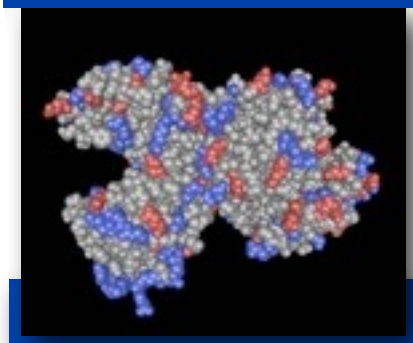
JAPANESE ASSOCIATION FOR LACTOFERRIN

Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第19号 2017年3月



1. 巻頭言
ラクトフェリンの多機能性は何に由来するのか 川上 浩

2. 学会イベント報告
第7回学術集会開催報告 玉置 幸道

3. 学会賞受賞研究紹介
マウス体内時計の光同調に対するウシ由来ラクトフェリンによる促進作用機序の解析 守屋 孝洋

4. テクニカルノート
3Dプリンターによるウシラクトフェリン N-ローブとC-ローブモデルの作製(その3) 島崎 敬一・相沢 智康

巻頭言

ラクトフェリンの多機能性は何に由来するのか

川上 浩
Hiroshi KAWAKAMI
共立女子大学大学院
家政学研究科 教授

1984年、Köhler博士とMilstein博士が、モノクローナル抗体作製技術でノーベル生理学・医学賞を受賞されました。そのニュースに触発されて、ヒトとウシのラクトフェリン(LF)のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを造ったのが、私とLFの最初の出会いです。ちょうどその頃、米国カリフォルニア大学デービス校のBo Lönnerdal教授のもとで、ヒト小腸上皮細胞からLFレセプターを分離する研究に従事する機会を得ました。今から30年前のことです。Lönnerdal教授の研究室には、現在までに多くの日本人研究者が在籍してきましたが、私はその最初の日本人でした。日本から持参したモノクローナル抗体を樹脂に固定化し、実験に使用するLFを母乳や牛乳から分離しました。そんな中、ふと疑問に思うことがありました。試薬のLFと、抗体で精製したLFの特性がどうも違うのです。それ以来、LFの多様な生理作用が、LF自体の多機能性に由来することとは別に、他の生理活性成分と挙動を共にすることで発現されるのではないかと考えるようになりました。試薬として市販されているLFの純度は、一般的に90%前後です。食品添加物のLF原末は、総タンパク質あたり85%以上のLFを含有すれば、「ラクトフェリン」として使用できます。どちらを用いて研究しても論文の記載はLFですが、そこには10～15%ほどの夾雑物が存在する可能性があるのです。したがって、こうした市販のLFに含まれるLF以外の成分を特定し、既に報告されている様々な生理作用との相関を考察することは大変重要な課題です。そこで、市販のLFに含まれる成分を解析したところ、94種類もの物質が検出されました。この中には酵素や増殖因子なども含まれます。それなら、遺伝子組換え型LFを使えばよいではないか…と思われるかもしれませんが、糖鎖構造が乳由来のLFとは異なります。では、LFの研究はどう進めればよいのか?これはLFに限ったことではありません。天然物の研究では、物質を分子で考えるのか、素材として扱うのか、研究者自身がしっかりと認識しながら研究を進めるしかないのだと思います。

第7回学術集会開催報告

玉置 幸道
Yukimichi TAMAKI
朝日大学歯学部教授

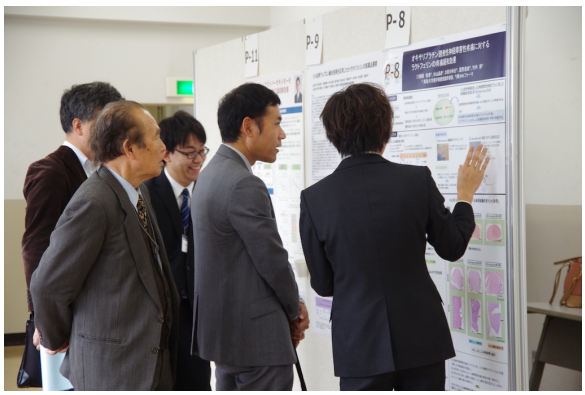
平成28年10月30日(日)に東京・品川の昭和大学旗の台キャンパスで第7回日本ラクトフェリン学会学術集会を開催いたしました。今回は第12回国際ラクトフェリン会議をウェスティンナゴヤキャッスルで名古屋市立大学教授・津田洋幸先生を大会長として開催した翌年ということや、開催日が日曜日であったこと、さらに臨床ラクトフェリン研究会との初の共同開催など定例の開催と比べていくつかの変更点がありました関係で、演題数や協賛を含めた運営面に一抹の不安も抱えていたのですが、151名もの参加者が集いたいへん活発な研究発表大会となりました。

今回は医療系とのタイアップを意識して特別講演にはシンガポールで歯科医院を開設され、国際ラクトフェリン会議にはほぼ毎回参加されているDr.Reginald Teoを招き、歯科臨床におけるラクトフェリンの活用を中心に講演をお願いしました。Dr.Teoは臨床家として活動を続けているため実際のラクトフェリンに関する研究や開発などを手掛けているわけではないのですが、日々の診療への応用や、自身が長きにわたりラクトフェリンを摂取しているおかげで充実した生活を送っている様子などを披露していただきました。またシンポジウムでは近年の医療問題を論じるうえで避けて通れない少子高齢化をテーマとし、「超高齢社会のラクトフェリン活用」というタイトルで4名の研究者の方々にご講演をいただきました。座長は唾液腺研究に詳しい昭和大学口腔病理学講座の美島教授が務められ、各々の講師の先生方からは歯周疾患進行の抑制やアンチエージングへの効能などにつきまして詳細なデータを基に解説を加えていただきました。興味ある方はhttp://lactoferrin.jp/2016/pdf/symposium.pdfをご参照ください。

医療の世界のみならず多くの分野でのラクトフェリンの可能性については論を待つものではありません。今後もさらなる研究成果により様々な場面で活用が進むこと、そのためには本会が牽引役をしっかりと果たしていくことを再認識し、閉会いたしました。後の懇親会では富田賞(2名)・学会賞(1名)の各表彰式が執り行われ、大いに盛り上がりました。

最後になりましたが、本大会開催に向けて貴重な御助言を賜りました島崎敬一理事長はじめラクトフェリン学会の理事の先生方、森永乳業株式会社、ライオン株式会社をはじめ協賛をいただきました企業の皆様方、臨床ラクトフェリン研究会役員ならびに関係各位に対し、深く感謝申し上げます。

口頭発表の様子



ポスター発表の様子

マウス体内時計の光同調に対するウシ由来ラクトフェリンによる促進作用機序の解析

守屋 孝洋
Takahiro MORIYA
東北大学大学院薬学研究科
生活習慣病治療薬学分野

睡眠・覚醒やホルモン分泌など多くの行動・生理機能には24時間周期の日内リズムが認められ、これらは体内時計によって生み出されている。体内時計の機能異常は睡眠障害だけでなく、気分障害や糖尿病、悪性腫瘍の発症リスクを増加させることが近年明らかになっており、体内時計の働きをうまくコントロールできる食品素材の開発が望まれている。私たちは、多機能性タンパク質であるラクトフェリンが体内時計の働きに対してどのような作用を示すのかをマウスモデルを用いて検討した。その結果、ウシ由来ラクトフェリンの投与がマウス行動リズムの新しい明暗環境に対する同調速度を高め、さらに光照射による活動開始位相の変化を大きくすることを見出した。また、時計遺伝子の発現解析により、ラクトフェリンが体内時計の存在する視交叉上核への光シグナル伝達を増強していることが明らかになった。これらのマウスモデルを用いた実験により、ラクトフェリンは体内時計の機能改善作用を有している可能性が強く示唆された。

はじめに

睡眠・覚醒やホルモン分泌、深部体温など多くの生理機能は日周変動がみとめられ、これらの日内リズムは体内時計によって生み出されている。哺乳類の体内時計の中枢は脳視床下部の視交叉上核[a)]という領域に存在しており、様々な神経経路および液性因子の分泌を介してリズム信号を全身に伝達し、個体としての日内リズムを生み出している。一方、体内時計によって自律的に作りだされるリズムの周期は正確には24時間ではないため、環境中の昼夜の変化、すなわち光信号が体内時計の針のずれを日々補正し、体内時計を正しく24時間周期で働かせている。光信号による体内時計の針の補正を「光同調」といい、網膜から視交叉上核へ至るモノシナプス経路（網膜視床下部路）によって伝達される（図1）。体内時計の光同調が不十分だと、概日リズム睡眠障害[b)]のような睡眠障害だけでなく、冬季うつ病とよばれる季節性感情障害が発症することが報告されており、また、体内時計の異常は睡眠障害だけでなく、気分障害や糖尿病、悪性腫瘍の発症リスクを増加させることが近年明らかになっており、体内時計の働きをうまくコントロールでき、日常的に摂取可能な食品素材の開発が望まれている。ところで、ラクトフェリンは初乳や好中球顆粒に多く含まれる分泌型糖タンパク質であり、抗菌・抗ウィルス活性の他にも、免疫賦活作用、抗肥満作用、骨密度増加作用など多彩な生理・薬理作用を有している。さらにラクトフェリンには抗不安作用や鎮痛作用などの中枢作用、すなわち脳の働きを調整する作用があることも報告されている[2)3)]。そこで私たちは、ラクトフェリンが体内時計の働きを調節する作用をもつ可能性についてマウスモデルを用いて検討することにした。

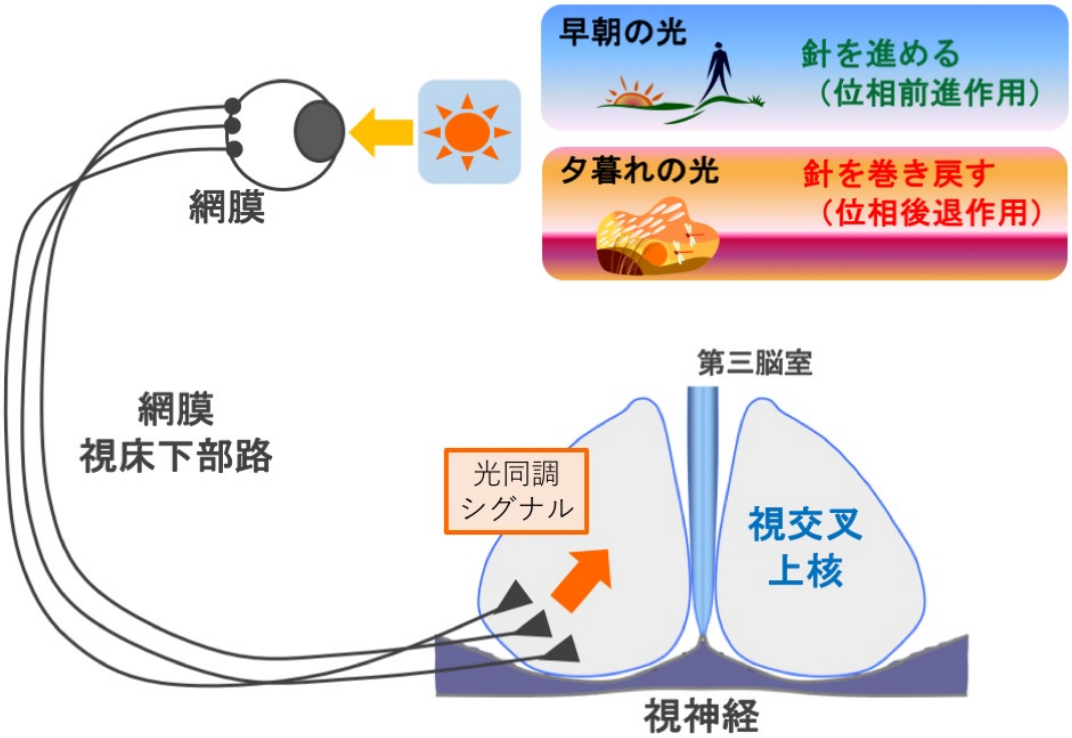


図1 体内時計の位相（針）をリセットする光同調シグナルの伝達経路

光は網膜で感知され、モノシナプス経路である網膜視床下部路によって体内時計の中枢である視交叉上核へ伝達される。光による針のリセットは光を浴びる時刻によって異なり、早朝（正確には夜明け前）の光は位相の前進を、夕暮れ（正確には暗期の前半）の光は位相の後退を引き起こす。

1.マウス行動リズムに対するラクトフェリン投与の作用

実験には雄性ICRマウス（実験開始時8週齢）を用いた。マウスの行動リズムは焦電型赤外線センサーによるマウス自発運動感知、あるいはケージ内部に設置した直径13cmの回し車の回転数測定によって24時間連続記録を行い、解析した。ウシ由来ラクトフェリン原末（bLF）および腸溶性マイクロカプセル化ウシ由来ラクトフェリン製剤（eMC-bLF）は蒸留水に懸濁し、経口投与あるいは静脈内投与した。

まず、マウス時差ぼけモデルに対するラクトフェリン投与の効果を調べた（方法・評価の概念図を図2に示す）。すなわち、12:12時間の明暗サイクルの8時間前進に伴うマウス自発運動リズムの再同調に対する由来ラクトフェリンの投与の効果を検討したところ、bLF原末（300 mg/kg）またはeMC-bLF（bLFとして300 mg/kg）の明暗シフト1日目の明期開始時刻における単回経口投与は、自発運動リズムの新しい明暗サイクルへの再同調をそれぞれの溶媒群に比較して有意に速めることが観察された。また、恒暗条件下におけるeMC-bLFの単回経口投与（300 mg/kg）およびbLFの単回静脈内投与（10 mg/kg）は活動開始時刻4時間後の光照射（15分間）による輪回し行動リズムの位相後退を大きくすることが観察された（方法・評価の模式図を図3に示す）。さらに、eMC-bLFを含む混合粉末飼料の慢性摂取の影響を検討したところ、恒暗条件下における輪回し行動のリズム周期にはほとんど影響しなかったが、活動開始時刻4時間後の光照射（15分間）および12時間後の光照射（60分間）による位相の変化（それぞれ位相後退と前進を引き起こす）を劇的に大きくすることが観察された。これらの結果より、ラクトフェリンにはマウス体内時計の光同調を促進する作用があり、この作用は体内吸収されたラクトフェリン分子がもたらしている可能性が示唆された。

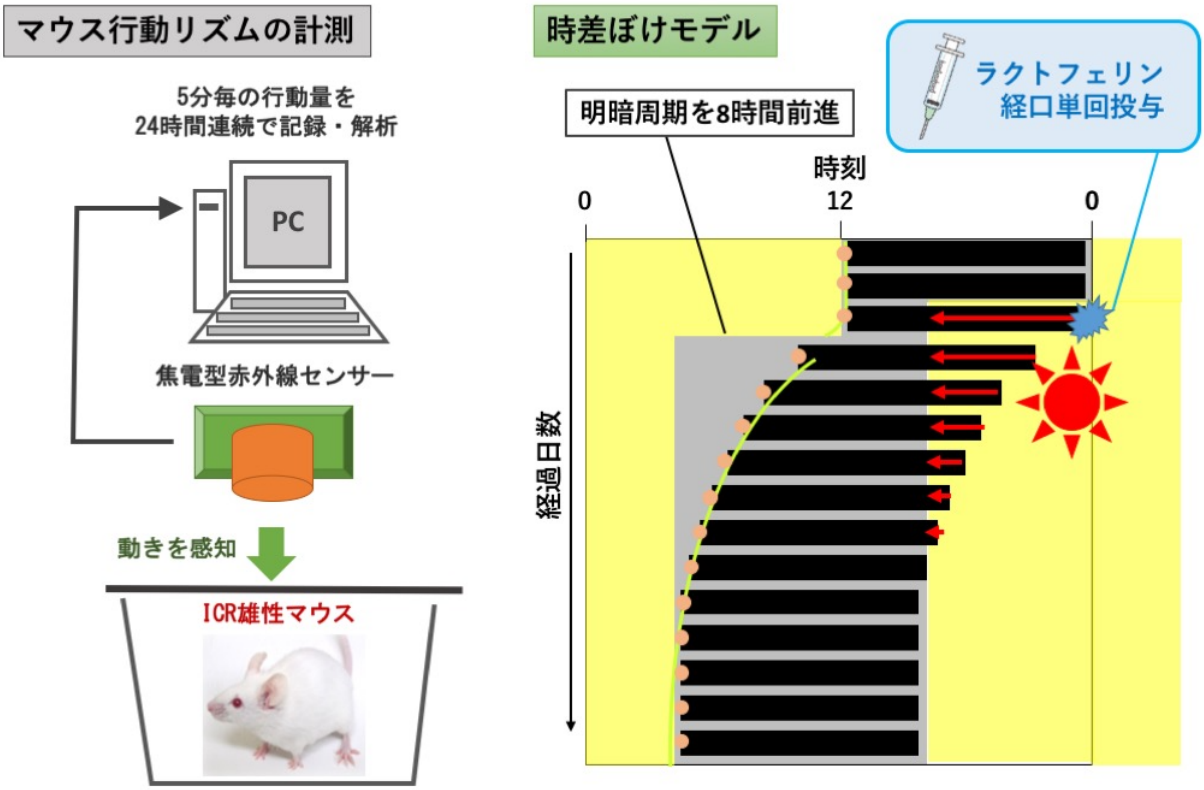


図2 マウス時差ぼけモデルの方法と評価方法

詳細は本文を参照

2.光照射による視交叉上核の時計遺伝子*Per1*および*Per2*の急性mRNA発現誘導に対するラクトフェリン投与の作用

前述したように光同調信号は網膜から視交叉上核へ至るモノシナプス経路によって体内時計に伝達される。また、視交叉上核では時計遺伝子[c)]とそれによってコードされる時計タンパク質が転写・翻訳のフィードバックループを形成し、これが体内時計のリズム発振源であるとされている。光信号は時計遺伝子のうち、*Per1*や*Per2*などの急性発現誘導を介してループの回るタイミングをずらし、体内時計の位相を同調していることが知られている[4)]。そこで、ラクトフェリンの光同調増強効果が中枢時計の視交叉上核レベルで生じているのかを検討するために、光パルスによる視交叉上核の時計遺伝子*Per1*および*Per2*の急性発現上昇に対する影響を*in situ* hybridization法によって検討した。その結果、eMC-LFの経口単回投与は非光照射群における視交叉上核の*Per1*および*Per2*のmRNAレベルを上昇させた。また、eMC-LFの経口単回投与は光照射による視交叉上核の*Per1*および*Per2*のmRNAレベルに対しても増強作用を示した。以上の結果から、ラクトフェリンはマウス体内時計の光同調を強力に増強する作用を有することが観察され、これは視交叉上核の光シグナル応答レベルで生じていることが明らかになった。

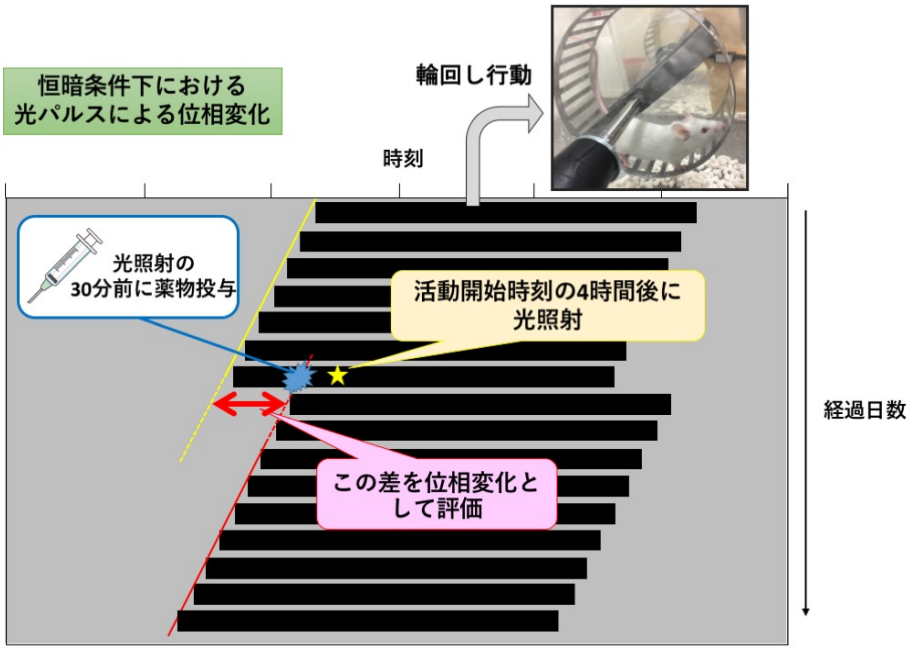


図3 光パルスによるマウス輪回し行動リズムの位相変化のスケジュールと評価方法

恒暗条件下でマウスの輪回し行動を24時間連続で測定すると、マウスの体内時計周期は24時間より短いので活動開始時刻が日々早まる。各マウスで実験日の活動開始時刻を予想し、その4時間後に短時間の光照射（15分間）を与えると、体内時計の針がリセットされ、翌日からの活動開始時刻が遅くなり、この“ずれ”を位相変化量として定量した。ラクトフェリンは光照射開始の30分前に投与した。

おわりに

本研究により、ラクトフェリンには体内時計の機能調節作用があることがマウスモデルで明らかになった。混合飼料を用いた慢性投与の実験では、ラクトフェリン摂取は恒暗条件下のリズム周期には影響を与えず、光照射による活動開始時刻の位相変化を特異的に大きくすることが観察され、さらに経口単回投与の実験では光照射をせずにラクトフェリンを単独で投与した場合ではマウス行動リズムの位相はまったく影響されないことを考え合わせると、ラクトフェリンは体内時計のリズム発振機構そのものには影響せず、光同調シグナルを特異的に促進していることが示唆された。

一方、本研究では光同調促進作用におけるラクトフェリン分子の一次標的組織あるいは一次標的分子（すなわちラクトフェリン受容体）を明らかにすることはできなかった。本研究でラクトフェリンの静脈内投与は光による位相変化を増強することが観察されたので、少なくとも体内吸収されたラクトフェリンが促進作用をもたらす可能性は示唆されたが、中枢時計の視交叉上核にラクトフェリン分子が直接的に作用しているかどうかは不明である。私たちの予備的な実験では、ラクトフェリンはラット視交叉上核由来細胞株に対して細胞内Ca^{2+}応答を惹起することや、マウス視交叉上核スライス培養系においてラクトフェリンが時計遺伝子発光レポーターリズムを変化させることが観察されており、今後、さらなる解析を進めていきたいと考えている。

また、夜行性動物であるマウスに対するラクトフェリンの光同調促進作用が、昼行性のヒトにそのまま外挿できるかどうかも今後の重要な課題である。興味深いことに、最近、ラクトフェリンの摂取はヒトにおいて睡眠衛生を改善する作用を示すことが報告された[5)]。視交叉上核の活動性や光同調信号に対する応答性は昼行性動物と夜行性動物とで共通であることが知られており、ラクトフェリンがヒトにおける光同調を促進する可能性も十分に考えられる。細胞レベル・分子レベルでの細かい解析だけでなく、ヒトなどを対象とした多角的な研究がラクトフェリン作用のさらなる理解には必要であると思われる。

謝辞

本研究は株式会社NRLファーマとの共同研究により行われ、ラクトフェリン原末および腸溶性マイクロカプセル化ウシ由来ラクトフェリン製剤は同社よりご提供いただいた。また、研究のご指導を賜りました鳥取大学名誉教授・原田悦守先生ならびに株式会社NRLファーマ・桑田英文博士、ならびにその他の共同研究者の諸氏に深謝する。

脚注

a)視交叉上核

視床下部底部に位置する一対の神経核であり、局所破壊実験による生理リズムの消失や、*in vivo*および*in vitro*でニューロンの電気活動性に約24時間の周期性が観察されることから哺乳類の中枢時計として同定された。

b)概日リズム睡眠障害

睡眠の質や量自体は正常であるものの、入眠時刻や覚醒時刻に異常が見られ、その結果として社会生活や日常生活に苦痛や支障が起こる。体内時計の異常がその病因として推定されている。

c)時計遺伝子

日内リズムの形成に必要な遺伝子群のうち、特にリズム発振そのものに中心的な役割を果たす遺伝子群を時計遺伝子といい、その多くは転写調節因子をコードしている。ヒトなどの哺乳類では、*Clock*や*Period*(*Per1*、*Per2*、*Per3*)、*Cryptochrome*(*Cry1*、*Cry2*)などが時計遺伝子として知られている。

参考文献

1) 守屋孝洋 (2013) 時間薬理学による最新の治療戦略大戸茂弘 編、精神疾患「精神疾患と時間治療・体内時計の分子機構と精神疾患」、医薬ジャーナル社、p182-204
2) Hayashida *et al.* (2003) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 285(2):R306-312.
3) Kamemori *et al.* (2004) Brain Res. 1029(1): 34-40.
4) Moriya *et al.* (2000) Mol Pharmacol. 58(6): 1554-1562.
5) Uesaki *et al.* (2016) Jpn Pharmacol Ther. 44(9):1347-1360.

3Dプリンターによるウシラクトフェリン N-ローブとC-ローブモデルの作製（その3）

島崎 敬一　相沢 智康
Keiichi SHIMAZAKI　Tomoyasu AIZAWA
北海道大学名誉教授　北海道大学　先端生命科学研究院

ラクトフェリンを構成している2つのローブ（N-ローブとC-ローブ）の3Dプリンターによる作成過程とその背景について、これまで2回にわたって紹介してきました（ニュースレター15,17号）。その後さらにリボンモデルの作成を行ったので、本稿で紹介いたします。

11. ラクトフェリン分子のリボンモデルの作成

タンパク質分子の主鎖、すなわち骨格構造だけを観察する場合は、タンパク質の二次構造を識別するのに適した表現法のリボンやカートゥーンと呼ばれるモデルでの表現が適しています。そこで、ラクトフェリン分子のリボンモデルを3Dプリンター（AGILISTA-3000、キーエンス）を用いて作成しました（図7-a）。用いたX線結晶解析データはこれまでと同じく1BLF.pdb(6)で、鉄イオンを2個結合した飽和型（ホロラクトフェリン）です。

写真を見て推測されるように、リボンモデルでは構成している鎖の強度が作成した分子モデルの形態を保つために非常に重要になってきます。そこで、主鎖の太さの設定を変えたり、安定化のためにジスルフィド結合（S-S結合）を導入して強度不足から生じる型崩れを回避しました。リボンモデルは主鎖を一筆書きのように表現する方法のため、ジスルフィド結合はデフォルトでは表示されません。また、鉄イオンに配位しているアミノ酸側鎖をボールスティック（ball-stick）で表示しようとしましたが、接続部が点になってしまい、かつ鉄イオンとアミノ酸残基側鎖との配位結合は連続体として認識されないため、鉄イオンが本来あるべき位置から落下してしまうというような様々な困難に直面しました。そこで、PyMol(7)ではなくChimera(12)を用いてデータを加工し、数々の試行錯誤と試作を繰り返して完成にこぎつけました。本来は図7-bに示したように鉄イオンが結合していますが、作成したモデルでは糖鎖と鉄イオンは省いたものとなっています。

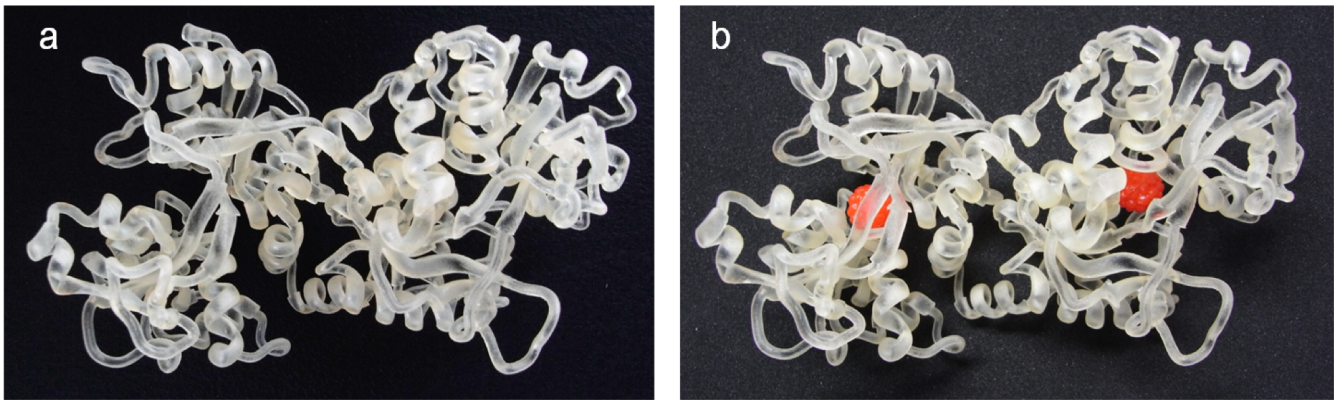


図7 3Dプリンターで作成したラクトフェリン分子のリボンモデル （a） と、それに鉄イオンを加えたもの (b)

作成したモデルのサイズは14 cm × 9 cm × 7 cm、重さ29.0 g。赤い球は鉄イオンのイメージを示したが、実際のイオン半径の割合より大きい。なお、背景を黒にしたのは、照明で生じる影を見えにくくするため。

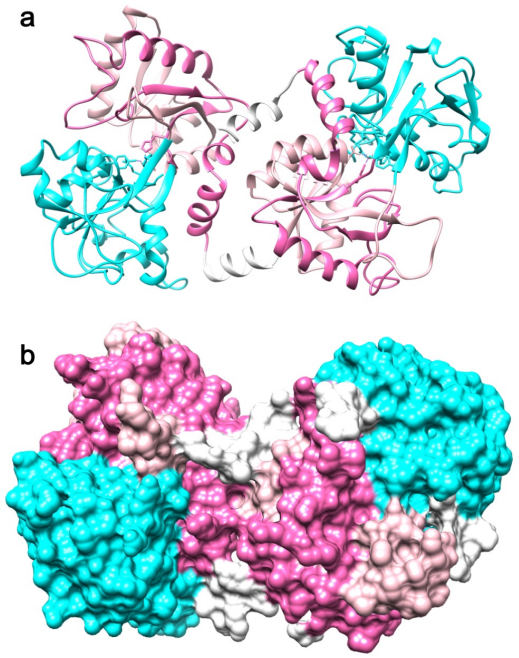


図8　ラクトフェリンを構成している4つのドメイン構造を(a)骨格構造(リボンモデル)と(b)表面構造(surface model)で表現した(Chimeraで作成)

N1(1-90)とC1(345-431)をpinkで、N1(251-333)とC1(593-676)をhotpinkで、N2(91-250)とC2(432-592)をcyanで示した。

鉄イオンと配位しているアミノ酸残基はN-ローブではAsp60, Tyr92, His253, Tyr192、C-ローブではAsp395, His595, Tyr433, Tyr526です。鉄イオンの結合していないアポラクトフェリンの状態ではドメイン間の隙間がやや大きくなります。また、ヒトラクトフェリンのデータですが、分子を楕円形と仮定するとその大きさは55×35×35Åと報告されています(13)。一方、鉄のイオン半径は電子状態にもよりますが0.7～0.9Åです。これらに基づいて計算すると、作成した分子モデルの実サイズ(14 cm×9 cm×7 cm)に合う鉄イオン半径は約2 mmとなります。用いたプラスチック球の半径が6 mmだったので、写真ではかなり誇張したサイズになっています。

12. ラクトフェリン分子のドメイン構造

ラクトフェリンは2つのローブから構成されていますが、表1に示したように各ローブはそれぞれN1とN2およびC1とC2のドメインに分けられます(6)。これら4つのドメインの立体モデルを作成して、それぞれのブロックをパズルのように組み合わせることが出来るのではないかというのが、そもそもの発想でした。しかし、タンパク質の立体構造はそんなに生易しいものではないということが、これまでの過程でよく分かりました。そこで、差し当たってはコンピューター上でそれぞれの構造を表示してみます(図8)。また、抗菌ペプチドであるラクトフェリシンB(Phe17-Phe41またはAla42) とラクトフェランピンB(Trp268-Arg284) は共にN1ドメインに位置していることが表1から分かります

表1. ウシラクトフェリンとヒトラクトフェリンの各ドメイン構成アミノ酸残基

	ウシ*	ヒト**
N1	1-90, 251-333	4-90, 252-332
N2	91-250	91-251
C1	345-431, 593-676	345-433, 596-663
C2	432-592	434-595

* ウシラクトフェリンのドメイン構成 (6)

**ヒトラクトフェリンのドメイン構成 (14, 15)

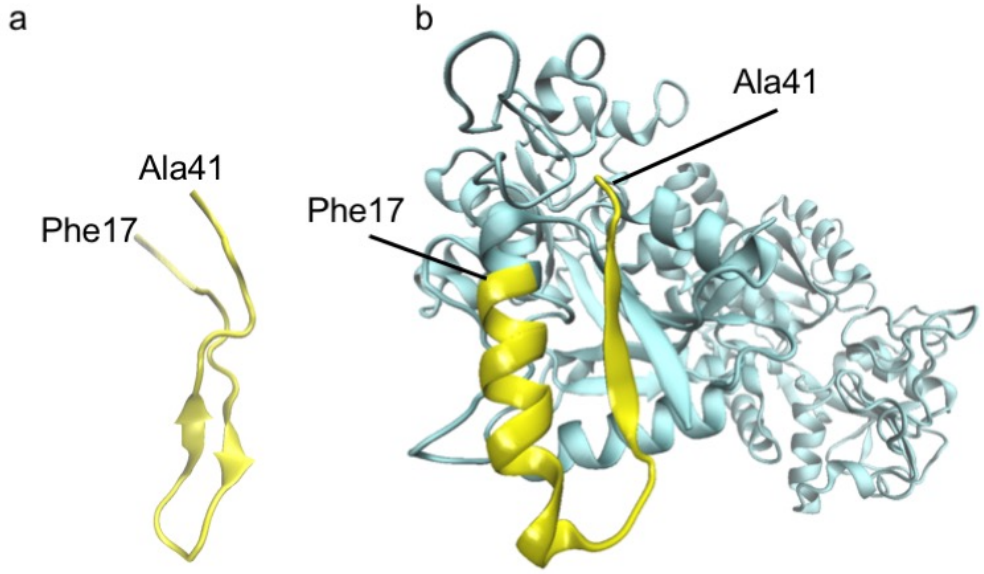


図9.ラクトフェリシンの立体構造　（VMD（17）で作成）

a. NMR解析によって得られたラクトフェリシンの立体構造（1LFC.pdb）。水に溶けた状態のラクトフェリシン分子は、分子内β-構造を形成していることが分かる。

b.X線結晶解析データによるラクトフェリン分子内でのラクトフェリシン部分を黄色で示したもの。ほぼ半分がヘリックス構造をとり、残りの部分はβ-構造をとっている。

13.タンパク質の立体構造に影響を与える因子

X線解析では、タンパク質の単結晶を用いて解析しますが、NMR（核磁気共鳴）法では溶液状態で測定します。タンパク質は固体状態（結晶）でも、溶液状態でもその立体構造は同じと考えられています。他にタンパク質溶液で構造に関する情報を得る手段としては、円偏光二色性（CD）、それ以前には旋光分散（ORD）が使われていましたが、それらはタンパク質の二次構造すなわち規則構造（α-ヘリックス、β-構造）と不規則構造の割合に関する情報しか得られませんでした。しかし、芳香族アミノ酸側鎖やその他の発色団の吸収変化の測定では、二次構造に変化は無くとも芳香族アミノ酸側鎖の関与する微細な変化やリガンド結合などによる立体構造の変化が追跡できるなど、とても有効な方法だといえます。

ラクトフェリンは分子量が76kDaで、NMRで解析する対象としては大き過ぎます。ウシラクトフェリンをペプシン加水分解して得られた抗菌活性ペプチドであるラクトフェリシンB（lactoferricin B）のNMRデータ（16）がありますので、その立体構造とともにラクトフェリン分子内での位置が分かるように示したのが図9です。固体状態と液体状態とでタンパク質がとっている立体構造、すなわち三次元の空間配置は同じと考えられると書きましたが、この図を見ると全く異なっています。なぜそのようになるのでしょうか。

ラクトフェリシンはヘパリンやリポ多糖に結合する性質があり、Lys-Cys-Arg-Arg (18-21)とArg-Met-Lys-Lys (25-28)が特異的な結合部位です (18)。ラクトフェリシンとヘパリンとの相互作用を円偏光二色性スペクトルの変化で比較したところ、水溶液中でのラクトフェリシンの形態は不規則構造(50%)とβ-構造(40%)ですが、ヘパリンを加えると不規則構造の減少とβ-構造の増加が観察され、さらに塩化ナトリウムを加えるとβ-構造が減少して不規則構造が元の割合に戻るという興味深い結果が得られました。電解質(イオン性物質)の有無による静電的相互作用の影響で、ラクトフェリシンとリガンド(この場合はヘパリン)との解離・会合がペプチドの可逆的な構造変化を誘起したと理解できます。タンパク質やペプチドの立体構造はそれらのアミノ酸配列によって決まります。それらのペプチド鎖の情報をもった遺伝子の塩基配列でその立体構造がすでに決まっているとも言えますが、実際にはペプチド鎖の折りたたみの仕方を間違ってすぐに崩壊したり、あるいはシャペロンで修正される場合もあります。本来、タンパク質やペプチドの立体構造は、各アミノ酸側鎖の性質とその周囲の環境によってエネルギー的に最も安定な形に落ち着くものです。アミノ酸側鎖が親水性か疎水性か、解離基があるならば陽イオンか陰イオンか、さらに側鎖が水のような極性溶媒に囲まれているのか、あるいは非極性の環境にあるのかなど、さまざまな要因が絡んで立体構造が決定されます。ヘパリンとの相互作用の例を引用しましたが、グラム陰性菌の細胞壁表面にあるリポ多糖にラクトフェリンやラクトフェリシンが結合する際にも、結合部位のペプチド鎖の立体構造が微妙に変化します。この構造変化が菌体表層の脂質二重膜に貫入しやすくなってさらに大きなダメージを与え、最終的に菌体を崩壊させると考えられます。

14.本稿を終えるに当たって

これまで述べてきたタンパク質立体構造の三次元モデルの最大の利点は、実際に触れることができて立体的な構造を直感的に理解できることだと思います。しかし、原稿上では写真だけとならざるを得ませんので、それを補う意味でコンピューターグラフィックスによるモデル図も多用しました。これらを併用することによって、ラクトフェリンのタンパク質分子としてのイメージがさらに把握しやすくなったものと思います。

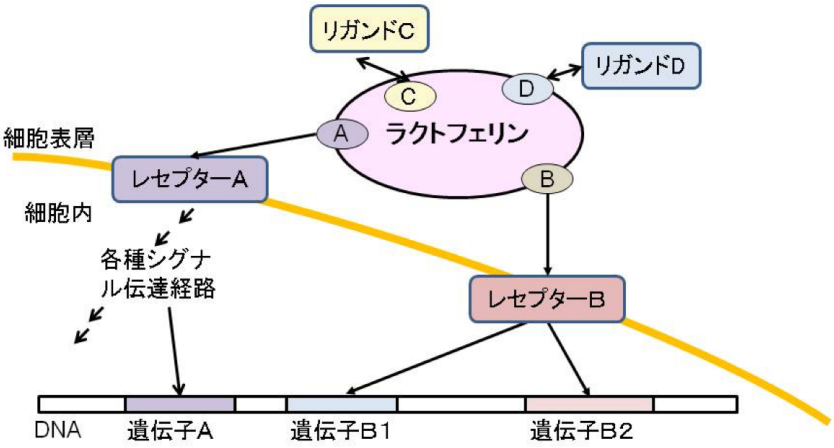


図10.ラクトフェリン分子の多機能性発現仮説

ラクトフェリンあるいはそのフラグメントに含まれるA、Bの部位が、それぞれ細胞表面のレセプターA、Bと結合することを示している。Aの場合は各種シグナル伝達経路を経由して機能を発現する可能性を、Bの場合は、核内へ移行して、遺伝子B1やB2に働きかけてタンパク質B1、B2の発現を制御する可能性を表現している。さらに部位C、Dは鉄イオンその他のリガンド結合に関係する部位を表わしている。

タンパク質にはさまざまな分子が結合し、それら結合状態のX線結晶解析データもRCSB Protein Data Bank(PDB)などに収載されています。また、既知のタンパク質のサブユニット間の相互作用部位に関する情報も容易に得られます。一方で、何らかの実験データから異なる2つのタンパク質分子が相互作用することが分かった場合、それが新規な発見であれば当然のことにX線結晶解析データはありません。そのような場合に両タンパク質の相互作用部位を推定する目的で、化学的、物理化学的、遺伝子工学的などのさまざまな方法が用いられます。しかし、両方のタンパク質分子の表面モデルを本シリーズで述べたような方法で作成し、両者がフィットする部分を「アナログ的に見つけて次のステップに進む」というやり方が直感的ではありますが最も早道な突破口ではないでしょうか。

タンパク質の生物学的機能は、その立体構造と密接に関係しています。ラクトフェリンの多機能性の発現も例外ではありません。例えば図10にごく簡略化して示したように、ラクトフェリン分子表面には複数のリガンドやレセプターとの結合部位が存在します。それらには立体構造を破壊(変性)しても活性がほとんど変化しないアミノ酸配列依存性の部位と、変性させると失活する立体構造依存性の部位があります。たとえば、鉄イオンの2つの結合部位はN1とN2ドメインおよびC1とC2ドメインに含まれるアミノ酸残基から構成されていて、当然のことにそれらの残基はアミノ酸配列(一次構造)的には離れた部分あるため立体構造依存性の部位です。そのようなラクトフェリンの特異的な部位が、さまざまな細胞の表面に存在するレセプターを経由して種々のシグナル伝達経路を辿ったり、そのままあるいは断片化されてDNAやRNAなどと相互作用することにより非常に多様な生物活性を発現できるのだと考えられます。

「構造解析」という堅い語調から、生物系や医学系とはかけ離れた概念と思わずに、タンパク質・ラクトフェリンの示す多機能性を理解する一助にして頂ければ幸いです。

15. 追加情報

本ニュースレター第7号でgifアニメーションの手法で回転する分子モデルの作り方を説明しました。gifアニメーションは各種の動画フォーマットと違って画像ファイルと同じように扱え、手軽なのが特徴です。その際に用いたVMD(17)で動画やアニメーションを保存するためには、そのためのプログラムパッケージをインストールする必要がありました。しかし、インストールの方法が難しくてよく分からなかったので、一般的な動画取込みソフトとgifアニメーションへの変換ソフトを用いる方法を使いました。しかし今回用いたPyMol(7)、あるいはCCP4mg(19)ではMPEG-1形式（mpg）で動画として直接に保存できるため、mpeg→gif変換ソフトを使って簡単にgifアニメーションを作成することができます。

参考文献

(文献番号は初回からの継続)

6. Moore et al., (1997) J. Mol. Biol., 274, 222-236.
7. PyMol(https://www.pymol.org/)
12. Chimera ((https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/)
13. Anderson et al., (1987) Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1769-1773
14. Anderson et al., (1994) Adv. Exp. Med. Biol., 357, 227-230 (Plenum Press).
15. Baker and Baker, (2005) Cell. Mol. Life Sci., 62, 2531-2539.
16. Hwang et al., (1998) Biochemistry, 37, 4288-4298. 1LFC.pdb
17. VMD(http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/)
18. Shimazaki et al., (2000) Excerpta Medica Inter. Congr. Ser. 1195, 37-46 (http://www.cosmobio.co.jp/support/technology/milk-protein/tech_milk_k_03_20050131.asp)
19. CCP4mg (http://www.ccp4.ac.uk/MG/)

第13回国際ラクトフェリン会議のご案内

本年11月にローマ(イタリア)で、第13回国際ラクトフェリン会議が開催されます。国内外のラクトフェリン研究者が会する貴重な機会ですので、本学会の会員の皆様には奮ってご参加いただき、活発なご意見や討論をお願いいたします。

第13回国際ラクトフェリン会議
XIIIth International Conference on Lactoferrin, Structure, Function and Applications

会 期 :2017年11月5日(日)から10日(金)まで
会 場 :Hotel NH Collection Roma Vittorio Veneto

大会長:Prof. Piera Valenti

35歳以下の学生または博士研究員の優れた口頭発表演題を対象にGenevieve Spik賞が授与されます。
(Spik賞が制定された経緯については、ニュースレター4号をご覧ください。)

なお、国際会議の詳細については下記の公式サイトをご覧ください。
http://www.lactoferrinconference.com

日本ラクトフェリン学会ニュースレター
第19号 (2017年3月発行)

ニュースレター編集
日本ラクトフェリン学会
広報委員会

高山　喜晴
農業・食品産業技術総合研究機構　畜産研究部門
竹内　崇
鳥取大学農学部
島崎　敬一
北海道大学名誉教授

日本ラクトフェリン学会
事務局
〒467-8603
名古屋市瑞穂区田辺通３－１
名古屋市立大学
津田特任教授研究室
担当：鵜飼知里

lacto@phar.nagoya-cu.ac.jp
TEL & FAX：052-836-3497