

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19580309
 研究課題名（和文） 牛乳ラクトフォリンの強力なヒトロタウイルス感染阻害作用の分子基盤
 研究課題名（英文） Molecular basis for prevention of human rotavirus infection by bovine milk lactophorin
 研究代表者
 金丸 義敬（KANAMARU YOSHIHIRO）
 岐阜大学・応用生物科学部・教授
 研究者番号：50111795

研究成果の概要：ヒトロタウイルスは5歳以下の乳幼児下痢症の主因である。ワクチン接種の対象が限られており（6-12 週齢の乳児）、代替予防法の開発が望まれる。本研究は、牛乳タンパク質ラクトフォリン（LP）の強力な感染阻害活性を明確に示し、高い加熱耐性から、その活性が修飾糖鎖に起因することを示唆した。質量測定によってユニークな N 型糖鎖構造を明らかにし、その部分構造が 40%程度の感染阻害を示すことも明らかにした。また、LP 含有牛乳画分の下痢症予防効果を乳飲みマウス感染モデルにおいて実証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産学・草地学

キーワード：牛乳、ラクトフォリン、糖鎖、ロタウイルス、感染阻害、下痢症、乳飲みマウス

1. 研究開始当初の背景

本研究で扱うヒトロタウイルスは、乳幼児を中心にウイルス性下痢症を引き起こす病原体である。下痢に伴う脱水が原因となり、発展途上国を中心に毎年 60 万人近い死者を出している。2006 年に開発された 2 種類のロタウイルスワクチンは 100 カ国以上で認可を受け、その有効性の検証が行われている。し

かし、そのワクチン接種は 6-12 週齢の乳児に限定されたものであり、さらに患者の多くは免疫系の未熟な乳幼児であることから、ワクチンの代替となる予防法の開発も重要視されている。

我々はこれまでに、牛乳乳清から調製した糖タンパク質フラクション F1 について、ヒトロタウイルス感染阻害活性を示すこと

を報告した (Kanamaru *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 246-249 (1999)). また、その感染阻害作用成分が牛乳乳清に含まれる糖タンパク質ラクトフォリン (別名プロテオースペプトンコンポーネント 3) のフラグメントであることを明らかにした。ラクトフォリンは複数の分子種で構成されるが、いずれにも翻訳後修飾として N 型糖鎖 (77 位) と O 型糖鎖 (86 位) が報告されている。このラクトフォリンが示す感染阻害メカニズムの解明により、副作用が生じる可能性が低い食べもの ‘牛乳 (常乳)’ からのヒトロタウイルスに対する受動免疫素材の実用化への貢献が期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラクトフォリンの示すヒトロタウイルス感染阻害活性に関与する分子基盤を解明することである。

ロタウイルスの細胞レセプター候補としては、糖タンパク質やガングリオシドなどの複合糖質とともにインテグリンが報告されているが、感染メカニズムは複雑で多くの段階を含むことから、未だその全容解明には至っていない。従って、ラクトフォリンが示す活性に関与する分子基盤を同定することは、これまで未解明であるロタウイルスに対する細胞レセプター構造の解明にも大きなインパクトを与える可能性が考えられる。

これまでの調製法では、二次元電気泳動で分離したラクトフォリンを電気泳動溶出により回収していたことから、得られるサンプル量が限られていた。そこで先ずクロマトグラフィーを用いたラクトフォリンの分取方法について確立を目指した。

引き続き、ラクトフォリンの修飾糖鎖構造について、MALDI-QIT TOF MS を用いた構造解析を行い、糖鎖と活性との関連性について検討を行った。また、ラクトフォリンを含

有する牛乳分画物のロタウイルス感染予防効果を動物実験で調べた。

3. 研究の方法

(1) 乳タンパク質の分画

①プロテオースペプトンの調製

常乳から定法に従い、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 (プロテオースペプトン) は、純水で透析した後、凍結乾燥した。

②heparin 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 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 (流速 5 ml/min)。プロテオースペプトン (結合バッファーを用いて 10 mg/ml に調製) を 5 ml 添加した。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) を用意し、溶出した。非吸着画分、吸着画分をそれぞれ回収し、純水で透析した後、凍結乾燥した。

③ Hi-Load Superdex75 prep-grade によるゲルろ過クロマトグラフィーによる分画

Hi-Load Superdex75 prep-grade (GE Healthcare) を 6 M 尿素, 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 0.2 M 酢酸アンモニウム (pH 5.0) の溶出バッファーで平衡化した (流速 0.7 ml/min)。溶出バッファーに 10 mg/ml 濃度に溶かした試料をカラムに 5 ml 添加した。得られた画分をそれぞれ回収し、純水で透析した後、凍結乾燥した。

(2) 分析方法

①二次元電気泳動法

膨潤バッファーに溶解したサンプルを 7 cm IPG Ready-Strip (pI 5-8, Bio-Rad) になじま

せた後、PROTEIN IEF Cell (Bio-Rad) を用いて、膨潤ならびに等電点電気泳動を開始した。等電点電気泳動後の Strip は還元・アルキル化した後、PROTEAN3 (Bio-Rad) を用いた 15% SDS-PAGE に供した。200 V 定電圧で泳動を行い、CBB 染色によりタンパク質を検出した。

②ウエスタンブロッティングと酵素抗体法

mini Trans-blot electrophoretic transblot cell (Bio-Rad) を用い、電気泳動で分離したタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon, Millipore) にブロッティングした。転写後の PVDF 膜は、一次抗体 (ラクトフォリン 1C10 抗体: 名古屋大学松田幹教授より分与) と二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG) を用いて検出した。

③MALDI-QIT TOF MS

二次元電気泳動によって分離した目的スポットについて切り出し、ゲル内消化 (PNGase F) によって N 型糖鎖を抽出した。遊離 N 型糖鎖について、BlotGlyco 糖鎖精製ラベル化キット (住友ベークライト) を用いた PA 標識を行い、脱試薬・脱塩して精製した。MALDI プレートにアプライして MALDI-QIT-TOF MS (AXIMA Resonance、島津製作所) を用いた MS, MS² 測定により、構造推定を行った (実験方法の詳細は投稿雑誌を参照)。

(3) ヒトロタウイルス感染実験

①ヒトロタウイルス中和活性試験

細胞実験では、アカゲザル腎臓由来 MA104 細胞に対するヒトロタウイルス MO 株の細胞感染阻害を観察する中和活性試験により、各サンプルの感染阻害活性を比較した (実験方法の詳細は投稿雑誌を参照)。長崎大学医学部 中込治教授 中込とよ子准教授 (MO 株, 3.4×10^6 ffu/ml) から分与いただいたウイルスを用いた。試料のタンパク質の

定量は Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて行った。

②乳飲みマウスを用いたロタウイルス感染予防試験

動物モデルを用いた検討は、岐阜大学動物取扱規則及び岐阜大学動物実験委員会規則に則り、各部局で承認を受けて行った。BALB/c 系統妊娠マウスを購入 (日本 SLC)、出産させ、子マウスを得た。5 日齢の同腹子マウスを一群とし、サンプル (F1, 2.5 mg/匹) を経口投与した。その 60 分後、ヒトロタウイルス (MO 株, 1.7×10^5 ffu/匹) を経口投与により感染させた。ウイルス感染から 3 日間の子マウスの糞便の状態を観察した。コントロールにはサンプルの代わりに PBS を投与した。

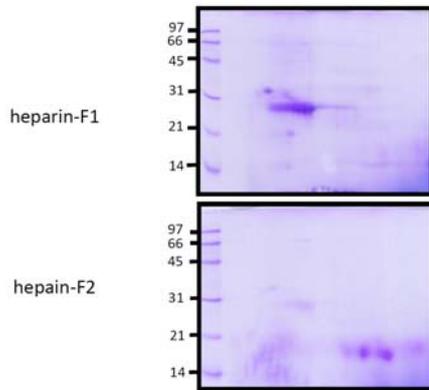
4. 研究成果

(1) ラクトフォリンのカラム分取法の確立

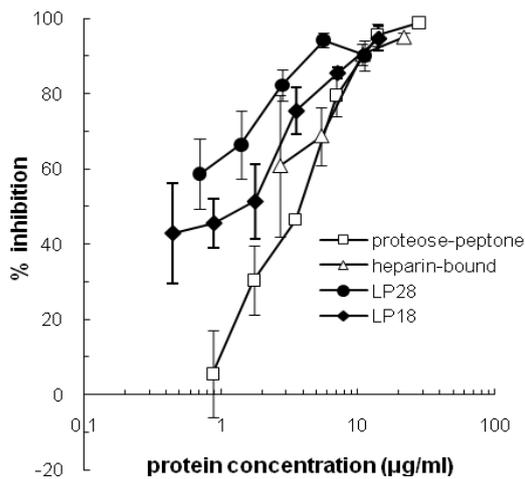
ラクトフォリンは、主として 28 kDa と 18 kDa の糖ペプチドで構成される (LP28, LP18)。いずれのラクトフォリンの C 末端領域には塩基性アミノ酸 (リジン・アルギニン) が豊富に配列されている。そこでプロテオームペプトンからヘパリンアフィニティーを用いたラクトフォリンの分取を試みた。ヘパリン吸着画分の二次元電気泳動パターンから、予想通り、ラクトフォリン (LP28, LP18) はヘパリン吸着画分に溶出されていることを確認した。出発物質であるプロテオームペプトンの MIC が $3.6 \mu\text{g/ml}$ であるのに対して、ヘパリン吸着画分の MIC は $2.0 \mu\text{g/ml}$ であり、活性が強まっていることが示された。

LP18 については阻害活性が認められているが、LP28 については不明である。そこで、尿素存在下での酢酸アンモニウムバッファーによるゲルろ過クロマトグラフィーを行うこととした。得られた 2 つの溶出ピーク (溶

出順に hep1, hep2) について二次元電気泳動に供したところ、それぞれ主として、hep1 は LP28、hep2 は LP18 で構成されたタンパク質プロファイルを示した。



中和活性試験を行ったところ、hep1(LP28)の MIC は 0.47 $\mu\text{g/ml}$ 、hep2(LP18)の MIC は 0.97 $\mu\text{g/ml}$ といずれも強い活性を示した。

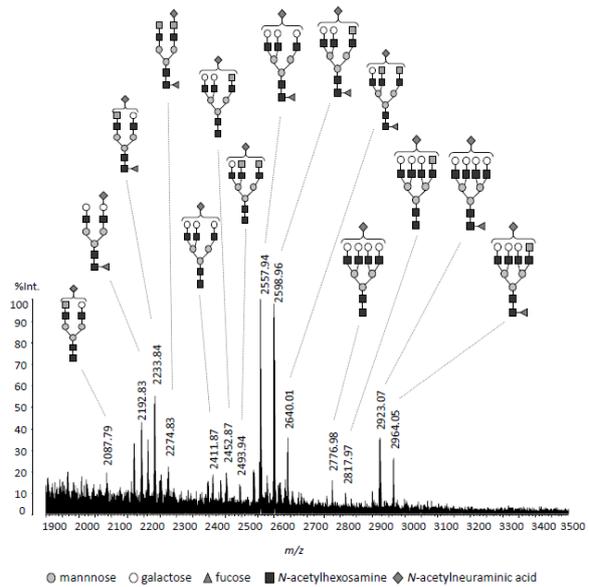


以上の結果から、分子サイズに関係なく、ラクトフォリンはヒトロタウイルス感染を阻害することが示された。また LP28 と LP18 に共通する分子構造が活性に関与していることが示唆された。

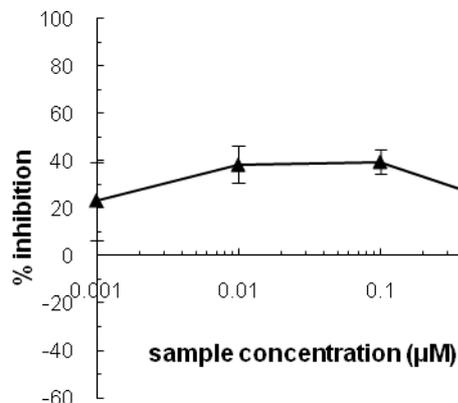
(2) LP18 の N 型糖鎖構造解析と阻害活性との関係

LP28 と LP18 に共通する構造が阻害活性に関与することが示唆されたことから、よりシンプルな構造を持つ LP18 に絞り、MALDI-QIT TOF MS による 77 位の N 型糖鎖

構造解析を行った。その結果、既報告 (Girardet JM *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **234**, 939-946 (1995)) の構造以外にも 2, 3, 4 本鎖の N 型糖鎖多型を有することが分かった。また、いずれの糖鎖構造も非還元末端に 1 つのシアル酸を持っていた。乳脂肪球皮膜タンパク質に特徴的な LacdiNAc (GalNAc-GlcNAc) 構造を持つことが明らかとなった (Inagaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 447-450 (2010))。

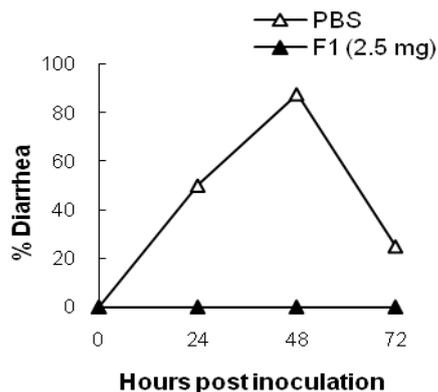


ユニークな LacdiNAc モチーフが見つかったことから、市販の LacdiNAc について中和活性試験を行ったところ、0.1-0.01 μM 濃度範囲において 40%程度の阻害が観察された。



(3) 乳飲みマウスモデルを用いたヒトロタウイルス感染予防試験

PBS 投与群では、感染後 48 時間に下痢発症のピークを迎え、72 時間後でも下痢症状から回復していないマウスも観察された。その一方で、LP 含有牛乳画分 (F1) 投与群では、試験期間中、下痢症状が全く認められなかったことから、事前に F1 を投与することにより、下痢発症を有意に抑えることが実証した。



(4) 今後の展望

本研究から、LP18 だけでなく LP28 もヒトロタウイルス感染阻害活性を示すことが示された。LP18 の N 型糖鎖構造 (Asn77) について質量分析を行った結果、多様な糖鎖構造を持つこと、ユニークな LacdiNAc 構造を持つことが明らかとなった。現時点までの研究から、ラクトフォリンの持つ多様性に富んだ糖鎖構造が阻害活性を要因ではないかと考えている。今後は、LP18 の O 型糖鎖構造 (Ser86) についても解析を進め、阻害活性に関与する基盤構造をより詳細に明らかにしていきたい。

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 3 件)

- ① Mizuho INAGAKI, Shuuichi NAKAYA, Daisuke NOHARA, Tomio YABE, Yoshihiro KANAMARU, and Tohru SUZUKI
The Multiplicity of N-Glycan Structures of

Bovine Milk 18 kDa Lactophorin (Milk GlyCAM-1). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 447-450 (2010) 査読あり

- ② Mizuho INAGAKI, Mayumi YAMAMOTO, Xijier, Cairangzhuoma, Kenji UCHIDA, Hiroshi YAMAGUCHI, Mihoko KAWASAKI, Kousaku YAMASHITA, Tomio YABE, and Yoshihiro KANAMARU

In Vitro and in Vivo Evaluation of the Efficacy of Bovine Colostrum against Human Rotavirus Infection. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press (2010) 査読あり

- ③ 稲垣瑞穂、小林ちひろ、野原翠、金丸義敬 牛乳 α -ラクトアルブミン及び β -ラクトグロブリンによる腸感染のコントロール ミルクサイエンス, **56**, 131-136 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 稲垣瑞穂、希吉爾、山本真弓、矢部富雄、長岡利、高橋毅、中込治、中込とよ子、金丸義敬、牛乳ラクトフォリン 28K 及び 18K の単離とそれらのヒトロタウイルス感染阻害活性、日本農芸化学会 (2009、福岡)
- ② 稲垣瑞穂、矢部富雄、長岡利、高橋毅、中込治、中込とよ子、金丸義敬、牛乳ラクトフォリンの示すヒトロタウイルス感染阻害活性における糖鎖の関与、日本生化学会中部支部例会 (2008、岐阜)
- ③ 稲垣瑞穂、矢部富雄、長岡利、高橋毅、中込治、中込とよ子、金丸義敬、牛乳ラクトフォリンの示すヒトロタウイルス感染阻害活性における糖鎖の関与、第 5 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 (2008、神奈川)
- ④ 稲垣瑞穂、矢部富雄、長岡利、高橋毅、中込治、中込とよ子、金丸義敬、牛乳ラクトフォリンの示すヒトロタウイルス感染阻害活性における糖鎖の関与、特定領域研究「感

染現象のマトリックス」第7回感染症沖縄
フォーラム（2008、沖縄）

- ⑤ 稲垣瑞穂、矢部富雄、長岡利、高橋毅、中込治、中込とよ子、金丸義敬、牛乳ラクトフォリンのヒトロタウイルス感染阻害作用の分子基盤、日本農芸化学会（2007、名古屋）
- ⑥ 金丸義敬、稲垣瑞穂、乳成分のヒトロタウイルスに対する増殖抑制作用と下痢症状軽減効果、日本農芸化学会（2007、名古屋）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金丸 義敬 (KANAMARU YOSHIHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：19580309

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし