

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 9 月 24 日現在

機関番号：13701
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009年度～2011年度
 課題番号：21580325
 研究課題名（和文）ウシ初乳カッパカゼイ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）The molecular basis of bovine colostrum kappa casein for inhibitory mechanism against human rotavirus infection
 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（和文）：ヒトロタウイルス（HRV）は乳幼児下痢症の主因ウイルスである。本研究において、 κ -CN が持つ O 結合型糖鎖を切断することにより、HRV 感染阻害活性が失われることから、 κ -CN が示す HRV 感染阻害作用には、O 型糖鎖構造が不可欠であることが明らかにされた。質量分析の結果から、常乳と分娩後 6, 7 日目初乳（後期初乳）に含まれる κ -CN は、糖鎖構造が異なることが分かった。実験的に指摘された後期初乳の κ -CN の活性が常乳のものより若干高い可能性は糖鎖構造の違いに起因するのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Human rotavirus (HRV) is a major etiologic agent of severe infantile gastroenteritis. In this study, we investigated the inhibitory effect of bovine kappa casein (κ -CN) against HRV infection. κ -CN is the only casein characterized with O-linked glycans. Deglycosylated casein obtained by neuraminidase and O-glycosidase treatments did not exhibit the anti-HRV activity, suggesting that O-linked glycan structure in κ -CN is essential for its antiviral activity. From the analysis of MALDI-TOF MS, the composition of κ -CN glycan was different between mature milk and late colostrum obtained from normal cows at 6-7 day after parturition. Experimentally indicated slightly higher activity of κ -CN from the latter than that from the former could be ascribed to the difference in the attached carbohydrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：カッパカゼイン、ロタウイルス、牛乳、糖鎖、腸管感染症、食品

1. 研究開始当初の背景

乳幼児を中心にウイルス性胃腸炎を引

き起こすヒトロタウイルスは、下痢に伴う脱水が原因となり、発展途上国を中心に年間およそ 60 万人と見積られる子どもたちを死に追いやるとされている。2011 年、我が国でもロタウイルスワクチンが認可を受け、販売が始まった。しかしながら、ロタウイルスワクチンに限らず、ワクチン接種による免疫賦活は、免疫系が未熟な乳幼児に対して負担になることは言うまでもない。

我々はこれまでに、分娩後 6, 7 日目のウシ初乳（後期初乳）および常乳中のカッパカゼイン (κ -CN) がヒトロタウイルス感染阻害を示すことを見出した。ウシ κ -CN のヒトロタウイルス感染阻害についてはすでに米国からの特許が存在する (10-505828)。我々の結果もこの特許の内容を支持するが、この特許中には初乳 κ -CN についての抗ウイルス効果やその阻害メカニズムに対して言及がない。初乳 κ -CN には常乳成分とは異なる O-結合糖鎖の存在が報告されていることから (Guerin et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 351 (1974) 325-332)、強力なヒトロタウイルス感染阻害作用への初乳特有の O-結合糖鎖の関与が示唆される。

ところで、ヒトロタウイルスは、宿主細胞上の糖鎖（シアル酸）との接触を必要とすることなく感染が始まると言われているが、近年、ヒト株感染時のシアル酸要求性を提唱する論文が見受けられる。このようにロタウイルスと糖鎖の関わりは、未だに明確に定義されていない。

2. 研究の目的

本研究は、後期初乳および常乳のヒトロタウイルス感染阻害作用に着目し、その活性に直接関与する分子構造および阻害メカニズムの詳細を明らかにすること、また、下痢予防素材としての有効性を動物レベルで検証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) サンプルの分画方法

① 乳サンプル

常乳については、岐阜大学応用生物科学部附属フィールド科学教育研究センターのホルスタイン牛より得た。後期初乳については、分娩後 6, 7 日目の乳牛より採取し、脱脂処理・加熱殺菌を行い、膜による濃縮処理後に粉末状態にしたものを用いた。

② κ -CN 分画

常乳については、定法に従い調製した脱脂乳を、pH4.6 に調製することでカゼインを沈殿させた。後期初乳については、超純水に溶解後、常乳と同様な手法でカゼインを調製した。得られたカゼイン (crude CN) は、純水で透析した後、凍結乾燥した。crude CN に IgG 抗体の混入が認められたことから、

crude CN を proteinG カラム (GE healthcare) に供することで IgG の除去を行った (製品プロトコールに従って実施)。得られた proteinG 非吸着画分 (CN) を強陰イオン交換カラム monoQ (GE Healthcare) に供して、 κ -CN の分取を行った。結合バッファには、20 mM イミダゾール、3.3 M 尿素 (pH 8.0) を、溶出バッファには、結合バッファの組成に 0.8 M NaCl を加えたものを用いた。2-メルカプトエタノール存在下の結合バッファに溶解して 4°C で一晩静置した CN は、カラムに 0.5 ml 添加し、流速 1 ml/min で溶出した。得られた画分は、純水で透析し、凍結乾燥した。

③ κ -CN 由来の糖ペプチド分取

LA-PNA カラム (J-オイルミルズ) に、トリプシン消化した CN を供した。このカラムは、Gal β 1-3GalNAc を非還元末端に有する構造 (ムチン型糖鎖) に対して結合特異性を持つ。結合バッファには、50 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.3) を、溶出バッファには、結合バッファの組成に 50 mM D(+)-ガラクトースを加えたもの (pH 7.3) を用いた。試料 0.2 ml をカラムに供し、流速 0.4 ml/min で溶出した。得られた吸着画分は、限外ろ過により脱塩・透析し、凍結乾燥した。

(2) 糖鎖の切断

① Neuraminidase を用いた非還元末端シアル酸除去

50 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.5) に CN を溶解し、neuraminidase (vibrio cholera 由来、roche) を用いて切断した (酵素濃度 0.2U/mg, 37°C, 22 時間反応)。

② O-glycosidase を用いた O 結合型糖鎖除去
シアル酸除去 CN に対して、O 結合型糖鎖の切断を試みた。50 mM Tris-HCl (pH 6.5) に溶解し、O-glycosidase を加えて切断した (酵素濃度 2 mU/mg, 37°C, 24 時間反応)。限外ろ過を用いて脱塩を行い、超純水に置換した。

③ 糖鎖切断の確認

ドットブロット法を用い PVDF 膜に脱糖鎖処理を行った試料を固定化した。試料中の糖鎖の存在の有無は、レクチンの反応性を調べることで判断した。検出には、ビオチン標識 PNA, ABA, WGA および POD 標識ストレプトアビジンを用いた。

(3) ヒトロタウイルス感染試験

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 (実験方法の詳細は過去の投稿雑誌を参照)。長崎大学医学部 中込治教授 中込とよ子准教授 (MO 株, 3.4 x 10⁶ fcfu/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。

(4) O 結合型糖鎖構造の分析

CN について、AutoGlycoCutter を用いて O 結合型糖鎖を遊離させ 2AA 標識を行った後、Amide-80 カラム (東ソ) を接続した NP-HPLC および MALDI-TOF MS で分析した。

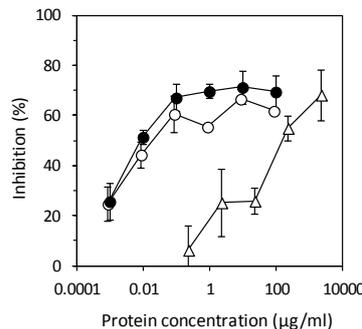
(5) エバネッセント波励起蛍光検出によるヒトロタウイルス-カゼインの相互作用解析

エポキシコートガラススライドに試料 (95°C、30 分間の加熱処理をした CN) をスポットし、室温湿潤下で一晩固定化した。過剰な試料を洗浄後、ブロッキングを行った。ブロッキング後に、活性化ウイルス (0.9 x 10⁶ fcfu/ml) を反応させた。試料とウイルスの結合は、HRV 過免疫初乳中から抽出した IgG 抗体および Cy3 標識抗ウシ IgG 抗体を用いて検出し、Bio-Rex scan 200 (rexxam) で計測した。

4. 研究成果

(1) κ-CN 含有フラクションの HRV 感染阻害試験

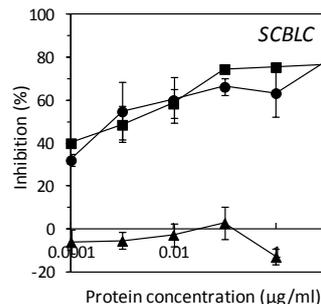
monoQ カラムを用いて分取したκ-CN 含有フラクションについて、中和活性試験法を用いて、抗 HRV 効果を調べた。結果を右図に示す。後期初乳由来κ-CN 含有画分 (右図●) および常乳由来κ-CN 含有画分 (右図○) は、1 μg/ml 濃度において、70% 程度の感染阻害活性を示した。ウシラクトフェリン (右図△) と比較して、いずれも 100 倍近く強い活性であった。またκ-CN 含有画分は、95°C、30 分間の加熱処理後も、50%以上の活性を保持していたことから (データ省略)、阻害活性の基盤構造として、糖鎖構造の関与が示唆された。



(2) 脱糖鎖処理による阻害活性への影響

(1)において、阻害活性への糖鎖の関与が示唆されたことから、CN の脱糖鎖処理を試みた。右図は、後期初乳 CN の脱糖鎖処理後の HRV 中和活性試験の結果を示している。

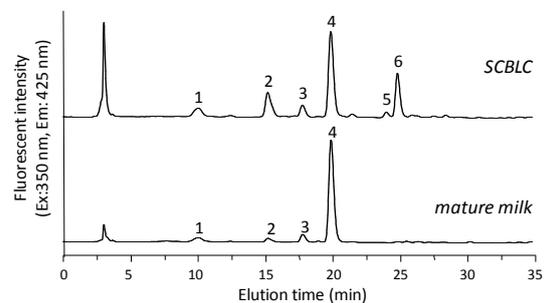
未消化 CN (右図●)



およびシアリダーゼ消化後の CN (右図■) では、同程度の阻害活性を示したことから、非還元末端のシアル酸は、感染阻害能に影響を与えないことが分かった。これに対し、O 型糖鎖を切断した CN (右図▲) では、阻害活性が消失したことから、κ-CN 中の O 結合型糖鎖が感染阻害活性に必須であることが明らかとなった。常乳に関する結果も同様な結果を得ている (データ省略)。(1)および(2)の実験結果から、後期初乳と常乳間の活性の差異が消失する可能性が指摘され、加熱に影響を受ける構造もまた活性に関与する可能性が示唆された。

(3) 後期初乳κ-CN および常乳κ-CN の O 結合型糖鎖の分析

後期初乳および常乳の CN から O 結合型糖鎖を分離し、糖鎖構造解析を行った。

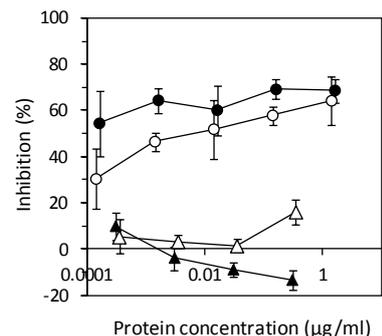


上図は、HPLC の溶出パターンを示している (上段:後期初乳、下段:常乳)。1-4 のピークは、後期初乳および常乳に共通して検出され、主要構造として core1 構造 (Gal β1-3 GalNAc) を持っていた。一方、5, 6 のピークは、後期初乳のみに検出され、主要構造として core2 構造 ((GlcNAcβ1-6)Galβ1-3GalNAc) を持っていた。

(4) κ-CN 糖ペプチド画分前処理による感染阻害への影響

κ-CN は、唯一の糖鎖を持つ CN である。そこで、CN をトリプシンで消化した後、Gal β1-3 GalNAc に特異的に結合する PNA レクチンカラムを使い、糖ペプチド画分の収集を試みた。得られた糖ペプチド画分を、ウイルス感染前に宿主細胞に添加・洗浄した後、ウイルスを感染させた。この状況でも感染阻害が成立するかを検討した。

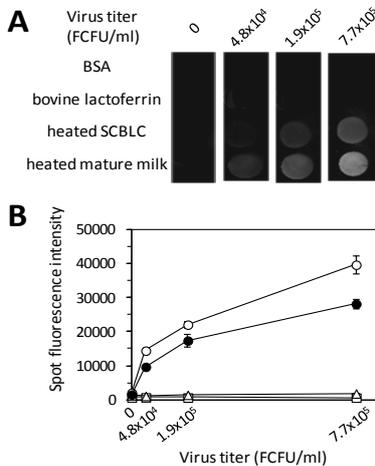
結果を右図に示す。通常の中和活性試験では、後期初乳糖ペプチド (右図●) および常乳糖ペプチド (右図○) では、阻害活性が認められたものの、ウイルス感染前の後期初乳糖ペプチド



ド接種 (右図▲) および常乳糖ペプチド接種 (右図△) では、活性が認められなかった。このことから、κ-CN は宿主細胞側と作用するのではなく、ウイルスと作用する可能性が示唆された。

(5) エバネッセント波励起検出法を用いたウイルスとカゼインの相互作用検出

95°C、30分間の加熱処理をしたCNをエポキシコートアレイに固定し、ウイルスとの結合をエバネッセント波励起によって検出した。その結果、BSA (図B, □) およびウシラクトフェリン (図B, △) ではスポットが検出されなかったが、加熱後期初乳CN (heated SCBLC: 図B, ●) および加熱常乳CN (heated mature milk: 図B, ○) では、ウイルス濃度依存的にスポット輝度が強くなった。このことから、加熱後期初乳CN および加熱常乳CN がウイルスと結合することが示された。



(6) まとめ

本研究において以下について明らかとなった。

- ① ウシκ-CN は、泌乳時期に関わらず、ヒトロタウイルス感染阻害活性を示す。
- ② ウシκ-CN のヒトロタウイルス感染阻害には、κ-CN 分子内の糖鎖構造が必須である。ただし、非還元末端のシアル酸は必要としない。
- ③ ウシκ-CN は、宿主細胞との相互作用ではなく、ウイルス側と相互作用することにより感染阻害を誘導する。
- ④ 後期初乳と常乳のκ-CN に見られる活性の若干の違いは、糖鎖構造の違いに起因する可能性が指摘された。
- ⑤ 加熱によって影響を受けるペプチド構造がκ-CN の抗ウイルス活性に何らかの意味を持つ可能性が示唆された。

なお、当初計画していた下痢予防素材としての有効性についての動物レベルの検証については、動物実験に要する量を確保することができなかったために研究期間内に実施できなかった。この点については現在も継続して検討中であることを付記する。

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)

① 稲垣瑞穂、金丸義敬

ロタウイルス下痢症に対する牛乳タンパク質の利用性

ミルクサイエンス, 60(1), 25-38(2011)

査読あり

〔学会発表〕 (計 6 件)

① 村西晴香、山本真弓、ツェーランジョマ、稲垣瑞穂、シジル、内田健志、川西貴、矢部富雄、金丸義敬

ヒトロタウイルス感染に及ぼすウシ後期初乳κ-カゼインの防御効果 (2012年3月23日、京都女子大学、京都)

② 村西晴香、山本真弓、ツェーランジョマ、稲垣瑞穂、シジル、内田健志、川西貴、矢部富雄、金丸義敬

ウシ後期初乳κ-カゼインのヒトロタウイルス感染阻害作用の解析、日本酪農科学シンポジウム (2011年9月22日、フォレスト仙台、仙台)

③ 村西晴香、山本真弓、ツェーランジョマ、稲垣瑞穂、シジル、内田健志、為定誠、矢部富雄、金丸義敬

ウシ後期初乳κ-カゼインのヒトロタウイルス感染阻害作用の解析、日本農芸化学会 (2011年3月27日、京都女子大学、京都)

④ 村西晴香、山本真弓、ツェーランジョマ、稲垣瑞穂、シジル、内田健志、矢部富雄、金丸義敬

牛乳カゼインによるヒトロタウイルス感染阻害作用の解析、日本酪農科学シンポジウム (2010年8月20日、共立女子大学、東京)

⑤ ツェーランジョマ、村西晴香、内田健志、斎藤正一郎、矢部富雄、金丸義敬

マウスに腸組織損傷に及ぼすウシの後期初乳の影響、日本農芸化学会 (2010年3月29日、東京大学駒場Iキャンパス、東京)

⑥ 金丸義敬

ヒトロタウイルス感染の予防と症状軽減化に有効な牛乳タンパク質、日本畜産学会主催シンポジウム ルミナントバイオロジーの新展開 (2010年3月27日、明治大学駿河台キャンパス、東京)

〔図書〕 (計 0 件)

〔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◇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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：