

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780124

研究課題名(和文) ウイルスへの直接結合によらない牛乳ラクトフォリンの示す感染阻害メカニズムの解明

研究課題名(英文) The study of inhibitory mechanism of bovine milk lactophorin, which is independent of the binding to virion

研究代表者

稲垣 瑞穂 (INAGAKI, Mizuho)

岐阜大学・(連合)農学研究科(研究院)・学術研究補佐員

研究者番号：50626356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000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。これまでの研究から、牛乳に含まれるロタウイルス感染阻害成分としてラクトフォリン(lactophorin, LP)を見いだした。本研究より、LPは、ウイルスとの接触する機会をもたなくとも、宿主細胞に対して何らかの相互作用をおよぼし、ロタウイルス構成タンパク質の合成およびアセンブリを阻害していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Human rotavirus (HRV) is a major etiologic agent of severe infantile gastroenteritis. In our previous study, we have found that bovine milk lactophorin (LP) exhibited inhibitory activity against HRV infection. In this study, we demonstrated that LP inhibits the synthesis and assembly of viral protein without contact between LP and virion. It indicated that LP has a unique inhibition mechanism against HRV infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：ラクトフォリン ヒトロタウイルス 感染症 糖鎖 牛乳

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトロタウイルス (HRV) は乳幼児を中心にウイルス性下痢症を引き起こす病原体である。日本における被害は、死者こそ稀なもの、直接医療費は年間 220 億円と推定される。その予防対策として 2 種類のロタウイルスワクチン (任意接種) が認可を受けている。しかし、その接種時期は 6-12 週齢の乳児に限定されたものであり、ポリオなどの複数の定期接種と日程が重複することから、乳児の免疫系に負荷をかけている。またロタウイルスの複製のメカニズムの詳細が未解明なこともあり、治療法も確立されていない。

我々はこれまでに、子どもにとって最も身近な食材である牛乳を使った疾病予防を提案してきた。その中で、牛乳乳清に含まれるラクトフォリン (Lactophorin, LP) が HRV の増殖を強力に抑制することを見いだした (Inagaki et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010)。この LP の感染阻害様式は、LP とウイルスの直接的な結合によるものではなく、LP が宿主細胞に何らかの影響を与えることにより感染阻害を導く可能性が指摘されていた。

## 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 感染防御成分として実用化することが最終目標である。本研究では、宿主細胞内でのウイルスタンパク質の合成および転写に与える影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 乳タンパク質の分画

#### ①プロテオームペプトンの調製

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。

#### ②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 (プロテオームペプトン) 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 LP は二次元電気泳動により精製できているこ

とを確認した。

### (2) 顕微鏡観察による 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。LP は、様々な濃度に希釈し、後述の①、②、③のようなタイミングで添加した：①LP を HRV 感染前に 1 時間添加した場合 (pre-treatment)、②LP と HRV を同時に添加した場合 (co-inoculation)、③HRV 感染 1 時間後に LP を添加した場合 (post-infection) の 3 パターンについて試験した。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対照とし、LP の HRV 感染防御能は、対照群の HRV 感染を 50%阻害する濃度である最小阻害濃度 (MIC) で表す。

### (3) <sup>35</sup>S-methionine/cysteine (Met/Cys) を用いた HRV 感染細胞におけるタンパク質合成の経時的追跡

96-well プレートで単層培養が完成した MA104 細胞に LP18 を 1 時間添加した後によく洗浄し、HRV MO 株 (G3P[8], m.o.i=6) を 1 時間接種した。維持培地に置き換えて所定の時間 (1, 4, 7 時間) まで培養した後、<sup>35</sup>S-Met/Cys を添加し、30 分間ラベルをおこなった。ラベル後、細胞を回収して SDS-PAGE に供し、オートラジオグラフィーを BAS-2500 (富士フイルム) によって取得した。

### (4) ロタウイルス非構造タンパク質 NSP4 の定量

96 ウェルで培養したコンフルエントの MA104 細胞に対してヒトロタウイルス (m.o.i=6) を 1 時間接種し、その後、接種物を取り除いて維持培地に置換し、培養を継続した。接種物除去から 7 時間後、細胞から RNA を回収し精製した。精製 RNA を用いてストランド特異的逆転写 (iScript select cDNA synthesis kit (bio-rad)) を行うことで鎖特異的 cDNA を作成し、定量 PCR StepOnePlus (アプライドバイオサイエンス) を実施した。

LP をウイルス感染前に 1 時間添加した場合 (pre-treatment)、ウイルス感染と同時に添加した場合 (co-inoculation)、LP18 未添加ウイルス感染 (HRV)、LP18 未添加ウイルス非感染 (non-infection) の計 4 パターンを調製し、毒素タンパク質をコードする NSP4(+) および NSP4(-) の定量を試みた。作成した cDNA は、THUNDERBIRD qPCR mix (東洋紡) および StepOnePlus (アプライドバイオサイエンス) を用いて定量した (18S rRNA を内部標準として測定して補正した)。プライマーは以下を設計して用いた。NSP4 fw : 5' GAGAGGTTGAGTTACCGTTGT 3', NSP4 rv : 5' TTCAGAAGC GGCGGA ACTCTTCA 3',

NSP4 probe: 5'(FAM)CTGTGGC(ZEN)TTCTCAGTCAATCA(IBFQ) 3', 18S rRNA fw: 5'CTGAGAAACGGCTACACATC 3', 18S rv: 5'GCCTCGAAAGAGTCTGTATTG 3', 18S probe: 5'(FAM)AAATTACCC(ZEN)ACTCCCGACCCG (IBFQ) 3'

(5)免疫染色法を用いたLPの細胞局在  
ガラスウェル上に培養したコンフルエントのMA104細胞に対してLPを添加し、37°Cもしくは4°Cで1時間培養を続けた(4°Cの試験では、コンフルエントMA104細胞を、試験直前に、4°Cで30分程度冷して用いた。)いずれも、1時間培養後に接種物を除去および洗浄し、4% PFAで固定した後に、冷メタノールで透過処理(2 min)を行った。LPはZenon標識した1C10抗体を用いて検出した。F-actinおよび核はphalloidinとDAPIで検出し、共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss, LSM710)で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 申請当初の研究計画の結果

LPはpIの異なる複数の分子種で構成されることから、申請当初、LPを分子種ごとに回収する方法を確立して、分子種ごとのHRV感染阻害活性の評価および修飾糖鎖のプロファイリングを行う計画だった。

クロマトグラフィー手法を用いた分子種の単離は、牛乳から精製されるLPの量が非常に微量であるため(現在の分画方法では、1 mg/牛乳 1L)、カラムの選択を含め、様々な分離条件での検討ができなかった。

代案として、二次元電気泳動によりLPをゲル上でpIごとに分離し、それぞれのLP該当スポットからタンパク質を溶出させる方法を行った。しかしながら、一次元電気泳動による条件検討の段階で、SDS-PAGEおよびnative-PAGE分離後のゲルから活性を保持したかたちでLPを抽出できないことがわかった。

分子種ごとに活性をプロファイリングすることは一時中断して、後述の検討項目を新たに加えて実施した。

##### (2) ウイルス感染に対しLPの投与のタイミングに応じて誘導される抗ウイルス効果の検討

ウイルス感染に対してLPの投与するタイミングを検討することで、LPのロタウイルス感染阻害機構の特徴付けを行うことを目的とし、顕微鏡観察によるHRV感染阻害評価法(VP6の検出)を用いて検討を行った。

その結果、LPをHRV感染前に1時間添加した場合(pre-treatment)およびHRVと同時に接種した場合(co-inoculation)では、濃度依存的な感染阻害活性を示した(それぞれのMICは、9.9 µg/ml、2.3 µg/mlであった)。一方で、HRV感染後にLPを1時間添加した場合(post-infection)では、感染阻害活性が認められなかった。

この結果から、LPを事前に添加することにより、LPとウイルスが直接接触する機会がないにも関わらず、VP6の合成を抑制することが明らかとなった。

##### (3) <sup>35</sup>S-methionine/cysteine (Met/Cys)を用いたHRV感染細胞におけるタンパク質合成の経時的追跡

LPがVP6以外の10種のウイルスタンパク質の合成にどのような影響を与えているのかを調べるために、ウイルス感染8時間後に細胞の中で作られているタンパク質を<sup>35</sup>Sメチオニンでラベル化し、その細胞溶解液をSDS-PAGEに供することで、ウイルス感染8時間後に細胞内で合成されているタンパク質を検出した。

LPの事前接種の有無で比較したところ、LPの事前投与により細胞内で合成される11種のウイルスタンパク質の量が全体的に減少していた。これらの結果から、ウイルス感染前にLPを細胞に添加することでほぼすべてのウイルスタンパク質の合成を抑制していることが分かった。

##### (4) ロタウイルス非構造タンパク質NSP4の定量

転写に対するLPの影響を調べるため、18S rRNAを内部標準として毒素タンパク質をコードするNSP4についてストランド(+/-)別に定量することを試みた。

18S rRNAは、サンプル間で大きな差が見られなかった。18S rRNAを内部標準として補正したところ、NSP4+でpre-treatmentは17%、co-inoculationは2%の抑制が見られた。NSP4-においてもpre-treatmentで15%、co-inoculationで2%まで抑制されていた。

従って、LPは、NSP4遺伝子の増幅(viral mRNAからNSP4+へのtranslationおよびNSP4+からNSP4-へのreplication)を劇的に抑制することが分かった。

##### (5) 免疫染色法を用いたLPの細胞局在

LPが細胞に与える影響に対する見当をつけるため、宿主細胞でのLPの視覚化を試みた。4°Cもしくは37°Cにおいて、LPをMA104細胞に1時間添加した後に固定し、LP抗体を用いた免疫染色を行い共焦点顕微鏡で観察した。

4°Cでは細胞一様に認められ、37°Cでは核周辺に凝集して観察された。ふたつの温度条件下では観察される陽性反応が異なっていたことから、LPは細胞内に取り込まれる可能性が示唆された。

##### (6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究の結果から、LPのHRV感染阻害メカニズムは、抗体などに代表されるウイルスに対する直接的な不活化(中和)とは異なり、必ずしもウイルスと遭遇する必要がなく感

染阻害を導く機能を持つことが明らかとなった。その阻害は、感染細胞内でのウイルス構成タンパク質の合成を大幅に抑制するものであった。今後、LP がウイルス複製のどのステップを阻止しているかを解明することにより、本研究結果が創薬・治療薬へと応用されることが期待される。

また本研究で明白となった「ミルクタンパク質 (LP) が宿主細胞側へ作用し、抗ウイルス効果を付与する」ことは、ミルクが未知の生体防御機能を秘めた潜在的能力の高い食品素材であることを改めて指摘する。

#### (7) 今後の展望

今後は、LP の細胞内局在に関する詳細な解析、ウイルス複製前期 (ウイルスの宿主細胞への接着、侵入、脱殻および全ウイルスゲノムの転写) に与える影響について検討する必要がある。

#### 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 Inagaki, M., Muranishi, H., Yamada, K., kakehi, K., Uchida, K., Suzuki, T., Yabe, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O., and Kanamaru Y., Bovine k-casein inhibits human rotavirus (HRV) infection via direct binding of glycans to HRV. *J. Dairy Sci.*, 査読有 97(5) pp. 2653-2661, 2014  
DOI: 10.3168/jds.2013-7792

[学会発表] (計 10 件)

- ① 稲垣瑞穂、大野翔平、小林純子、高橋毅、杉山誠、金丸義敬、中込とよ子、中込治、鈴木徹、牛乳ラクトフォリンによるロタウイルス非構造タンパク質 NSP4 遺伝子の転写抑制、第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (2013、神戸)
- ② Mizuho Inagaki, Yoshitaka Nakamura, Takeshi Takahashi, Tomio Yabe, Tohru Suzuki, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, and Yoshihiro Kanamaru, The utilization of concentrated sweet whey against human intestinal gastroenteritis, IDF World Dairy Summit 2013 (2013, Yokohama)
- ③ 大野翔平、稲垣瑞穂、山田佳太、矢部富雄、鈴木徹、高橋毅、杉山誠、中込とよ子、中込治、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作用 (続報)、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)
- ④ Mizuho Inagaki, Shohei Ohno, Keita Yamada, Takeshi Takahashi, Tsukasa Matsuda, Tomio Yabe, Tohru Suzuki, Makoto Sugiyama, Toyoko Nakagomi,

Osamu Nakagomi, and Yoshihiro Kanamaru, The inhibitory mechanism of bovine lactophorin against human rotavirus gastroenteritis, World Congress of Microbes 2012, (2012, Guangzhou, China)

[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 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・大学院連合農学研究科・学術研究補佐員  
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：