

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02151

研究課題名(和文) 乳タンパク質ラクトフェリンの抗ウイルス・抗菌作用の構造基盤解明と活性増強

研究課題名(英文) Structural basis for antiviral and antibacterial activities of milk protein lactoferrin and its activity enhancement

研究代表者

永田 宏次 (Nagata, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30280788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラクトフェリン(LF)の抗ウイルス活性、抗菌活性、抗炎症活性の分子基盤を明らかにするために、LFの上記活性と関係するウイルスタンパク質、細菌タンパク質、ヒトのタンパク質の組換え体を調製し、分子間相互作用解析や複合体の構造解析・予測を進めた。抗ウイルス活性に関して、食品添加物であるパパインがノロウイルス外被タンパク質P domainを効率的に分解することを見出した。抗菌活性について、虫歯菌(*S. mutans*)表層タンパク質とヒト唾液凝集素との相互作用をLFが唾液凝集素に結合することで阻害することを確認し、複合体の構造解析・予測を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラクトフェリン(LF)の抗菌・抗ウイルス作用について、分子構造に基づく作用機構解明・可視化を進めた。LFがヒト唾液凝集素のSRCRドメインに結合することを示し、SRCRドメインの立体構造を解明し、複合体モデルを構築して、LFが虫歯菌の歯面吸着を阻害するしくみをおおよそ明らかにした。また、LFの抗ウイルス活性を検討する過程で、食品添加物のパパインが効果的にノロウイルス外被タンパク質を分解することを見出した。これらの成果はLFやパパインといった天然タンパク質の機能を活かすことで、ある程度の抗菌・抗ウイルスは実現できることを示すものであり、持続可能な食生活の実現に寄与すると期待している。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular basis of the antiviral and antibacterial activities of lactoferrin (LF), we prepared recombinant viral, bacterial, and human proteins related to the above activities of LF, and proceeded with intermolecular interaction analysis and structural analysis and prediction of complexes. For the antiviral activity, we found that papain, a food additive, efficiently degrades the norovirus outer capsule protein P domain. For antibacterial activity, we confirmed that LF inhibits the interaction between *S. mutans* surface protein and human salivary agglutinin (SAG) by binding to SAG, and analyzed/predicted the structures of the protein complexes.

研究分野：食品物理化学・構造生物学

キーワード：ラクトフェリン C型肝炎ウイルス ノロウイルス 虫歯菌 唾液凝集素 分子間相互作用解析 立体構造解析 作用機構可視化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ラクトフェリン (lactoferrin, LF) は、ヒトをはじめとする哺乳類の母乳 (特に初乳) 涙、唾液、胆汁、膵液、膿液などの外分泌液や、好中球に含まれる分子量約 80 kDa の鉄結合性糖タンパク質である。LF は多機能タンパク質として知られ、(1) 抗菌・抗ウイルス作用、(2) 免疫調節作用、(3) 脂質代謝改善作用、(4) 鉄分の吸収調節作用 (貧血の改善) (5) 腸内細菌の調節作用、(6) 歯周病の症状の改善作用、(7) 痛みの軽減など鎮痛作用、(8) 抗がん作用など、様々な作用を示す。各作用については、確固たるエビデンスに基づくものもあるが、分子レベルでのメカニズム解明が進んでいないものが多かった。

特に、(1) の抗菌作用に関して、LF 自体にも静菌作用がみられるが、LF がペプシンにより消化されて生じるペプチド、ラクトフェリシンはさらに強力に殺菌作用を示す。ラクトフェリシンは細菌の細胞膜に孔を開けて殺菌効果を示すことが示唆されているが、これを実証したデータはまだなかった。また、(1) の抗ウイルス作用に関して、ヒトに感染する 10 種類以上のウイルス (B 型肝炎ウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス 1 型・2 型、アデノウイルス、ネコヘルペスウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス) に対して、LF が感染防御作用を示すことが知られているが、その分子機構はまだ不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、LF の抗ウイルス作用および抗菌作用に着目し、アミノ酸配列が異なるヒト (ウイルスや細菌にとって宿主) およびウシ (大量生産が可能な天然原料) の LF が、ウイルスや細菌をどのように認識して、どのようなしくみで抗ウイルス・抗菌作用を示すのか、定量的分子間相互作用解析および複合体立体構造解析により、分子レベルで可視化して解明することを目的とする。LF の抗ウイルス・抗菌作用の明確な科学的証拠を取得した後に、そのデータに基づいて、より強力な活性をもつペプチド断片、変異体、あるいは誘導体の取得を目指す。

本研究の学術的独自性と創造性は、有機化学合成的な薬剤に頼らず、乳という自然の恵である感染防御タンパク質 LF を、C 型肝炎ウイルス (HCV) ノロウイルス (NV) への感染防御分子として利用し、『食』を基盤として国民の健康増進を図ることにある。さらに、LF の活性部位の分子構造を基に、より強力な感染予防タンパク質またはペプチド (誘導体) を分子設計し、新しい医薬品素材として開発することにある。

3. 研究の方法

LF はサプリメントとして摂取可能なウシ LF を用いた。

LF に結合する可能性があるタンパク質やペプチドは、大腸菌や原虫細胞を宿主とする発現系を構築し、組換えタンパク質を調製して、相互作用解析や複合体の結晶化に用いた。

分子間相互作用解析は、プルダウンアッセイ、ゲルろ過、等温滴定熱測定、表面プラズモン共鳴により行った。

結晶化は市販の結晶化キットを用いて行った。大型放射光施設 SPring-8 または Photon Factory で X 線回折実験を行い、結晶構造解析はソフトウェア CCP4 と Phenix を用いて行った。

タンパク質やその複合体の立体構造予測は、AlphaFold2 やその他のソフトウェアを用いて行った。

4. 研究成果

(1) HCV 外被タンパク質 E2 の発現、精製、LF との相互作用解析

HCV 外被タンパク質 E2 について、大腸菌および原虫を宿主とする発現系を構築し、大腸菌を宿主として発現させた E2 を精製したが、LF にも HCV 受容体である CD81LEL (ここで LEL は large extracellular loop) にも結合しなかったため、E2 のコンストラクトを再設計し、発現・精製した。この再設計 HCV 外被タンパク質 E2 について、LF との相互作用をプルダウンアッセイにより検出することに成功したが、このコンストラクトは人工的な領域を含むため、E2 と LF や CD81LEL との親和性が最大になるようにアミノ酸配列を最適化する必要がある。原虫細胞でも E2 の発現を試みた糖鎖付加 E2 については発現を検出できていない。今後、大腸菌を宿主として発現・精製した改変型 E2 のアミノ酸配列の最適化を行った上で、LF-E2 複合体の立体構造解析を行う予定である。

一方、肝臓細胞表面に提示されている HCV 受容体タンパク質 CD81 の長い細胞外ループ (LEL) の大腸菌での発現・精製に成功し、LF との複合体の結晶化を進めたが、良質の結晶は得られていない。今後も結晶化の条件検討を進めて行く。

(2) NV 外被タンパク質 P domain の発現、精製、不活化食品添加物の探索

NV 外被タンパク質 P domain についても、大腸菌を宿主とする発現・精製系を構築した。大腸菌で発現し精製した NV 外被タンパク質 P domain については、ヒトのノロウイルス受容体の部分構造であるフコースとの相互作用をプルダウンアッセイによって検出した。さらに等温滴定熱測定 (ITC) による定量的相互作用解析においても相互作用を検出できたため、P domain の機能を保持した状態で発現・精製に成功したことが示された。

P domain とヒトのノロウイルス受容体候補であるフコースとの相互作用を阻害する食品成分の探索を行い、候補物質としてフコイダンが得られたが、これについては他の研究グループが既に報告していた。

NV は食中毒原因ウイルスであり、LF による感染予防よりも、NV 外被タンパク質 P domain の不活化が感染予防に効果的であると考え、食品添加物プロテアーゼを用いた P domain の分解実験を行ったところ、パパインが効果的に P domain を分解することを見出した (論文投稿準備中)。

(3) 唾液凝集素タンパク質・虫歯菌表層タンパク質の発現、精製、相互作用解析

ウシラクトフェリン (LF) が虫歯菌 (*Streptococcus mutans*) の表層タンパク質 PAc とヒトの唾液凝集素 SA_g の分子間相互作用を阻害する機構について、各タンパク質間の相互作用解析と複合体の結晶構造解析により解明を進めた。ヒトの唾液凝集素 SA_g を構成するドメインの一つ SRCR ドメイン (SRCRD) の組換え体を発現・巻き戻し・精製し、結晶構造を 2.5Å 分解能で決定し、カルシウム結合部位を特定することができた。このカルシウム結合部位はハイドロキシアパタイト結合部位と考えられ、この部位で SA_g の SRCRD が歯表面に結合することが示唆された (論文投稿準備中)。また、SA_g の SRCRD は、プルダウンアッセイにより PAc の AVP 領域と結合することが示されたが、PAc の C 領域との結合は観測されなかった。SA_g の SRCRD はプルダウンアッセイにより LF 全長だけでなく、LF のペプチド断片 (480-492) にも結合することが示された。等温滴定熱測定により、SA_g の SRCRD と LF のペプチド断片 (480-492) との結合は単一結合部位で、解離定数 $K_D = 3 \mu\text{M}$ であった。SA_g の SRCRD と PAc の AVP 領域との共結晶化、および、SA_g の SRCRD と LF 全長または一部 LF (480-492) との共結晶化も進めてきたが、良質の結晶がまだ得られていない。結晶が得られ次第、複合体構造解析を行い、SA_g の SRCRD (歯表面をコートしている SA_g) と PAc の AVP 領域 (虫歯菌の表層タンパク質) との相互作用を LF がどのような形で阻害するのかを可視化することを計画している。また、SA_g 全長の立体構造を AlphaFold2 により予測し、2 個の SRCRD が取りうる相対配置の範囲を決定するとともに、SA_g 全長と PAc、SA_g 全長と LF の複合体モデルを構築し、LF による虫歯菌の歯面吸着阻害機構の可視化モデルを構築した。

(4) LF の抗炎症作用の作用機構の解析

LF は上記の抗菌・抗ウイルス活性に加え、好中球細胞外トラップ (NETs) 放出を抑制することにより抗炎症作用を示す。LF と結合して特定の好中球マーカーとして機能する人工ペプチド MUB40 と LF の相互作用について、プルダウンアッセイや等温滴定熱測定で解析し、AlphaFold2 で複合体モデルを構築した。一方、SIRT1 タンパク質も抗炎症作用を有することが知られているため、SIRT1 の活性促進剤の作用機構を解析した。今後、LF と SIRT1 の抗炎症作用の関係についても研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhang Mimin, Lu Peng, Terada Tohru, Sui Miaomiao, Furuta Haruka, Iida Kilico, Katayama Yukie, Lu Yi, Okamoto Ken, Suzuki Michio, Asakura Tomiko, Shimizu Kentaro, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-ichiro, Shimada Norimoto, Yang Jinwei, Ishikawa Tsutomu, Tatsuzaki Jin, Nagata Koji	4. 巻 4
2. 論文標題 Quercetin 3,5,7,3',4'-pentamethyl ether from <i>Kaempferia parviflora</i> directly and effectively activates human SIRT1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01705-1	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤友弥、張迷敏、陸鵬、岡本研、伊藤英晃、鈴木道生、花田耕介、柘植尚志、中曽根光、米倉円佳、永田宏次
2. 発表標題 植物由来抗菌周病菌ペプチドの同定と作用機構解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021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 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 ラクトフェリンの齧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 黎黎、鈴木道生、久和茂、伊藤英晃、永田宏次
2. 発表標題 抗ノロウイルス活性を有する食品成分の探索, 同定と作用機序解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黎黎、鈴木道生、久和茂、伊藤英晃、永田宏次
2. 発表標題 抗ノロウイルス活性を有する食品成分の探索, 同定と作用機序解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修 坂上吉一 (第11章執筆 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 (第11章 乳タンパク質ラクトフェリンの抗ウイルス・抗菌作用と活性増強)	

〔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
研究 分担者	鈴木 道生 (Suzuki Michio) (10647655)	東京大学・大学院農学生命科学研究科 (農学部)・准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	川上 浩 (Kawakami Hiroshi) (90458860)	共立女子大学・家政学部・教授 (32608)	

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