

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05504

研究課題名(和文) ミルクを用いた乳幼児のための感染症予防素材の創出

研究課題名(英文) The development of infectious disease prevention for infants using bovine milk

研究代表者

稲垣 瑞穂 (Inagaki, Mizuho)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50626356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛乳乳清に含まれるラクトフォリン(LP)はヒトロタウイルス(HRV)感染を強く抑制する。本研究では「LPの示す抗HRV活性に関する糖鎖基盤構造の解明」と「LPの示す初期感染阻害点の把握」を試みた。その結果、LPのO結合型糖鎖に含まれるN-アセチルラクトサミン構造の抗HRV活性への関与が示唆された。合わせて、LPの阻害機構は、これまでに報告してきたウイルスの転写・翻訳阻害だけでなく、ウイルスの宿主細胞への吸着も阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児は生後2ヶ月から様々なワクチン接種を受ける。ワクチン接種は感染予防において重要な役割を果たすが、同時に、新生児の未熟な免疫系の負担となる。本研究では、乳幼児の罹患率が非常に高いロタウイルス下痢症に対して牛乳成分(ラクトフォリン)の感染阻害効果と阻害メカニズムを検証している。この検証は、ウイルス感染を宿主細胞の恒常性破綻ととらえると、乳成分を用いた細胞恒常性の維持機能の解明とも言える。本研究で得られる知見は、調製粉乳・乳幼児ケア食品への乳素材の添加、ウイルスの複製阻害方法の開発、乳素材による細胞恒常性の強化などへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lactofolin (LP) contained in milk whey strongly suppresses human rotavirus (HRV) infection. In this study, we attempted to understand both “Which sugar chain structure contained in LP is involved in the anti-HRV activity?” and “Which point does LP show inhibition activity in the early stages of HRV infection?”. As a result, it was suggested that the N-acetyllactosamine structure contained in the O-linked sugar chain of LP is involved in the anti-HRV activity. Overall, it was suggested that the LP inhibition mechanism may inhibit not only the transcription / translation inhibition of the virus reported so far, but also the adsorption of the virus to the host cell.

研究分野：食品科学

キーワード：ロタウイルス ラクトフォリン 牛乳 感染予防 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトロタウイルス (HRV) は乳幼児を中心に深刻な下痢症状をもたらす病原体である。非常に強い感染力を持つことから、十分な衛生が確保された環境においても 5 歳までに必ずロタウイルスに感染し、下痢を発症する。我が国では、2020 年 10 月からロタウイルスワクチンが定期接種に組み込まれている。

新生児のワクチンスケジュールは生後 2 ヶ月から始まり、ロタウイルスに限らず、Hib 感染症、小児肺炎球菌、B 型肝炎、結核 (BCG) 4 種混合 (ジフテリア、百日せき、ポリオ、破傷風) など、さまざまな予防接種が続く。いずれも弱毒化・不活化した病原体ではあるが、乳児の免疫系に負荷がかかることが予想される。

乳は、未熟な新生児の成長に不可欠な食材である。このことから、乳には生命を守るための成分・機能が含まれていると考え、私たちは「牛乳」を用いた乳幼児のための疾病管理を提案してきた。その一例として、牛乳乳清に含まれる微量成分ラクトフォリン (Lactophorin, LP) による HRV 感染抑制活性を長く検証している。

LP は HRV 感染を特異抗体並みに抑制する。先行研究から、LP が示す HRV 感染阻害について 2 つの特徴「LP の示す活性は、LP に修飾された糖鎖が関与する」と「LP は宿主細胞内でウイルスの複製を阻害する」ことが明らかになっていた。LP のウイルス複製に対する阻害機構の解明は、ウイルス感染抑制の戦略的アプローチを考える上でも有意義である。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、LP が宿主細胞をどのように制御して HRV 感染を抑制するのかを明らかにすることである。本研究では「LP の示す抗 HRV 活性に関与する糖鎖基盤の解明」と「LP の示す初期感染阻害点の把握」を試みた。

3. 研究の方法

(1) ラクトフォリンの調製

ホルスタイン牛より得た常乳から、常法に従ってプロテオソームペプトンを調製した。プロテオソームペプトンは尿素を用いて変性させ、ヘパリンクロマトグラフィーに供した。ヘパリン担体に吸着させた LP サンプルは、バッファー中の塩濃度を高めることで溶出した。得られた LP は SDS-PAGE および LP 特異抗体 1C10 を用いたウェスタンブロットにより、分取を確認した。

(2) 各種酵素処理

糖鎖切断には、以下の酵素をマニュアルに沿って用いた。

N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) の切断: ノイラミダーゼ (Roche, code 10269611001)

N 結合型糖鎖の切断: N-glycosidaseF (Roche, code 11365193001)

O 結合型糖鎖の切断: O-glycosidase (NEW ENGLAND BioLabs, code P0733S)

N-アセチルラクトサミン (LacNAc) の切断:

α2-3,6,8,9 ノイラミダーゼ A (NEW ENGLAND BioLabs, code P0720S)

β(1-4)ガラクトシダーゼ S (NEW ENGLAND BioLabs, code P0745S)

β-N-アセチルグルコサミニダーゼ S (NEW ENGLAND BioLabs, code P0744S)

(3) 顕微鏡観察による活性評価

HRV 感染試験は、ガラスウェル上に培養したセミコンフルエントのアカゲザル腎臓 MA104 細胞と HRV MO 株 (G3P[8]) を用い、多重感染度 (Multiplicity of Infection; MOI) 0.01 の条件で試験した。タンパク質濃度は、BCA アッセイにより求めた。

様々な濃度に希釈した LP と HRV を混合し、MA104 細胞に播種した (同時接種法)。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対照とし、対照群の HRV 感染に対して 50% 阻害する乳サンプルの濃度を最小阻害濃度 (MIC) として求めた。

(4) ウイルス mRNA 遺伝子定量用の感染試験

96 ウェルプレートに培養したセミコンフルエント MA104 細胞と HRV MO 株 (G3P[8]) を用い、MOI 2.25 の条件で実施した。評価には LP が含まれる乳サンプルを用いた。PO-13 抗体検出に基づいた顕微鏡観察による活性評価を行い、乳サンプルに十分な活性があることを確認した。

3 つの条件を用意した。HRV と PBS を 1:1 で混合したサンプル (RV-P)、HRV と乳サンプル (1.25 mg/mL) を 1:1 で混合したサンプル (RV-L)、HRV と乳サンプル (12.5 mg/mL) を

1:1 で混合したサンプル (RV-H)。

〔実験 1〕感染阻害評価：MA104 細胞に対し、RV-P、RV-L、RV-H のいずれかを添加し 37 で 1 時間感染を行った。その後上清を除去し PBS で 2 回洗浄したのち、2%FCS 培地を添加して 16 時間感染を進行させた。

〔実験 2〕侵入阻害評価：MA104 細胞に対し、RV-P、RV-L、RV-H のいずれかを添加し、37 で 1 時間感染を行った。

〔実験 3〕吸着阻害評価：MA104 細胞に対して、細胞の生理機能を停止するために 4 で 20 分間インキュベートした。その後、RV-P、RV-L、RV-H のいずれかを添加し、4 のまま 1 時間感染を行った。

感染終了後、上清を除去し PBS で 2 回洗浄したのち細胞を回収した。細胞から total RNA の抽出ならびに gDNA の除去を行い、ウイルスタンパク質 VP6 をコードするマイナス鎖 RNA に特異的なプライマーを用いて cDNA を合成した (詳細は 4.(2) に記載)。

VP6 マイナス鎖特異的 cDNA 量を定量 PCR 法により評価した。実験 1 では、検量線を作成し (検量線用テンプレートは受託合成) ウイルスコピー数を求めた。実験 2 と実験 3 では 18S rRNA を内因性コントロールとした相対定量を行った。

4. 研究成果

(1) LP の示す抗 HRV 活性に寄与する糖鎖基盤の解明

N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) 切断による活性への影響の評価を行った。LP に対してノイラミナーゼ処理を行い、シアル酸認識 SSA レクチン染色により LP の Neu5Ac の切断を確認した。限外ろ過により LP から Neu5Ac を取り除き、得られたサンプル Sial について活性を評価したところ、Sial は未処理の LP と同程度の抗 HRV 活性を示した。以上から、Neu5Ac は抗 HRV 活性に関与しないことが明らかとなった。

O 結合型糖鎖コア構造の切断による活性への影響の評価を行った。Sial に対して、界面活性剤 NP-40 存在下で *O*-グリコシダーゼ処理を行った。GalNAc-Gal (Core1) 構造認識 ABA レクチン染色を用い、*O* 結合型糖鎖が切断できたか否かを評価した。反応条件を色々と検討したが、ABA レクチン反応性が変化しなかった。このことから、LP に修飾された *O* 結合型糖鎖の鎖長は比較的長いこと、タイプ II 型の特徴である *N*-アセチルラクトサミン (LacNAc; Gal(β1-4)GlcNAc) を含む構造を予想した。

LacNAc の切断による活性への影響の評価を行った。3種の酵素処理を行った Digest に対してレクチン染色を行い、LacNAc が切断できたか否かを評価した。1C10 抗体染色では、LP に相当するバンドについて低分子量側へのシフトが観察されたが、バンドの形状はブロードであり完全に切断できていなかった。染色結果から LP の *O* 結合型糖鎖には LacNAc が構成ユニットとして含まれること、Digest は一部の LacNAc が切断されていることが示唆された。

LP、Sial、Digest について、顕微鏡観察による活性評価を行った。LP と Sial は同程度の活性を示した一方、一部の LacNAc 切断を達成した Digest では活性の低下が見られた。以上の結果から、LP の *O* 結合型糖鎖にはミルクオリゴの主要構造である LacNAc が含まれており、LacNAc 構造が LP の抗 HRV 活性に関与している可能性が示唆された。

(2) LP の示す初期感染阻害点の把握

細胞に侵入したウイルスを定量することで、LP の HRV 感染阻害機構に対する新しい知見を得ることを試みた。HRV は細胞侵入後、転写によりプラス鎖を増幅する。そのため、ウイルスの侵入量を調べるためにはマイナス鎖のみを定量する必要がある。

Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた RV MO 株の VP6 プラス鎖遺伝子配列を読み (1,236 bp) 相補鎖の VP6 マイナス鎖配列情報を得た。VP6 マイナス鎖を特異的に認識する 136 bp のプライマーを設計した。プラス鎖と区別するため、設計した Fw プライマーの 3' 末端側に tag 配列 (AACGTACTACAACCTTTTCCAACGC, Plaskon et al., PLoS ONE, vol.4 e7468) を付けた。Tag 付きの Fw プライマーを用いて逆転写反応を行うことで、逆転写した VP6 マイナス鎖 cDNA は区別した。定量 PCR の際には、Tag プライマーと Rv プライマーを用いて tag 付き cDNA を増幅した。非感染細胞では VP6 マイナスの増幅ならびに非特異的な増幅が起こらないことを確認したのち、実験 1-3 を実施した。

HRV mRNA の定量〔実験 1〕感染阻害評価：RV-P の VP6(-)のコピー数と比較して、RV-L では 73%の減少、RV-H では 93%の減少がみられた。

HRV mRNA の定量〔実験 2〕侵入阻害評価：

感染 1 時間後の細胞を回収して細胞内に侵入したウイルス量を測定した。ウイルスの複製段階に達していないため、マイナス鎖のコピー数を求めることは困難と判断し、18S rRNA を内因性コントロールとした相対定量で評価することとした。RV-P の相対的 RNA 発現レベルを 1 としたとき、VP6(-)の RNA は RV-L では 62%の減少、RV-H では 86%の有意な減少がみられた。LP とウイルスを宿主細胞に同時に加えた際、感染 1 時間の時点において既に細胞内に侵入するウイルス量が減少することが示唆された。

HRV mRNA の定量〔実験 3〕吸着阻害評価：冷却処理で細胞の整理機能を止めた細胞を用

いて感染 1 時間後の宿主細胞へのウイルス吸着量を測定した。RV-P の相対的 RNA 発現レベルを 1 としたとき、VP6(-)の RNA は RV-L では 77%の減少、RV-H では 89%の有意な減少がみられた。LP は宿主細胞に吸着するウイルス量を減少させる可能性が示唆された。

従来の検証では、LP を細胞に 1 時間添加して十分に洗浄した後に、ウイルス接種を行っても HRV 感染を抑制することを観察している（プレトリートメント法）。合わせて、LP 添加 1 時間後の細胞内局在を共焦点顕微鏡で調べた際、LP は細胞の中に取り込まれて凝集することも観察している。これら従来の観察は、プレトリートメント法では LP はウイルスと接触するタイミングを持たないことを明示している。一方、今回の同時接種の検証から、細胞への侵入前（おそらく細胞表面）においても感染抑制機能を持つ可能性が示唆された。以上、同時接種法とプレトリートメント法の比較から、LP はウイルス接種のタイミングに応じて異なる阻害機構により HRV 感染を阻止していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 稲垣瑞穂、金丸義敬	4. 巻 92
2. 論文標題 乳成分を用いた受動免疫素材の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ビタミン	6. 最初と最後の頁 424-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20632/vso.92.9_424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chihiro Kobayashi , Mizuho Inagaki , Midori Nohara , Mayuko Fukuoka , Xijier , Tomio Yabe, Yoshihiro Kanamarua	4. 巻 88
2. 論文標題 The effects of denatured major bovine whey proteins on the digestive tract, assessed by Caco-2 cell differentiation and on viability of suckling mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Research	6. 最初と最後の頁 221-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0022029921000376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤江美、大野翔平、小林純子、山田佳太、中川智行、矢部富雄、中込とよ子、中込治、稲垣瑞穂
2. 発表標題 口ウイルス増殖抑制活性に対するラクトフォリン修飾シアル酸の役割
3. 学会等名 酪農科学会シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keita Yamada, Junko Nio-Kobayashi, Mizuho Inagaki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 699(585-595)
3. 書名 Lectin Purification and Analysis	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------