

## 学位論文題名

Binding and growth promotion effects of lactoferrin  
on *Bifidobacterium* spp.

(ラクトフェリンのビフィズス菌との結合性および成長促進作用について)

## 学位論文内容の要旨

牛乳に含まれるラクトフェリンはオボトランスフェリンと同様にトランスフェリンファミリータンパク質といわれている。分子量は約8万の金属結合性糖タンパク質で、抗菌活性、抗ウイルス活性、細胞増殖活性、抗腫瘍作用、抗炎症作用その他さまざまな生物学的な機能が知られている。一方、腸内有用細菌として知られているビフィズス菌は、グラム陽性の嫌気性菌であり、健康の維持・増進に大きく寄与している。最近各種乳酸菌の中でもプロバイオティクスの主役を占めている。これら体内でのビフィズス菌の生育を促進する物質はビフィズス因子ともいわれ、オリゴ糖がよく知られている。このように有用菌の増殖を促進する食品成分はプレバイオティクスといわれている。牛乳に限らず各種哺乳類のミルクタンパク質の中にも、ビフィズス菌生育促進作用を示すタンパク質やペプチドが存在し、特にカゼインの加水分解物については早くから知られていた。一方、ラクトフェリンには整腸作用があると期待されていたが、これまで分子レベルで明快に証明する報告は無かった。本研究ではビフィズス菌にラクトフェリン結合タンパク質を見出し、かつ他のトランスフェリン族タンパク質についてその結合性を比較検討し、さらにそれらのビフィズス菌に対する生育促進機能を追究したものである。その成果の概要は以下の通りである。

## 1. ビフィズス菌へのトランスフェリン類の結合性

4種のビフィズス菌、すなわち *Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum* について、ウシおよびヒト由来のラクトフェリンとの親和性を調べた。まず菌体から膜画分と細胞質画分とを分離し、SDS-電気泳動を行った後にPVDF膜に転写し、ピオチン化ラクトフェリン次いでアビジン標識ペルオキシダーゼによって検出するfar-Western法を行った。その結果、ラクトフェリンと結合性を示すタンパク質が *Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis* について検出され、かつアポ型、ホロ型のいずれにおいても観察されたことから、鉄の有無は関係ないことが判明した。また、ラクトフェリン結合タンパク質はビフィズス菌の膜成分および細胞質成分共に認められた。

さらにトランスフェリンおよびオボトランスフェリンについても同様に結合タンパク質のバンドが観察された。膜画分のこれら結合性タンパク質の分子量はSDS-電気泳動の移動度から69 kDa、細胞質画分では20, 35, 50, 66 kDaと推定された。さらにラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンを用いた結合阻害実験により、69 kDaタンパク質はラクトフェリンとトランスフェリンあるいはオボトランスフェリンに対して非拮抗的な結合性を示すことが明らかとなった。

## 2. ラクトフェリン結合タンパク質の同定

ビフィズス菌について見出されたラクトフェリン結合タンパク質の同定を試みた。SDS-電気泳動後のゲルからラクトフェリン結合タンパク質バンドを切り出し、トリブシンによってフラグメント化したのち、飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)によってその質量スペクトルを測定しペプチドマップを作成した。次いでアミノ酸配列既知のタンパク質に該当するタンパク質があるかどうかを、オンラインデータベース(ProteinProspector, MS-Fit)によって検索した。ところが、該当するタンパク質がないことから本実験によって見出されたビフィズス菌のラクトフェリン結合タンパク質は新規のタンパク質である可能性が高い。

## 3. ビフィズス菌に対する生育促進効果

ラクトフェリンを含むトランスフェリンファミリータンパク質3種について、上述の4種のビフィズス菌の生育に対する効果を検討した。ラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンの鉄飽和型および鉄遊離型それぞれについて、ビフィズス菌に対する成長促進の効果を測定した。その結果、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*の生育について促進効果が認められた。しかし、*Bifidobacterium longum*については生育に対する効果は認められなかった。さらにラクトフェリンのプロテアーゼ分解混合物についても*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*について生育促進効果が観察され、消化管内においてラクトフェリンの分解物がプレバイオティクスとして機能する可能性が強く示唆された。また、成長促進効果の認められたラクトフェリンなどについても、アポ型とホロ型で有意の差がなかったことから、ビフィズス菌に鉄イオンを供給しているための促進効果ではないことが結論された。ビフィズス菌のラクトフェリン結合タンパク質が細胞膜上でレセプターとして機能し、結合したラクトフェリンを細胞内に移行し、細胞分裂を促進する何らかの機構の存在が推定された。

以上のように本研究は牛乳に含まれるラクトフェリンおよび腸内有用菌であるビフィズス菌との相互作用に関与する新規のタンパク質を見出した。また、そのタンパク質の存在が種依存性であること、および生育促進とも密接な関連を示すことも見出した。これらの成果は学術的に大きな価値があるだけでなく、健康の維持・増進に利用され得る可能性を秘めている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 敬 一  
副 査 教 授 服 部 昭 仁  
副 査 教 授 横 田 篤  
副 査 助 教 授 玖 村 朗 人

学 位 論 文 題 名

## Binding and growth promotion effects of lactoferrin on *Bifidobacterium* spp.

(ラクトフェリンのビフィズス菌との結合性および成長促進作用について)

本論文は図51、表7、全5章からなる総頁111の英文論文である。別に参考論文2編が添えられている。

牛乳に含まれるラクトフェリンはトランスフェリン族タンパク質の一つで、分子量約8万の金属結合性糖タンパク質である。抗菌活性、抗ウイルス活性、細胞増殖活性、抗腫瘍作用、抗炎症作用その他さまざまな生物学的な機能が知られている。一方、腸内有用細菌であるビフィズス菌はグラム陽性の嫌気性菌であり、健康の維持・増進に大きく寄与し、各種乳酸菌の中でもプロバイオティクス製品の主役を占めている。これら体内でのビフィズス菌の生育を促進する物質はビフィズス因子といわれ、またこのように有用菌の増殖を促進する食品成分はプレバイオティクスともいわれる。牛乳に限らず各種哺乳類のミルクタンパク質の中にも、ビフィズス菌生育促進作用を示すタンパク質やペプチドが存在し、特にカゼインの加水分解物については早くから知られていた。一方、ラクトフェリンには整腸作用があると期待されていたが、これまで分子レベルで明快に証明する報告はなかった。本研究ではビフィズス菌にラクトフェリン結合タンパク質を見出し、かつ他のトランスフェリン族タンパク質についてその結合性を比較検討し、さらにそれらのビフィズス菌に対する生育促進機能を追究したものである。その成果の概要は以下の通りである。

### 1. ビフィズス菌へのトランスフェリン族タンパク質の結合性

4種のビフィズス菌、すなわち*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum*について、ウシおよびヒト由来のラクトフェリンとの親和性を調べた。まず菌体から膜画分と細胞質画分とを分離し、

SDS-電気泳動を行った後にPVDF膜に転写し、ビオチン化ラクトフェリン次いでアビジン標識ペルオキシダーゼによって検出するfar-Western法を行った。その結果、ラクトフェリンと結合性を示すタンパク質が*B. longum* 以外について検出され、かつアポ型、ホロ型のいずれにおいても観察されたことから、鉄の有無は関係ないことが判明した。また、ラクトフェリン結合タンパク質はビフィズス菌の膜成分および細胞質成分共に認められた。さらにトランスフェリンおよびオボトランスフェリンについても同様に結合タンパク質のバンドが観察された。膜画分のこれら結合性タンパク質の分子量はSDS-電気泳動の移動度から69 kDa、細胞質画分では20, 35, 50, 66 kDaと推定された。さらにラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンを用いた結合阻害実験により、69 kDaタンパク質はラクトフェリンとトランスフェリンあるいはオボトランスフェリンに対して非拮抗的な結合性を示すことが明らかとなった。

## 2. ラクトフェリン結合タンパク質の同定

ビフィズス菌について見出されたラクトフェリン結合タンパク質の同定を試みた。SDS-電気泳動後のゲルからラクトフェリン結合タンパク質バンドを切り出し、トリブリンによってフラグメント化したのち、飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)によってその質量スペクトルを測定しペプチドマップを作成した。次いでアミノ酸配列既知のタンパク質に該当するタンパク質があるかどうかを、オンラインデータベース(ProteinProspector, MS-Fit)によって検索した。乳酸菌・ビフィズス菌で該当するタンパク質がないことから本実験によって見出されたビフィズス菌のラクトフェリン結合タンパク質は新規のタンパク質である可能性が高い。

## 3. ビフィズス菌に対する生育促進効果

ラクトフェリン、トランスフェリン、オボトランスフェリンの鉄飽和型および鉄遊離型それぞれについて、4種のビフィズス菌に対する成長促進の効果を測定した。その結果、*B. bifidum*、*B. breve*、*B. infantis* の生育について促進効果が認められた。しかし、ラクトフェリン結合タンパク質が欠落していた*B. longum* については生育に対する効果は認められなかった。さらにラクトフェリンのプロテアーゼ分解混合物についても*B. bifidum*、*B. breve* について生育促進効果が観察され、消化管内においてラクトフェリンの分解物がプレバイオティクスとして機能する可能性が強く示唆された。また、成長促進効果の認められたラクトフェリンなどについても、アポ型とホロ型で有意の差がなかったことから、ビフィズス菌に鉄イオンを供給しているための促進効果ではないことが結論された。ビフィズス菌のラクトフェリン結合タンパク質が細胞膜上でレセプターとして機能し、結合したラクトフェリンを細胞内に移行し、細胞分裂を促進する何らかの機構の存在が推定された。

以上のように本研究は牛乳に含まれるラクトフェリンおよび腸内有用菌であるビフィズス菌との相互作用に関与する新規のタンパク質を見出した。また、そのタンパ

ク質の存在が菌株によって異なり、かつ生育促進とも密接な関連を示すことも見出した。これらの成果は学術的に大きな価値があるだけでなく、健康の維持・増進に利用され得る可能性を秘めている。よって審査員一同は、KIM, Woan-Sub (金 完燮)が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。