

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380170

研究課題名（和文） 腸管上皮 M 細胞のプリオン蛋白取り込みに関わる分子構成と発現調節機構の解明

研究課題名（英文） Identification of membrane proteins associated with Prion invasion in bovine intestinal microfold (M) cells

研究代表者

麻生 久 (ASO HISASHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50241625

研究成果の概要（和文）：腸管上皮 M 細胞のプリオン蛋白に親和性がある膜蛋白を同定する目的で、M 細胞に分化したウシ腸管上皮細胞にプリオン蛋白結合磁気ビーズを添加し、磁気ビーズを取り込んだ細胞内小胞を回収した。2 次元電気泳動後、解糖系酵素アルドラーゼ A を LC-MS/MS 解析により同定した。アルドラーゼ A は、異常プリオン蛋白の取り込みに関わる回腸パイエル板 M 細胞および鼻腔咽頭上皮の管腔側に局在し、プリオン蛋白に親和性があることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In order to identify a membrane protein associated with the Prion invasion in bovine intestinal microfold (M) cells, M cell-differentiated bovine intestinal epitheliocyte cell line (BIE cells) were treated with recombinant bovine prion protein-coated magnetic beads, and then vesicles including magnetic beads were purified from BIE cells. After 2D-electrophoresis, fructose-bisphosphate aldolase A was identified using LC-MS/MS spectrometer. Aldolase A were specifically expressed on M cells in ileal Peyer's patches and the epithelium in myctero pharynges, these tissues of which were thought to be associated with Prion invasion. In addition, the far western analysis revealed that aldolase A could bind to prion protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：機能性物質

## 1. 研究開始当初の背景

粘膜を介する抗原感作の場である小腸パイエル板には樹状細胞を中心とした抗原提示細胞が集中し、パイエル板を覆う濾胞随伴上皮（ドーム上皮）には特殊な上皮細胞である M 細胞が高頻度で存在する。この M 細胞は蛋白、核酸、細菌、ウイルスなどを細胞内に取り込み、外来抗原情報として下部リンパ組

織に伝達する機能（高分子輸送能：トランスサイトシス）を有することから、初期粘膜免疫応答において重要な役割を担っている。

1986 年英国で発見された牛海綿状脳症（BSE）はウシのプリオン病であり、1996 年英国において新たな疾患概念として提唱されたヒトの新変異型クロイツフェルトヤコブ病（若年発症型）が牛由来食品を介した

BSE のヒトへの伝播であることがほぼ確実となっている。その感染は、消化管 M 細胞が異常プリオン蛋白を取り込むことより始まると予想されている。しかしながら、in vitro での腸管上皮細胞の分化と機能発現を解析するシステムが確立されていないため、M 細胞特有の機能であるトランスサイトシスに関わる膜輸送蛋白複合体トランスポートゾームを構成する分子とその発現調節機構および M 細胞を介した異常プリオン蛋白侵入機構の詳細な研究が滞っているのが現状である。

## 2. 研究の目的

申請者は、世界に先駆けてウシ、ブタおよびマウスの腸管上皮細胞株の樹立に成功し、これらの腸管上皮細胞株と腸管リンパ球との共培養を行うことにより、蛍光ビーズを取り込んで腸管上皮細胞の下部へトランスサイトシスを行う M 細胞分化誘導系を既に確立している。よって、本研究では、ウシおよびマウス M 細胞分化誘導系を用いて、腸管上皮 M 細胞のプリオン蛋白取り込みに関わる膜輸送蛋白複合体トランスポートゾームライブラリーを構築し、プリオン蛋白侵入に必須な蛋白分子の特定を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 磁気カラムによるトランスポートゾームの回収：ウシ腸管上皮細胞株 (BIE) およびマウス腸管上皮細胞 (MIE) の M 細胞分化系を用いて、プリオン蛋白を結合した磁気ビーズを添加して培養し、細胞内を輸送中の機能ユニットであるトランスポートゾームを磁気カラムに捕捉することにより分離・精製を行う。回収した蛋白群は 2 次元電気泳動法により視覚化し、スポット解析を行う。

(2) プロテオーム解析による蛋白ライブラリーの構築：数種類選定した 2 次元電気泳動スポットのプロテオーム解析により蛋白質を同定する。次に、培養細胞あるいは腸管組織を用いて、同定した蛋白質に対する抗体による免疫染色を行い、その発現を解析する。

(3) プリオン蛋白との親和性解析：プリオン蛋白との親和性は、同定した蛋白の発現が確認されている樹立したウシ神経前駆細胞株より抽出した蛋白を SDS-PAGE 後にメンブランへ転写し、プリオン蛋白を処理してその結合性を判定する Far Western Blot 解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) M 細胞に分化した BIE 細胞より回収した蛋白で、磁気ビーズのみの対象区と比較してウシ PrP 結合磁気ビーズ添加区において強く発現している 5 個の蛋白スポットを確認した。分子量 40kDa のスポットに着目し、

LC-MS/MS 解析により aldolase A であることが判明した。

(2) aldolase A はウシ空腸上皮には発現が確認されなかったが、回腸パイエル板濾胞随伴上皮 (FAE) で発現していた。回腸の aldolase A 陽性細胞は、ウシ腸管 M 細胞マーカーのサイトケラチン 18 と共染色されたことにより、M 細胞であることが判明した。

BIE 細胞は aldolase A を発現し、M 細胞に分誘導することによりその発現が増加した。また、aldolase A は BIE 細胞の頂端側に染色された。

(3) aldolase A はプリオン蛋白と結合し、その結合はメンブラン転写後に抗 aldolase A 抗体で処理することにより特異的に阻害されることが、Far Western Blot 解析より明らかとなった。以上より、ウシ腸管 M 細胞に特異的に発現する aldolase A は、プリオン蛋白に特異的な親和性を有することが判明し、経口摂取した異常プリオン蛋白の腸管における侵入機構に関わっている可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Tomoyuki Shimazu, Julio Villena, Masanori Tohno, Hitomi Fujie, Shoichi Hosoya, Takeshi Shimosato, Hisashi Aso, Yoshihito Suda, Yasushi Kawai, Tadao Saito, Seiya Makino, Shuji Ikegami, Hiroyuki Itoh, Haruki Kitazawa. Immunobiotic Lactobacillus jensenii elicit anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infection and Immunity* 80 (1): 276-288, 2012. (査読有り)
2. Ikuro Takakura, Kohtaro Miyazawa, Takashi Kanaya, Wataru Itani, Kouichi Watanabe, Shyuichi Ohwada, Hitoshi Watanabe, Michael T. Rose, Suehiro Sakaguchi, Noriyuki Nishida, Shigeru Katamine, Takahiro Yamaguchi, Hisashi Aso. Orally administered prion protein is incorporated by M cells and propagated into lymphoid tissues by macrophages in prion protein knockout mice. *American Journal of Pathology* 179 (3): 1301-1309, 2011. (査読有り)
3. Tetsuya Hondo, Takashi Kanaya, Ikuro Takakura, Hitoshi Watanabe, Shyuichi Ohwada, Kouichi Watanabe, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Takahiro

- Yamaguchi, Hisashi Aso. Cytokeratin 18 is a specific marker of bovine intestinal microfold (M) cell. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 300: G442-G453, 2011. (査読有り)
4. Hitoshi Watanabe, Michael T. Rose, Hisashi Aso. Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 22:186-191, 2011. (査読有り)
  5. Miyake M., Hayashi Shinichiro, Iwasaki S., Uchida T., Watanabe K., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. TIEG1 negatively controls the myoblast pool indispensable for fusion during myogenic differentiation of C2C12 cells. *Journal of Cellular Physiology* 226(4):1128-1136, 2010. (査読有り)
  6. Hitoshi Watanabe, Daisuke Akasaka, Hideki Ogasawara, Kan Sato, Masato Miyake, Kazuki Saito, Takashi Kanaya, Ikuro Takakura, Guozheng Chao, Michael T. Rose, Shyuichi Ohwada, Kouichi Watanabe, Takahiro Yamaguchi, Hisashi Aso. Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology* 151 (10): 4776-4786, 2010. (査読有り)
  7. Kohtaro Miyazawa, Takashi Kanaya, Ikuro Takakura, Sachi Tanaka, Tetsuya Hondo, Hitoshi Watanabe, Michael T. Rose, Haruki Kitazawa, Takahiro Yamaguchi, Shigeru Katamine, Noriyuki Nishida, Hisashi Aso. Transcytosis of murine-adapted BSE agent in an in vitro bovine M cell model. *Journal of Virology* 84 (23): 12285-12291, 2010. (査読有り)
  8. Miyake M., Hayashi S., Iwasaki S., Chao G., Takahashi H., Watanabe K., Ohwada S., Aso H., Yamaguchi T. Possible role of TIEG1 as a feedback regulator of myostatin and TGF- $\beta$  in myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393 (4): 762-766, 2010. (査読有り)
  9. 本堂哲也、金谷高史、高橋 遊、渡邊一史、大和田修一、渡邊康一、山口高弘、麻生 久：ウシ腸管上皮細胞株(BIE)の in vitro M細胞分化誘導系における最適条件の検討、東北畜産学会報 55(3): 49-53. (査読有り), 2010
  10. Kohtaro Miyazawa, Tetsuya Hondo, Takashi Kanaya, Sachi Tanaka, Ikuro Takakura, Wataru Itani, Michael T. Rose, Haruki Kitazawa, Takahiro Yamaguchi, Hisashi Aso. Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line. *Histochemistry and Cell Biology* 133:125-134, 2010. (査読有り)
  11. Tomoyuki Shimazu, Masanori Tohno, Shinichiro Katoh, Takeshi Shimosato, Hisashi Aso, Yasushi Kawai, Tadao Saito, Haruki Kitazawa. Utilization of the porcine system to study lymphotoxin- $\beta$  regulation in intestinal lymphoid tissue. *Biochemical Genetics.* 47:126-136, 2009. (査読有り)
  12. Yuko Miyake, Masahiro Sakurai, Sachi Tanaka, Woro Anindito Sri Tunjung, Masaki Yokoo, Hiromichi Matsumoto, Hisashi Aso, Takahiro Yamaguchi, and Eimei Sato. Expression of Hyaluronan Synthase 1 and Distribution of Hyaluronan During Follicular Atresia in Pig Ovaries. *Biology of Reproduction* 80 (2): 249-257, 2009. (査読有り)
- [学会発表] (計67件)
1. Watanabe H., Saito K., Saito R., Nakano T., Okada N., Sumiyoshi K., Ohwada S., Watanabe K., Aso H. (2011) Effect of peripheral serotonin on glucose uptake in murine brown adipocyte. 2011 ASCB Annual Meeting. 11th-15th December The American Society for Cell Biology [, Denver, , USA]
  2. Kitazawa, Haruki; Shimazu, Tomoyuki; Tohno, Masanori; Villena, Julio; Hosoya, Syoichi; Fujie, Hitomi; Suda, Yoshihito; Shimosato, Takeshi; Aso, Hisashi; Makino, Seiya; Ikegami, Shuuji; Kawai, Yasushi; Saito, Tadao. (2010) Evaluation of anti-inflammatory immunobiotics in porcine intestinal epithelial cells. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics – IPC2010. 15th-17th June 2010 [Kosice, Slovakia]
  3. Suda, Yoshihito; Takahashi, Yu; Tohno, Masanori; Villena, Julio; Hosoya, Syoichi; Fujie, Hitomi; Shimosato, Takeshi; Kobashi, Jin; Ishida, Mitsuharu; Aso, Hisashi; Kawai, Yasushi; Saito, Tadao; Makino, Seiya; Ikegami, Shuuji; Kitazawa, Haruki. (2010) Effect of immunobiotics on the

- immune performance and productivity of pigs. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2010. 15th-17th June 2010 [Kosice, Slovakia]
4. H. Watanabe, D. Akasaka, K. Saito, H. Ogasawara, T. Kanaya, M. Miyake, S. Iwasaki, T. Hondo, Y. Takahashi, K. Sato, S. Ohwada, K. Watanabe, T. Yamaguti, H. Aso (2009) Peripheral Serotonin Enhanced Bile Acids Circulation and Accelerated Lipid Metabolism. 49th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 5th-10th December 2009 [San Diego, U. S. A.]
  5. S. Iwasaki, M. Miyake, E. Kitagawa, K. Watanabe, S. Ohwada, H. Aso, T. Yamaguti (2009) Myostatin Expresses in Neurons Related to Olfactory System in the Brain. 49th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 5th-10th December 2009 [San Diego, U. S. A.]
  6. M. Miyake, S. Iwasaki, C. Guozheng, H. Takahashi, K. Watanabe, S. Ohwada, H. Aso, T. Yamaguti (2009) Silencing TIEG1 Expression Promotes Myotube Formation through Regulation of Apoptosis. 49th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 5th-10th December 2009 [San Diego, U. S. A.]
  7. T. Hondo, H. Aso, T. Kanaya, I. Takakura, H. Watanabe, M. Miyake, S. Iwasaki, K. Saito, Y. Takahashi, S. Ohwada, K. Watanabe, T. Yamaguti (2009) Cytokeratin 18 Is a Specific Marker of M Cell of Bovine Peyer's Patches. 49th Annual Meeting, The American Society for Cell Biology. 5th-10th December 2009 [San Diego, U. S. A.]
  8. 招待講演：麻生 久「腸管からのプリオン侵入機構」、第16回東北大学学際ライフサイエンスシンポジウム、東北大学（仙台）平成23年11月1日
  9. 招待講演：麻生 久「腸管上皮M細胞は経口摂取プリオン蛋白の取り込みに関与する。」、日本解剖学会第57回東北・北海道連合支部学術集会、岩手大学（盛岡）平成23年（2011年）9月11日
- Cytokeratins in Bovine Intestinal Microfold (M) Cells. In: Cytokeratins-Tools in Oncology, Gerhard Hamilton (Ed.), pp. 3-14, 2012. (Publisher: InTech, ISBN: 978-953-51-0047-8)
2. 麻生 久：第1章（2）細胞の機能「細胞の増殖分化」p21-25、農学生命科学を学ぶための入門生物学（東北大学出版会）平成23年（2011年）5月10日
  3. Kohtaro Miyazawa, Takashi, Kanaya, Sachi Tanaka, Haruki Kitazawa, Michael T. Rose, Takahiro Yamaguchi, Hisashi Aso: Phenotypes and Distributions of Dendritic Cells in Peripheral Blood and Tissues Cattle. In: Dendritic Cells: Types, Life Cycles and Biological Functions. Lorraine C. Welles (ed) pp. 123-138, 2010. (NOVA Science Publishers, Inc.)
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/keitai/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

麻生 久 (ASO HISASHI)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：50241625

### (2) 研究分担者

山口 高弘 (YAMAGUCHI TAKAHIRO)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：20111297  
大和田 修一 (OHWADA SHUICHI)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：00183244  
渡邊 康一 (WATANABE KOICHI)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：80261494  
北澤 春樹 (KITAZAWA HARUKI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10204885

## [図書] (計3件)

1. Takashi Kanaya, Tetsuya Hondo, Kohtaro Miyazawa, Michael T. Rose and Hisashi Aso (2012). The Expression of