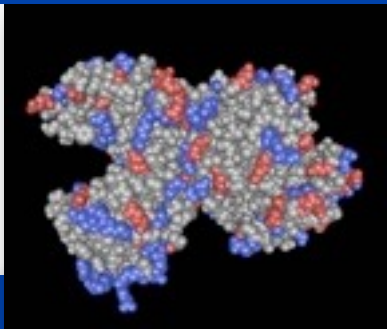


Lactoferrin NEWS

日本ラクトフェリン学会ニュースレター 第17号

2016年6月



1. 巻頭言

第7回学術集会の開催にあたって
玉置 幸道

2. 学会賞受賞研究紹介

ウシラクトフェリンを周産期の乳牛
に給与すると生産性が向上する
平子 誠

3. 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2) 島崎敬一・相沢
智康

巻頭言

第7回学術集会の開催にあたって

玉置 幸道

Yukimichi TAMAKI

朝日大学歯学部教授

(第7回学術集会大会長)

わたしとラクトフェリンとの出会いはいまから10年ほど前に遡りますが、当時の非常勤講師の先生からラクトフェリンって知っているか?と尋ねられたことがキッカケでありました。よく調べてみたところ医療系でも腫瘍、肝炎やエイズ等で高い評価を得ていることを知り、歯科医療でも何か役に立つのではとの観点から、徐々に関わりを強めるようになりました。ラクトフェリンについては(株)NRLファーマの故・安藤邦雄博士からいろいろなことを教えていただき、歯科の中でも重度歯周病に代表される難治慢性疾患や各種炎症への適用、ドライマウスや口臭の改善など幅広く試みてきました。

今までに4回ほど「臨床ラクトフェリンシンポジウム」と称した講演会を開催し、専門に研究をしておられる先生方からラクトフェリンの生体との関わりを解説していただくとともに、臨床の症例に向けての活用方法や効果などを紹介してきました。シンポジウム開催を通して多くの先生方と知り合うことができ、今回このような合同開催という場を設けていただける運びとなりました。合同大会ですので特別講演にはシンガポールの歯科医Dr.Reginaldに講演を依頼し、またシンポジウムでは医療系の大きなテーマでもある超高齢化社会を題材にして、老齢による生理的レスポンスの低下に対するラクトフェリンへの期待で討論をしていきたいと考えています。

最後になりましたが、第7回学術大会に向けては臨床ラクトフェリンシンポジウムのメンバー一同とともに、精一杯の準備を致す所存でございます。どうか盛会となるように多くのご協力を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

ウシラクトフェリンを 周産期の乳牛に給与すると生産性が向上する

平子 誠

Makoto HIRAKO

農業・食品産業技術総合研究機構

畜産研究部門 家畜育種繁殖研究領域

高泌乳牛にはその能力に見合う栄養価の高い飼料(濃厚飼料)を給与する必要がある。しかし、濃厚飼料を多給すると、急速な発酵によって発生した有機酸でルーメン¹⁾液が酸性化し、ルーメンフローラを構成する細菌が死滅して多量のリポポリサッカライド(LPS)が発生するため、潜在性ルーメンアシドーシス²⁾のリスクが高くなる。そこで、LPS吸着能と抗菌作用を有するラクトフェリンに着目し、飼料添加による泌乳および繁殖性改善効果を検証した。その結果、ルーメン菌叢が安定化して微生物態タンパク質(MCP)³⁾合成量が増加した。ルーメン液pHの変動が小さくなり、LPS活性値の上昇も抑えられた。また、血液中のLPS結合タンパク質と炎症性サイトカイン濃度の上昇も抑制され、泌乳成績と繁殖成績の両方が向上した。これらのことから、ラクトフェリンの給与は乳牛の生産性向上に寄与することが実証された。

乳牛はアスリートに例えられるほど、その栄養管理に細心の注意が必要である。特に、維持から生産に向けて餌が切り替わる周産期の管理が重要で、牧草よりエネルギー価の高い穀類を多く含む飼料(濃厚飼料)の給与量が少なくいと栄養不足になり、多すぎるとルーメン発酵に異常をきたし、どちらも周産期疾病の原因となる。そこで、濃厚飼料多給期のルーメン環境改善と疾病予防を目的に、周産期の乳牛にウシラクトフェリン(LF)を給与する飼養試験を行った。

1. *In vitro*での予備試験

乳牛へのLFの給与量を定めるため、*in vitro*で予備試験を行った。ルーメン液に0.01~5g/LのLFを添加して培養したところ、5g/Lで繊維分解菌の増殖が大幅に抑制された。ルーメン液の総量はおよそ50L程度なので、250g給与するとルーメン内の繊維消化率が低下すると考えられた。また、ルーメン液を長時間培養すると、1g/L(給与量として50g相当)以下では菌叢構造が無添加と変わらなかったのに対し、5g/Lでは大きく変化し適切なルーメン発酵が行われない可能性が示された。これら

のことから、1回あたりの給与量は50gを超えないようにすべきであると考えられた。

2. 通常飼養下でのLF50g給与

通常飼養のホルスタイン種経産牛を対照区12頭、LF区12頭の2群に分け、LF区には櫛引ら(2008)が子牛で行った先行試験で得られた有効量(日量3g)を参考に、子牛との体重比と予備試験の結果を考慮して分娩後毎朝50gのLFを4週間給与した。その結果、期待に反してルーメン液中のリポポリサッカライド(LPS)活性値が対照区より高くなる個体が認められた。血液中のTNF α 濃度の上昇は抑えられていたことから、日量50gのLF給与では、免疫賦活効果は覗かれるものの、一部の牛には用量が多すぎてルーメン菌叢に悪影響があったものと考えられた。一方、本飼養試験と並行して高橋ら(2011)が行ったウシ子宮内膜上皮細胞培養系におけるLFの添加効果を調べる実験において、0.1g/LのLFが1mg/LのLPSによるプロスタグランジン産生刺激を抑制することが明らかになった。そこで、次の飼養試験はLFの給与を日量10gに低減して実施することにした。

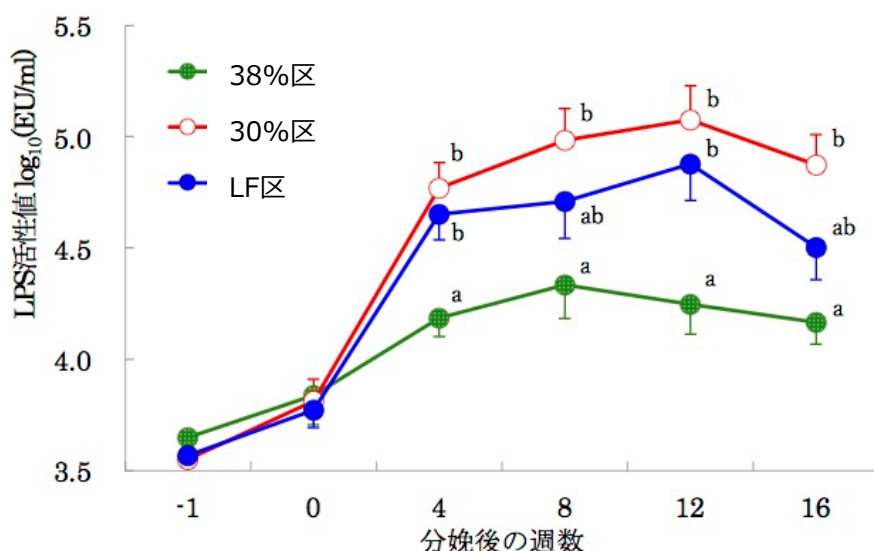


図1 分娩後各週次におけるルーメン液中LPS活性値

エラーバーはSEM a,b: 同時期の異文字間に有意差 ($P < 0.01$)

3. 濃厚飼料多給下でのLF10g給与

ホルスタイン種経産牛32頭を供試し、分娩後飼料中の中性デタージェント繊維(NDF)⁴⁾の水準を38%(粗飼料多給)に設定した38%区(12頭)、30%(濃厚飼料多給)に設定した30%区(10頭)および30%区と同様の飼料にLF10gを含む補助飼料を添加したLF区(10頭)の3群に分け、飼養試験を行った。乾物摂取量に差はなかったが、分娩後の体重減少は38%区が大きく、体重の回復も遅かった。乳量は38%区が少なく、LF区、30%区の順に多くなった。乳成分では38%区の乳脂率が30%区に比べて高く、LF区は両者の中間であった。ルーメン液中LPS活性値は、30%区が38%区に比べて高く、LF区は30%区よりやや低値で推移した(図1)。血液中のTNF α およびIFN γ 濃度は30%区がLF区および38%区より高値で推移した。繁殖成績はいずれも有意ではなかったが、初回排卵は30%区が38%区に比べて早かった。一方、初回授精日数、空胎日数は38%区が30%区に比べて短く、LF区は38%区と同等であった。また、試験期間内の受胎頭数はLF区が最も多かった。これらの結果から、濃厚飼料の多給により泌乳には良好な効果が認められるものの、繁殖には悪影響を及ぼすことが推察

され、LFの給与によりこれらの悪影響が緩和される可能性が示された。

4. 分娩前からのLF10g給与

ホルスタイン種経産牛を対照区とLF区の2群(各12頭)に分け、分娩前は濃厚飼料の給与量を徐々に増やすリードフィーディングを行い、分娩後はやや濃厚飼料多給状態となるNDF33%の飼料を給与した。LF区のみ分娩前3週から分娩後12週まで飼料にLF10gを添加した。乾物摂取量と体重に差はなかったが、LF区では分娩前後の餌が切り替わる時期のルーメンにおける菌叢構成とpHの変動が小さく、泌乳早期の微生物態タンパク質(MCP)合成量が多かった(図2)。また、血液中のLPS結合タンパク質濃度の上昇が対照区より緩やかで、その後も低値で推移した。乳量は対照区と比べて有意に多く、乳脂率、乳タンパク質率等の乳成分値も高かった。繁殖成績は対照区と比べてやや良好であったが、有意ではなかった。前回の飼養試験の結果と比較すると、分娩前からLFを給与すると分娩前後のルーメン環境改善に効果を発揮し、泌乳期には濃厚飼料多給下でより顕著な効果が現れると考えられた。

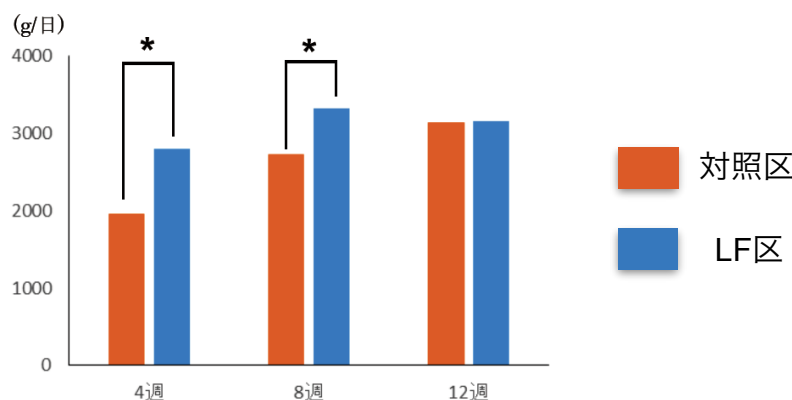


図2 分娩後各週次におけるルーメンMCP合成量(最小二乗平均値)

* 対照区とLF区間に有意差 ($P < 0.05$)

5. 結論

3回の飼養試験で得られた結果を総合すると、乳牛への適量のLF給与は、周産期の餌が切り替わる時期のルーメン菌叢を安定化させ、MCP合成量を増加させること、ルーメンpHの変動を抑え泌乳前期のLPS活性値の上昇を抑えること、免疫機能を良好に保つことなどにより、泌乳成績と繁殖成績の両方を向上させることが示唆された。

参考文献

Kushibiki S. et al.: Effect of bovine lactoferrin feeding on lipopolysaccharide-induced metabolic and hormonal disturbances in preruminant calves. Anim Sci J 79: 375-381, 2008.

高橋ひとみ他: ラクトフェリンはリポポリサッカライドによるウシ子宮内膜上皮細胞のプロスタグランジンF2 α 産生促進作用を緩和する. ラクトフェリン2011(日本医学館・日本ラクトフェリン学会第4回学術集会実行委員会編)pp121-125.

謝辞

本研究は農林水産省農林水産技術会議事務局の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」および「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の助成を得て行われた。

本研究の遂行にあたり、飼養試験および各種分析を担当した神奈川県秋山清博士、同部門の櫛引史郎博士、真貝拓三博士、高橋ひとみ博士をはじめとする共同研究者の諸氏に感謝する。

脚注

1) **ルーメン**: 第一胃、反芻動物の4つある胃のうち最初に位置し、食道が変化したもの。容積が最も大きく、乳牛ではドラム缶1本分(200L)にも達し、微生物の発酵により繊維を分解する発酵槽の役割を担う。循環ポンプの働きをする第二胃とあわせて反芻胃という。

2) **潜在性ルーメンアシドーシス**: ルーメン液の局所的な酸性化によってルーメン壁が傷つき、バリア機能が失われてLPS等の有害物質が体内に吸収され、顕性の障害が進行していくこと。慢性肝機能障害、乳量・乳質の低下、繁殖障害等、生産性の低下を招く。

3) **微生物態タンパク質(MCP)**: 微生物の菌体を構成するタンパク質、牛が摂取したアミノ酸やタンパク質の大部分は、ルーメンに棲息する微生物が一度分解し、菌体タンパク質として再構成される。牛はこれを下部消化管に送り、消化・吸収して利用する。ルーメン微生物はアンモニアや尿素からアミノ酸を合成できるので、反芻動物は単胃動物より窒素の利用効率が高い。MCP合成量はルーメン発酵の健全性の指標ともなる。

4) **中性デタージェント繊維(NDF)**: 中性の界面活性剤で可溶化しない繊維成分、植物の細胞壁を構成するセルロース、ヘミセルロース、リグニンなどからなる。ルーメン発酵により分解されて揮発性脂肪酸となり、ルーメン壁から吸収されて栄養源として利用される。

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2）

島崎 敬一

Keiichi SHIMAZAKI

北海道大学名誉教授

相沢 智康

Tomoyasu AIZAWA

北海道大学 先端生命科学研究院

3Dプリンターによるラクトフェリン分子モデルの作成過程を、前稿（ニュースレター第15号）で紹介しましたが、本稿ではその詳細および背景について補足します。

5. ラクトフェリン立体構造データの選択

タンパク質の立体構造データはRCSB Protein Data Bank(PDB)のサイトからダウンロードします(登録なし、無料)。検索欄に"lactoferrin"あるいは、"lactotransferrin"と入力すると100件以上のデータがヒットしますので、ウシラクトフェリンに絞るためにRequirements欄のOrganismでBos taurusを選択します。このように非常に多くの立体構造データがあるので、ラクトフェリン分子全体のデータ、N-ローブあるいはC-ローブのデータ、リガンドとの複合体のデータ、ミルク由来か組換え体かなど、目的によって選べるメリットがあります。さらに解像度の違いや、解析方法がX線結晶解析かNMR(核磁気共鳴)かも選択できます。上述のRequirements欄のExperimental MethodにはX-rayとsolution NMRとがあり、そこでNMRを選択すると、ラクトフェリシン(lactoferricin)やラクトフェランピン(lactoferampin)などの数kDaのフラグメントに絞られます。本稿ではニュージーランドのE.N.Bakerらのグループが解析した1BLF.pdb(6)を用いています。

6. 表示する構造部位の選択・表示

3Dプリンターでラクトフェリンの表面モデル(surface structure)を作るに当たって、分子全体をプリント(作成)するとN-ローブとC-ローブがその接続部(Thr334-Arg344)を蝶番のようにして開いたり閉じたりできるの

ではないかと考えました。しかし、3Dプリンターのシステムでは両ローブの複数の接触部位をそれぞれ連続体として認識するために両ローブは固定されてしまうことが分かり、N-ローブとC-ローブそれぞれに分けて作成することとしました。

作成する各ローブは個別に表示して3Dプリンターにデータを渡すようにします。[PyMol](#)(7) その他の分子表示ソフトでラクトフェリン分子の部分構造を表示するには、求める構造を構成しているアミノ酸配列の範囲を指定することで行います。また、エディターなどでpdbファイルを開いて必要なデータ部分と不要な部分を選択して編集する方法もあります。そのようなやり方で編集している画面をコピーして示そうとしたのですが、ラクトフェリシンB(Phe17-Phe41)の25残基分だけでも膨大な量(200行以上)となりますので省きました。

7. pdbデータから3Dプリンターへ

pdbデータに基づいて3Dプリンターで分子モデルを作成させるためには、まずpdb形式の立体構造データを分子構造表示ソフト(ここではPyMolを使用)に読み込み、表示させた分子モデルの形態をVRML(Virtual Reality Modeling Language)フォーマットで保存し(拡張子はwrl)、これをやはりフリーウェアの[MeshLab](#)(8)を用いてSTL(Standard Triangulated Language)フォーマットに変換してから3Dプリンター制御ソフトに渡すという手順

8. 立体モデルとそれに対応するグラフィックス表示

図5(a-c)に3Dプリンターで作成した分子モデルと、分子構造表示ソフトで表示したものをそれぞれ対応させて示しました。5-aに示したN-ローブとC-ローブの各モデルの径は共にほぼ5cmで、重量は46gでした。5-bは5-aに相当するグラフィックスで、5-cはラクトフェリン全体の分子です。赤で示した部分は両ローブの連結部分で3回転の α -ヘリックス構造をとり、11残基(Thr334-Arg344)で構成されています。Arg344はC-ローブ側にあるVal345と結合しており、Val345のほとんどは分子内に埋没していることが分かります。さらにbとcでは識別しやすいように、ラクトフェリン部分(Phe17-Phe41)を黄色で示しました。また、bではC末端残基(Arg 689)を青で示してありC-ローブでは確認できますが、全分子モデルでは見えなくなっています。そのため、C末端残基は両ローブの接合部位に位置して比較的アクセスされ難い環境に位置していることが分かります。

9. ウシラクトフェリン分子の糖鎖結合部位

ラクトフェリンは糖タンパク質ですが、今回作成した分子モデルでは糖鎖は省きました。糖タンパク質の結合様式には、アスパラギンのアミド基に糖鎖が結合したN-グリコシド結合型(N-結合型)と、セリンやトレオニン(スレオニン)のOH基に結合したO-グリコシド結合型(O-結合型)とがありますが、ラクトフェリンの場合はN-結合型です。ラクトフェリンに含まれるAsn残基は分子中に30個近くありますが、その中でシークオン(sequon)配列すなわちAsn-X-SerまたはAsn-X-ThrのAsn残基に糖鎖が結合します。ウシラクトフェリンの場合、糖鎖結合部位はAsn233, 281, 368, 476, 545の5か所あり、これらの部位は全て分子表面に存在しています(図6-a)。また、Asn-(GlcNAc)2-Man-(Man-GlcNAc)2-(Man)nなどがウシラクトフェリンにおける主な糖鎖として報告されています(10)。ここで用いたX線結晶解析データ(1BLF.pdb)ではC-ローブの3か所に糖鎖が付いてい

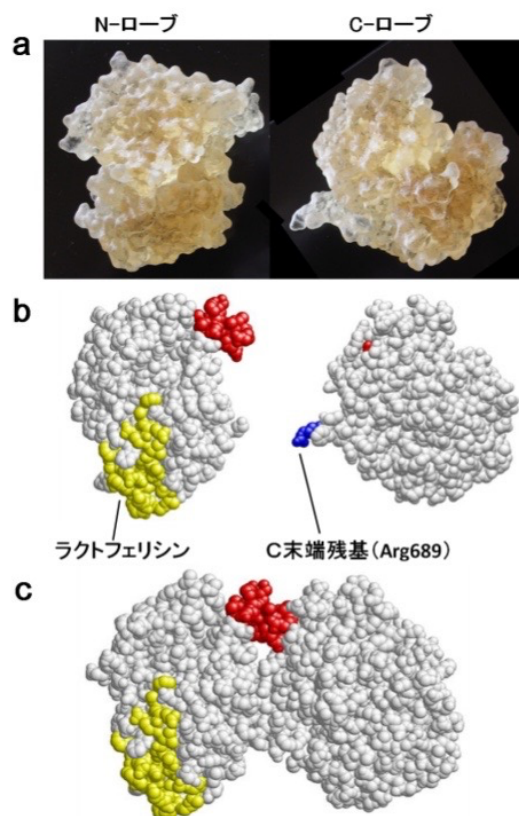


図5 完成したウシラクトフェリンのN-ローブとC-ローブおよび分子構造表示ソフトで表示した図の比較

- 3Dプリンターで作成したN-ローブ(左)とC-ローブ(右)。共に直径はほぼ5cmで、重量は46 g。
- Rasmol (9) のsurface modelで表示したN-ローブとC-ローブ。N-ローブの赤色はローブ間の連結部位(Thr334-Arg344)でC-ローブの赤色はVal345、青色はC末端残基(Arg 689)。黄色の部位はラクトフェリンB(Phe17-Phe41)を示す。
- Rasmolのsurface modelで表示したラクトフェリン分子全体。着色部分はbと同じ。

て、それぞれはAsn368-GlcNAc, Asn476-(GlcNAc)2-Man, Asn545-(GlcNAc)2-(Man)4となっています。しかし、4か所に結合していると記述している論文もあります。これら糖鎖の組成や結合部位の違いが、ラクトフェリン分子の不均一性の一要因となっています。なお、ヒトラクトフェリンの場合は3か所(Asn137, 479, 624)の内のAsn137と478に糖鎖が結合していると報告されています(11)。

GlcNAc, N-アセチルグルコサミン(pdbではNAGと表記)
Man, マンノース

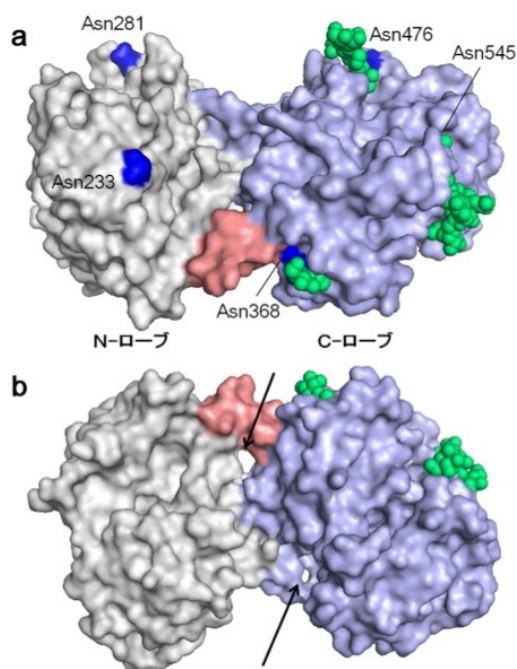


図6 ラクトフェリン分子と糖鎖 (a) およびN-ローブとC-ローブ接触面の貫通部 (b)

N-ローブはgray90、C-ローブはlight blue、両ローブ接続部分をsalmon、糖鎖結合部位のアミノ酸残基(Asn)をblue、糖残基をgreenで示した(PyMolで作成)。なお、このラクトフェリン分子ではAsn233とAsn281に糖鎖は結合していない。また、分子を異なる方向から眺めると、N-ローブとC-ローブの接触面に少なくとも2か所の貫通部分(bの矢印で示した部分)があることが分かる。

また、N-ローブとC-ローブの接触面を図5-aでみるとゴツゴツしていて多数の隙間があります。図6-bにそれらの内の2つの貫通部分を示しました。大きい方の穴のサイズをPyMolの機能を使って推定すると5-10Å程度となり、水分子(直径がほぼ3Å)よりも大きい分子でも自由に出入りできることが分かります。

10.次回はリボンモデルの作成です

ラクトフェリン分子モデル作成の目的は、モデルを手にとって立体構造を実感し、さらに多機能性発現のメカニズムについて何らかのヒントを得ようとすることでした。3Dプリンターによる表面モデルとコンピューターグラフィックスとを併用することによってかなり想像の翼を広げることができますが、より深く知るためにリボンモデルも作成しましたので、次回で紹介いたします。

なお、コンピューターグラフィックスによるタンパク質分子の表示では自由に色調をコントロールできますが、ここで用いた3Dプリンターでは完成した分子モデルに筆で彩色するしかありません。しかし調べてみると、既にキヤノンからカラー3Dプリンター(インクジェット粉末積層方式)が販売されていることが分かりましたので付記します。

参考文献・参考サイト

(文献番号は前回からの継続)

6. Moore et al., (1997) J. Mol. Biol., 274, 222-236.
7. PyMol(<https://www.pymol.org/>)
8. MeshLab (<http://meshlab.sourceforge.net/>)
9. RasMol(<http://www.openrasmol.org/OpenRasMol.html>)
10. Spik et al., (1988) Biochimie, 70, 1459-1469.
11. Harridas et al., (1995) Acta Crystallogr., D51, 629-646.

第7回学術集会のご案内

本会の第7回学術集会が下記の概要で開催されます。今回の学術集会は、「2016年度臨床ラクトフェリン研究会」との合同大会です。演題登録などの詳細は、下記の[大会専用ホームページ](http://lactoferrin.jp/2016/)で、順次ご案内する予定です。会員の皆様には、奮ってご参加くださいますようお願い申し上げます。

場 所 : 昭和大学 旗の台キャンパス

(東京都品川区旗の台1-5-8)

会 期 : 10月30日(日)

大会長: 玉置 幸道(朝日大学歯学部)

<http://lactoferrin.jp/2016/>

プログラム: 招待講演

シンポジウム

一般講演

ポスターセッション

ランチョンセミナー

企業展示

懇親会(学会賞・富田賞表彰式)

連絡先: 臨床ラクトフェリン研究会事務局

〒142-8555

東京都品川区旗の台1-5-8

昭和大学歯学部歯科理工学教室内

電話(直通)03-5706-5895

info@clinical-lactoferrin.com

日本ラクトフェリン
学会ニュースレター
第17号 (2016年6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

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

〒232-0024

横浜市南区浦舟町4-57

横浜市立大学附属

市民総合医療センター

TEL: 045-261-5656

内線1871

FAX: 045-253-9902

E-mail:

lacto@yokohama-cu.ac.jp