

学 位 論 文 題 名

Analysis of *in vitro* Interaction between
Bovine Lactoferrin and Bifidobacteria

（ビフィズス菌と牛ラクトフェリンとの相互作用に関する *in vitro* での解析）

学位論文内容の要旨

本論文は8章から構成された英文論文で、腸内有用細菌であるビフィズス菌とミルクタンパク質の一つであるラクトフェリンとの相互作用について解明しようとしたものである。

ビフィズス菌は特に乳児の腸内において優勢な菌であり、健康維持および増進にとって非常に大きな働きをしていることが解明されつつある。そのため、さまざまなプロバイオティクス製品の主要な菌としても用いられている。一方、ラクトフェリンは分泌液中に含まれる抗菌性タンパク質であるが、もっぱらミルク中に多く含まれ、かつ抗菌性だけではなく非常に多様な機能を示す金属結合性の糖タンパク質である。

本論文の最初の章においては、ビフィズス菌の示す健康への寄与に関するこれまでの知見を概説するとともに、ラクトフェリンの機能についても述べている。ビフィズス菌とラクトフェリンの接点は乳児の消化管内である。牛乳に比べて人乳中でのラクトフェリン含量は10倍ほど多く、さらにはかなりの量のオリゴ糖も含まれている。オリゴ糖には腸内有用菌の増殖を促進するプレバイオティクスとしての働きが知られている。一方、母乳栄養児とラクトフェリン添加育児用調整粉乳を与えた人工栄養児の腸内細菌叢の比較調査などから、ラクトフェリンについても整腸作用、さらにはビフィズス菌の生育促進作用を示唆する報告が多い。そこで本研究においては、ラクトフェリンのビフィズス菌生育に対する効果を *in vitro* で、すなわちラクトフェリン分子とビフィズス菌との相互作用の面から解明しようとした。用いたビフィズス菌は *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* の4種14株である。

ラクトフェリンのビフィズス菌への結合

ラクトフェリン存在下で培養したビフィズス菌について、ラクトフェリンが菌体表面に結合していることを証明した。ビオチン化ラクトフェリンおよび FITC 標識アビジンを用いて結合ラクトフェリンを共焦点蛍光顕微鏡で観察する方法と、金コロイド標識した抗ラクトフェリン抗体を用い透過型電子顕微鏡で観察する方法とを使用した。その結果、確かにラクトフェリンはビフィズス菌 (*B. breve* 29098 A 261-22, *B. bifidum* 29006 A 234-4, *B. infantis* 21143 I 63-7, *B. longum* ATCC 15708) の表面に結合していることが観察された。さらにその結合する部位は菌体表面全体ではなく局在化していることが分かった。

ラクトフェリン結合タンパク質の検出

菌体を超音波処理による破碎、あるいは界面活性剤による処理を行い、膜タンパク質画分を

調製し、ファーウエスタン法によってラクトフェリン結合性タンパク質の検出を行った。すなわち、SDS-電気泳動法によって膜タンパク質画分を分離した後、PVDF 膜に転写してビオチン化ラクトフェリンおよびペルオキシダーゼ標識アビジンを用いて検出した。後者の検出方法で検出されたラクトフェリン結合性タンパク質は、およそ 50 kDa であった。ラクトフェリンはトランスフェリンファミリータンパク質の一つであることから、構造的にホモロジーの高いトランスフェリンについても同様の実験を行い、50 kDa のラクトフェリン結合性タンパク質はトランスフェリンとは結合せず、ラクトフェリンに対して特異的であることを確かめた。

ラクトフェリンの結合部位の推定

ラクトフェリンは 689 残基からなるタンパク質であり、N-ローブ（1～340）および C-ローブ（341～689）で構成されている。鉄飽和ラクトフェリンに対してトリプシンによる限定分解を行い、2つのフラグメントを得た。これらは 284～689（N-ローブの一部と C-ローブ）および 341～689（C-ローブ）であった。そこでそれぞれのフラグメントを用いてビフィズス菌膜タンパク質に対して免疫ブロット法を行ったところ、284～689 フラグメントは結合性を示したが、C-ローブのみである 341～689 フラグメントでは検出できなかった。このことから、ビフィズス菌のラクトフェリン結合性タンパク質への結合部位は N-ローブに含まれる 284～340 の範囲にあることが推定できた。

ラクトフェリン結合性タンパク質の分離

ビフィズス菌膜タンパク質画分に存在するラクトフェリン結合性タンパク質を同定するために、アフィニティークロマトグラフィーによる分離を試みた。HiTrap NHS-Sepharose カラムにラクトフェリン分子を固定化したものを用い、ビフィズス菌膜タンパク質画分から吸着画分を分離した。得られた吸着画分を SDS-電気泳動法によって分析したところ、分子量が 50 kDa であり、また免疫ブロット法でラクトフェリン結合性であることが確かめられた。しかし、アミノ酸配列分析を行うにはさらに純度を高め、かつ得られる量を増やすことが必要であった。

ラクトフェリンのビフィズス菌生育に対する効果

ラクトフェリンのビフィズス菌生育に対する効果を *B. breve*（4 株）、*B. bifidum*（3 株）、*B. infantis*（3 株）、*B. longum*（4 株）について調べた。その結果、生育比が 120%以上を示した菌株は、*B. breve* 4 株の内 3 株、*B. bifidum* 3 株の内 2 株、*B. infantis* 3 株の全て、*B. longum* は 4 株の内 2 株であった。このことから、ラクトフェリンの生育促進効果の有無は菌株によって異なることが判明した。促進効果のある場合は、ラクトフェリン濃度依存的であった。またラクトフェリンは鉄結合性タンパク質であることから、ホロラクトフェリンとアポラクトフェリンとについて比較したところ、ホロラクトフェリンの方が若干促進活性が高かった。また、菌体へのラクトフェリンの結合、および菌体膜タンパク質画分にラクトフェリン結合性タンパク質を有していた菌株はいずれもラクトフェリンによる生育促進効果が観察された。

結び

一般にラクトフェリン抗菌性タンパク質として分類されている。しかし、この抗菌性には選択性があり、多くのビフィズス菌に対してはむしろ生育を促進させる作用を示すことが本研究によって確かめられた。さらにラクトフェリンによるビフィズス菌の生育促進のためには、単に栄養的なことだけではなく両者の相互作用が関与していることが本研究によって明らかにすることができ、そのメカニズムの解明に糸口を与えたものと期待できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 崎 敬 一

副 査 教 授 横 田 篤

副 査 助 教 授 玖 村 朗 人

学 位 論 文 題 名

Analysis of *in vitro* Interaction between Bovine Lactoferrin and Bifidobacteria

(ビフィズス菌と牛ラクトフェリンとの相互作用に関する *in vitro* での解析)

本論文は8章から成る英文の論文で、腸内有用細菌であるビフィズス菌とミルクタンパク質の一つであるラクトフェリンとの相互作用について解明しようとしたものである。

ビフィズス菌は特に乳児の腸内における優勢菌で、健康維持および増進にとって大きな働きをし、様々なプロバイオティクス製品の主要な菌としても用いられている。一方、ラクトフェリンはミルク中に主に含まれるタンパク質で、抗菌性の他に非常に多様な機能を示す金属結合性の糖タンパク質である。本論文においてはまず、ビフィズス菌の示す健康への寄与に関するこれまでの知見、およびラクトフェリンの機能について述べている。牛乳に比べて人乳中でのラクトフェリン含量は10倍ほど多く、さらにオリゴ糖も多い。オリゴ糖には腸内有用菌の増殖を促進するプレバイオティクスとしての働きがあるが、ラクトフェリンにも整腸作用、さらにはビフィズス菌の生育促進作用を示唆する報告が多い。これら過去の知見の蓄積が、本研究を始めるに至った動機であることなどを述べている。

最初にラクトフェリン存在下で培養したビフィズス菌について、ラクトフェリンが菌体表面に結合していることを証明した。ビオチン化ラクトフェリンおよび FITC-アビジンを用いて共焦点蛍光顕微鏡で観察する方法と、金コロイド標識した抗ラクトフェリン抗体を用いて透過型電子顕微鏡で観察する方法とを使用した。その結果、確かにラクトフェリンはビフィズス菌に結合していること、さらにその結合部位は菌体表面に局在していることが分かった。

次いで、ラクトフェリン結合タンパク質の検出を行った。菌体を破碎、あるいは界面活性剤による処理を行い膜タンパク質画分を調製し、ファーウエスタン法によってラクトフェリン結合性タンパク質の検出を行った。検出されたラクトフェリン結合性タンパク質の分子量は、

およそ 50 kDa であった。ラクトフェリンはトランスフェリンファミリータンパク質の一つであることから、ホモロジーの高いトランスフェリンについても同様の実験を行い、このラクトフェリン結合性タンパク質はトランスフェリンとは結合せず、ラクトフェリンに対して特異的であることを確かめた。

さらに、ラクトフェリンの結合部位の推定を行った。ウシラクトフェリンは 689 個のアミノ酸残基を持ち、N-ローブ(1~340)および C-ローブ(341~689)で構成されている。ホロ型ラクトフェリンに対してトリプシンによる限定分解を行い、2つのフラグメントを得た。これらは 284~689(N-ローブの一部と C-ローブ)および 341~689(C-ローブ)であった。そこでそれぞれのフラグメントを用いてビフィズス菌膜タンパク質に対して免疫ブロット法を行ったところ、284~689 フラグメントは結合性を示したが、C-ローブのみである 341~689 フラグメントでは検出できなかった。このことから、ビフィズス菌のラクトフェリン結合性タンパク質への結合部位は N-ローブに含まれる 284~340 の範囲にあることが推定できた。

そこでラクトフェリン結合性タンパク質の同定のために、固定化ラクトフェリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによる分離を試みた。ビフィズス菌膜タンパク質画分から得られた結合画分は、SDS-電気泳動によって分子量が 50 kDa であり、さらに免疫ブロット法でラクトフェリン結合性であることを確認した。

以上の実験の他に、ビフィズス菌の生育に対するラクトフェリンの効果を調べた。生育比が 120%以上を示した菌株は、*B. breve*4株の内3株、*B. bifidum*3株の内2株、*B. infantis*3株の全て、*B. longum*は4株の内2株であった。このことから、ラクトフェリンの生育促進効果の有無は菌株によって異なり、かつ濃度依存的であることが判明した。さらにアポ型よりもホロ型ラクトフェリンの方が促進活性がやや高かった。また、菌体へのラクトフェリンの結合、および菌体膜タンパク質画分にラクトフェリン結合性タンパク質を有していた菌株はいずれもラクトフェリンによる生育促進効果が観察された。

一般にラクトフェリンは抗菌性タンパク質として分類されている。しかし、この抗菌性には選択性があり、多くのビフィズス菌に対してはむしろ生育を促進させる作用を示すことが本研究によって確かめられた。さらにラクトフェリンによるビフィズス菌の生育促進のためには、単に栄養的なことだけではなく両者の相互作用が関与していることが本研究によって明らかにすることができ、そのメカニズムの解明に糸口を与えたものと期待できる。

よって、審査員一同は、MD. MORSHEDUR RAHMAN 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。