

ラクトフェリンペプチドが微生物の生育に与える影響

誌名	ミルクサイエンス = Milk science
ISSN	13430289
著者名	織田, 浩嗣
発行元	日本酪農科学会
巻/号	61巻3号
掲載ページ	p. 271-275
発行年月	2012年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ラクトフェリンペプチドが微生物の生育に与える影響

織田 浩 嗣*

(森永乳業株式会社食品基盤研究所)

The effect of lactoferrin peptides on the growth of bacteria

Hirotsugu Oda

(Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd., 5-1-83,
Higashihara, Zama, Kanagawa 252-8583)

1. はじめに

ラクトフェリン (LF) は多くの哺乳動物の乳汁に含まれる分子量約8万の糖タンパク質である。LFの立体構造は相同性の高いNローブとCローブから構成され、各ローブはそれぞれ1分子の鉄イオンをキレートする領域を有する。乳中のLF含有量は動物の種により異なり、ヒトの乳に最も多く含まれ、常乳で1~3 mg/mL、初乳で5~7 mg/mL含まれている (hLF)。一方、牛乳では生乳で0.1~0.4 mg/mL含まれているが (bLF)、加熱殺菌により容易に失活する。LFは乳汁以外にも、涙、唾液等の外分泌液、血漿、好中球の二次顆粒にも含まれている。このように、LFは外部と接する部分や微生物を攻撃する好中球から分泌されることから、生体防御成分として作用していると考えられ、これまでに抗微生物作用、ビフィズス菌増殖促進作用、免疫調節作用等を示すことが報告されている¹⁾。

2. LFの抗菌作用とビフィズス菌増殖促進作用

LFはグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌等に対し、幅広く抗菌作用を示すことが知られている²⁾。LFの抗菌メカニズムとして、LFは鉄イオンをキレートする性質を持つことから、微生物の生育に必要な鉄を奪うことにより静菌作用を示すと考えられている³⁾。また、LFのNローブに存在する塩基性の領域は、微生物と直接的に相互作用することにより傷害することが知られている⁴⁾。LFはグラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) に結合し、

外膜から遊離させることにより、傷害を与えると考えられている⁵⁾。また、LFは歯周病菌や緑膿菌のバイオフィーム形成を抑制することも報告されている^{6,7)}。

一方、LFは有用菌であるビフィズス菌に対しては抗菌作用を示さず、逆に増殖促進作用を示すことが知られている⁸⁾。LFのビフィズス菌増殖促進メカニズムは不明な点が多いが、ビフィズス菌の膜表面にはLF結合タンパク質が存在することが知られ、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) がその候補と考えられている⁹⁾。乳酸菌 *Oenococcus oeni* では、SO₂ ストレス下でGAPDHの発現上昇が報告され¹⁰⁾、酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、GAPDHの酸化ストレスシグナル促進が報告されており¹¹⁾、LFはビフィズス菌のストレス応答機構に作用する可能性が推測されている⁹⁾。また、乳児型のビフィズス菌種である *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* では、培地中にhLFやbLFを添加することにより、ヒトの乳中に含まれるオリゴ糖の資化に関与する遺伝子の発現上昇が観察されている¹²⁾。

ただし、LFの抗菌作用やビフィズス菌増殖促進作用は比較的高濃度で観察され、その活性は穏やかである¹³⁾。

3. LF由来抗菌ペプチド

hLFやbLFを胃の消化酵素ペプシンで分解すると、鉄キレート能が消失するにも関わらず、抗菌活性が高まることが知られている。これは、LFのNローブに存在する塩基性の領域が活性ペプチドとして遊離するため、ラクトフェリシン (LFcin H, LFcin B) と命名されている (表1(a, b))¹⁴⁾。bLFとLFcin Bの抗菌活性を表2に示す。LFcin Bは、分子量がbLFの約1/25であることを考慮しても、より低濃度で抗菌作用を示した。このことはLFの抗菌作用が胃での消化により増強され

* 連絡者 織田浩嗣 (おだ ひろつぐ)
〒252-8583 神奈川県座間市東原5-1-83
森永乳業株式会社食品基盤研究所素材機能研究部
(Tel : 046-252-3045, E-mail : h-oda@morinagamilk.co.jp)
2012年10月31日 受付
2012年11月8日 受理

表1 LF由来の抗菌ペプチド

(a) LFcIn H		
1	10 11 12	20
G R R R R S V Q W C A	V S Q P E A T K C F	Q W Q R N M R K V R G P P V S C I K R D S P I Q C I
(b) LFcIn B		
	17 19	36 42
	F K C R R W Q W R M K K L G A P S I T C V R R A F	
(c) LFampin		
268		284
W K L L S K A Q E K F G K N K S R		

表中の C-C 線部位は、SS 結合を示す。

表2 bLF と LFcIn B の抗菌活性

Strain	MIC in $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	bLF	LFcIn B
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> O111	2,000	6
<i>Escherichia coli</i> IID861	2,000	6
<i>Escherichia coli</i> O157: H7-A	3,000	8
<i>Salmonella enteritidis</i> IID604	>8,000	12
<i>Yersinia enterocolitica</i> IID981	2,000	6
<i>Proteus vulgaris</i> JCM1668T	2,000	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM1662T	>8,000	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMI603	>8,000	12
Gram-positive bacteria		
<i>Listeria monocytogenes</i> IDF1b	1,000	0.6
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	2,000	0.6
<i>Bacillus cereus</i> MMI1272	>8,000	9
<i>Streptococcus bovis</i> JCM5672	>8,000	3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCCE19433	>8,000	>60
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM2151	1,000	3
<i>Staphylococcus aureus</i> R1 (antibiotic-resistant)	>8,000	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM2414T	1,000	3
Yeast		
<i>Candida albicans</i> TIMM1768	200	12.5
Filamentous fungi		
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> TIMM2789	100	6.3
<i>Trichophyton rubrum</i> IFO32409	100	13

る可能性を示唆している。LFcIn B はグラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌等の病原菌を中心に強い抗菌作用を示す一方、ピフィズス菌に対しては殆ど影響を与えないことが知られている¹⁵⁾。LFcIn B の抗菌メカニズムとして、LFcIn B が細菌の細胞膜に孔を形成してイオン透過を促進し、細胞膜内外のイオン濃度勾配を保持できなくすることにより抗菌作用を示す可能性が示唆されている¹⁶⁾。

LFcIn を含め、多くの抗菌ペプチドは塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸を多く含む両親媒性であることが知られている。この配列上の特徴に着目し、bLF から見出された抗菌ペプチドがラクトフェリン (LFampin) である (表 1(c))¹⁷⁾。LFampin 配列は bLF の N ロープに存在し、bLF の立体構造上 LFcIn B 配列の近傍に位置し、共に bLF の抗菌活性に寄与していると考えられている。化学合成した LFampin は *Candida albicans* に対し、LFcIn B と同等の抗菌活性を示すことが知られている。ただし、LFampin はペプシン分解により活性が消失する可能性が示唆され、LF の胃内消化では生じない可能性が考えられる。一方、bLF を仔牛の消化酵素レンネットで分解すると LFcIn B と LFampin 類縁体の両方が生じ、高い抗菌活性を示すことが報告されており、牛乳を飲む仔牛の消化管では 2 つの抗菌ペプチドが生じる可能性が示唆されている¹⁸⁾。

4. hLF 由来ピフィズス菌増殖促進ペプチド

母乳を飲む乳児の腸内細菌叢はピフィズス菌が優勢であることから、母乳のペプシン分解物からピフィズス菌を選択的に増殖促進させるペプチドが探索され、3 つの

表4 BLPのビフィズス菌増殖促進スペクトル

ビフィズス菌種	株数	bLF	bLFペプシン分解物	BLP
<i>B. breve</i>	7	0	7	7
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	5	0	5	5
<i>B. bifidum</i>	5	0	2	2
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	3	0	1	1
<i>B. adolescentis</i>	6	0	2	3
<i>B. catenulatum</i>	4	0	1	1
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4	0	0	0
<i>B. angulatum</i>	3	0	0	0
<i>B. dentium</i>	5	0	0	0

被験物質 (3.75 μ M) を添加した MRS 培地 (0.05% Cys 含有) で各種ビフィズス菌株を嫌気培養し (37°C, 16時間), コントロール比150%以上増殖した株の数。

6. まとめ

LFを胃の消化酵素ペプシンで分解すると、元のLFと比較して強い抗菌作用を示すペプチド (LFcin H, LFcin B) だけでなく、元のLFと比較して強いビフィズス菌増殖促進作用を示すペプチド (hLACFR-I, hLACFR-II, BLP) も生じることが判明し、この現象は母乳成分である hLF と牛乳成分である bLF に共通して見られることが判明した。また、BLPはビフィズス菌の中でも特に乳児型の菌種である *B. breve* と *B. longum* subsp. *infantis* に対して増殖促進作用を示す傾向が見られた。このことは、乳中のLFが胃で消化されて生じるペプチドが、乳児期の良好な腸内細菌叢の形成や維持に一定程度寄与する可能性を示唆しており、育児用粉乳であっても bLF や bLF ペプシン分解物を添加することにより、その機能が一部再現される可能性を示唆している。今後、メカニズムや腸内細菌叢への影響を検討する予定である。

参考文献

- 1) 織田浩嗣, 村田麻衣, 山内恒治. ラクトフェリンの保健機能, 乳業技術, **60**, 9-22 (2010)
- 2) Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties, *Mol. Immunol.*, **40**, 395-405 (2003)
- 3) Arnold RR, Cole MF, McGhee JR. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. **197**, 263-265 (1977)
- 4) Ellass-Rochard E, Roseanu A, Legrand D, Trif M, Salmon V, Motas C, Montreuil J, Spik G. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of

the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem. J.* **312**, 839-845 (1995)

- 5) Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J, Nuijens JH. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.* **62**, 2628-2632 (1994)
- 6) 若林裕之, 山内恒治, 小林哲夫, 八重島智子, 岩附慧二, 吉江弘正. ラクトフェリンの歯周病菌バイオフィルムに対する効果. ラクトフェリン2009. 75-78. 日本医学館(2009)
- 7) 新宮浩之, 江原友子, 松本哲哉. 緑膿菌臨床分離株のバイオフィルム産生に及ぼすラクトフェリン効果. ラクトフェリン2009. 127-131. 日本医学館(2009)
- 8) Rahman MM, Kim WS, Kumura H, Shimazaki K. Screening of Bifidobacterium spp. based on in vitro growth responses to bovine lactoferrin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 453-458 (2010)
- 9) 島崎敬一, 田島恵梨香, Rhaman MM, 金完燮. GAPDHがビフィズス菌のラクトフェリン結合蛋白質. ラクトフェリン2011. 105-112. 日本医学館(2011)
- 10) Carreté R, Reguant C, Bordons A, Constantí M. Relationship between a stress membrane protein of *Oenococcus oeni* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **127**, 43-51 (2005)
- 11) Morigasaki S, Shimada K, Ikner A, Yanagida M, Shiozaki K. Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol. Cell.* **30**, 108-113 (2008)
- 12) Garrido D, Nwosu C, Ruiz-Moyano S, Aldredge D, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Endo- β -N-acetylglucosaminidases from Infant Gut-associated Bifidobacteria Release Complex N-glycans from Human Milk Glycoproteins. *Mol. Cell Proteomics.* **11**, 775-785 (2012)
- 13) Saito H, Miyakawa H, Ishibashi N, Tamura Y, Hayasawa H, Shimamura S. Effect of iron-free and metal-bound forms of lactoferrin on the growth of bifidobacteria, *E. coli* and *S. aureus*. *Biosci. Microflora.* **15**, 1-7 (1996)
- 14) Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys.*

- Acta.* **1121**, 130–136 (1992)
- 15) Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., and Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 472–479 (1992)
 - 16) Umeyama M, Kira A, Nishimura K, Naito A. Interactions of bovine lactoferricin with acidic phospholipid bilayers and its antimicrobial activity as studied by solid-state NMR. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 1523–1528 (2006)
 - 17) van der Kraan MI, Groenink J, Nazmi K, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides.* **25**, 177–183 (2004)
 - 18) Elbarbary HA, Abdou AM, Park EY, Nakamura Y, Mohamed HA, Sato K. Novel antibacterial lactoferrin peptides generated by rennet digestion and autofocusing technique. *Int. Dairy J.* **20**, 646–651 (2010)
 - 19) Liepke C., Adermann K., Raida M., Mägert HJ, Forssmann WG., and Zucht HD. Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.* **269**, 712–718 (2002)
 - 20) Pierce A, Colavizza D, Benaissa M, Maes P, Tartar A, Montreuil J, Spik G. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196**, 177–184 (1991)
 - 21) Kim WS, Rahman MM, Kumura H, Shimazaki K. Comparison of growth promoting effects on *Bifidobacterium* spp. by bovine lactoferrin hydrolysates. *Biosci. Microflora.* **24**, 119–123 (2005)
 - 22) Dionysius DA, and Milne JM. Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *J. Dairy Sci.* **80**, 667–674 (1997)
 - 23) 光岡知足. 腸内菌叢研究の歩み. 腸内細菌学雑誌. **25**: 113–124 (2011)