

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580153

研究課題名（和文） 多機能性乳タンパク質の生化学的性質の解明とその応用に関する研究

研究課題名（英文） Biochemical properties of a multifunctional protein in milk and its application

研究代表者

川上 浩（KAWAKAMI HIROSHI）

共立女子大学・家政学部・教授

研究者番号：90458860

研究成果の概要（和文）：多機能性乳タンパク質であると言われているラクトフェリンに結合している生理活性成分を、独自の分離精製技術や検出技術で明らかにするとともに、精製したラクトフェリン結合成分の生理作用を、培養細胞や実験動物の系で個別に評価した。既に報告されているラクトフェリンの生理作用との相関を調べたところ、いくつかの生理作用がラクトフェリン結合成分に起因している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Biologically-active compounds that bound to lactoferrin were isolated by several chromatographic techniques, and their activities were individually evaluated by *in vitro* and *in vivo* experiments. The multifunctional properties of lactoferrin were suggested to be due to some compounds interacted with lactoferrin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

乳は、誕生直後の哺乳類が唯一の栄養補給源とする生体分泌液であり、新生児に必要とされるすべての栄養素を含んでいる。また、未熟な新生児の生理的機能を補うために、様々な生理活性成分も含有する。その生理活性成分の一つであると言われているラクトフェリン（LF）は、鉄をキレート結合して赤色を呈する分子量 80kDa の糖タンパク質であ

る。現在までに、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗酸化作用、抗炎症作用、免疫調節作用、鉄吸収調節作用、骨代謝調節作用、脂質代謝調節作用および鎮静作用など、10種類以上の生理作用が報告されている。単一物質としては生理作用の多様性が極めて高く、乳の一成分でありながら医学系学術情報データベース MEDLINE で文献検索を行うと、6,000 報以上の研究報告を数える状況にある。

LF 含量が最も多い体液はヒトの母乳 (1~10 mg/ml) であるが、血中には 0.1~2 μ g/ml 程度の LF しか存在しない。しかしながら、*in vitro* で LF の生理作用を評価した培養細胞実験では、培地中に添加しなくてはならない LF の有効量が極めて多いことに疑問が残る。また、遺伝子組み換え型 LF を用いた実験では、乳由来の LF にみられる生理作用が確認できない報告例などもある。現在のところ、その原因は LF の糖鎖構造や高次構造の違いにあるとされており、LF 自体が多様な機能を保有するタンパク質であるという考え方をもとに、研究が進行している現状にある。

しかしながら、本研究代表者は、LF の様々な生理作用が、LF 自体の多機能性に起因するだけではなく、複数の生理活性成分が LF に特異的に結合していることによって発現されているのではないかという仮説を立て、研究を進めることとした。こうした様々な生理活性成分は、LF の一般的な分離方法であるイオン交換クロマトグラフィーのみでは精製が困難であり、一定の特異性をもって LF と結合しているものと思われる。したがって、LF の生理作用に関して研究者ごとに異なる結果が報告されている原因は、市販されている LF の不均一性にあり、生理活性の本体が LF に結合している各種成分の種類や量に由来する可能性があると考えた。また、LF 自体の生理的意義に関しては、LF に特異的に結合している生理活性成分を、ターゲットとなる細胞や作用部位に送り届けるキャリアーとして働いている可能性や、生体内の消化作用から生理活性成分を守っている可能性などが考えられる。

本研究代表者らは、ヒト消化管粘膜上皮細胞の刷子縁膜上に、LF に特異的なレセプターがあることをすでに明らかにしている。LF は哺乳類の乳の中でも、ヒトの母乳に特に多く含まれるタンパク質であることから、LF と挙動を共にする生理活性成分を明らかにすることができれば、安全性の高い乳児用の医薬品や健康補助食品素材の開発に結びつく可能性がある。特に、母乳栄養児と人工栄養児における免疫機能や神経系発達機能の違いが、様々な生理活性成分と結合する LF の含有量において、母乳と牛乳の間に 10~100 倍の差があることに起因するという仮説に立つと、本研究がもたらす発展性は計り知れない。母乳栄養児が様々な感染症にかかりにくい理由としては、母乳が IgA などの免疫抗体を含有することが考えられている。しかしながら、こうした抗体成分は母親の感染履歴に依存するものであり、抗原特異的な感染防御因子が、新生児が生育する環境でも現実的に機能する可能性はそれほど高くないと思われる。さらに、知能の発達や精神安定化能力に関しても、母乳栄養児と人工栄養児の間に

差があるという研究もある。こうした観点からも、母乳中に含まれる免疫機能調節因子あるいは神経機能調節因子の解明が待たれるところである。21 世紀の少子高齢社会においては、乳幼児および高齢者のための医療や健康維持が益々重要視される中で、母乳と牛乳の最も大きな差の一つである LF の生化学的特性に起因する生理作用の違いを、LF 結合成分の解明という観点から研究を進めていくことは、極めて独創的で発展性の高いものであると考える。

本研究により、現在までに報告されてきた様々な LF の生理作用が、LF と親和性をもつ他成分に由来することが明らかになれば、活性中心成分を単独で分離精製することによって、低投与量で有効性の高い医薬品素材や機能性食品素材とすることができる。また、遺伝子組換え技術などで活性中心成分自体を生産することも可能となり、医薬品への実用化をより早めることができる。さらに、LF を生理活性成分の輸送タンパク質、あるいは活性中心成分の安定化タンパク質という観点でとらえることによって、真の生理活性成分をターゲット細胞に直接送り届ける生理学的条件の設定が可能となり、乳という極めて安全性の高い天然物を基盤にしたドラッグデリバリーシステム (DDS) などの開発にも道が開ける可能性がある。

2. 研究の目的

LF に結合している生理活性成分を、独自の分離精製技術や検出技術で明らかにするとともに、分離した LF 結合成分の生理作用を培養細胞や実験動物で個別に評価し、すでに報告されている LF の生理作用との相関を調べながら、LF が保有すると言われている生理作用の本体を明らかにする。特に、LF は経口的に摂取する乳由来のタンパク質であることから、消化管粘膜の上皮細胞、および粘膜固有層の免疫細胞などに及ぼす生理作用について明らかにする。こうして生理作用の本体を把握した後に、真の有効成分を乳から抽出するだけではなく、遺伝子組換え技術などで生産し、医薬品素材あるいは機能性食品素材としての有効利用を図ることにつなげる。

3. 研究の方法

(1) LF 結合タンパク質の分離精製 : Superdex 200 pg カラムおよび TSK gel G2000SW カラムによるゲルろ過クロマトグラフィー、SP-Sepharose カラムによる陽イオン交換クロマトグラフィー、Heparin-Sepharose CL-6B カラムおよびモノクローナル抗ウシ LF 抗体固定化カラムによるアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせて、LF に結合しているタンパク質を分離精製した。

- (2) 低分子成分の分離精製：LF 溶液を分画分子量 20kDa の限外ろ過膜および電気透析膜で処理し、分子量 20kDa 以下の低分子画分を分離した。さらに、HPLC システムで TSKgel SP-5PW によるイオン交換クロマトグラフィー、Superdex Peptide PC 3.2/30 によるゲル濾過クロマトグラフィー、および XBridge BEH300 C18 による逆相クロマトグラフィーを行い、分子量 20kDa 以下の低分子成分を精製した。
- (3) 構造解析およびペプチド合成：分離精製したタンパク質については、ペプチドシークエンサーで N 末端アミノ酸配列を解析した。低分子画分ペプチドについては、LC/MS/MS およびマイクロシーケンス法で、分子量とアミノ酸配列を解析した。アミノ酸配列が明らかになったペプチドは、ペプチドシンセサイザーで F-moc 法により化学合成した。
- (4) 株化培養細胞による機能性評価：ヒト結腸腺癌上皮細胞株 Caco-2 のサイトカイン産生調節作用について、分離精製した LF 結合タンパク質の活性を比較検討した。また、ヒト胎児腸管細胞 INT407 株、マウス消化管から分離した T 細胞、B 細胞、樹状細胞などを用いて、LF の生理機能としてすでに報告されているサイトカイン産生調節作用や IgA 抗体産生作用について、LF 結合タンパク質の活性を比較検討した。具体的なサイトカインとしては、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-17、IL-18、IFN- γ 、TNF- α などを測定し、消化管における免疫調節作用や抗炎症作用について解析した。一方、骨芽細胞増殖作用は、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用い、DNA への BrdU の取込量を測定することで調べた。骨吸収抑制作用の測定では、RANKL 刺激により破骨細胞に分化させたマウスマクロファージ単球系細胞株 RAW264 を用いた。蛍光標識コンドロイチン硫酸を結合させたリン酸カルシウム上で破骨細胞を培養し、ピット形成を反映する蛍光強度で骨吸収活性を評価した。
- (5) 実験動物を用いた機能性評価：BALB/c 系マウス、免疫疾患モデル NOD マウス、抗原特異的アレルギーモデル OVA-IgE マウスを用いて、消化管上皮細胞や免疫担当細胞の機能や、サイトカイン産生に及ぼす影響について調べた。

4. 研究成果

- (1) LF 結合タンパク質の分離：Superdex 200 pg カラム、TSKgel G2000SW カラム、SP Sepharose カラム、Heparin-Sepharose CL-6B カラム、およびモノクローナル抗ウシ LF 抗体固定化カラムを用いて、LF 結合タンパク質を分離精製した。N-末端

アミノ酸配列を解析した結果、ラクトパーオキシダーゼ (LPO)、アンジオジェニン、ラクトジェニン、リボカラリン、リボヌクレアーゼ、シスタチン C、プラスミン、セクレタリーコンポーネント、インスリン様成長因子、繊維芽細胞成長因子結合タンパク質、およびその他複数のタンパク質が同定された。

- (2) LF 結合低分子成分の分離精製：分画分子量 20kDa の限外ろ過膜で分子量 20kDa 以下の低分子画分を分取した後、電気透析によりミネラル成分を除去した。HPLC システムで、TSKgel SP-5PW によるイオン交換クロマトグラフィー、Superdex Peptide PC 3.2/30 によるゲル濾過クロマトグラフィー、および XBridge BEH300 C18 による逆相クロマトグラフィーを行い、UV220nm で検出された複数の画分を分取した。各 HPLC 画分に含まれるペプチドの分子量とアミノ酸配列は、LC/MS/MS とマイクロシーケンス法で明らかにした。また、Fmoc 法を用いてペプチドの化学合成を行い、分離精製物および化学合成物の生理活性を比較した。
- (3) 生理作用の比較検討：*in vitro* 実験系で LF の生理作用として報告されているいくつかの機能が、LF 結合タンパク質に起因することが、精製 LF の作用と比較することで明らかとなった。すなわち、LF 結合タンパク質を除去した LF のプロテアーゼ活性、リボヌクレアーゼ活性、およびシステインプロテアーゼ阻害活性を常法に従って測定した。その結果、LF には活性がなかったが、プラスミン、リボヌクレアーゼ、およびシスタチン C には、それぞれの活性が認められた。一方、骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖促進作用は、LF よりもインスリン様成長因子の活性の方が高かった。また、破骨細胞による骨吸収作用は、培養液中への LF 添加では抑制されなかったが、アンジオジェニン添加によって抑制された。さらに、Caco-2 細胞による炎症性サイトカイン IL-8 産生を抑制する成分を、LF 結合タンパク質の中から探索したところ、LPO が IL-8 産生抑制作用をもつことが明らかとなった。
- (4) 免疫調節作用の評価：自己免疫疾患モデル NOD マウスの脾臓細胞を用いて、(1) 項および (2) 項で分離精製した画分の各種サイトカイン産生促進作用を比較した。各サイトカインに対する特異抗体を用いた固相酵素免疫検定法 (ELISA) で、培養上清中のサイトカイン濃度を測定したところ、抗炎症サイトカイン IL-10 の産生を促進する作用が、LPO に確認された。LF には抗炎症作用が報告されているが、今回の分離操作で精製した LF には、

IL-10 産生促進作用はみられなかった。したがって、LF の抗炎症作用の活性本体の一つは、LF に結合している LPO であると考えられた。そこで、LPO の IL-10 産生促進作用のメカニズムを、自己免疫疾患モデル NOD マウスの脾臓細胞を用いて解析した。誘導された IL-10 産生細胞は、I 型糖尿病発症の引き金になるグルタミン酸デカルボキシラーゼに特異的な自己免疫応答を抑えた。磁気細胞分離法 (MACS) で脾臓細胞から CD4⁺T 細胞を分離し、同様の実験に供した結果、IL-10 産生促進作用には T 細胞のみが関与するわけではないことが分かった。

BALB/c 系マウスの脾臓細胞と、MACS で分離した脾臓由来 CD4⁺T 細胞を、ConA あるいは抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体とともに、LPO を添加して培養し、培養液中の IL-10 濃度を測定したところ、ConA 存在下で LPO の IL-10 産生促進作用が確認された。抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体の存在下では、IL-10 産生が促進されなかったことから、LPO の作用には、T 細胞以外の細胞による刺激の関与が考えられた。また、鶏卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA) を免疫した BALB/c 系マウスのリンパ節細胞を抗原とともに培養し、抗原特異的な T 細胞応答が、LPO の作用によって抑制されるかどうかを調べた。具体的には、BALB/c 系マウスの脾臓細胞および脾臓由来 CD4⁺T 細胞を用いた。その結果、LPO が濃度依存的に抗原特異的な T 細胞応答を抑制することが明らかとなった。

鶏卵アレルギーモデルとして開発された OVA-IgE マウスを用いた実験でも、脾臓細胞の抗原依存的増殖応答を、LPO が抑制することが明らかとなった。また、OVA に特異的な IgE 抗体遺伝子を、BALB/c マウスにトランスジェニックしたモデル動物においても、LPO の抑制作用が明らかになった。これらの結果から、LPO が鶏卵アレルギーの予防や、その症状の緩和に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 12 件)

- ① 生方孝明、鶏卵アレルギーに特異的な免疫応答に及ぼす LPO の抑制効果、日本食品免疫学会、2011 年 10 月 18 日、東京大学
- ② 川上浩、高齢者の免疫機能に及ぼす腸溶性 LF の効果、酪農科学シンポジウム、2011 年 9 月 22 日、フォレスト仙台
- ③ 真下和樹、自己抗原および牛乳 LPO により誘導される IL-10 産生細胞、日本動物細胞工学会、2011 年 7 月 22 日、東京大

学

- ④ Hiroshi Kawakami、Effect of enteric coated LF supplementation of the immune status of healthy elderly individuals、International Conference on Lactoferrin、May 8, 2011、HOTEL EL CID Mazatlan Mexico
- ⑤ 榎本淳、LPO および抗原刺激により誘導される IL-10 産生型制御性細胞、日本農芸化学会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学
- ⑥ Atsushi Enomoto、Suppressive effects of LPO on the induction of autoimmune responses in NOD mice、International Congress of Immunology、August 23, 2010、Kobe Convention Center
- ⑦ 柏木春香、LPO の T 細胞増殖応答抑制効果ならびに IL-10 応答誘導効果、日本食品免疫学会、2010 年 6 月 1 日、東京大学
- ⑧ 中村圭介、LPO により誘導される IL-10 産生型制御性細胞、日本食品免疫学会、2010 年 6 月 1 日、東京大学
- ⑨ 榎本淳、LPO はマウス脾臓細胞の IL-10 応答を誘導する、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ⑩ 知花誠也、LPO がマウス脾臓細胞の IL-10 応答を誘導するには T 細胞の活性化が必要である、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ⑪ 野澤清史、LPO は OVA に特異的なマウス T 細胞応答と IgE 応答を抑制する、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学
- ⑫ 一ノ瀬薫、LPO により誘導される IL-10 産生細胞は NOD マウスの自己抗原特異的 T 細胞応答を抑制する、日本農芸化学会、2010 年 3 月 28 日、東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 浩 (KAWAKAMI HIROSHI)
共立女子大学・家政学部・教授
研究者番号：90458860