

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850078

研究課題名(和文) 感染細胞内で機能する牛乳ラクトフォリンのウイルス複製阻害機構の解明

研究課題名(英文) The inhibitory mechanism of viral replication by lactophorin that functions in infected cells.

研究代表者

稲垣 瑞穂 (INAGAKI, Mizuho)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50626356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ロタウイルスは乳幼児下痢症の主因である。牛乳乳清に含まれる18kDaラクトフォリン(LP)は宿主細胞に対して何らかの相互作用をすることで、ウイルスゲノムの転写以降のステップを抑制することを見出した。LPにはN結合型糖鎖およびO結合型糖鎖が修飾されている。この活性には、LPのタンパク質構造の関与は低く、O結合型糖鎖が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rotavirus is the leading cause of severe gastroenteritis in infants. 18 kDa Lactophorin (LP), which contains in bovine skim milk, suppresses the synthesis and assembly of viral protein by interaction with the host cells. It suggests that LP inhibits the early stages of viral infection, namely adhesion, penetration, uncoating. This activity might be attributed O-link glycans in LP.

研究分野：食品科学

キーワード：ラクトフォリン ヒトロタウイルス 感染防御 糖鎖 牛乳 レクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒトロタウイルス (HRV) は、乳幼児の重症急性胃腸炎の主因である。衛生状況に関係なく、5歳までに世界中の子どもたちが一度は罹患することからも、ロタウイルスの感染力の強さとその予防が極めて難しいことがわかる。

これまでに、食品成分によるロタウイルス感染防御としては、大豆イソフラボンによるウイルスへの宿主細胞への結合阻害やグランベリージュースによるウイルス凝集効果などが報告されている。しかしながら、本研究で扱う 18 kDa ラクトフォリン (LP) は、いずれの報告と比較しても非常に活性が高い。

これまでの研究から、LP の示す感染阻害活性は、必ずしもウイルスと直接出会う必要はなく、宿主細胞と相互作用することによる新しい阻害様式であることが示唆されている。しかしながら、その阻害機構のみならず LP の活性に関与する分子構造など基本的な情報についても不明である。

2. 研究の目的

LP の HRV 増殖抑制メカニズムを分子レベルで解明し、ロタウイルスワクチンを補填する HRV 感染防御素材として実用化することである。LP の示すユニークなウイルス複製阻害機構の解明に向けた足掛かりとして、本研究では LP の活性に関与する分子構造の特定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 乳タンパク質の分画

プロテオースペプトンの調製

岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター柳戸農場に飼育されているホルスタイン牛より得た常乳から、定法に従って脱脂乳を調製した。95°C, 30分間加熱した脱脂乳について 30°C まで冷却した後、pH 4.6 に調整することでカゼインを沈殿させた。遠心分離により熱変性したタンパク質を除去して得られた画分は、純水で 48 時間透析した後、凍結乾燥した。

ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーによる分画

HiTrap Heparin HP (5 ml, GE Healthcare) を 2 本連結させて AKTA explore 10S に接続した。カラムを 3 M 尿素含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) の結合バッファーで平衡化したのち、結合バッファーに 2 mg/ml 濃度に試料 (プロテオースペプトン) を溶かし、カラムに 40 ml 添加した。(流速 2.5 ml/min)。溶出バッファーには、結合バッファー組成に 2 M NaCl を加えたバッファー (pH 7.0) を用いてステップワイズ (30% 溶出バッファー) で溶出して LP (18 kDa) を回収した。純水で 48 時間透析した後、凍結乾燥した。得られた画分について、二次元電気泳動および LP 抗体染色に供し、LP が分取できていることを確認した。

(2) HRV 感染阻害評価

HRV 感染試験は、ガラスウェル上に培養したコンフルエントのアカゲザル腎臓 MA104 細胞を用いた。サンプルを様々な濃度に段階希釈し、この希釈サンプルと HRV を同時に細胞へ添加した (同時接種法)。HRV 接種は MO 株 (G3P[8], m.o.i=0.01) を共通して用いた。感染細胞は、rotavirus protein (VP)6 を認識する抗体 PO-13 を用いて検出した。蛍光顕微鏡の観察により感染細胞数を測定した。培地に被験物質を添加しない場合をコントロールとし、LP の HRV 感染防御能は、コントロール群の HRV 感染を 50% 阻害する濃度である最小阻害濃度 (MIC) を算出した。

(3) LP 派生サンプルの調製

LP のアミノ酸高次構造破壊

protease K (EC 3.4.21.64) を用いて LP のタンパク質構造を破壊した。消化済みの LP を SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供し、タンパク質構造が破壊できたかを確認した。

LP の N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖ペプチドの分画

LP に対して *N*-glycosidase F (EC 3.5.1.52) を用いて *N* 結合型糖鎖を酵素的に切断し、*N*-gly を得た。SDS-PAGE に供し、LP のバンドが低分子量側へシフトすること、及び、*N* 結合型糖鎖を認識する ConA レクチンの反応性を調べることで *N* 結合型糖鎖の切断を確認した。

この *N*-gly には、*N* 結合型糖鎖 (*N*-glycan) と *O* 結合型糖鎖を持つ LP (*O*-LP) が含まれる。そこで *N*-gly をサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-25, GE Healthcare) に供することで *N*-glycan および *O*-LP に分画を試みた。

各種の定量法

得られたフラクションについて、糖の定量にはグルコースをスタンダードとしたオルシノール硫酸法、タンパク質の定量には BSA をスタンダードとしたブラッドフォード法もしくは BCA 法を用いた。

(4) レクチンを用いた競合感染試験

(2) で記述した HRV 感染阻害評価を以下にアレンジして実施した。まず競合感染試験に供するレクチン濃度を決めるため、予備検討として WST8 法を実施した。これにより、細胞増殖および細胞毒性に影響を与えない各レクチンの添加濃度を決定した。

WST8 により決定したレクチン濃度をもとに、x1, x10, x100 の 3 段にレクチンを希釈した。LP と 3 種の濃度に希釈したレクチンについて、それぞれマイクロチューブ内で混合し、37 °C、1 時間インキュベートして LP-レクチン混合液を調製した。この LP-レクチン混合液を細胞へ 1 時間作用させたのち (プレトリートメント法)、接種物を取り除いて細胞を

よく洗いウイルス感染を行った。コントロールはレクチンの代わりに PBS を用いることで、レクチン添加が LP の感染阻害に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) LP のアミノ酸高次構造が活性に与える影響

LP を protinase K 酵素処理に供することにより proK を得た。得られた proK について、SDS-PAGE およびウェスタンブロットに供した。CBB 染色および LP 特異抗体である 1C10 を用いた抗体染色においていずれも反応性が見られなかったことから、アミノ酸高次構造が破壊されていることを確認した。得られた proK について同時接種法にて活性を評価したところ、酵素消化後も活性が保持されており、その活性は濃度依存的であった。しかしながら、proK については、サンプルを希釈するとともに顕著な活性の低下が見られた (MIC; LP 43 $\mu\text{g/ml}$, proK 63 $\mu\text{g/ml}$)。アミノ酸高次構造については必ずしも必要がないが、低濃度でも活性を示すためにはアミノ酸構造が必要である可能性が考えられた。

(2) LP に修飾された N 結合型糖鎖構造が活性に与える影響

N-glycosidase F を用いて LP フラクシオンに含まれる N 結合型糖鎖を特異的に切断することで、Ngly を得た。得られた Ngly について、CBB 染色、LP 抗体染色および N 結合型糖鎖の検出には conA、O 結合型糖鎖の検出には ABA を用いたレクチン染色を行った。CBB 染色より LP のバンドが低分子量側にシフトしていたことから、N 結合型糖鎖の切断を確認した。LP 抗体染色において検出された全てのバンドについて、N-glycosidaseF 消化により低分子量へのバンドシフトが確認されていることから、主要成分である 18 kDa 以外のマイナーな LP についても N 結合型糖鎖の切断が確認できた。conA レクチン染色では、LP 分子サイズに相当する N 結合型糖鎖について顕著なシグナルは検出されなかった。また、レーン全体の conA 反応性が低下していたことから、N 結合型糖鎖が切断できたと考えられた。ABA 染色では、N-glycosidaseF 消化後も低分子量にシフトしたバンドが確認された。

次に、Ngly をサイズ排除クロマトグラフィー (Sephadex G-25, GE Healthacre) に供して、N-glycan と O-LP の分画を行った (溶出条件: PBS pH7.0, 2.5 ml/min, 1ml apply, 1ml fractionation)。得られたフラクシオンについては、ドットプロット法で膜に固定化して LP 抗体染色を試みた。尚、LP 抗体の抗原結合部位はアミノ酸部位であることから、O-LP については検出が可能である。その結果、ボイド領域 (Vo) から約 0.4 カラムボリュームに相当する fr.3 に LP 抗体の陽性反応を確認した。N-glycan の検出には、オルシノール硫酸法を用いた。上記のサイズ排除クロマトグラフィ

ーを行う際に、コントロールとして LP (N-glycosidaseF 未消化の LP) を分画し、LP 由来の分画物と Ngly 由来の分画物を比較することで、N-glycan フラクシオンを特定した。フラクシオンごとに、ブラッドフォード法によるタンパク質定量とオルシノール硫酸法による糖の定量を行ったところ、Ngly の fr.5 および fr.6 において糖が検出され、これらは N-glycosidaseF 消化で遊離した N-glycan と考えられた。

得られた Ngly (O-LP と N-glycan の混合物)、O-LP、N-glycan について同時接種法により活性を評価したところ、Ngly については LP と比較して活性が低下していた。O-LP については LP とほぼ同等の活性が認められた。一方で、N-glycan については感染阻害が見られなかった。(MIC; Ngly 157 $\mu\text{g/ml}$, O-LP 18 $\mu\text{g/ml}$, N-glycan not-detected)。

以上の結果より、N 結合型糖鎖の可能性は低いことが示唆される。しかしながら、今回の Sephadex G-25 による分画法により、すべての N-glycan が完全に除去できていない可能性も考えられるため、N-glycan と O-LP の分画方法についての更なる検証が必要である。

(3) レクチンを用いた競合感染試験による感染阻害基盤糖鎖構造の推定

(2) において、N 結合型糖鎖構造の関与が示唆されたことから、N 結合型糖鎖の内、ハイマンノース・2 本鎖複合型・混成型を認識する conA レクチンについて検証を行った。conA レクチンのみの添加 [LP(-)/conA(+)] では感染阻害が見られず、conA レクチンと LP の混合液 [LP(+)/conA(+)] をプレトリートメントした場合に感染阻害が見られた。さらに 3 本鎖・4 本鎖を認識する PHA-L レクチンでも同様な検証を行ったところ、やはり PHL-A レクチン添加のみでは感染阻害が認められず、LP と PHL-A [LP(+)/PHA-L(+)] をプレトリートメントした場合にのみ感染阻害活性が発揮された。以上の結果より、N 結合型糖鎖を認識する 2 種のレクチンを用いることで LP の N 結合型糖鎖をマスクして感染阻害試験を行ったが、コントロールと比較して、レクチン競合による LP の感染阻害率の低下が観察されなかったことから、N 結合型糖鎖の活性への関与は低いと考えられた。

続いて、同様の手法を用いて、O 結合型糖鎖にみられる T 抗原 (Gal 1-3GalNAc) を認識する PNA による競合試験を実施した。予想に反して感染阻害率の低下が見られなかった。上述の N 結合型糖鎖認識レクチンの結果と同様に、PNA レクチンのみの添加 [LP(-)/PNA(+)] では感染阻害が見られず、PNA レクチンと LP の混合液 [LP(+)/PNA(+)] をプレトリートメントした場合に感染阻害が見られた。LP に修飾された O 結合型 T 抗原について PNA レクチンでマスクしたが、LP の感染阻害活性が保持されていたことから、O 結合型糖鎖の T 抗原の活性への関与は

低いことが示唆された。

LP の N 結合型糖鎖には、自然界では珍しい LacdiNAc 構造 (GalNAc 1,4 GlcNAc) を持つことから、LacdiNAc 認識レクチンである CNL についても検証を行った。しかしながら、前述の conA、PHA-L、PNA レクチンの結果と同様に、CNL レクチンのみの添加 [LP(-)/CNL(+)] では感染阻害が見られず、CNL レクチンと LP の混合液 [LP(+)/CNL(+)] をプレトリートメントした場合に感染阻害が見られた。このことより、LacdiNAc 構造の活性への関与は低いと考えられた。

以上の結果より、単一のレクチンを用いた LP のプレトリートメントでは活性の低下が見られなかったことから、活性に關する構造としては、今回検討できなかったレクチンが認識する糖鎖構造や複数の糖鎖構造が關与している可能性が考えられた。

(4) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

LP の活性は、他の食品成分による感染阻害活性よりも明らかに強い活性を示し、酵素消化耐性という特徴を持つことから、実用化に長けた成分である。本研究において、LP の示す抗ロタウイルス活性に關する主要な分子基盤構造を糖鎖に絞り込めたことから、活性に關する詳細な糖鎖構造の特定が進むことにより、創薬へと繋がる可能性が考えられる。

(5) 今後の展望

これまでに得ている結果から、LP の抗ウイルス活性は、ウイルスの宿主細胞への接着、侵入、脱殻のいずれかのステップの阻止による可能性が高いと考えられる。今後も検証を重ね、どのステップによる阻害かを明確にする必要がある。また、LP の示す活性には、LP に修飾された糖鎖が重要であることが示唆されていることから、その詳細な糖鎖構造を特定することが求められる。

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 1 件)

稲垣瑞穂、牛乳タンパク質による腸感染症のコントロール、日本病態生理学会雑誌、査読無、24、2015、pp 29-33

[学会発表](計 4 件)

稲垣瑞穂、大野翔平、小林純子、山田佳太、高橋毅、中込とよ子、中込治、金丸義敬、鈴木徹、牛乳ラクトフォリンがロタウイルスゲノムの転写および複製に与える影響。日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日(岡山県岡山市)

稲垣瑞穂、鈴木徹、牛乳ラクトフォリンの示すウイルス感染阻害活性から探るミルク

糖鎖の可能性。2015 年度日本乳酸菌学会 泊り込みセミナー、2015 年 5 月 14 日(兵庫県淡路市)

稲垣瑞穂、牛乳タンパク質による腸感染症のコントロール。第 25 回日本病態生理学会、2015 年 7 月 31 日(愛媛県松山市)

稲垣瑞穂、大野翔平、小林純子、山田佳太、金丸義敬、中込とよ子、中込治、鈴木徹、ロタウイルス増殖抑制活性に關する牛乳ラクトフォリンの分子構造の特定、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日(北海道札幌市)

[図書](計 1 件)

Inagaki, M., Yabe, T. and Kanamaru, Y., Nova Science Publishers, Inc., Whey Protein: Functional Properties, Production and Health Benefits., 2014, pp. 163-177

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 瑞穂 (INAGAKI, MIZUHO)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号: 50626356

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: