

2015 年研究開発功績賞受賞者論文 総合論文

プロテオミクスの機能性食品開発研究への活用 ～ラクトフェリンの内臓脂肪低減メカニズムの解析～

関 桂子^{*1,2}, 小野知二^{1,2}, 中村佳菜恵¹, 森下 聡¹, 村越倫明^{1,2}

*E-mail: k-ikoma@lion.co.jp

¹ライオン株式会社 : 256-0811 神奈川県小田原市田島 100

²横浜市立大学先端医科学研究センター : 236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9

(受付 2016 年 4 月 18 日, 改訂 2016 年 6 月 2 日, 受理 2016 年 6 月 3 日)

ラクトフェリンは哺乳類の乳中に豊富に含まれる糖タンパク質であり, 感染防御, 免疫賦活など, 様々な生理機能を持つことが知られている. 我々は腸溶化したラクトフェリンに内臓脂肪低減効果という新機能を見出したことから, その機能性食品への展開と作用機序解明に向けて様々な検討を行ってきた. 特に, 脂肪分解促進効果の作用機序解析においては, プロテオーム解析技術を活用することで変動因子の抽出やラクトフェリン受容体の同定を行い, 分子生物学的な解析による裏付けを重ねることで詳細な分子機構を解明することができた.

2015 年の「機能性表示食品」制度のスタートなど, 近年の食品業界を取り巻く環境は刻一刻と変化しており, より高いレベルの研究成果が求められるようになってきている. 今後も, 人々の健康の維持・増進に貢献できる, 確固たるエビデンスを持った製品を開発すべく, 学際領域の知識・技術との連携を活かして取り組んでいきたい.

1 序 論

メタボリックシンドロームとは, 内臓脂肪型肥満に加え, 高血糖・高血圧・脂質異常のうち 2 つ以上を合併した状態をいう. 2008 年の厚生労働省の調べによると, 40～74 歳の日本人男性の 2 人に 1 人, 女性の 5 人に 1 人はメタボリックシンドローム, あるいは予備軍と診断されている. メタボリックシンドロームを予防, 改善するためには, その成因子とされる内臓脂肪の蓄積を抑制することが重要であると考えられている. 従来, 脂肪組織は単なるエネルギーの貯蔵組織であると考えられてきたが, 近年の研究により脂肪組織はアディポネクチンや TNF- α 等のアディポカイン (Adipokine : 脂肪組織が分泌するホルモン) など, 多彩な因子を産生する巨大な内分泌器官であることが分かってきた. 内臓脂肪が過剰に蓄積し, 脂肪細胞が大きく肥大すると, マクロファージ等の炎症細胞の集積や血管の炎症性変化等に代表される, いわゆる“慢性炎症”が生じ, 動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病の発症の原因になることも分かってきている. このような背景からも, メタボリックシンドロームの予防には内臓脂肪の制御が重要なポイントとなると考えられている.

ラクトフェリンは, 哺乳類の乳中に主に存在する分子量約 8 万の糖タンパク質である. ヒトでは母乳中に 1～

3 mg/ml 程度含まれており, 初乳ではさらに高濃度 (5～7 mg/ml) 含まれることが知られている. トランスフェリンファミリーに属し, 分子中に鉄を 2 原子配位することが可能なため, 薄ピンク色を呈しており, 赤いタンパク質とも呼ばれている. ラクトフェリンの立体構造は Baker らによって解明されたが¹⁾, その構造は N ロープと C ロープから構成されており, それぞれに鉄を 1 原子ずつ配位することができる (Fig. 1). ラクトフェリンは多機能性タンパク質として知られており, 鉄分補給, 抗菌作用, リポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) 不活性化作用, 抗ウイルス作用, 免疫賦活作用, 抗酸化作用, 抗炎症作用, がん予防作

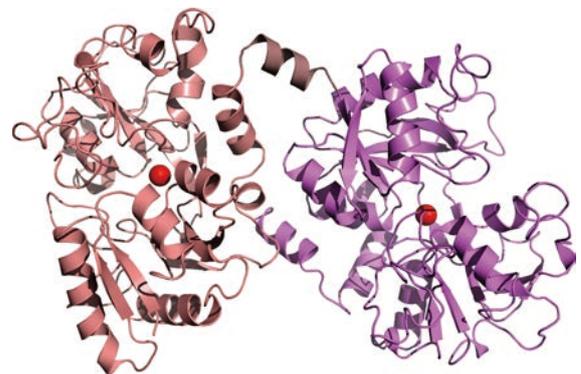


Fig. 1 Human lactoferrin (modified version of PDB data 1B0L)

用等^{2)~9)}, 実に様々な機能を持つことが報告されている。

我々は、歯周病菌由来の LPS を不活性化する素材を探した結果、ラクトフェリンが強い作用を有することを見出した。一方、歯周病は全身健康にも影響を与える可能性が示唆されており、その原因因子が LPS であることも示唆されていた。そこで、我々は歯周病菌由来の LPS をマウスに投与した結果、血中の総コレステロール、中性脂肪が上昇することを確認すると共に、これらのマウスに予めラクトフェリンを摂取させておくと、前述の脂質異常が予防できることも見出した。さらに興味深いことに、ラクトフェリンを投与したマウスは、なぜか内臓脂肪の蓄積が少ないことを偶然発見した。

ラクトフェリンの脂質代謝に対するヒトでの有効性については、症例報告レベルではあるが、ラクトフェリン腸溶錠（胃では崩壊せず小腸で崩壊する錠剤）によりウエスト、体重の減少が認められる症例があることが報告されていた¹⁰⁾。そこで、ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果を科学的に立証するため、ラクトフェリン腸溶錠を用いて、外部の臨床試験機関による二重盲検群間比較試験を実施した¹¹⁾。肥満傾向の日本人男女（内臓脂肪面積平均 100 cm² 以上）に対して、ラクトフェリン腸溶錠群及びラクトフェリンの代わりに乳糖を配合した群（プラセボ群）の 2 群（各群 n=13）を設定し、1 日に 300 mg、8 週間摂取した結果、ラクトフェリン群では、プラセボ群と比較して、体重が 2.5 kg 有意に減少し ($p=0.013$)、CT 撮影による腹部内臓脂肪面積が 12.8 cm² 有意に減少 ($p=0.0089$) することを明らかにし、ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果を科学的に立証した。一方、皮下脂肪に関しては、プラセボ群とラクトフェリン群の間に有意差は認められなかった。このことからラクトフェリンは、メタボリックシンドロームの成因基盤である内臓脂肪に特徴的に効果を示すことが明らか

かとなった。

ラクトフェリンによる内臓脂肪低減効果に関してはこれまでに報告例がなく、作用機序解明のため、まずはラクトフェリンの体内動態を調査した。経口投与したラクトフェリンの吸収経路については Takeuchi らが報告しており¹²⁾、小腸に到達したラクトフェリンは、門脈からではなくリンパ系を介して吸収された後、血流に乗ることを示している。小腸におけるラクトフェリンの吸収経路については Talukder らが考察している。彼らは小腸パイエル板の上部の上皮組織にラクトフェリンが強く結合することを示しており、本結果よりラクトフェリンは M 細胞を介して取り込まれているのではないかと推察している¹³⁾。さらに Teraguchi らは、ラクトフェリンをラットに投与しても、血液中にラクトフェリンを検出することはできず、例え血液に移行したとしても極微量であることを示した¹⁴⁾。これらの体内動態の報告から、我々は 1 つの仮説を構築した。それは、経口摂取したラクトフェリンは、小腸の周囲に存在する脂肪組織である腸間膜脂肪に集積するのではないかということである。小腸からリンパ系を介して吸収されたラクトフェリンは、最初に腸間膜脂肪と接触することになるためである。この仮説を検証するため、ラットを用いてラクトフェリンを強制胃内投与し、体内動態を解析した。その結果、未分解のラクトフェリンが一部小腸に到達し、血中や他の臓器にはほとんど検出されず、腸間膜脂肪に局在していることを明らかにした¹⁵⁾。この結果より、ラクトフェリンは腸間膜脂肪をはじめとする内臓脂肪に直接届き、作用を發揮している可能性が示唆された (Fig. 2)。

そこで、ラクトフェリンの脂肪細胞に対する作用をラット腸間膜脂肪由来の前駆脂肪細胞の初代培養系を用いて検討した。その結果、ラクトフェリンが脂肪細胞における脂肪の合成を抑制するという新しい知見を見出した。しか

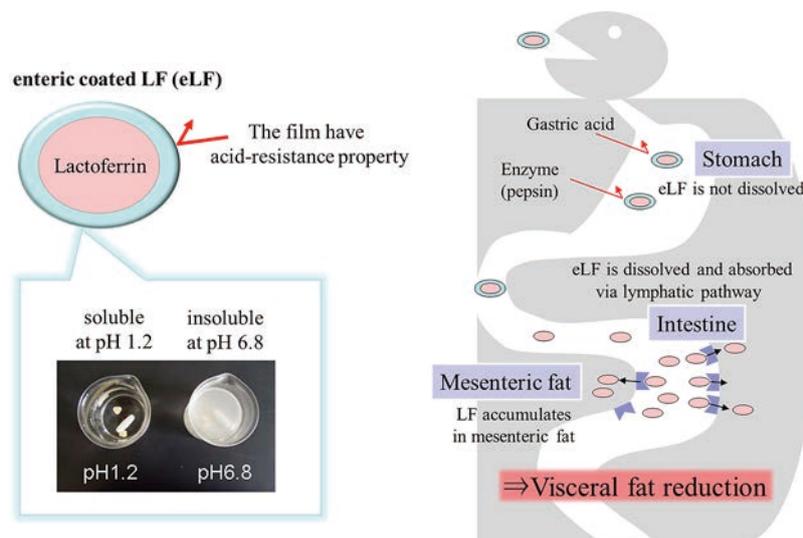


Fig. 2 Schematic diagram of visceral fat reduction by enteric coated lactoferrin

しながら、胃の消化酵素であるペプシンで分解したラクトフェリンではその活性が消失することも明らかとなった。よって、ラクトフェリンを経口摂取して内臓脂肪低減効果を発揮させるためには、ラクトフェリンが胃で分解されずに腸まで届くことが必要であると考えられた。脂肪細胞に対するラクトフェリンの脂肪合成抑制作用に対する作用メカニズムについて、DNA マイクロアレイ解析により検討した。その結果、ラクトフェリンが脂肪酸合成酵素等の脂肪合成に関与する酵素群の遺伝子発現を抑制し、さらに peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 等の脂肪細胞の分化調節因子の発現を抑制することを見出した¹⁵⁾。

脂肪組織の重量は脂肪の合成と分解のバランスで決定される。ラクトフェリンの脂肪合成抑制作用については上述の通りである。そこで本稿ではラクトフェリンの脂肪分解促進作用について、我々がこれまでに得ている知見を報告する。

2 ラクトフェリンの脂肪分解促進作用¹⁶⁾

ラクトフェリンの脂肪分解促進作用を検討するに際し、ラット腸間膜脂肪組織由来の前駆脂肪細胞の初代培養系を用いて検討を行った。細胞を6日間培養して成熟脂肪細胞へと分化誘導を行った後に、ラクトフェリンまたはペプシン分解したラクトフェリンを添加した。ポジティブコントロールとしては、 β 受容体のアゴニストであり、脂肪分解促進作用が知られている L-isoproterenol を、ネガティブコントロールとしては代表的な可溶性タンパク質である BSA を使用した。L-isoproterenol を添加した培養上清では、コントロールと比較して3倍程度のグリセロール濃度の上昇が認められたことから、評価系の妥当性が検証され

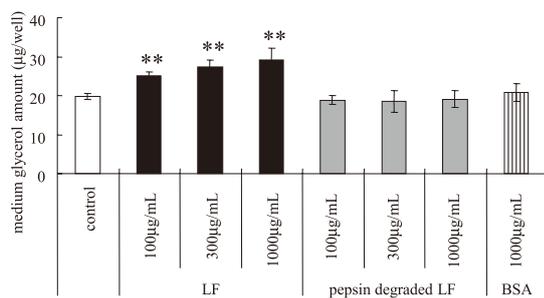


Fig. 3 The effect of pepsin degradation on the lipolysis actions of lactoferrin (LF) against mature-adipocyte

Medium glycerol amount were analysed 24 h after addition of each samples to compare the lipolysis activity of LF and pepsin degraded LF. Bovine serum albumin was used as negative control. The results are shown as means with their standard deviation, n=3. **p<0.01 dunnett test compared with control. LF, lactoferrin; BSA, bovine serum albumin.

Reprinted with permission from Ref. 16 © (2013) Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry.

た。一方、ラクトフェリンに関しては、濃度、時間依存的にグリセロール濃度の上昇が認められたことから、ラクトフェリンも脂肪細胞に対する脂肪の分解促進活性を有することが明らかとなった。ペプシンで分解したラクトフェリンに関しては、グリセロール濃度の上昇が認められなかったことから、脂肪の分解促進活性が消失することが明らかとなった (Fig. 3)。本結果からも、ラクトフェリンの内臓脂肪低減効果の発揮には、腸溶加工技術が重要であることが強く示唆された。なお、ネガティブコントロールである BSA についてもグリセロールの濃度上昇は認められなかった¹⁶⁾ (Fig. 3)。

3 ラクトフェリンの脂肪分解促進作用メカニズムの解析¹⁷⁾

ラクトフェリンの新たに見出された作用である脂肪分解促進作用について、更に詳細な分子メカニズムを解明すべく、ラクトフェリンを添加した成熟脂肪細胞のプロテオーム解析を実施した。前章と同様に初代培養細胞を成熟脂肪細胞へ分化させ、LF を添加したのち 1, 3, 9 時間後の細胞を回収した。抽出したタンパク質をトリプシン消化し、精製したペプチドを LTQ Orbitrap Velos を用いて LC-MS/MS 解析した。その結果、cAMP シグナル経路のタンパク質であり、脂肪分解の律速酵素である Hormone sensitive lipase (HSL) の有意な発現上昇が確認され、更に ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) シグナル経路の構成因子である Mitogen-activated Protein Kinase 3 (MAPK3, ERK1) や Ras 関連タンパク質において発現量変化が見られた (Table 1)。加えて、脂質代謝や TCA 回路の関連因子においても発現量変化が確認された。これらの結果より、ラクトフェリンは一般的な脂肪分解において活性化される cAMP シグナル経路に加えて、細胞の増殖や分化などに関与する ERK シグナル経路 (Ras-Raf-ERK 経路) に作用する可能性が示唆された。そこでこれら 2 つのシグナル経路に着目し、さらに解析を行った。

脂肪細胞の脂肪滴における脂肪分解には Protein kinase A (PKA) による HSL と Perilipin (PLIN) という脂肪滴表面に局在するコートタンパク質のリン酸化が必要である^{18)~20)}。そこで、同様に調製した細胞ライセートのウエスタンブロッティングを行ったところ、HSL, PLIN の PKA によるリン酸化サイトである HSL Ser660 及び PLIN Ser497 のリン酸化による活性化を確認した (Fig. 4A, B)。また、PKA の酵素活性を ELISA 法により調べたところ、同様にラクトフェリン添加による活性化が確認された (Fig. 4C)。これより、ラクトフェリンは一般的な脂肪分解に見られる cAMP シグナル伝達経路の活性化を促進していることがわかった。

次に、ラクトフェリンが古典的 ERK シグナル経路 (Ras-

Table 1 Proteins detected that are involved in signaling or metabolic pathways¹⁷⁾

Function	Accession	Peptide count	Peptides used for quantitation	Confidence score	Anova (p)*	Description	Gene name	1 h		3 h		9 h		
								Fold change	p-value	Fold change	p-value	Fold change	p-value	
cAMP signaling pathway														
	P15304	18	17	788.35	0.0049**	Hormone-sensitive lipase	Lipe	HSL	0.97	0.17	1.06	0.37	1.19	0.023*
	P43884	17	17	1396.82	0.0046**	Perilipin-1	Plin1	PLIN	0.88	0.032*	0.96	0.35	0.98	0.71
	P27791	1	1	56.66	0.25	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	Prkaca		0.88	0.58	1.71	0.082	1.39	0.41
	P12369	11	8	699.96	0.23	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	Prkar2b	PKA	1.03	0.65	1.02	0.70	1.07	0.12
	P09456	1	1	48.84	0.57	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	Prkar1a		1.30	0.60	1.71	0.23	1.84	0.066
	P12368	4	1	302.54	0.68	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	Prkar2a		1.07	0.86	1.42	0.21	1.67	0.18
ERK signaling pathway														
	P63086	4	2	208.46	0.62	Mitogen-activated protein kinase 1	Mapk1	ERK2	1.15	0.49	1.27	0.15	1.15	0.35
	P21708	3	2	202.13	0.21	Mitogen-activated protein kinase 3	Mapk3	ERK1	1.02	0.85	1.19	0.037*	1.18	0.19
	Q01986	4	4	113.46	0.40	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Map2k1	MEK	1.06	0.74	0.79	0.078	1.01	0.89
	O35509	6	6	300.16	0.0069**	Ras-related protein Rab-11B	Rab11b		1.01	0.90	1.20	0.024*	1.00	0.90
	P35281	4	2	221.96	0.29	Ras-related protein Rab-10	Rab10		0.92	0.73	1.24	0.42	1.74	0.023*
	P70550	4	2	223.99	0.23	Ras-related protein Rab-8B	Rab8b	Ras protein	1.28	0.33	1.48	0.027*	1.16	0.42
	P36860	2	2	61.61	0.55	Ras-related protein Ral-B	Ralb		0.77	0.17	1.03	0.86	0.88	0.29
	D3Z8L7	2	2	68.82	0.43	Ras-related protein R-Ras	Rras		1.19	0.21	0.97	0.68	0.94	0.36
Lipid metabolism														
	Q06000	3	3	167.5	<0.001***	Lipoprotein lipase	Lpl	LPL	0.66	0.0088**	0.68	0.0046**	0.94	0.22
TCA cycle														
	Q8VHF5	14	14	678.33	0.17	Citrate synthase, mitochondrial	Cs	CS	1.01	0.80	1.06	0.13	1.11	0.048*
	P52873	45	44	3082.24	0.57	Pyruvate carboxylase	Pc	PC	1.01	0.87	1.03	0.68	1.05	0.091

Details include function, accession number, peptide count, and peptides used for quantitation, confidence score, p-value (ANOVA), description, gene name, trivial name, fold-change (LF-treated group/untreated control group), and p-value (Student t test). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

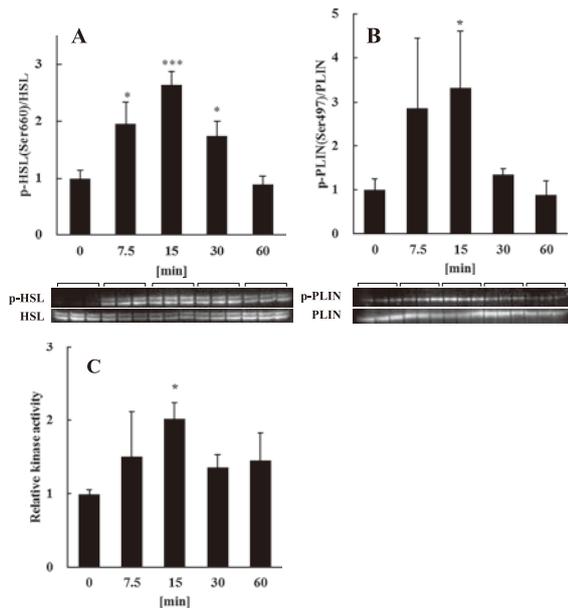


Fig. 4 Analysis of the effects of LF on the phosphorylation of HSL and PLIN by PKA and determination of PKA activity¹⁷⁾

Phosphorylation of HSL and PLIN by PKA was detected in the presence or absence (0 min) of LF. Phosphorylation levels normalized to protein expression levels are shown. (A) Phosphorylation of HSL Ser660 and (B) PLIN Ser497 by PKA. (C) Analysis of PKA activity in cells treated with LF. PKA activity in adipocytes was detected using an ELISA before (0 min) and after treatment with LF. Kinase activity normalized to the total protein determined by BCA is shown. The statistical significance of the data at each sampling time compared with the 0-min sample was evaluated using Dunnett's multiple comparison test, and the data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 HSL, hormone-sensitive lipase; LF, lactoferrin; PLIN, perilipin; PKA, protein kinase A; SD, standard deviation.

Raf-ERK 経路) を活性化するか調べるため、同様に調製した細胞ライセートを用いて ERK1/2 のリン酸化 (Thr202/Tyr204) を ELISA 法により調べたところ、ラクトフェリン添加によるリン酸化レベルの上昇を確認した (Fig. 5A)。そこで c-Raf (RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase, Raf-1) の Ras 結合ドメインを用いて活性化 Ras タンパク質のプルダウンアッセイを行ったところ、ERK1/2 と同様に添加初期から活性化することが分かった (Fig. 5B)。これより、ラクトフェリン添加により活性化された Ras が、c-Raf から ERK1/2 へとカスケード的にリン酸化シグナルを伝達したことが示された。これまでに、ラクトフェリンは線維芽細胞や骨芽細胞、角化細胞において、ERK1/2 を活性化し、細胞増殖や遊走、分化の促進やコラーゲンマトリックスの形成に関与するなどの報告があり^{21)~23)}、脂肪細胞においても同様に ERK1/2 を活性化することが分かった。

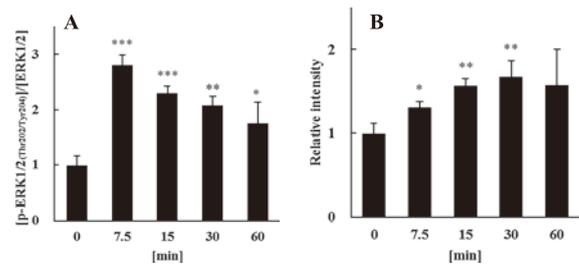


Fig. 5 Analysis of the effects of LF on the activation of ERK1/2 and activation of Ras¹⁷⁾

(A) Activation of ERK1/2 (Thr202/Tyr204) after treatment of adipocytes with LF. Phosphorylated ERK1/2 was detected in the presence or absence (0 min) of LF. Phosphorylation levels normalized to protein expression levels are shown. (B) Ras activation through c-Raf in adipocytes treated with LF. Activated Ras captured from cell lysates using a pull-down assay kit before (0 min) and after treatment with LF. Activated Ras eluted from the beads was detected using western blot analysis. The statistical significance of the data at each sampling time compared with the 0-min sample was evaluated using Dunnett's multiple comparison test, and the data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. ERK, extracellular signal-regulated kinase; LF, lactoferrin; SD, standard deviation.

前述のプロテオーム解析結果に見られたようなタンパク質レベルでの発現量変化には、何らかの転写因子の関与の可能性が考えられる。cAMP シグナル経路や ERK シグナル経路が活性化していたという結果から、両経路の下流にある転写因子である cAMP response element binding protein (CREB) の関与が疑われた^{24),25)}。そこで、ウェスタンブロットングにより CREB の活性化を調べたところ、ラクトフェリン添加による CREB Ser133 のリン酸化レベルの亢進を確認した (Fig. 6A)。CREB は cAMP シグナル経路の重要なタンパク質である HSL²⁶⁾ や cAMP 合成酵素である Adenyl cyclase (AC)^{27),28)} の転写制御因子であったため、これらのタンパク質発現量を確認したところ、ラクトフェリン添加から 1 時間以降で増加することが分かった (Fig. 6B, C)。この発現量変化が CREB の活性化によるものなのか確認するため、CREB の活性化に最も寄与する PKA の阻害剤である H-89 を細胞培養系に添加して、CREB のリン酸化を阻害した (Fig. 7)。その結果、ラクトフェリン添加による HSL の発現上昇は顕著に阻害され (Fig. 8A)、さらに脂肪分解も一部阻害された (Fig. 8B)。これより、ラクトフェリンは CREB などの転写因子を活性化し、脂肪分解の律速酵素である HSL など、一連のシグナル経路に関与するタンパク質の発現量変化を起こすことで、生体中のホルモン刺激などとは異なる長時間の脂肪分解効果を発揮している可能性が示唆された。

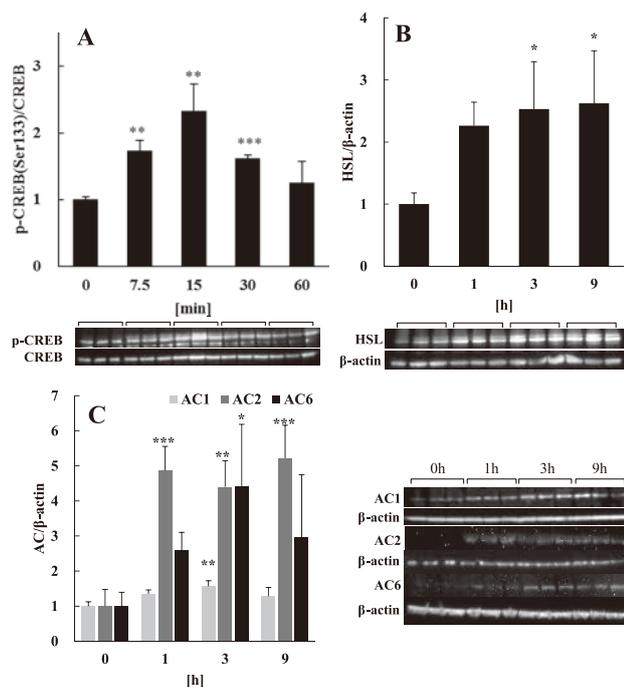


Fig. 6 Analysis of the effect of LF on CREB activation¹⁷⁾

(A) Phosphorylation of CREB-Ser133 in adipocytes treated with LF. Phosphorylated CREB was detected in the presence or absence (0 min) of LF. The figure shows CREB phosphorylation normalized to the protein expression level. Changes in protein expression levels of (B) HSL and (C) AC isomers (AC1, 2, and 6) in the presence or absence (0 min) of LF normalized to the protein expression level of β -actin. The statistical significance of the data at each sampling time compared with the 0-min sample was evaluated using Dunnett's multiple comparison test, and the data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. AC, adenylyl cyclase; CREB, cAMP response element binding protein; HSL, hormone-sensitive lipase; LF, lactoferrin; SD, standard deviation.

4 脂肪細胞におけるラクトフェリン受容体の探索

ラクトフェリンの受容体は、小腸や肝臓、マクロファージなど、さまざまな組織において複数種のタンパク質が確認されており^{29),30)}、ラクトフェリンの多彩な機能発現の理由であると考えられている。しかし脂肪細胞において脂肪分解シグナルを伝達するようなラクトフェリン受容体は

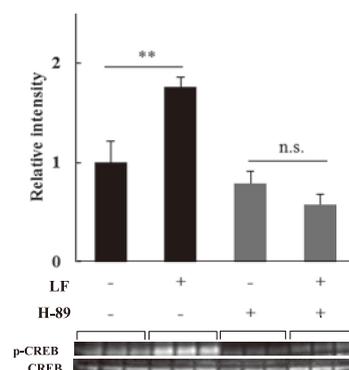


Fig. 7 The influence of PKA activity inhibition on the downstream factor CREB¹⁷⁾

Phosphorylation level of CREB-Ser133 was detected 15 min after the treatment with 1 mg/ml of LF with or without H-89, a selective PKA inhibitor. Adipocytes were pre-incubated in H-89 starting at 30 min before the addition of LF. Phosphorylation level was normalized to the CREB protein expression level. The statistical significance of the differences in the data for LF treated vs. untreated samples was evaluated using the Student t test. ** $p < 0.01$, n.s.; no significant difference. The data represent the mean \pm SD of triplicate determinations of one of the three identical experiments. LF, lactoferrin; PKA, protein kinase A; CREB, cAMP response element binding protein; HSL, hormone sensitive lipase; SD, standard deviation.

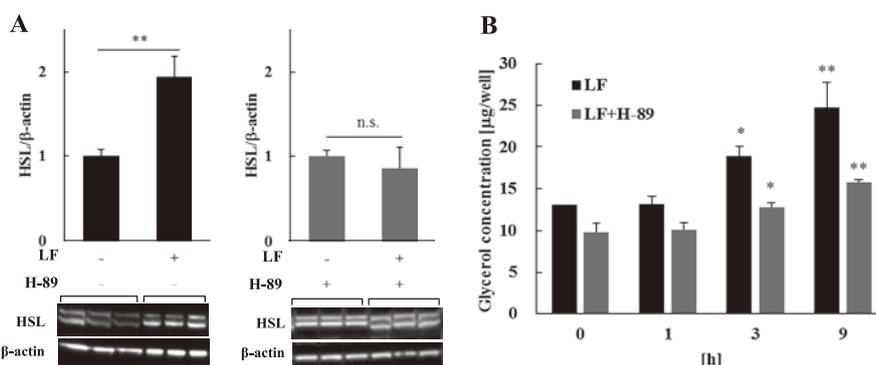


Fig. 8 The influence of PKA activity inhibition on the HSL expression level and lipolysis by LF¹⁷⁾

(A) Change in expression levels of HSL by LF. The protein expression levels of HSL were detected 3 h after the treatment with 1 mg/ml of LF with or without H-89, a selective PKA inhibitor. Changes are normalized to the β -actin protein expression level. The statistical significance of the data compared with the LF untreated sample was evaluated using Student's t test, and the data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of the three identical experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Activation of lipolysis by LF. The amount of glycerol in the medium was analyzed after the treatment with 1 mg/ml of LF with or without H-89, a selective PKA inhibitor, to quantify lipolysis. The statistical significance of the data compared with LF untreated cells was evaluated using Dunnett's multiple comparison test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. The data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. LF, lactoferrin; SD, standard deviation.

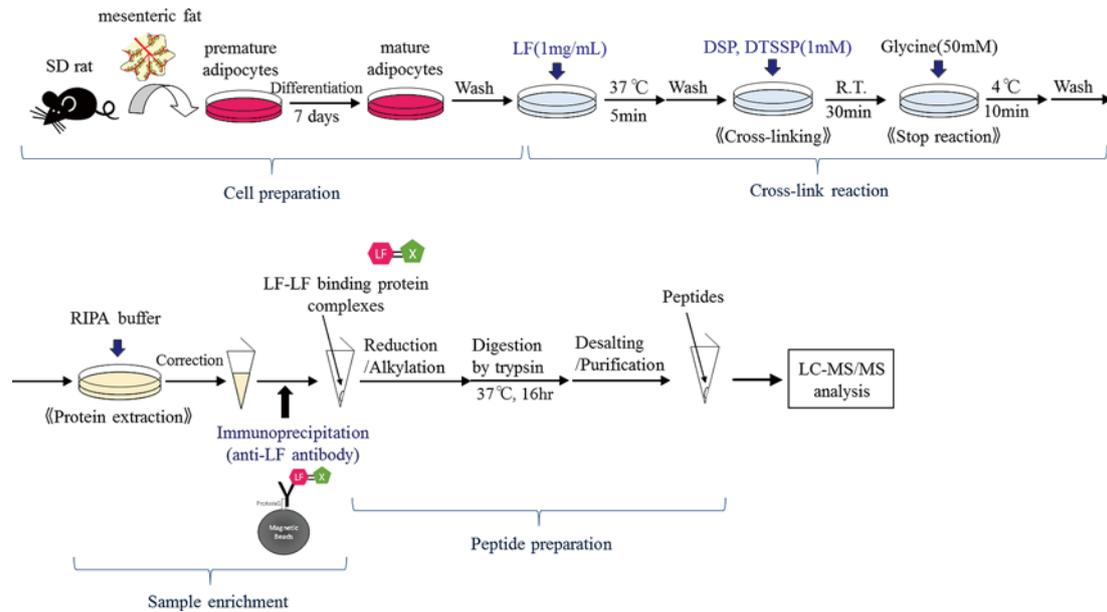


Fig. 9 Schematic diagram of proteome analysis

いまだ同定されておらず、メカニズム解析においては重要な知見となると考えられた。そこでラクトフェリンによる脂肪分解シグナルを伝達する脂肪細胞上のラクトフェリン受容体を同定すべく、プロテオーム解析を活用した受容体探索を実施することとした。まず成熟脂肪細胞にラクトフェリンを添加し、脂肪分解シグナルの活性化が起こるタイムポイントにおいて、余剰のラクトフェリンを洗い流した後に、受容体に結合しているラクトフェリンを疎水性の架橋試薬である DSP (dithiobis-succinimidylpropionate) もしくは親水性の架橋試薬である DTSSP (3,3'-dithiobis-sulfosuccinimidylpropionate) を用いて化学的に共有結合させ、ラクトフェリン-ラクトフェリン結合タンパク質の複合体を形成した。この複合体を抗ラクトフェリン抗体により精製し、トリプシン消化後に LC-MS/MS 分析を行い結合タンパク質を同定した (Fig. 9)。ラクトフェリンが受容体に結合後にエンドサイトーシスにより取り込まれる可能性も考慮し、DSP、DTSSP 両試薬にて共通に検出されたタンパク質のうち、細胞膜画分に局在が知られる 151 種類のタンパク質を候補タンパク質として同定した。この中には他の組織でラクトフェリン受容体として知られるタンパク質が 4 種類存在し、特に Low density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) は検出されたペプチド数、Confidence score 共にトップの因子であった。LRP1 は脂肪細胞以外にもさまざまな組織に発現し、多彩なリガンドをもつことが知られる LDL レセプターのファミリー分子であり²⁹⁾、脂質代謝以外にも、細胞内ドメインのリン酸化を介して細胞成長や分化、プロテアーゼ分解など、多種多様なシグナル伝達に関与する報告がある^{30)~32)}。我々はこの LRP1 を脂肪細胞におけるラクトフェリン受容体とし

ての有力な候補として選定し、脂肪分解シグナル伝達への関与を検討することとした。

5 LRP1 を介したラクトフェリンの脂肪分解シグナルの解析¹⁷⁾

成熟脂肪細胞においてラクトフェリンが伝達する脂肪分解シグナルに LRP1 が関与するか調べるため、siRNA を用いて脂肪細胞の LRP1 をノックダウンした。その結果、ラクトフェリンを添加しても脂肪分解が起こらず、HSL の活性化も生じなくなることが分かった (Fig. 10)。これより、ラクトフェリンによる脂肪分解において LRP1 は重要な役割を果たすことが強く示唆された。

Goretzki らは、ヒトメラノーマ細胞である M21 に発現させた LRP1 は、ラクトフェリンとの結合によって stimulatory GTP-binding protein (G_{α_s}) を介して細胞内 cAMP レベルと PKA 活性を上昇させると報告しており³³⁾、脂肪細胞においても同様に G タンパク質の活性化が起こっている可能性が考えられた。G タンパク質の活性化は通常 G タンパク質受容体 (GPCR) を介して行われ、特に脂肪分解においては GPCR であるアドレナリンレセプターの関与が一般的である。LRP1 を介した脂肪分解シグナルと、アドレナリンレセプターによる脂肪分解シグナルの関連を調べるため、 β_1 アドレナリンレセプターの阻害剤である Atenorol を用いて検討を行った。その結果、Atenorol による β_1 アドレナリンレセプターの活性阻害下においてもラクトフェリンによる脂肪分解促進作用は減弱しないことが分かった (Fig. 11)。これより、ラクトフェリンによる LRP1 を介した脂肪分解シグナルは、アドレナリンレセプター活性に依存しないメカニズムによることが示唆された。

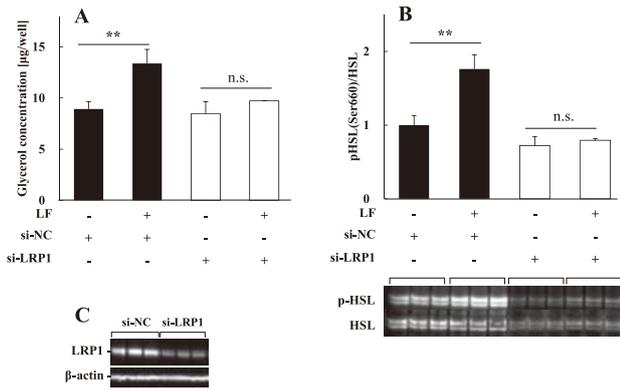


Fig. 10 LF-induced lipolysis in LRP1-silenced adipocytes¹⁷⁾

(A) Activation of lipolysis by LF. To quantitate lipolysis, the amount of glycerol in the medium was analyzed 24 h after adding 1 mg/ml of LF. The statistical significance of the differences between LF treated and untreated cells was evaluated using the Student *t* test. $**p < 0.01$. The data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. (B) Activation of HSL by LF treatment. Phosphorylation of HSL was detected in the presence or absence of 1 mg/ml LF 15 min after the addition of LF. Phosphorylation levels normalized to protein expression levels are shown. The statistical significance was evaluated using the Student *t* test vs LF untreated control. $**p < 0.01$; n.s., no significant difference. The data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of three identical experiments. (C) LRP1 silencing by siRNA. Adipocytes were transiently transfected with negative control siRNA (siNC) or LRP1 siRNA (siLRP1) (see Materials and methods). LRP1 protein expression was monitored by immunoblotting during each assay. Distinctive data is shown. β -actin was used as a loading control. HSL, hormone-sensitive lipase; LF, lactoferrin; LRP1, lipoprotein receptor-related protein 1; SD, standard deviation.

6 cAMP シグナル経路と ERK シグナル経路のクロストークの可能性

cAMP 合成酵素である AC は、一般にアドレナリンレセプターのようなホルモン受容体などの GPCR の活性化とそれに引き続く活性化 G タンパク質との相互作用により活性化する³⁴⁾。一方で、ERK シグナルは一般に成長因子等の受容体に多く見られるチロシンキナーゼ型受容体によって活性化する。古くからこれら2つのシグナル経路は、相互に交わらない独立したシグナルカスケードであると考えられてきた。しかし、近年の研究成果より、2つのシグナル経路は、複数の因子間において^{35),36)}、特に、AC の活性化に関連して制御関係がある可能性が示されている^{25),37)~41)}。例えば、Raf キナーゼ (B-Raf, c-Raf) は AC のセリン残基をリン酸化することが知られており^{37),42),43)}、また Raf キナーゼと AC は直接相互作用するがその相互作用には AC のアイソフォーム選択性があることなどが確認されている⁴³⁾。また、c-Raf の活性は複数のリン酸化サイ

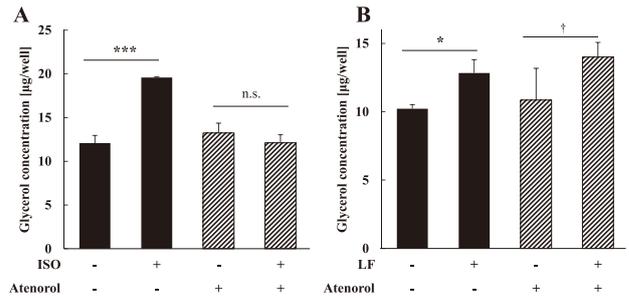


Fig. 11 The influence of a β AR-blocker on the activities of lipolysis inducers¹⁷⁾

(A) Activation of lipolysis in adipocytes by L-isoproterenol (ISO) with or without a β AR inhibitor. The amount of glycerol in the medium was analyzed 24 h after adding 0.1 μ M of ISO with or without atenolol (β_1 AR blocker) to quantitate lipolysis. The statistical significance of the differences in the data for LF treated vs. untreated cells was evaluated using the Student's *t* test. $***p < 0.001$, n.s.; no significant difference. The data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of the three identical experiments. (B) Activation of lipolysis by LF with or without β AR inhibitor. The amount of glycerol in the medium was analyzed 24 h after adding 1 mg/ml of LF with or without atenolol (β_1 AR blocker) to quantify lipolysis. The statistical significance of the data of LF treated and untreated cells were evaluated using Student's *t* test. $*p < 0.05$, $^\dagger p < 0.1$, n.s.; no significant difference. The data represent the mean \pm SD values of triplicate determinations of one of the three identical experiments. LF, lactoferrin; SD, standard deviation.

トにより制御されることが知られているが、PKA は c-Raf の Ser259 をリン酸化することで活性を負に制御している^{44),45)}。さらに PKA は、GPCR をリン酸化することで Gs 共役型の AC 活性化から Gi 共役型の ERK シグナル活性化経路にスイッチさせるとの報告もある⁴⁶⁾。脂肪分解時における cAMP シグナル経路と ERK シグナル経路の相互制御関係やその生理的意義については、今後さらなる詳細な検討が必要である。

7 結論

我々はラクトフェリンの内臓脂肪低減メカニズムの一端として、ラクトフェリンの脂肪分解促進作用を見出した。胃の消化酵素であるペプシンで分解したラクトフェリンには、本作用が消失したことから、本作用の発揮には腸溶性能を付与することが望ましいことも示唆された。さらに本作用の詳細な分子機構について検討した結果、ラクトフェリンは成熟脂肪細胞において LRP1 を介して cAMP/ERK シグナルを活性化し、脂肪分解促進効果を発揮しているという仮説を構築した (Fig. 12)。この仮説は、アドレナリンレセプターなどのカテコールアミンレセプターによって引き起こされる GPCR 依存性の脂肪分解シグナル伝達³⁴⁾とは異なるメカニズムである。ラクトフェリンは脂肪細胞に添加後、数分で ERK シグナルを活性化させ、間接的に

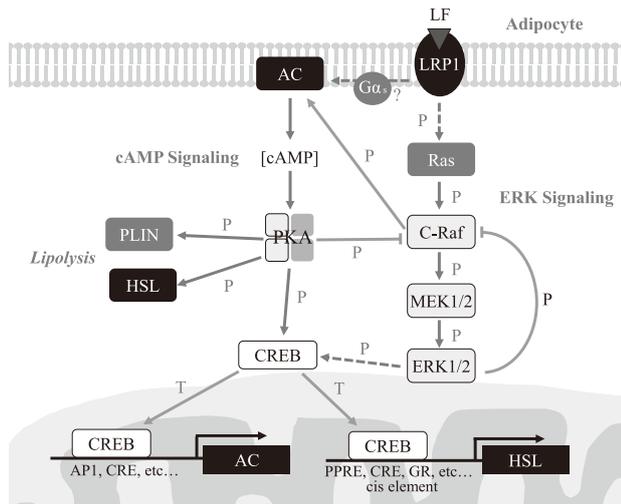


Fig. 12 Hypothetical model depicting the induction of lipolysis by LF in mature adipocytes¹⁷⁾

T, Transcription; P, Phosphorylation; solid arrow, direct interaction; dashed arrow, indirect interaction. AC, adenylyl cyclase; CREB, cAMP response element binding protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; $G\alpha_s$, G_s alpha subunit; HSL, hormone-sensitive lipase; LF, lactoferrin; LRP1, low-density lipoprotein receptor-related protein 1; PKA, protein kinase A; PLIN, perilipin.

細胞内 cAMP 濃度の上昇, それに伴う PKA, HSL, PLIN, CREB の活性化を起こす。既存の文献情報によると, AC と c-Raf の直接的な相互作用など, cAMP/ERK シグナル伝達経路には複数のクロストークによる活性制御機構の存在が示唆される。c-Raf は多数のタンパク質によるリン酸化で活性が制御されているが, PKA もその制御因子の一つとなっている^{44),45)}。過剰な ERK シグナル経路の活性化は c-Raf の過リン酸化を生じ, フィードバック阻害が起こるとの報告もある⁴⁷⁾。ラクトフェリンの添加により見られる cAMP/ERK シグナル経路の活性化は, このような複雑な活性制御の結果として現れる表現型であると考えられる。添加初期に起こる, これらシグナル経路の活性化は, CREB 等の転写因子の活性化を素早く惹起し, HSL や AC といった脂肪分解に関与するタンパク質の発現量変化を亢進することで脂肪分解を長期的に活性化する。生体内においては, ラクトフェリンは時間と共に代謝を受けて分解されるため, その効果は徐々に消失して定常状態に戻る, というのが, これまでの結果から考察しているラクトフェリンの作用メカニズム仮説である。ラクトフェリンが結合した LRP1 からどのように AC 活性化が起こり, cAMP の細胞内濃度上昇を促すのかなど, まだまだ未解明な部分があり, さらに詳細に解析することで仮説を検証していきたいと考えている。

8 おわりに

世界に先駆けて日本で誕生した「食の機能性研究」や日

本で提唱された「食品因子 (Food Factor)」の概念は, いまや世界的にも広まり, 認知されるようになってきた。欧米でも「Functional Foods」という言葉が定着しつつある。2015年4月に「機能性表示食品」制度がスタートするなど, 食品業界を取り巻く状況は刻一刻と変化している。この流れに沿うように, 食品の機能性に関する研究もレベルの向上が求められ, 数年前に比べれば方法論や解析手法の選択肢も含め, 格段に進化してきている。機能成分の生理活性に関するメカニズム研究に, プロテオミクスをはじめとする先端解析技術を, いかにも取り入れ, スタンダードとしていくかが今後の研究を加速し, レベルアップしていく鍵となるのではないだろうか。今後も, 人々の健康の維持・増進に貢献できる, 確固たるエビデンスを持った製品を開発すべく, 学際領域の知識・技術との連携を活かして取組んでいきたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり, プロテオーム解析にご尽力いただきました横浜市立大学平野久教授, 木村弥生准教授, 倉田陽一氏, 井野洋子氏に深く御礼申し上げます。

利益相反の開示

著者らはライオン株式会社の社員であり, 本研究は, 文部科学省イノベーションシステム整備事業先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」の中で実施されました。

文 献

- 1) Anderson BF, Baker HM, Dodson EJ, *et al.* Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(7):1769-1773.
- 2) Paesano R, Pietropaoli M, Gessani S, *et al.* The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. *Biochimie.* 2009;91(1):44-451.
- 3) Tomita M, Bellamy W, Takase M, *et al.* Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci.* 1991;74(12):4137-4142.
- 4) Tanaka K, Ikeda M, Nozaki A, *et al.* Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(4):367-371.
- 5) Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, *et al.* Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis.* 1995;172(2):380-388.
- 6) Zimecki M, Właszczczyk A, Cheneau P, *et al.* Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 1998;46(4):231-240.
- 7) Shoji H, Oguchi S, Shinohara K, *et al.* Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced

- oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Pediatr Res.* 2007;61(1):89–92.
- 8) Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, *et al.* Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.* 1997;121(2):211–216.
 - 9) Koza T, Iinuma G, Ohashi Y, *et al.* Effect of orally administered bovine lactoferrin on the growth of adenomatous colorectal polyps in a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(11):975–983.
 - 10) 木元博史. ラクトフェリン腸溶錠により血清脂質の改善が認められた症例. *Milk Science.* 2004;53:313–314.
 - 11) Ono T, Murakoshi M, Suzuki N, *et al.* Potent anti-obesity effect of enteric-coated lactoferrin: decrease in visceral fat accumulation in Japanese men and women with abdominal obesity after 8-week administration of enteric-coated lactoferrin tablets. *Br J Nutr.* 2010;104(11):1688–1695.
 - 12) Takeuchi T, Kitagawa H, Harada E. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp Physiol.* 2004;89(3):263–270.
 - 13) Talukder MJ, Takeuchi T, Harada E. Characteristics of lactoferrin receptor in bovine intestine: higher binding activity to the epithelium overlying Peyer's patches. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2003;50(3):123–131.
 - 14) Teraguchi S, Wakabayashi H, Kuwata H, *et al.* Protection against infections by oral lactoferrin: evaluation in animal models. *Biometals.* 2004;17(3):231–234.
 - 15) Ono T, Morishita S, Fujisaki C, *et al.* Effects of pepsin and trypsin on the anti-adipogenic action of lactoferrin against pre-adipocytes derived from rat mesenteric fat. *Br J Nutr.* 2011;105(2):200–211.
 - 16) Ono T, Fujisaki C, Ishihara Y, *et al.* Potent lipolytic activity of lactoferrin in mature adipocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(3):566–571.
 - 17) Ikoma-Seki K, Nakamura K, Morishita S, *et al.* Role of LRP1 and ERK and cAMP Signaling Pathways in Lactoferrin-Induced Lipolysis in Mature Rat Adipocytes. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141378.
 - 18) Souza SC, Muliro KV, Liscum L, *et al.* Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem.* 2002;277(10):8267–8272.
 - 19) Su CL, Sztalryd C, Contreras JA, *et al.* Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(44):43615–43619.
 - 20) Sztalryd C, Xu G, Dorward H, *et al.* Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1093–1103.
 - 21) Takayama Y, Takahashi H, Mizumachi K, *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced collagen gel contractile activity of human fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003;278(24):22112–22118.
 - 22) Grey A, Banovic T, Zhu Q, *et al.* The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 2004;18(9):2268–2278.
 - 23) Tang L, Wu JJ, Ma Q, *et al.* Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound re-epithelialization. *Br J Dermatol.* 2010;163(1):38–47.
 - 24) Adams JP, Roberson ED, English JD, *et al.* MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2000;60(3):377–394.
 - 25) Xia Z, Storm DR. Role of signal transduction crosstalk between adenylyl cyclase and MAP kinase in hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.* 2012;19(9):369–374.
 - 26) Lampidonis AD, Stravopodis DJ, Voutsinas GE, *et al.* Cloning and functional characterization of the 5' regulatory region of ovine Hormone Sensitive Lipase (HSL) gene. *Gene.* 2008;427(1-2):65–79.
 - 27) Chao JR, Ni YG, Bolaños CA, *et al.* Characterization of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene promoter: regulation by cAMP and CREB. *Eur J Neurosci.* 2002;16(7):1284–1294.
 - 28) Gao MH, Tang T, Guo T, *et al.* Adenylyl cyclase type VI gene transfer reduces phospholamban expression in cardiac myocytes via activating transcription factor 3. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38797–38802.
 - 29) Suzuki YA, Lopez V, Lönnnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2560–2575.
 - 30) Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 2001;108(6):779–784.
 - 31) Barnes H, Larsen B, Tyers M, *et al.* Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J Biol Chem.* 2001;276(22):19119–19125.
 - 32) Barnes H, Ackermann EJ, van der Geer P. v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene.* 2003;22(23):3589–3597.
 - 33) Goretzki L, Mueller BM. Low-density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) interacts with a GTP-binding protein. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 2):381–386.
 - 34) Bockaert J. [G-protein-coupled receptors: general features and activation mechanisms]. *Bull Acad Natl Med.* 2012;196(9):1765–1775.
 - 35) Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, *et al.* Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):70–84.
 - 36) Dumaz N, Marais R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.* 2005;272(14):3491–3504.
 - 37) Beazely MA, Alan JK, Watts VJ. Protein kinase C and epidermal growth factor stimulation of Raf1 potentiates adenylyl cyclase type 6 activation in intact cells. *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):250–259.
 - 38) Tan CM, Kelvin DJ, Litchfield DW, *et al.* Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase. *Biochemistry.* 2001;40(6):1702–1709.
 - 39) Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, *et al.* Adipose-derived factor

- CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *FASEB J.* 2013;27(1):25–33.
- 40) Smit MJ, Verzijl D, Iyengar R. Identity of adenylyl cyclase isoform determines the rate of cell cycle progression in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):15084–15089.
 - 41) Park HY, Kang YM, Kang Y, *et al.* Inhibition of adenylyl cyclase type 5 prevents L-DOPA-induced dyskinesia in an animal model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2014;34(35):11744–11753.
 - 42) Tan Y, Rouse J, Zhang A, *et al.* FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 1996;15(17):4629–4642.
 - 43) Ding Q, Gros R, Gray ID, *et al.* Raf kinase activation of adenylyl cyclases: isoform-selective regulation. *Mol Pharmacol.* 2004;66(4):921–928.
 - 44) Dumaz N, Marais R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem.* 2003;278(32):29819–29823.
 - 45) Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, *et al.* Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science.* 1999;286(5445):1738–1741.
 - 46) Feldman DS, Zamah AM, Pierce KL, *et al.* Selective inhibition of heterotrimeric Gs signaling. Targeting the receptor-G protein interface using a peptide minigene encoding the Galpha(s) carboxyl terminus. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28631–28640.
 - 47) Dougherty MK, Müller J, Ritt DA, *et al.* Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell.* 2005;17(2):215–224.

Application of Proteomic Approach for Developing Functional Food Products: Analysis of the Mechanism of Action of Lactoferrin for Reducing Visceral Fat

Keiko Seki^{*1,2}, Tomoji Ono^{1,2}, Kanae Nakamura¹, Satoru Morishita¹, Michiaki Murakoshi^{1,2}

*E-mail: k-ikoma@lion.co.jp

¹Research and Development Headquarters, Lion Corporation, Tajima 100, Odawara, Kanagawa 256-0811, Japan

²Advanced Medical Research Center, Yokohama City University, Fukuura 3-9, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan

(Received: April 18, 2016; Revised: June 2, 2016; Accepted: June 3, 2016)

Lactoferrin (LF) is a multi-functional milk protein. We previously reported that enteric-coated LF decreased visceral fat accumulation in a clinical trial. Animal studies revealed that ingested LF was delivered to mesenteric fat and *in vitro* experiments showed that LF promoted the lipolysis of mature adipocytes. Therefore, we attempted to identify the mechanism underlying lipolysis induced by LF. Pre-adipocytes derived from mesenteric fat tissue of male rats were cultured and differentiated into their mature form, and cells were collected at various time points after the addition of LF. Proteomic analysis revealed changes in the expression levels of proteins related to the cAMP and ERK signaling pathways. Therefore, we validated the activation of these pathways using Western blotting, ELISA, and pull-down assay. We then detected the increased phosphorylation level of CREB, a downstream transcription factor of both cAMP and ERK signaling pathways, which regulates the expression levels of enzymes involved in lipolysis. We also attempted to identify LF receptors on adipocytes. We again used a proteomic approach to analyze LF binding proteins. Finally, we identified low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) as the most reliable candidate for the LF receptor. Silencing analysis of LRP1 showed attenuated lipolytic activity of LF, and we concluded that LRP1 is the LF receptor for sending lipolytic signals by LF on adipocytes. LF binds LRP1 and activates the cAMP/ERK signaling pathway via phosphorylation and transcriptional regulation, and then these effects result in the promotion of lipolysis in mature adipocytes.

Keywords: adipocytes; lactoferrin; lipolysis; proteomics.