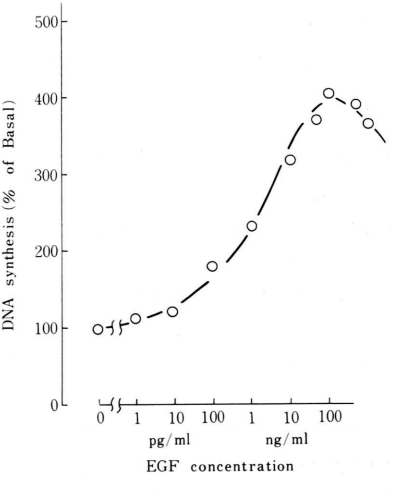


**図4**　上皮成長因子（epidermal growth factor, EGF）による初代培養肝細胞のＤＮＡ合成誘導

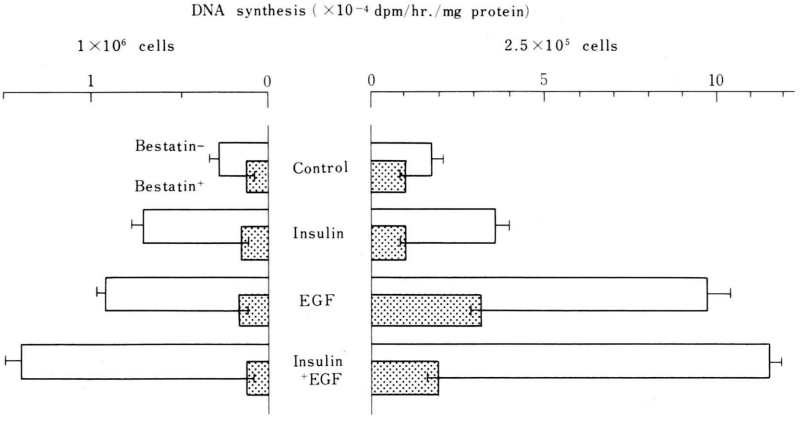


**図5**　EGFにより誘導されるDNA合成におよぼすアミノペプチダーゼインヒビーター，ベスタチンの影響[1)]

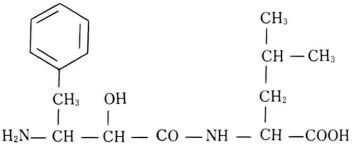


**図6**　アミノペプチダーゼインヒビター，ベスタチンの構造

性に近い水準で保持していることが知られている細胞である。本研究でも，ソマトメジンCの分泌能に関して，この細胞の高い能力が証明された。しかもこの分泌が，諸種のホルモンによって調節されていることも明らかになった。研究目的の項で述べたように，ソマトメジンCは，ヒトを含めた動物の成長，タンパク質同化，等に非常に重要であることが近年次々と明らかにされているホルモンである。このホルモンの分泌を促進または抑制する物質を検索することは，将来，応用範囲の広い物質が得られる可能性が大きいと言えよう。

また，EGFによるDNA合成の誘導系を開発できたことも，独特の有用物質の検索系となると考えられる。EGFのレセプターは，ある種の発癌遺伝子（erbB）と相同性が高いことが知られており，もし，この肝細胞のEGFによるDNA合成誘導活性を抑制する新しい物質が発見できれば，発癌の機構に新たな知見を提供できるばかりか，ある種の癌の治療にも結びつけられる可能性があると言えよう。

一方，EGFのDNA合成促進作用と同様の作用は，インスリンも示すことから，この検索系を用いて，DNA合成誘導を促進する物質が得られれば，肝硬変患者の肝再生，糖尿病患者のインスリン応答能改善などに応用することが可能であろう。

このように，初代培養肝細胞系は，非常に有用性の高い系である。われわれは，すでに，この系の尿素合成能を指標に，独特のホルモン様作用を示すペプチドを，カイゼンのトリプシン水解物中から分離し，その性質を明らかにしつつある。また，同系で，微生物の培養液中から，肝細胞に独特の抗酸化作用を示す化合物を分離している。今回新たに開発された2つのアッセイ系が，新しい有用物質—特に食品中の—の発見につながることを期待して，検索を続けていく計画である。

## 文 献

1) Takahashi, S.-I., Kato, H., Seki, T., Noguchi, T., Naito, H., Aoyagi, T. and Umezawa, H. (1985). Bestatin, a microbial aminopeptidase inhibitor, inhibits DNA synthesis induced by insulin or epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. J. Antibiotics 38, 1767-1773.

# Development of new systems for screening new regulatory substances in foods employing primary cultures of rat hepatocytes.

Tadashi Noguchi (Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo)

Recently, many peptides of food protein origin have been shown to have functions to regulate cellular metabolism or biological activity of animals. These include casein phosphopeptides (acceleration of intestinal calcium absorption), an inhibitor of angiotensin-converting enzyme, and endorphin-like peptides. These discoveries opened a new field of investigations to disclose potential functions of food proteins. In order to elucidate the potential functions, new systems for screening functions are required. In this context, I tried to develop new systems for elucidating the new functions of peptides derived from food proteins.

Three systems were proposed. The first is based on the activity of primary cultures of rat hepatocytes to secrete insulin-like growth factor I (somatomedin C). This hormone has been shown to be very important in growth and protein anabolism in animals and human beings. The new system determines the rate of secretion of this hormone by the hepatocytes employing a radioimmunoassay system. The second system is based on the activity of primary cultures of hepatocytes to synthesize DNA in the presence of epidermal growth factor. Primary cultured hepatocytes synthesize DNA only in the presence of growth factors or insulin in the medium. Therefore, some substances which depress or enhance the activity of growth factors or insulin will affect the activity of the factors to induce DNA synthesis in hepatocytes. The newly developed system will be useful for screening new substances to affect the activity of growth factors or insulin. The third system is based on the activity of hepatocytes to synthesize urea. The activity to synthesize urea is regulated by insulin (depression), glucagon (accerelation) and many other factors. This system has been employed in our laboratory since several years ago. Several peptides have been found to affect the activity. Especially, a heptapeptide from $\beta$-casein showed specific effects to regulate the activity of ureogenesis in hepatocytes through regulating the supply of amino nitrogen for urea synthesis.

The new systems developed in this project will lead to discoveries of new functions of peptides from food proteins, thereby elucidating potential functions of food proteins.