

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：80122

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450415

研究課題名(和文) 生体内タンパク質分解能と非定型BSE発生の関連性

研究課題名(英文) The relation between a cause of atypical bovine spongiform encephalopathy and the protein resolving ability in cattle

研究代表者

福田 茂夫 (FUKUDA, Shigeo)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部畜産試験場・主査

研究者番号：00390865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、牛の加齢と脳内不溶性タンパク質量を比較し、その関連性を明らかにすることである。また生体内のタンパク質分解酵素による異常プリオンタンパク質への影響を明らかにする。健康と畜牛3グループ(48～60か月齢、96～119か月齢および120か月齢以上)の牛について、延髄のタンパク質量を調査した。延髄の不溶性プリオンタンパク質(PrP)量に有意な差はなかった。しかし不溶性PrP量の上位25%のサンプルは、120か月齢以上の牛がもっとも多かった。非定型BSEの異常型プリオンタンパク質は、定型BSEよりもペプシンやトリプシンに消化されたが不完全であった。

研究成果の概要(英文)：More than 100 cases of atypical bovine spongiform encephalopathy (atypical BSE) has been reported in many countries including Japan. Most cases of atypical BSE have been reported in cattle older than 8 years of age. The purpose of this study was to clear the compare the insoluble protein amount in the brain of the aged cattle. The insoluble protein amounts of the medulla oblongatae were investigated about 3 groups of cattle (from 48 to 60 months old, from 96 to 119 months old and more than 120 months old). There were not significant differences in the insoluble protein amount of 3 groups each. But there were a lot of samples from cattle more than 120 months old in dominance 25% of the insoluble normal prion protein amount. The pathogenic isoform prion protein of atypical BSE digested by pepsin and trypsin more than typical BSE, but it was incomplete.

研究分野：獣医学

キーワード：牛 プリオン 伝達性海面状脳症

1. 研究開始当初の背景

牛海綿状脳症 (BSE : Bovine Spongiform Encephalopathy) は、中枢神経組織における空胞変性病変と異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の蓄積を特徴とする致死性神経疾患である。BSE は、これまで生化学的および神経病理学的な特徴や動物への伝達試験の結果から、単一のプリオン株に起因すると考えられていた。しかし、2004 年に非定型 BSE が報告され、これまでに 100 例以上が確認されている。非定型 BSE の PrP^{Sc} は、無糖鎖タンパク質の分子量の違いにより分類され、その大きさにより H 型、L 型と呼ばれている (Jacobs ら、2007)。非定型 BSE は、高齢牛で多く発生していること、散発的な発生状況から孤発性の可能性も示唆されており、BSE 対策の残された問題として、消費者から行政機関に対して原因究明を要望する声も挙がっている。

高齢牛では、若齢牛に比較し、脳内の酵素プロテアソーム活性が 33% 減少し、不溶性のプリオンタンパク質 (PrP) が増加することが明らかとなり (Yoshioka ら、2010)、非定型 BSE の発生要因として不溶性タンパク質が関与している可能性がある。一方、非定型 BSE の経口的な伝播リスクは否定されていないが、L 型非定型 BSE の牛への経口感染に成功したという報告は少なく、発生メカニズムの解明の関門となっている。経口投与によるマウスのスクレイピーの感染率は、対照 25% に対して胃酸分泌を抑制すると 59% に増加する (Martinsen ら、2011)。また PrP^{Sc} は、強力なタンパク質分解酵素である Proteinase K (PK) への抵抗性により、正常型 PrP と区別されるが、従来型 BSE よりも L 型非定型 BSE の PrP^{Sc} は PK で消化され易いことも明らかとなっている (Masujin ら、2008)。PrP^{Sc} の体内伝播や蓄積は、生体内のタンパク質分解酵素から影響を受けている可能性があるが、詳細な報告はない。

2. 研究の目的

- (1) 牛における加齢と不溶性タンパク質、特に PrP との関連性を明らかにする。
- (2) 生体内の酵素が非定型 L 型 BSE 感染牛の脳から抽出した異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BSE 検査陰性が確認された健康と畜牛、48 ~ 60 か月齢 (n=44)、96 ~ 119 か月齢 (n=42) および 120 か月齢以上 (n=40) の 3 群について、延髄を破砕し作成した乳剤を、2,500 rpm (570 × g)、10 分間、4 の条件下で遠心分離して上清 (S1) を得た。さらにその S1 を 50,000 rpm (100,000 × g)、1 時間、4 条件下で超遠心分離し、沈渣 (P2) を分取した。各サンプルは、SDS-PAGE サンプルバッファーと混和し、12% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。

polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレンに転写後、抗ウシ PrP 抗体を用い、画像解析装置 Chemidoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により PrP を検出した。不溶性タンパク質の量は解析ソフトウェア Quantity One (Bio-Rad) により化学発光強度を解析した。

(2) 健康牛、定型 BSE 実験感染牛および非定型 (L 型) BSE 実験感染牛の脳を用い乳剤を作製した。各乳剤に酵素 (ペプシン、トリプシン等) や消化管液を添加し、反応させた。反応後、SDS-PAGE および WB 法により含まれるタンパク質の分子量および量を解析した。

4. 研究成果

(1) 延髄の S1 中の総タンパク質量は、3 群間に有意な差は見られなかった。P2 中の不溶性 PrP 量は、3 群間に有意な差は見られなかったが、平均値は加齢により増加する傾向にあった (図 1)。

不溶性 PrP 量上位 25% 中の検体中、120 か月齢以上の牛の検体が最も多く、下位 25% 中では 48 ~ 60 か月齢の牛がもっとも多いことから、加齢に伴い不溶性 PrP 量の多い個体数が増える傾向がみられた (図 2)。電気泳動像や分子量に加齢による影響はみられなかった。脳内の不溶性 PrP 増加に加齢が関与していることが示唆されたものの他の要因も関与している可能性がある。Yoshioka らは、20 から 35 か月齢の牛と 120 か月齢以上の牛から得られる延髄より不溶性 PrP 量に有意な差を見いだした。高齢牛では、細胞内タンパク質分解酵素の活性が低下し、プリオンタンパク質の代謝にも影響を与えることが示唆される。加齢以外にも、遺伝やストレスなどの細胞内タンパク質分解酵素活性低下の要因が考えられる。不溶性 PrP 増加と非定型 BSE の発生については、さらに検討が必要である。

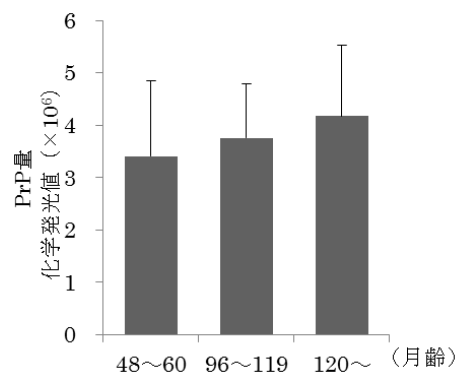


図 1 牛の加齢と延髄中の不溶性 PrP 量の比較

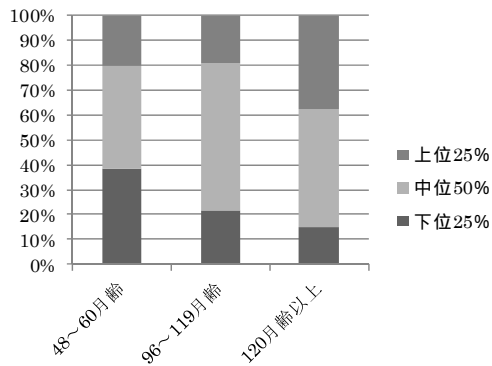


図2 牛の加齢と延髄中不溶性 PrP 量の上位 25%と下位 25%サンプルの分布

(2) 塩酸 (最終濃度 0.6M) 処理した 20%非定型 (L 型) BSE 感染脳乳剤に対し、消化酵素ペプシンを各濃度 (15mg/ml より 10 倍階段希釈) で 37、1 時間消化したところ、1.5mg/ml 以上の濃度で PrP^{Sc} のバンドが減弱した (図 3)。定型 BSE ではペプシン濃度に依存した変化は見られなかった。非定型 BSE 感染脳をトリプシン (最終濃度 2.5mg/ml) で 37、2 時間処理したところ、WB による牛 PrP 量は、処理なしに比較し 0.74 ± 0.05 倍 ($p < 0.05$) に減弱する像が得られた (図 4)。

以上のように、非定型 BSE の PrP^{Sc} は、消化管酵素であるペプシンおよびトリプシンの作用により、ある程度消化されることが示唆された。

非定型 L 型 BSE

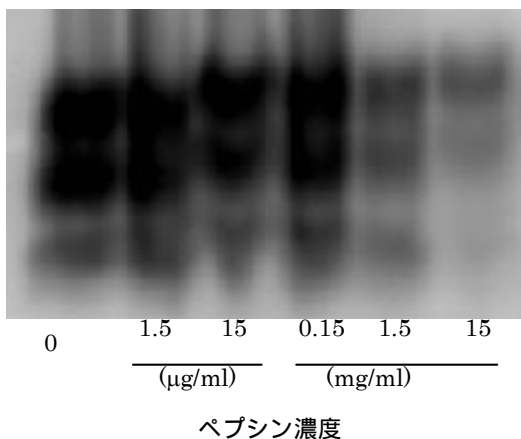


図3 非定型 BSE の PrP^{Sc} に対するペプシンの効果

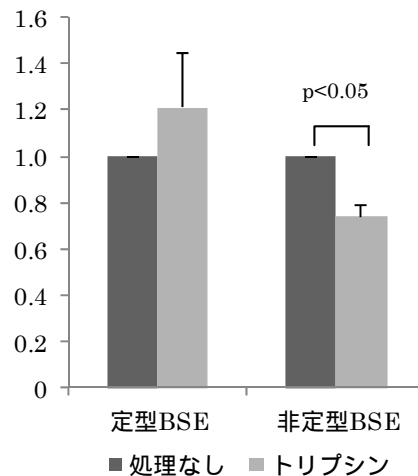


図4 定型および非定型 BSE の PrP^{Sc} に対するトリプシンの効果

また BSE 感染脳と牛の消化管液 (ルーメン、第四胃、十二指腸) を混合させた結果、非定型 BSE の PrP^{Sc} が減弱し、消化管液の影響を受けることが示唆された。牛の消化管液との反応では、ペプシン、トリプシン以外の酵素によるタンパク質分解または食渣や他の因子による物理的または化学的な作用による検出効率の低下が考えられる。いずれにしても、非定型 BSE は、消化管内で容易に分解されることは困難である。非定型 BSE の感染実験では、50g の非定型 L 型 BSE 感染脳を経口投与し、2 頭中 1 頭が 88 か月後に発症した例が報告された (Okada ら、2017)。10g 以下の投与量 ($n=14$) では感染しなかったことから、経口感染リスクは低いことが示唆された。本試験の結果は、非定型 L 型 BSE 感染脳を経口感染リスクが低い要因の一つであると考えられる。BSE を始め、プリオンの体内での感染機序については不明な点が多く、食品を介したプリオン感染リスクの低減にはさらに知見の集積が必要である。

<引用文献>

Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, Gavrier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, Groschup M, Erkens JH, Davidse A, van Zijderveld FG, Baron T. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol*, 45, 2007, 1821-1829.

Yoshioka Y, Ishiguro N, Inoshima Y. Proteasome activity and biological properties of normal prion protein: a comparison between young and aged cattle. *J Vet Med Sci*. 72, 2010,

1583-1587.

Martinsen TC, Benestad SL, Moldal T, Waldum HL. Inhibitors of gastric acid secretion increase the risk of prion infection in mice. Scand J Gastroenterol. 46, 2011, 1418-1422.

Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. Prion. 2, 123-128

Okada H, Iwamaru Y, Imamura M, Miyazawa K, Matsuura Y, Masujin K, Murayama Y, Yokoyama T. Oral Transmission of L-Type Bovine Spongiform Encephalopathy Agent among Cattle. Emerg Infect Dis. 23, 2017, 284-287.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 茂夫 (FUKUDA, Shigeo)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部畜産試験場・主査

研究者番号：00390865