

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：32608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K07745

研究課題名(和文)多機能性乳タンパク質の生理活性発現機構の解明とその応用に関する研究

研究課題名(英文)Biological activities of multifunctional protein in milk and their applications

研究代表者

川上 浩(Kawakami, Hiroshi)

国立女子大学・家政学部・教授

研究者番号：90458860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳中の塩基性タンパク質であるラクトフェリン(LF)の多様な生理作用が、LFと特異的に結合している微量活性成分に起因するのではないかという仮説のもとに、LFが保有する様々な生理作用の活性本体を明らかにし、医薬品あるいは機能性食品等の有効成分として活用することを目標とした。特に、ヒト試験で明らかとなったLFの免疫調節作用の活性本体を探索し、微量活性成分の輸送タンパク質としてのLFの機能性を解明することを目指した。未変性状態で単離したLF結合成分の炎症反応調節作用や免疫細胞活性化作用などを、培養細胞実験および動物実験で比較検討し、LFが保有する生理作用の活性本体を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラクトフェリン(LF)は、免疫調節作用、抗ウイルス作用、抗菌作用、鉄代謝調節作用、骨代謝調節作用、内臓脂肪低減作用など、20種類以上の生理作用をもつことが報告されている。単一物質としては生理作用の多様性が極めて高く、乳の成分でありながらPubMedで文献検索を行うと、現在までに8,000報以上の様々な研究報告がある。そこで、LFの多種多様な生理作用が、LFと特異的に結合している複数の生理活性成分に起因するのではないかという仮説を立てて研究を行い、LFが保有するいくつかの生理作用の活性本体を明らかにした。本研究は今後のLF研究の方向性を示唆し、革新的な進展をもたらすものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility that, besides the multi-functionality derived from the lactoferrin (LF) itself, LF expressed behaviors in conjunction with other bioactive compounds. The proteins and peptides present in LF used as a reagent and food ingredient were examined using LC-MS/MS proteomic analysis. Impurities in LF were fractionated using multi-stage methods, including affinity chromatography and ion exchange chromatography, and their bioactivities were individually evaluated by in vitro and in vivo experiments. Several components that exhibit bioactive characteristics, including immunomodulating effects and iron delivery metabolism were present among the impurities. The multifunctional properties of LF were suggested to be due to some compounds interacted with LF.

研究分野：農学

キーワード：食品機能

## 1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリン (LF) は、乳、涙、唾液などの外分泌液や、好中球に含まれる分子量約 80kDa の糖タンパク質である。2つの lobe (N-lobe と C-lobe) からなる高次構造をもち、各 lobe に 1カ所ずつ存在する鉄結合部位に、鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) がキレート結合する。LF と鉄の結合定数は  $10^{20} \text{ M}^{-1}$  であり、血液中の鉄結合性タンパク質であるトランスフェリン (TF) と鉄の結合よりも 30 倍ほど強い。TF が pH6 以下で鉄を遊離するのに対し、LF は pH4 以下になるまで鉄を離さない。LF を最も多く含むものは、ヒトの初乳 (5~10 mg/ml) である。常乳でも 1~2mg/ml の LF を含有することから、新生児は出生後数日間に 1 日あたり約 3g、その後も約 1g の LF を母乳から摂取している。LF は新生児の未熟な生体防御機能を補完する母乳成分であると考えられていることから、抗菌作用、抗ウイルス作用、免疫調節作用 (抗炎症・免疫賦活など)、消化管成熟化作用、鉄代謝調節作用などが主に研究されてきた。しかしながら、近年では骨代謝調節作用、内臓脂肪低減作用、抗がん作用など多種多様な生理作用が報告されている。新生児が摂取した母乳中の LF は、消化酵素による加水分解を完全には受けず、抗体との反応性や鉄結合力を維持した状態で便から検出される。この知見から、高次構造を維持した状態の LF が、消化管内で生体防御に関与する可能性が示唆されていた。

本研究代表者は、LF を固定化したアフィニティー担体を用いて、ヒト小腸上皮細胞刷子縁膜から LF レセプターを分離した。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果から、LF レセプターの分子量は 114 kDa であり、還元下での分子量シフトから、38 kDa のフラグメントがジスルフィド結合で結合した 3 量体構造をもつことを明らかにした。また、アスパラギン結合型糖鎖を切り出すペプチド *N*-グリコシダーゼ F 処理で、38 kDa のフラグメントは 34kDa となり、分子量 4kDa の糖鎖をもつことも判明した。その後、ヒト小腸粘膜から調製した LF レセプターの数カ所のアミノ酸配列をもとに、発現遺伝子配列断片データベースを解析し、仮想 LF レセプター遺伝子が構築された。これを理論的に翻訳したタンパク質の分子量が 34kDa であったことから、仮想遺伝子が LF レセプターと同じ配列をコードしていると仮定し、ヒト小腸の cDNA ライブラリーを用いて、ヒト LF レセプターの cDNA がクローニングされた。その遺伝子配列から理論的に導かれたアミノ酸配列は、インテレクチンとの相同性を示すことが報告された。

消化機能が完成された成人においては、経口摂取した LF が小腸粘膜上皮細胞の LF レセプターに到達し、生体内で様々な生理作用を発揮するためには、胃内での消化から LF を守ることが重要である。そこで本研究代表者は、腸溶剤化した LF の経口摂取による免疫調節作用を、健康な高齢者 (年齢 66~87 歳の男女: 62 名) を対象にした無作為化二重盲検プラセボ対照試験で調べた。腸溶性 LF サプリメントおよびプラセボサプリメントを調製し、3 ヶ月間にわたり被験者に毎日摂取していただいた。試験開始時、サプリメント摂取開始 1、2 および 3 ヶ月目に採血し、末梢血の血球機能分析を行った結果、腸溶性 LF サプリメントを 3 ヶ月間経口摂取した高齢者の好中球貪食能および NK 細胞活性が亢進することが確認された。したがって、腸溶剤化技術が胃内での LF の加水分解を防ぐことで、小腸粘膜の LF レセプターとの結合を可能にし、免疫機能の向上に寄与したものと考えられた。

免疫担当細胞の LF レセプターに関する研究は、好中球が LF を産生することから 1980 年代より盛んに行われてきた。最初に LF レセプターが同定された細胞は、マウスの腹腔マクロファージである。マクロファージは、免疫系を活性化する LPS のレセプターである CD14 を発現する。CD14 は分子量 55kDa の可溶性糖タンパク質であり、血清中に 2~6  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で存在する。また、単球やマクロファージの細胞膜表面に、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質として存在する。LF は、CD14 や CD14/LPS 複合体と結合 (結合定数:  $6.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) し、抗炎症作用を示す。ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は、細胞膜に 4 種類の LF レセプター (分子量: 35kDa、50kDa、60kDa、80kDa) をもち、マクロファージへと分化するにつれて LF との結合力を高める。LF が THP-1 細胞に結合すると、LPS 誘導型サイトカイン産生が抑制されることから、LF が細胞に取り込まれて核内に移行した後、転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化の抑制に関与していると考えられている。また、LF はフィトヘマグルチニンで活性化された T 細胞に結合するが、非活性化型 T 細胞には結合しない。リガンドプロット法による顕微鏡観察によって、活性化型 T 細胞に LF レセプター (分子量 105kDa) の発現が確認された。T 細胞に対するヒト LF の結合部位は、LF 分子 N-lobe の第一ドメインに存在する。また、ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat の培養上清から、可溶性 LF レセプターが精製された。このレセプターに対するモノクローナル抗体を用いて、Jurkat 細胞における LF レセプターの局在性を調べたところ、細胞膜だけでなく細胞質基質にも確認された。Jurkat 細胞の LF レセプターに結合した LF は、細胞内に取り込まれた後にエンドソーム小胞内に保持され、再び細胞外に放出された。また、LF は濃度依存的に Jurkat 細胞表面の CD4 密度を高めた。CD4 を発現するシグナル伝達系で、LF は様々なタンパク質のチロシンリン酸化反応を誘導し、分化や増殖に関わる調節酵素 MAPK の活性を高めた。また、T 細胞に特異的なプロテインキナーゼ p56lck も、LF による Jurkat 細胞の成熟化をもたらす経路に関与した。一方、LF は B 細胞にも結合して細胞内に取り込まれ、再び細胞外へと放出される。その結合は、LF の N 末端に分布する塩基性アミノ酸領域や、分子全体の塩基性に起因する。

生体内の LF は、血液中に 0.1~2 µg/ml の濃度で常に存在する。同じ鉄結合性蛋白質である TF の血中濃度 (3~5mg/ml) に比べると非常に微量であるが、感染が起こると好中球から産生され、血中の LF 濃度が高まる。LF 発見の当初は、細菌の増殖に必要な鉄を LF が捕捉し、細菌増殖を止める静菌作用が目玉された。しかしながら、LF が捕捉できる量以上の鉄が体内には存在するため、過度な免疫反応の調節が、内因性 LF の存在意義の一つであると最近では考えられている。たとえば、好中球が細菌を攻撃するために放出するヒドロキシラジカルが、周囲の正常な組織に障害を与えないように、ヒドロキシラジカル生成に必要な鉄をキレート結合し、その生成量を調節するという直接的な抗炎症作用が明らかにされている。また、LF が免疫担当細胞を誘導あるいは抑制することで、免疫系を調節する間接的な抗炎症作用も知られている。LF が免疫担当細胞にレセプターを介して結合することで、サイトカイン産生、顆粒球やリンパ球の分化・増殖が制御される。好中球に内在する LF の鉄結合量は少ないが、血中に放出されると血清鉄とキレート結合し、レセプターとの結合力が高まる。鉄を結合していない apo 型 LF は、鉄結合型 LF と比べて単球やマクロファージとの結合力が弱い。GM-CSF や GM-CSF 産生促進作用をもつモノカインの産生をほとんど抑制しない。一方、経口摂取した LF のような外因性 LF の免疫調節作用についても様々な研究がある。小腸上皮細胞の刷子縁膜に LF レセプターがあることから、intact な状態の LF が小腸から体内に取り込まれる可能性が示唆される。初乳をウシに投与すると、初乳に多い LF が血中に移行することが明らかにされており、免疫組織学的な観察でも、小腸上皮細胞の細胞膜や細胞質、粘膜固有層、リンパ管内のリンパ球やマクロファージに LF 陽性像が確認された。また、マウスに LF や LF の N 末端ペプチドを経口投与すると、粘膜固有層、リンパ組織および末梢血における T 細胞や NK 細胞が増加した。したがって、LF は小腸で吸収された後、粘膜固有層およびリンパ管を經由して運ばれ、左鎖骨下静脈から全身の循環血液中に輸送される可能性が考えられた。また、LF は小腸上皮細胞やマクロファージの IL-18 の産生を促進する。IL-18 は、T 細胞や NK 細胞による IFN- $\gamma$  の産生や、T 細胞や NK 細胞の反応性を高める。一日あたり 300mg/kg 体重の LF を、7 日間マウスに経口投与した実験では、腸管粘膜におけるカスパーゼ 1 と IL-18 の産生が促進された。IL-18 は分子量 24kDa の前駆体の形で生合成され、カスパーゼ 1 の作用で分子量 18kDa の活性型に変換される。したがって、経口摂取した LF が小腸上皮細胞にレセプターを介して取り込まれた後、核内に移行してカスパーゼ 1 の発現を高め、IL-18 前駆体から IL-18 の生成を促進するメカニズムが示唆されている。

このような状況の中、*in vitro* 実験での LF の有効量が極めて多いことに対する疑問や、遺伝子組換え型 LF と乳由来 LF の生理作用の違いなども報告されている。それらの原因は、LF の糖鎖構造や高次構造の差にあるとされており、LF 自体が多機能性をもつタンパク質であるという考え方を基盤に研究が進められているのが現状である。しかしながら、本研究代表者は“LF の多様な生理作用が、LF 自体の多機能性に由来するのではなく、複数の生理活性成分が、LF と特異的に結合していることで発揮されているのではないか”という仮説を立てて研究を推進してきた。例えば、MALDI-TOF-MS によるプロテオーム解析等で、100 種類以上の物質が市販の LF に含まれることを明らかにするとともに、その中の 94 種類のタンパク質やペプチドの構造や分子量などを明らかにしてきた。市販の LF に夾雑している様々な生理活性成分は、通常の LF 精製法では分離が困難であり、一定の特異性をもって LF と結合しているものと考えられる。現在、世界で研究に供されている市販 LF の調製法は、特許等の制約で試薬メーカーや乳素材メーカーごとに異なっており、LF 結合成分の種類や量に違いがあることを、本研究代表者はすでに明らかにしている。したがって、LF の生理作用に関する結果が、研究グループによって異なることが散見される原因の一つは、市販 LF の不均一性にあり、生理活性の発現が、LF に結合している各種生理活性成分の種類や量に依存している可能性があるものと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、“乳中の塩基性糖タンパク質である LF の多様な生理作用が、LF と特異的に結合している微量成分 (LF 結合成分) に起因するのではないか”という仮説のもとに、LF が保有する様々な生理作用の活性本体 (真の生理活性成分) を明らかにし、医薬品あるいは機能性食品等の有効成分として活用することを目的とする。特に、無作為化二重盲検プラセボ対照ヒト試験で、本研究代表者らが明らかにした腸溶性 LF の免疫調節作用の活性本体を特定するとともに、LF 結合成分の輸送タンパク質としての LF の機能性を解明することを目指す。具体的には、ヒト試験で明らかとなった LF の免疫調節作用のメカニズムを解明するために、プロテオーム解析で構造決定した成分を未変性状態で単離し、炎症反応調節作用や免疫細胞活性化作用などを、LF 自体の作用と比較しながら培養細胞系で明らかにする。活性が確認された LF 結合成分については、生体成分精製装置により動物実験での経口投与に十分な量を未変性状態で分離精製する。免疫機能を評価するための動物実験では、LF 結合成分の単独投与と LF 結合型での投与を比較し、既に報告されている LF の効果を対照に解析を行いながら、生理活性成分の輸送タンパク質としての有用性を確認する。

## 3. 研究の方法

(1) LF 結合成分の未変性分離: プロテオーム解析で構造決定した LF 結合成分の中で、精製時に構造変化が起こり、生理活性を維持した状態で分離できなかった成分を、生体成分精製装置 AKTAexplorer10S を用いて有機溶媒を使用しない生理的条件下で分離した。分離カラムには、抗

LF モノクローナル抗体を固定化したアフィニティー担体 Sepharose High Performance、ヘパリンを固定化したアフィニティー担体 Heparin Sepharose 6 Fast Flow、陽イオン交換担体 SP Sepharose Fast Flow、陰イオン交換担体 Q Sepharose Fast Flow を充填した。また、Superdex 200pg によるゲルろ過クロマトグラフィーも行った。さらに、低分子ペプチドについては、Superdex Peptide 10/300GL で精製した。

(2) 培養細胞系での活性評価：生理的条件下で精製できた LF 結合成分について、老齢 C57BL/6 マウス、抗原特異的免疫疾患モデルマウス (OVA23-3 マウス、D011.10 マウス)、免疫不全症モデル NOD マウス等から分離した各種免疫細胞 (T 細胞、B 細胞、樹状細胞、NK 細胞、好中球等) を用いて免疫調節作用を調べた。また、株化培養マスト細胞 RS-ATL8 を用いたルシフェラーゼアッセイ法で炎症反応調節作用を調べた。さらに、市販のヒト樹状細胞、ヒト好中球およびマウスマクロファージ RAW264.7 も用いた。精製した LF 結合成分の刺激下におけるサイトカイン産生量を測定し、免疫調節作用を評価した。サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 など) の定量は、各サイトカインに対する特異抗体を利用した ELISA 法で行った。消化管における鉄吸収機構に及ぼす作用は、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞およびヒト肝細胞株 HepG2 細胞を用いて評価した。HepG2 細胞を培養したマルチウエルプレート内に、ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞を MF 膜上で培養したインサートカップを入れ、インサート内が腸管腔側で、マルチウエル内が血流側となる腸管上皮-肝細胞共培養系を構築した。インサート側の培養液にクエン酸第二鉄を添加した 3~5 日後に、LF 結合成分および高度精製 LF をインサート側あるいはマルチウエル側に添加した。Caco-2 細胞をビーズ入りマイクロチューブ内で破碎し、抗フェリチン抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法で、Caco-2 細胞によるフェリチン合成量を測定した。Caco-2 細胞に取り込まれた後にマルチウエル側へ移行した鉄の量も測定するとともに、HepG2 細胞が産生したヘプシジンの量を、抗ヘプシジン抗体によるサンドウィッチ ELISA 法で測定した。さらに、Caco-2 細胞膜を界面活性剤で溶解した画分を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロッティング後に抗フェロポーチン抗体を用いた免疫染色法で、基底膜におけるフェロポーチンの発現を検出した。

(3) 実験動物系での活性評価：抗原特異的免疫疾患モデルマウス (OVA23-3 マウス、D011.10 マウス)、免疫不全症モデル NOD マウスおよび老齢 C57BL/6 マウスを用いて、高度精製 LF および精製 LF 結合成分の経口摂取時における免疫機能 (サイトカイン産生調節作用、IgA 抗体産生促進作用など) への影響を調べた。サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12 など) および IgA 抗体の定量は、ターゲットに対する特異抗体を利用した ELISA 法で行った。

(4) 唾液タンパク質との結合試験：LF 結合成分中で同定された分子量 1.4kDa の LF の C-lobe 由来ペプチドは、LF の抗齲蝕作用の活性中心であることが報告されている。LF の抗齲蝕作用は、LF ペプチドが唾液タンパク質 SRCRP2 に結合することで、*S. mutans* の表層タンパク質と唾液タンパク質との相互作用を阻害することで起こる。そこで、多段階クロマトグラフィーで精製した高純度 LF、LF の C-lobe 領域および LF ペプチドについて、唾液タンパク質 SRCRP2 との相互作用を X 線結晶構造解析および NMR 解析で調べた。

#### 4. 研究成果

(1) LF 結合成分のアフィニティー精製：プロテオーム解析で構造決定した LF 結合成分の中で、分離精製時に起こる構造変化によって、生理活性を維持した状態で単離することができない成分を、生物学的親和性をもとにしたアフィニティー精製で分離した。生体成分精製装置 AKTAexplorer10S を用いて、抗 LF モノクローナル抗体を固定化した Sepharose 担体を充填したカラムに LF 溶液を通液し、主要成分である LF を担体に吸着させ、イオン強度等を高めた溶液で担体を洗浄し、素通り画分および洗浄画分を回収した。さらに、各種サイトカインおよび各種増殖因子に対する市販抗体を固定化した Sepharose 担体に、素通り画分および洗浄画分を通液し、pH 変化により溶出操作を行い、ターゲットとしたサイトカインおよび増殖因子を単離精製した。SDS-PAGE による純度算定において、95%以上の純度が得られた精製 LF 結合成分は 34 種類であった。酵素類の精製は不純物の混入が多く、SDS-PAGE で純度 90%以上の目的物は精製できなかった。酵素類の分離には、抗体だけではなく基質も組み合わせたアフィニティー精製が必要であると考えられたので、各酵素の基質を Sepharose 担体に固定化したアフィニティーカラムで精製を試みた。また、陽イオン交換担体 SP Sepharose Fast Flow および陰イオン交換担体 Q Sepharose Fast Flow では、高純度の低分子ペプチドは得られなかった。そこで、逆相ペプチドカラム XSelectPeptide CSH C18 を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でさらに精製を加え、ペプチド 14 種類を単離した。この中で、動物試験に供せる量を精製できたペプチドは 2 種類であった。

(2) LF 結合ペプチドの LC-MS/MS 解析：LF 結合成分の中で、活性評価試験のために充分な量が精製できなかったペプチドを化学合成し、モノクローナル抗 LF 抗体を固定化したカラムで精製した高純度 LF との免疫調節作用の違いを比較した。また、分子量 8,000 未満にターゲットを絞った条件で、LF 結合成分に含まれるペプチドを網羅的に明らかにするため、LC-MS/MS ショットガン解析を行った。その結果、LF 結合成分中に 300 種類以上のペプチドの存在が明らかとなった。これらペプチドの分子量は 700~4,000 の範囲にあり、現在まで公知になっていないペプチドも含まれていた。

(3) LF 結合ペプチドの抗炎症作用 (*in vitro*): マウスマクロファージ RAW264.7 およびヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を、LPS および IFN- $\gamma$  で刺激して炎症性サイトカインと一酸化窒素(NO)を産生させ、高純度 LF および各種ペプチドの抗炎症作用を調べた。培養上清中の炎症性サイトカインを特異抗体による ELISA 法で測定した結果、複数のペプチドに TNF- $\alpha$ 、IL-1 および IL-6 の産生を抑制する活性がみられた。また、Muse セルアナライザーを用いて、生細胞内部で産生された NO 量を測定したところ、NO 産生を亢進するペプチドと抑制するペプチドの両方が確認できた。また、RAG2KO/OVA23-3 マウスと BALB/c マウスを交配させた RAG2KO/OVA23-3 $\times$ BALB マウスの脾臓細胞を用いて抗炎症作用を調べた。市販 LF、抗 LF モノクローナル抗体固定化カラムで市販 LF から精製した高純度 LF、抗 LF モノクローナル抗体固定化カラムの非吸着画分を HPLC でさらに分画したタンパク質およびペプチドを試料とした。RPMI1640 培地で調製したマウス脾臓細胞の培養液に試料を添加した後、オボアルブミン(OVA)で抗原刺激して 24 時間培養した。培養上清中のサイトカイン(IL-4 および IFN- $\gamma$ )産生量を ELISA 法で測定した結果、市販 LF および高純度 LF の添加で、脾臓細胞による IL-4 産生が有意に ( $p < 0.05$ ) 抑制された。一方、IFN- $\gamma$  産生量には有意な変化はみられなかった。抗 LF モノクローナル抗体固定化カラム非吸着画分に含まれるタンパク質の中には、IL-4 産生量を有意に促進する試料もみられたが、ペプチド画分には IL-4 産生量に有意な変化を及ぼすものはなかった。

(4) LF 結合ペプチドの抗炎症作用 (*in vivo*): IL-4 産生抑制作用が確認された高純度 LF を、RAG2KO/OVA23-3 マウスに経口投与する動物試験を行った。アレルゲンとなる OVA を摂取しない群、OVA を摂取する群、および OVA および高純度 LF を摂取する群の 3 群で比較した。マウスから摘出した脾臓の細胞培養液に OVA を添加して 24 時間培養した後、培養液中の IL-4 産生量を ELISA 法で測定した。その結果、OVA 摂取群では IL-4 産生量が有意に増加したのに対し、OVA 摂取とともに高純度 LF を経口投与した群では、IL-4 産生量が低下した。したがって、抗炎症作用は LF 自体にも存在すると考えられた。

(5) 抗齧蝕作用の活性中心探索: プロテオーム解析で構造決定した LF 結合成分の中には LF のペプチド断片が十数種類含まれており、これらは乳中に含まれるプラスミンによって LF が加水分解されたペプチド断片であると考えられた。その中で最も分子量の大きいペプチド断片は、LF の C-lobe 領域(分子量およそ 38kDa)に相当するタンパク質であったが、C-lobe 領域に含まれる複数のペプチド断片も存在した。その一つである分子量 1.4kDa のペプチドについては、LF の抗齧蝕作用の活性中心であることが報告されている。LF の抗齧蝕作用は、LF ペプチドが唾液タンパク質 SRCRP2 に結合することで、*S. mutans* の表層タンパク質と唾液タンパク質との相互作用を阻害することで生じるものと考えられている。そこで、多段階クロマトグラフィーで精製した高純度 LF、C-lobe 領域および LF ペプチドについて、唾液タンパク質との相互作用を X 線結晶構造解析および NMR 解析で調べた。その結果、高純度 LF は唾液タンパク質と強く結合したが、C-lobe 領域および LF ペプチドは相互作用を示さなかった。したがって、LF と唾液タンパク質との相互作用は、C-lobe 領域および LF ペプチドではなく、N-lobe 領域の方に活性中心が存在するか、もしくは N-lobe 領域と C-lobe 領域の協働作用である可能性が示唆された。

(6) 鉄代謝機構における役割: 高度精製 LF および LF 結合成分を用いて、消化管の鉄吸収機構における LF の役割を明らかにする実験を行った。Caco-2 細胞と HepG2 細胞による腸管上皮-肝細胞共培養系のインサート側培養液に、クエン酸第二鉄を添加して 3~5 日間培養した。その際、高度精製 LF および LF 結合成分もインサート側あるいはマルチウエル側に添加した。回収した Caco-2 細胞をビーズ入りマイクロチューブ内で破碎し、抗フェリチン抗体を用いたサンドウィッチ ELISA で、Caco-2 細胞のフェリチン合成量を測定した。また、マルチウエル内の培養液を回収し、Caco-2 細胞に取り込まれた後にマルチウエル側へ移行した鉄の量を測定した。また、HepG2 細胞が産生したヘプシジンの量を、抗ヘプシジン抗体によるサンドウィッチ ELISA 法で測定した。さらに、Caco-2 細胞膜画分を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロッティング後にフェロポーチンの発現を免疫染色で検出した。リン酸塩の存在下でクエン酸第二鉄をインサート内に添加すると、リン酸塩の濃度が高まるにつれて Caco-2 細胞のフェリチン合成量が低下したが、高度精製 LF が共存するとフェリチン合成量の低下は抑制された。Caco-2 細胞単独培養の場合、マルチウエル側に移行した鉄の量は増加し続けたが、HepG2 細胞との共培養では鉄の移行量が飽和状態に達した。高度精製 LF 存在下における HepG2 細胞のヘプシジン産生量の変化から、Caco-2 細胞内のフェリチンからの鉄の移行は、ヘプシジンによって調節されていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koshu Okubo, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Hiroshi Nishi, Jan M. Herter, Tanya Mayadas, Daigoro Hirohama, Kazuo Suzuki, Hiroshi Kawakami, Mototsugu Tanaka, Miho Kurosawa, Shinji Kagaya, Keiichi Hishikawa, Masaomi Nangaku, Toshiro Fujita, Matsuhiko Hayashi, Junichi Hirahashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Lactoferrin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Release in Inflammation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 204-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2016.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 川上 浩	4. 巻 55
2. 論文標題 ラクトフェリンの免疫調節機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食品と開発	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroshi Kawakami
2. 発表標題 Overview: Potential of milk proteins to promote human health
3. 学会等名 International Dairy Federation World Dairy Summit 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好光子、黎黎、片山幸江、盧翌、岡本研、鈴木道生、川上 浩、永田宏次
2. 発表標題 ウシラクトフェリンによるC型肝炎ウイルス感染抑制の分子機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 胡超越、福田玖瑠未、大野陽介、陸鵬、生島智樹、盧翌、岡本研、片山幸江、鈴木道生、川上 浩、永田宏次
2. 発表標題 ラクトフェリンの齶蝕防止作用の構造基盤解析
3. 学会等名 日本ラクトフェリン学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三好光子、李彦君、黎黎、陸鵬、張迷敏、生島智樹、盧翌、岡本研、片山幸江、鈴木道生、川上 浩、永田宏次
2. 発表標題 ラクトフェリンによるC型肝炎ウイルス感染防御の構造基盤解析
3. 学会等名 日本ラクトフェリン学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hu, C., Shojima, T., Katayama, Y., Suzuki, M., Kawakami, H., Nagata, K.
2. 発表標題 Analyzing the molecular mechanism of inhibition of bovine norovirus infection by bovine lactoferrin
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Li, L., Shojima, T., Lu, L., Katayama, Y., Suzuki, M., Kawakami, H., Nagata, K
2. 発表標題 Screening for infection inhibitors of human norovirus GI.17 from food ingredients
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村義隆、山口智大、清野翔平、川上 浩、田之倉優、小島正樹
2. 発表標題 抗貧血薬候補鉄配位ウシラクトフェリンのpH依存による会合機構
3. 学会等名 第34回PFシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松村義隆、山口智大、清野翔平、川上 浩、田之倉優、小島正樹
2. 発表標題 抗貧血薬候補ウシラクトフェリンの酸性pHから中性pHの会合機構
3. 学会等名 第16回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 永田宏次, 川上 浩	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 233
3. 書名 天然系抗菌・防カビ剤の開発と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------