

## 유청 단백질에서 유도되는 생리활성 펩타이드에 관한 연구

윤 승 섭  
매일유업(주) 중앙연구소

### Isolation of Mitogenic Glycophosphopeptides from Cheese Whey Protein Concentrate

Sung Seob Yun  
Maeil Dairy Industry Co., Ltd.

#### ABSTRACT

We investigated the immunological function of cheese whey protein concentrate(CWPC), which is a by-product of cheese production, using mitogenic activity in murine splenocytes as an index. A fraction isolated by gel filtration and anion exchange chromatography of CWPC showed high mitogenic activity, comparable to the activity of lipopolysaccharide (LPS). The fraction was detected as a single band on SDS-PAGE. It contained calcium, inorganic phosphorus, and carbohydrate, indicating the active component to be a glycophosphopeptide (GPP). Since pronase digestion of GPP did not reduce its mitogenic activity, carbohydrate rather than peptide may be important in the activity. When applied on an anti- $\beta$ -caseinophosphopeptide ( $\beta$ -CPP) antibody affinity column, the GPP was separated into two components, one with affinity to  $\beta$ -CPP and the other without such affinity. Both the components contained *N*-linked oligosaccharide chains and had the mitogenic activity. These results demonstrate that cheese whey contains a GPP having strong mitogenic activity

(Key words : Cheese whey protein concentrate(CWPC), Glycophosphopeptide(GPP), splenocytes, mitogenic activity, Glycomacropeptide(GMP).

#### I. 서 론

유단백질은 생체의 생명유지와 성장의 역할을 담당하는 영양원으로써의 기능뿐 아니라 경구 섭

취로 인한 면역계, 내분비계, 신경계 등의 생체조절에 관한 생리조절인자로써의 기능을 갖고 있다. 최근에는 유단백질을 효소 처리하여 여러 가지 생리활성을 갖는 각종 펩타이드를 분리 정제하여 특정한 기능을 갖는 식품 및 의약품 등에 이용하려

는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러한 것들을 요약하여 보면 opioid peptide (Table 1), carsoxin을 대표로 하는 opioid antagonist peptide (Table 2), 평활근 작동성을 갖는 peptide (Table 3), antithrombotic peptide, macrophage의 활성화로 phagocytosis를 돕는 peptide, 세포증식활성을 갖는 펩타이드, ACE inhibitor peptide, Interferon producing enhancer, calcium absorption enhancing peptide 등이 있으며, 이외에도 다양한 기능을 갖는 물질들이 속속 발견 보고되고 있다. 그러나 이렇게 고감도 assay에 의하여 찾아낸 식품단백질 유래의 생리활성을 갖는 물질들이 식품으로 섭취하였을 때 그 속의 내재된 일련의 활성들이 전부 발현된다는 것은 기대가 어렵다. 그러므로 인체에 유효한 활성을 갖는 펩타이드에 관해서는 생체내에서 생성될 수 있는 최적의 조건을 확립하는 것은 물론 흡수성 및 분해성 등의 제반 장애요인을 극복하기 위하여 식품의 형태를 재구성할 필요가 있는 것으로 판단된다. 또한 이러한 외인성 생리활성 펩타이드는 일반적으로 내인성 펩타이드와는 현저히 다른 구조 및 활성상관을 보이고 있으며, 또한 의약품 분야에의 응용으로 이러한 인자들을 리드 물질로 하는 고효성의 리간드 설계로의 전개가 기대된다. 이러한 취지에서 본 연구는 유청단백질에 내재되어 있는 생리활성물질을 찾아내고 그 메카니즘을 규명할 목적으로 실시되었다.

## II. 재료 및 방법

1. 치즈유청단백질 농축물(CWPC, cheese whey protein concentrate)에 함유된 면역부활활성을 갖는 물질의 분리정제

먼저 CWPC에 함유된 BGMP(bovine glycomacropeptide) frac.은 CWPC를 60°C, 1시간 가열처리하여 DEAE-Sephadex A-25로 분리하고 UF filter(MW; 2만)를 이용하여 농축시킨 후 동결건조하여 이것을 starting material로 하였다. 이런 전 처리 과정을 통하여 얻어진 BGMP frac.

을 Sephacryl S-200(XK50/100)을 사용하여 분획을 하고 Q-Sepharose Fast Flow(column, 25×60)를 이용하여 음이온 교환법에 의하여 정제하였다.

### 2. GPP(glycophosphopeptide)의 면역부활작용의 검색

면역부활활성의 검색은 Balb/c mouse의 임파세포 (spleen cell, Peyer's patch cell)의 증식효과를 지표(SI, stimulation index ; sample cpm / control cpm)로 실시되었으며, 사용한 배지는 10% FCS를 포함하는 RPMI 1640 이며, 세포수는  $5 \times 10^5$  / 0.2ml / well 이었다.

### 3. GPP의 이화학적 성질

GPP의 이화학적 성질을 밝혀내기 위하여 유도 결합 plasma 이온원질량분석계(ICP, inductively coupled plasma)를 사용하여 P 및 Ca을 정량하였으며 그 외에도 일반적인 방법으로 당의 함량, 당조성 및 아미노산 조성을 분석 정량하였다.

### 4. GPP의 활성부위에 대한 검토

GPP의 면역부활 활성의 발현에 관여하는 부위를 판단하기 위한 목적으로 GPP를 pronase로 분해하여, anti-β-CPP mAb, CPP-III(caseinophosphopeptide III, 明治製菓)등과 비교 검토하였다.

### 5. GPP의 표적 면역담당세포의 동정

7주령의 Balb/c mouse의 splenocytes 단세포 용액을 제조한 후, nylon wool과 Sephadex G-10 column을 이용하여 T세포를 분리하고, 항 T세포 항체(CD3, CD4, CD8) 및 보체(low tox-M Rabbit complement)를 사용하여 B세포를 분리 정제하여 각 세포에 대한 GPP의 세포증식효과를 검토하여, 표적세포를 동정하였다.

표 1. Opioid peptide의 구조

Peptide	기 원	구 조
내인성 opioid peptide		Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-X Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-X
식품단백질 유래 opioid peptide		
$\beta$ -Casomorphin	Bovine $\beta$ -casein	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
$\beta$ -Casomorphin	Human $\beta$ -casein	Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile*
Hemorphin	Hemoglobin	Tyr-Pro-Trp-Thr
$\alpha$ -Casein exorphin	Bovine $\alpha_{s1}$ -casein	Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu
$\beta$ -Casorphin	Human $\beta$ -casein	Tyr-Pro-Ser-Tyr-NH <sub>2</sub> *
$\beta$ -Casein(59~63)	Human $\beta$ -casein	Tyr-Gly-Phe-Leu-Pro*
$\alpha$ -Lactophin	$\alpha$ -Lactalbumin	Tyr-Gly-Leu-Phe-NH <sub>2</sub> *
$\beta$ -Lactophin	$\beta$ -Lactoglobulin	Tyr-Leu-Leu-Phe-NH <sub>2</sub> *
Serophin	Bovine serum albumin	Tyr-Gly-Phe-Gln-Asn-Ala*

표 2. 유단백질 유래의 opioid antagonist peptide

Peptide	기 원 (생성조건)	구 조
Casoxin A	Bovine $\kappa$ -casein (pepsin/trypsin)	Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-Asn-Tyr
Casoxin B	Human · bovine $\kappa$ -casein (합성)	Tyr-Pro-Tyr-Tyr
Casoxin C	Bovine $\kappa$ -casein (trypsin)	Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg
Casoxin D	Human $\alpha_{s1}$ -casein (pepsin/chymotrypsin)	Tyr-Val-Pro-Phe-Pro-Pro-Phe
Casoxin 6	Bovine $\kappa$ -casein (pepsin)	Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )
Casoxin 5	Bovine $\kappa$ -casein (합성)	Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )
Casoxin 4	Bovine $\kappa$ -casein (pepsin/trypsin)	Tyr-Pro-Ser-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )
Lactoferroxin A	Bovine lactoferrin (trypsin)	Tyr-Leu-Gly-Ser-Gly-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )
Lactoferroxin B	Bovine lactoferrin (trypsin)	Arg-Tyr-Tyr-Gly-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )
Lactoferroxin C	Bovine lactoferrin (trypsin)	Lys-Tyr-Leu-Gly-Pro-Gln-Tyr(-OCH <sub>3</sub> )

표 3. 식품단백질 유래의 평활근 작동성 peptide

Peptide	기원(소화효소)	모르모트 회장	개 장관막동맥	Opioid	ACE
Casoxin C (YIPIQYVLSR)	Bovine $\kappa$ -casein (trypsin)	수축	수축 및 이완 (내피의존성)	Antagonist	+
Casoxin D (YVPFPPF)	Human $\alpha_{s1}$ -casein (pepsin /chymotrypsin)	수축 (TTX감수성)	이완 (내피의존성)	Antagonist	-
Albutensin A (ALKAWSVAR)	Bovine serum albumin (trypsin)	수축	이완 (내피의존성)	-	+
$\beta$ -Lactotensin (HIRL)	Bovine $\beta$ -lactoglobulin (chymotrypsin)	수축 (TTX감수성)	반응없음	-	-

### III. 결과 및 고찰

#### 1. CWPC 유래의 당펩타이드(BGMP)frac. 중의 새로운 면역 부활 활성물질의 검색

CWPC 유래의 당펩타이드의 새로운 생리활성

물질을 검색하기 위하여 Sephacryle S-200를 이용한 gel filtration을 실시한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 세포증식 활성을 나타낸 분획은 용출시간이 가장 늦은 부분(F8)으로 SI=4.8±0.08의 활성치를 나타내었다.

또한 F8을 Q-Sepharose Fast Flow를 이용한 이온교환법으로 정제하여 Fig. 2의 결과를 얻었으

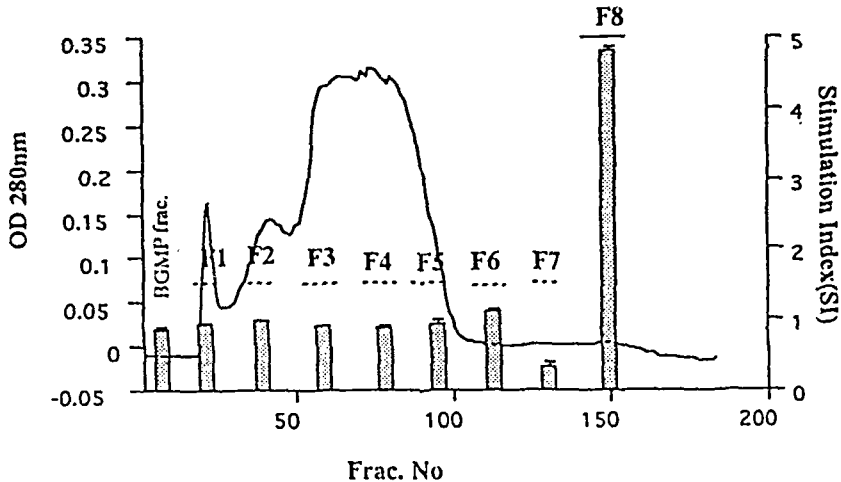


Fig. 1. Gel filtration chromatogram of BGMP fraction from cheese whey protein concentrate on a sephacryl S-200, and mitogenic activity of the BGMP fraction and each eluted fraction.

The solid line shows optical density at 280nm and the columns indicate the stimulation index(SI) of the GMP fraction and each eluted fraction, BGMP fraction(1.5) dissolved in 15ml of PBS (pH 7.2) was put on a Sephacryl S-200 column (50mm×1000mm) and eluted with the same buffer at a flow rate of 1.3ml/min. The mitogenic activity was measured for the GMP fraction and serial 8ml eluted fractions by blastogenesis assay using murine splenocytes. Splenocytes( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with each fraction (protein concentration= $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) or with PBS as a control for 4 days. The cultures were then pulsed with 0.25 mCi of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine and harvested after 8hr.

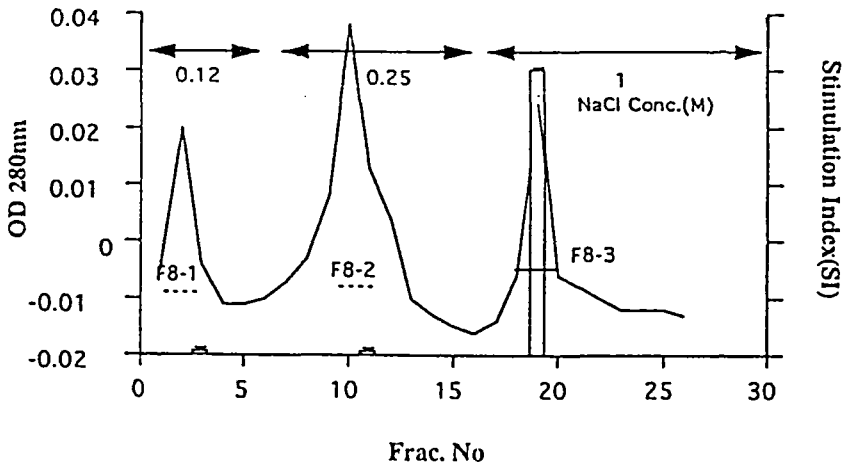


Fig. 2. Chromatography on Q-Sepharose fast flow column of F8 in Fig. 1, and mitogenic activity of each fraction.

The solid line shows optical density at 280nm and the columns show the stimulation index (SI) of each fraction. The pooled F8 (20mg protein/ml) dissolved in 0.01 M Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.12 M NaCl was put on a Q-Sepharose Fast Flow column (25mm×60mm) equilibrated with the same buffer. Stepwise gradient elution (0.12 M to 1M NaCl) was then done. The mitogenic activity was measured by the same method as in Fig. 1.

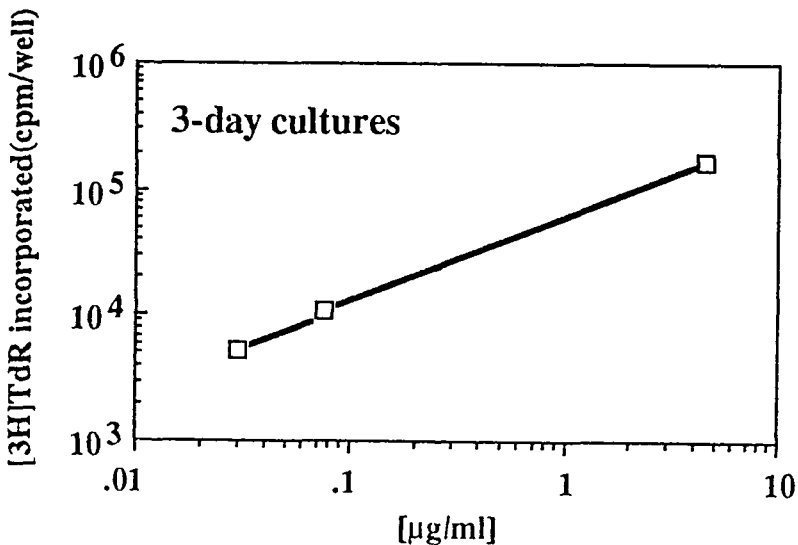


Fig. 3. Mitogenic properties of F8-3 in Fig. 2. Mitogenic activity with Dose of F8-3.

Splenocytes ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with various concentrations of F8-3 (0.03~3μg protein/ml) for 3 days. Cultures were then pulsed with 0.25μ Ci of [3H]-thymidine and harvested after 8hr.

며 1M의 염농도에서 용출한 peak(F8-3)에서 가장 강한 세포증식활성(SI=10.0±0.1)을 나타내

었다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 F8-3의 mouse 입과세포에 대한 dose response는 함량이 많아질수록 활성치가 높아지는 비례적 상관관계를 보였으며, 또한  $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서의 time course는 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 3일째 배양에서 가장 높은 활성치를 나타내고, 그 값은 양성 대조군인 Con A( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ , Concanavalin A) 및 LPS( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ , lipopolysaccharide)의 입과구 증식활성인자와 동등한 활성정도를 보였다.

SDS-PAGE와 lectine를 이용하여 분자량을 측정한 결과 Fig. 5와 같이 16 kDa의 단일 peak가 검출되었다. 이 성분은 CWPC 유래의 당펩타이드 중에 포함된  $\kappa$ -CN의 GMP(glycomacropeptide)와는 상이한 성분으로써 당을 포함하고 있는 분자량 16 kDa의 친수성이 강한 당펩타이드인 것으로 판단되었다. 또한 이 성분은 치즈유청단백질 농축물에 미량으로 존재하지만, 이미 mitogen으로 알려진 Con A 및 LPS 등과 같은 정도의 활성을 나타내었으며, 그 활성발현에 필요한 양은 Con A( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ )와 유사한  $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 또한, 이

성분은 전신면역의 지표인 비장입과세포뿐 아니라 장관면역계에 중요한 역할을 담당하고 있는 Peyer's patch cell에서도 그 활성을 나타내는 것으로 보아 전신 및 국부적인 면역기능의 부활화인자로써 응용의 가능성이 시사되었다. 치즈유청단백질농축물에 포함되는 당단백질 중에 면역부활작용이 보고되고 있는 것에는 면역 글로블린 G1 및 lactoferrin 등이 있으나 본 연구에서 분리정제된 16 kDa의 당펩타이드와는 별개의 것으로 판단되었다. 그리고 Shida 등이 우유를 가열처리하여 조정한 글리코실화- $\beta$ -Lg 및  $\alpha$ -La의 분자량은 각각 20 kDa와 16 kDa이며 cholera toxin과의 결합활성에 관한 보고가 있다. 그러나 이러한 물질의 mitogen활성에 관하여는 아직 보고된 바 없다.

#### 1) Affinity chromatography

Affinity chromatography는 먼저,  $3\text{mg}/\text{ml}$ 의 anti- $\beta$ -CPP 1ml를 NHS-activated Sepharose column에 0.5M의 NaCl을 포함한 0.2M의 Na-

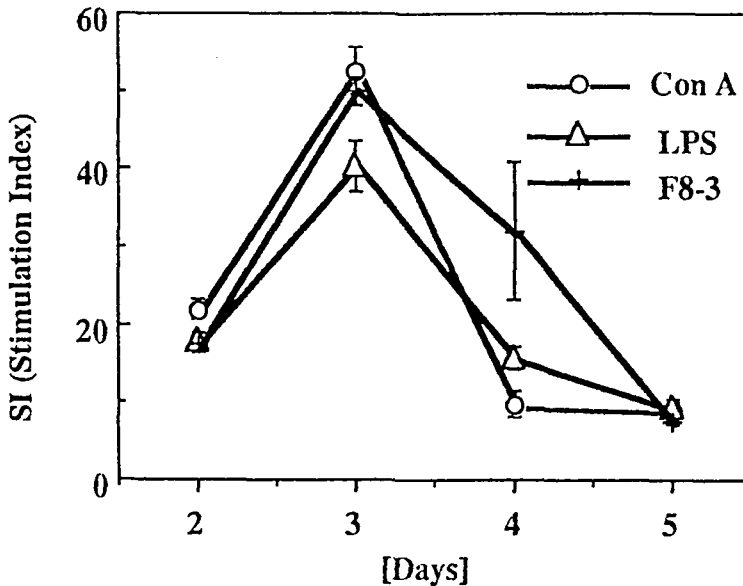


Fig. 4. Mitogenic properties of F8-3 in Fig. 2.

Course of mitogenic activity Splenocytes ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured with F8-3( $3\mu\text{g}$  protein/ml), LPS( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Con A( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 2~5 days. Cultures were then pulsed with  $0.25 \mu\text{Ci}$  of  $[^3\text{H}]$ -thymidine and harvested after 8hr.

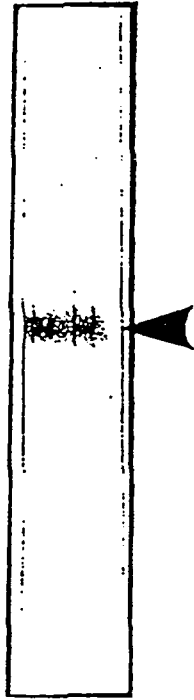


Fig. 5. SOS-PAGE and Electroblot Analysis of F8-3 in Fig. 2.

The active fraction after anion-exchange chromatography was separated on SDS-PAGE(15% gel) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. After incubation with peroxidase-labeled RCA 120 followed by washing, color was developed by incubation with 0.03% 3, 3'-diaminobenzidine and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS. A standard kit of prestained marker proteins was used for measurement of molecular masses.

HCO<sub>3</sub> buffer(pH 8.0)로 coupling시킨 후 0.1M 의 glycine-HCl buffer(pH 2.7)로 용출시키고 1M Tris로 용출액을 중화시켰다. 이렇게하여 chromatography를 실시한 결과 GPP에는 Fig. 6에서와 같이 phosphoserine domain을 인식하여 anti-β-CPP와 결합하는 부분과 결합하지 않은 부분이 존재하는 것으로 확인되었다. 또한 임파구 증식촉진활성은 Table 4에서 나타낸 바와 같이 인산기 항체의 결합부분에서는 SI=7.0±0.02를 나타내었고, 결합하지 않은 부분에서는 SI=5.1±0.07이었다. 이 결과는 affinity chromatography

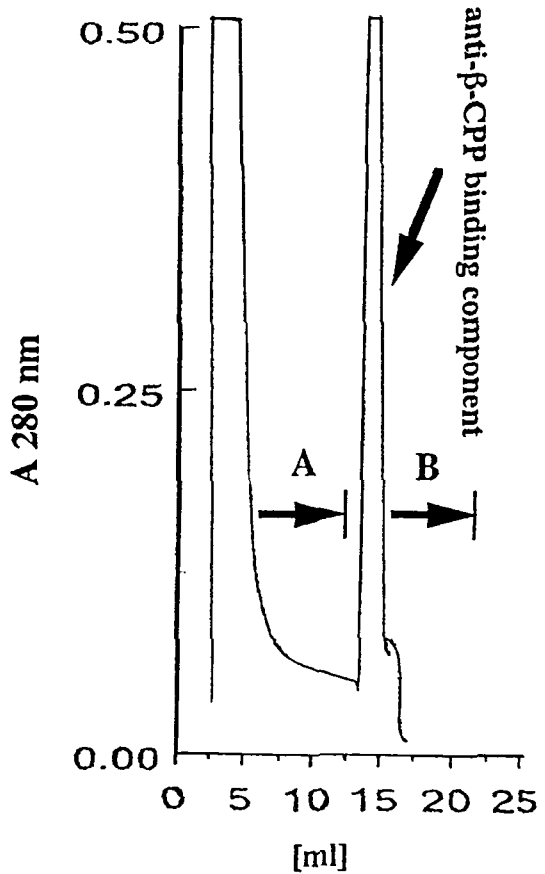


Fig. 6. Anti-β-CPP mAb affinity chromatography.

Three mg of monoclonal anti-β-caseinophosphopeptide (β-CPP)antibody was coupled with N-hydroxy succinimide-activated Sepharose column (1ml). The column was equilibrated with 75mM Tris-HCl (pH 8.0), sample were put on and eluted with 0.1 M glycine-HCl (2.7), The eluted fraction was neutralized with 1M Tris, then dialyzed exhaustively against distilled water and freeze-dried.

에 의해 분할된 후의 물질이 분할전의 물질보다 그 활성이 약간 감소되었으나, 여전히 높은 활성치를 나타내었다.

## 2) Amino acid analysis

Anti-β-CPP를 이용하여 분리한 각 성분에 대한 아미노산 조성을 분석한 결과 Table 4에서 나타낸 바와 같이 항체에 결합한 성분에는 serine 및

Table 4. Amino acid composition (mole %), carbohydrate composition (%) and mitogenic activities of GPP (s)

Component	GPP(s)	
	Non-bound component*	Bound component**
Amino acid(mole %)		
Asp	7.33	4.05
Thr	11.77	3.53
Ser	9.80	16.89
Glu	16.89	10.15
Pro	10.63	2.14
Gly	3.04	N.D.***
Ala	7.51	4.97
Val	8.14	3.04
Cys	0.47	0.13
Met	1.09	0.52
Lle	5.54	2.28
Leu	5.54	3.00
Tyr	0.88	0.98
Phe	1.50	1.67
Lye	5.94	2.85
His	0.91	2.57
Arg	1.65	1.17
Carbohydrate(%)		
	<i>(estimated from the reactivity of lectin-binding assay)</i>	
GalNAc	2.4	-
GalNAc	2.5	+
Man	13.3	++
Fuc	0.0	-
Gal	5.8	+
Sialic acid	2.1	+
Total	26.1	
SI	7.0±0.02	5.1±0.07

\* Non-bound component is the component which was not bound to affinity column coupled with anti-CPP mAb.

\*\* Bound component is the component which was bound to affinity column coupled with anti-CPP mAb.

\*\*\* Not determined (N.D.) because glycine-HCl buffer was used for elution.

\*\*\*\* Carbohydrate in the bound fraction was determined by using lectin-binding assay.



Glu이 많이 함유되어 있었으며, 결합하지 않은 부분에서는 Thr, Glu, Pro 등 산성의 아미노산이 다량 함유되어 있었다.

### 3) 당의 함량 및 당쇄의 분석

GPP의 당의 함량은 Table 4에서 나타낸 바와 같이 항체를 결합하지 않는 성분에서 26.1%로 상당히 높은 함량이었으며, 그 당조성은 GalNAc 2.4%, N-GlcNAc 2.5%, mannose 13.3%, galactose 5.8%, sialic acid 2.1%이었다. 또한 항체에 결합하는 성분에서는 당의 함량이 미량이었으므로 Lectin kit를 이용한 western blotting법으로 검출한 결과, N-글리코실 결합에 특징적인 mannose, galactose, sialic acid의 존재가 확인되었다.

### 4) Ca, P의 정량분석

ICP 장치를 이용하여 GPP의 Ca 및 P를 정량 분석한 결과 Table 5에 나타낸 바와 같이 Ca = 9.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein, inorganic phosphorous = 31.3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein 이 각각 함유되어 있었다.

## 2. GPP의 활성부위의 한정

앞에서 밝혀진 바와 같이, GPP는 N-글리코실 결합의 당을 갖고 있으며 더우기 phosphoserine domain을 갖는 새로운 물질이었으며, cheese whey 유래의 면역 부활성물질중 N-글리코실 결합을 갖는 당단백질은 생체에 있어서 다양한 생리 활성을 띄는 것이 알려져 있다. 예를 들면 면역글로블린의 당쇄는 정보전달의 receptor로써 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한, 단백질과 결합한 인산기는 칼슘과의 결합을 촉진하고, 생체에의 칼

Table 5. Calcium and inorganic phosphorus contents in F8-3 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein)

	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)
Calcium	9.4
Inorganic phosphorus	31.3

슘공급원으로서도 중요하다. 본 연구에서 발견한 GPP는 CPP와 같은 cluster를 보유하고 있으나, CPP와 같이 칼슘의 흡수를 촉진시키는 활성에 관하여는 좀더 연구되어야 할 부분이다. 한편 GPP의 어느 부위가 활성발현에 관여하고 있는지에 대해 불명확하므로 활성발현에 관여하는 부위를 한정할 목적으로 anti- $\beta$ -CPP 및 GPP의 pronase 처리로 펩타이드 부분의 관여에 관하여 검토하였다.

### 1) 세포증식에 영향을 미치는 인산기의 영향

GPP의 활성부위를 해석하기 위하여, 비교대상으로 인산기를 갖지만 당을 포함하지 않는 물질로서 CPP III 및 anti- $\beta$ -CPP mAb(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 처리를 한 GPP를 이용하여 세포증식활성을 검토한 결과, Table 6에서 나타낸 바와 같이 CPP III의 세포증식촉진 효과는 인정되지 않았다. 또한, anti- $\beta$ -CPP 처리를 한 GPP의 활성은 SP 및 PP세포에서 그 활성이 저하되지 않았으므로, GPP의 활성 발현에는 인산기의 영향이 없는 것으로 판단되었다.

### 2) Pronase 처리

펩타이드부분의 활성발현에의 관여를 조사하기 위하여 pronase 처리를 한 결과, Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 pronase에 의해 펩타이드 부분이 소화되어도 활성에 영향을 주지 않는 것으로 판단되

Table 6. Mitogenic activities of the glycoposphopeptide, caseinophosphopeptid and anti-CPP-treated GPP

	SI (stimulation index)	
	SP cells	PP cells
CPP*	1.3 $\pm$ 04	N.D
GPP**	7.5 $\pm$ 01	7.6 $\pm$ 09
A-GPP***	7.2 $\pm$ 02	6.2 $\pm$ 04

\* Caseinophosphopeptide III

\*\* Glycoposphopeptid(GPP)

\*\*\* Anti-CPP-treated GPP

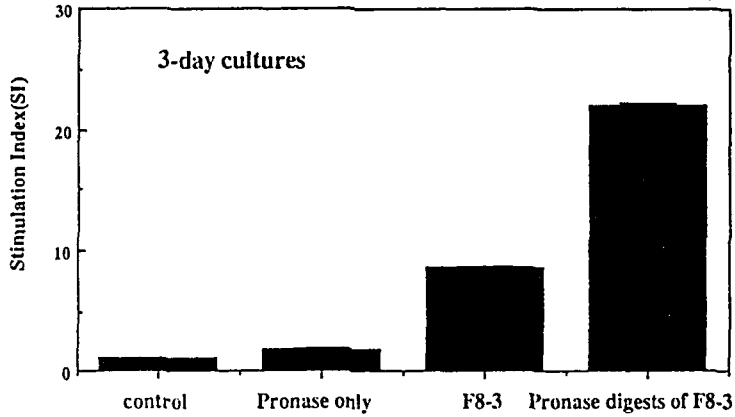


Fig. 7. Mitogenic activity of pronase digests of F8-3.

F8-3 was digested by pronase at 37°C for 24hr with the enzyme to substrate ratio of 1/100. The reaction was stopped by placing the reaction tubes in boiling water bath for 15min. Cont., P, p+F8-3 indicated control, pronase-treated buffer, F8-3 and pronase-treated F8-3, respectively.

Table 7. Effects of the GPP on T and B cells proliferations

Splenocytes	Stimulation index (SI)*
Control	1.0±00
T cells+MΦ	0.7±01
B cells+MΦ	6.6±09
T cells+MΦ+LPS	0.8±01
B cells+MΦ+Con A	1.2±01

\* Stimulation Index (SI) : sample cpm/control cpm  
(cpm : counter per minute)

었다. 즉, GPP의 세포증식활성의 발현에는 당쇄가 중요한 역할을 하고 있는 것으로 판단되었으며, 이 결과는 GPP의 활성발현에는 펩타이드 부분보다 당쇄의 영향이 깊은 것으로 판단되었다.

### 3. GPP의 표적 면역담당세포의 동정

Mouse lymphocytes에 대하여 증식활성을 갖는 물질로서 발견한 GPP의 표적세포를 동정하기 위하여 nylon wool와 Sephadex G-10 column을

사용하여 T세포를 항T세포 항체 및 보체를 사용하여, B세포를 각각 분리동정하여 각 세포분리에 대한 GPP의 증식 활성을 검토하여 Table 7에 나타낸 바와 같은 결과를 얻었다. T세포에 대해서는 그 활성이 인정되지 않았으나, B세포에 대해서만 특이적으로 증식활성을 나타내는 것이 밝혀졌다. 또한 여기에서 검정한 T세포 및 B 세포는 각각 다른 mitogen인 LPS와 Con A에 대한 반응을 나타내지 않는 것으로 인정되므로 각 세포는 서로 혼합되어 있지 않는 것으로 판단되었다.

## IV. 요약

### 1. CWPC중의 새로운 생리활성물질의 검색

Mouse 임파세포의 증식효과를 지표로 하는 면역기능을 검토하여 CWPC중의 면역 부활작용을 갖는 새로운 성분의 검색을 실시하였다. CWPC를 여러 가지 분획법으로 분획하여 mouse 임파세포의 증식효과를 지표로 면역 활성성분을 검색하였다. 그 결과 gel filtration, 음이온교환법을 사용하여 분획한 당을 다량 포함한 부분에 강한 면역부활담당세포에 대하여 증식활성을 나타내는 물질

을 발견하였다. 이 물질은 SDS-PAGE상에서 분자량이 약 16 kDa에 위치하여 Ca, P 및 당쇄를 포함한 물질이며, 이것을 GPP로 하였다. GPP에는 우유케이스인의 trypsin분해물이며 Ca와 무기인을 풍부하게 포함하는  $\beta$ -CPP와 유사한 phosphoserin 영역을 갖는 성분과 갖지 않는 성분의 2종류가 존재하며, 각각의 면역 부활활성이 인정되었다. 각 성분의 아미노산 분석, 당 분석의 결과에서 지금까지 보고된 우유중의 면역담당세포에 대한 증식활성을 갖는 물질과는 상이한 성분인 것으로 밝혀졌다. 더우기 이 활성물질(GPP)은 PP cell에서도 동등한 활성이 있는 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 종합하여 보면 CWPC중에는 지금까지 알려지지 않았던 새로운 면역 부활물질이 존재하며, 그 성분에는 CPP와 유사한 phosphoserine 영역이 존재하는 성분이 포함되어 있고, N-글리코실 결합의 당쇄가 존재하는 것으로 시사되었다. 이 성분은 전신면역의 지표인 비장세포에 대해서만이 아니고, 장관면역계에 중요한 역할을 담당하는 PP cell에서도 활성이 있는 것으로 보아 전신 및 국부적인 면역기능의 부활성분으로서 응용의 가능성이 시사되었다.

## 2. GPP의 면역담당세포에 대한 증식활성의 메카니즘의 검토

CWPC중의 GPP의 면역담당세포증식활성의 메카니즘을 해명하기 위해 먼저 이 성분중의 어느 부분이 활성화에 관여하는지를 pronase 분해 및 phosphoserine 영역을 인식하는 항체를 사용하여 검토하였다. 그 결과 pronase 분해처리에서도 활성의 감소를 나타내지 않았으므로 이러한 활성화는 당이 필수불가결하다는 점이 시사되었다. 또한 phosphoserine 영역을 인식하는 항체에 의해서도 활성화는 감소하지 않는 것으로 보아 phosphoserine 영역이 세포증식활성에 관여하지 않는 것으로 판단되었다. 또한 분획한 면역담당세포에 대한 증식활성을 측정하는 것으로 이 성분의 표적면역담당세포를 동정하여, B세포에 대해서만 특이적으로 증식활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

## V. 참고문헌

1. Yun, S. S., S-Konishi, Y. Kumagai, S. and K. Yamauchi. 1996. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(3):429-433.
2. Yun, S. S., S-Konishi, Y. Kumagai, S. and K. Yamauchi. 1996. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* 67(5):458-462.
3. Poter, J. W. G. 1978. *J. Soc Dairy Technol.*, 31, 199.
4. Renner, E. 1983. in *milk and dairy products in human nutrition*, W. Gmbh. Volkswirtschaftlicher Verlag, Munich, W. Germany.
5. McBean, L. D. and E. W. Speckmann. 1988. in "Fundamentals in dairy chemistry", ed by N. P. Wong, R. Jenness, Kenny, M. and E. H. Marth, Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 343-407.
6. Hambraeus, L. 1982. In "Developments in dairy chemistry-1", ed. by P. F. Fox, Elsevier, Appl. Sci. Pub., pp 289-313.
7. Shimizu, M. and K. Yamauchi. 1986. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 791.
8. Andrews, A. T. 1978. *Eur. J. Biochem.*, 90, 59.
9. Eigel, W. E. 1981. *Int. J. Biochem.*, 13, 1399.
10. Godovac-Zimmermann, J. 1988. *TIBS.*, 13, 64.
11. Ebner, K. E. and F. Schanbacher. 1974. In "A comprehensive Treatise" Vol II, Academic Press, New York, pp 77-96.
12. Shida, K., K. Takamizawa, M. Nagaoka, A. Kushiro and T. Osawa. 1994. *J. Dairy Sci.*, 77, 930.
13. Saito, T., M. Miura, Y. Fujioka, H. Kitazwa and T. Itho. 1993. *Anim. Sci Technol. (Jpn)*, 65, 105.

14. Hashizume, S., Kuroda, K., and H. Murakami. 1983. *Biochim. Biophys. Acta*, 763, 377.
15. Gray, A. L. and A. R. Date. 1983. *Analyst*, 108, 1033.
16. Kanno, C., S. Hwangbo and N. Azuma. 1995. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 848.
17. Suzuki, J., A. Kondo, I. Kato, S. Hase and T. Ikenaka. 1991. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 283.
18. Kijimoto Ochiai, S., Y. Katagiri and H. Ochiai. 1985. *Anal. Biochem.*, 147, 222.