

氏 名 (本国籍)	稲垣 瑞穂 (愛知県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 金丸 義敬
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博甲第544号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	牛乳タンパク質のヒトロタウイルス感染阻害作用の 生化学的解析とその利用性
審査委員会	主査 岐阜大学 准教授 矢部 富雄 副査 岐阜大学 教授 金丸 義敬 副査 岐阜大学 教授 長岡 利 副査 信州大学 教授 大谷 元 副査 静岡大学 教授 森 誠

論 文 の 内 容 の 要 旨

ロタウイルス胃腸炎は、乳幼児のほとんどが経験する疾病であり、世界中で年間 60 万人近い死者が出ている。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。本研究は、乳幼児に最も身近な食材である牛乳を素材としたヒトロタウイルス (HRV) 感染を予防するための代替手段の確立を目的として行われた。

1. 抗体成分を利用したウシ後期初乳の HRV 感染阻害作用と動物モデルにおける感染予防効果の検討

抗体を多量に含むウシの初乳は HRV 感染予防素材となる可能性を秘めているが、我が国では分娩後 5 日間の初乳の出荷は禁止されている。そこで国内に食品として流通可能である分娩後 6, 7 日目の牛乳 (後期初乳) を用い、脱脂、濃縮処理した後期初乳について HRV 感染阻害活性を *in vitro* で検討した。その結果、HRV 阻害活性が報告されているウシラクトフェリンと比較して、後期初乳は約 100 倍強い阻害活性 (MIC 2.1 $\mu\text{g/mL}$) を持つことを明らかにした。さらに、HRV 接種の 1 時間前に後期初乳タンパク質 2.5 mg を単回投与することにより、乳飲みマウスの下痢の発症を予防できることを示した。以上から、

食品として利用可能な通常の飼育下にある乳牛の後期初乳の HRV 胃腸炎予防食材としての可能性を明らかにした。

2. 抗体以外の牛乳成分の HRV 感染阻害作用と動物モデルにおける感染予防効果の検討

後期初乳は量的に限定される。そこで、常乳から調製される高分子量タンパク質複合体（ミルクムチン複合体，F1）が HRV 感染に対して強力な阻害活性を示すという既報に基づいて、この F1 に含まれる感染阻害成分の単離・同定を行なった。加熱処理（95°C，30 分間）した F1 を硫酸分画し、二次元電気泳動で分離した成分の感染阻害活性とアミノ酸シーケンス分析から、16 kDa ラクトフォリン（LP16）が HRV 感染を強力に阻害することを明らかにした（MIC < 0.1 µg/mL）。同様に、F1 に含まれる HRV 阻害成分として PAS6/7 も明らかにした（MIC 3.9 µg/mL）。さらに、LP16 および PAS6/7 を含む F1 について、HRV 接種の 1 時間前に 2.5 mg を単回投与することにより、ロタウイルス性胃腸炎の発症から乳飲みマウスを予防するという結果を得た。この結果は、一般的な予防成分として知られる抗体以外にも、LP フラグメントや PAS6/7 という非免疫グロブリン成分を用いた感染防御の可能性を示すものであった。これらの結果を発展させて、チーズを製造する際に大量に廃棄されているホエイ（チーズ製造時副産物）の有効活用の一例として HRV 阻害活性の検証を行った。その結果、ラクトフォリン及び PAS6/7 を含むチーズ製造時副産物が HRV 感染阻害に有効であることを *in vivo* 及び *in vitro* で確認し、チーズ製造時副産物が乳幼児のヒトロタウイルス胃腸炎の予防に有効である可能性を明白に示した。

3. HRV 感染阻害メカニズムの生化学的解析

強力な活性を示したラクトフォリン（LP）の基盤構造を明らかにするために、牛乳を加熱処理して得られるプロテオースペプトンから LP の回収及びその活性評価を試みた。その結果、等電点の異なる少なくとも四つ以上のスポットで構成される 18 kDa ラクトフォリン（LP18）を二次元電気泳動によって検出した。各スポットのロタウイルス感染阻害活性を調べ、スポットごとの阻害活性が異なることを明らかにし、阻害活性への修飾糖鎖の関与の可能性を示唆した。

LP18 の翻訳後修飾として N 型糖鎖（77 位）と O 型糖鎖（86 位）が既に報告されていることから、MALDI-QIT-TOF MS (AXIMA Resonance) を用いた MSⁿ 解析による N 型糖鎖構造分析から、LacdiNAc (GalNAc-GlcNAc) 構造を持つ 2, 3, 4 本鎖の N 型糖鎖多型を明らかにした。PNGase F を用いた N 型糖鎖切断が阻害活性に与える影響について検討したが、結論を得るには至らなかった。また、LacdiNAc について中和活性試験を行ったが、顕著な阻害活性を認めなかった。

以上をまとめると、本研究は、牛乳中の HRV 感染阻害活性を示す成分として、ウシ後期初乳中に含まれる抗体と常乳中に含まれる非抗体成分としての LP フラグメント及び PAS6/7 を明らかにし、ヒトロタウイルス胃腸炎の予防食品素材としての後期初乳やチーズ製造時副産物の実用化の可能性を示した。

審 査 結 果 の 要 旨

ロタウイルス胃腸炎は乳幼児のほとんどが経験する疾病であり、これにより世界中で年間 60 万人近い死者が出るとされている。2006 年に開発された 2 種類のロタウイルスワクチンは現在 100 カ国以上で認可され、その有効性の検証が行われつつある。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るが、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が重要視されている。そこで、当該学位申請者の稲垣瑞穂は、乳幼児にとり最も身近な食材の一つである牛乳を素材として取り上げ、ワクチンに代わるヒトロタウイルス (HRV) 感染予防手段の確立を目的として研究を行った。

最初の実験では、ウシ後期初乳の抗体成分を利用した HRV 感染阻害作用と動物モデルにおける感染予防効果の検討を行った。素材はわが国で食品として流通可能である分娩後 6、7 日目の牛乳 (後期初乳) であった。その結果、これまでに HRV 感染阻害活性が報告されているウシラクトフェリン (MIC 228 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較して約 100 倍強い阻害活性をもつことを明らかにした (MIC 2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。さらに、HRV 感染前に後期初乳タンパク質 2.5 mg を単回投与することにより、乳飲みマウスの下痢の発症を予防できることを示した。この結果から、食品として利用可能な通常の飼育下にある乳牛の後期初乳の HRV 胃腸炎予防食材としての可能性を指摘した。

2 番目の実験では、抗体以外の牛乳成分の HRV 感染阻害作用と動物モデルにおける感染予防効果を検討した。牛乳乳清から調製される高分子量タンパク質複合体 (ミルクムチン複合体、F1) が HRV 感染に対して強力な阻害活性を示すことから (MIC 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、この F1 に含まれる感染阻害成分の単離・同定を行った。その結果、加熱耐性の牛乳タンパク質であるラクトフォリン (LP16) が HRV 感染を強力に阻害することを明らかにした (MIC <0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。また、F1 に含まれる HRV 阻害成分としてさらに PAS6/7 も明らかにした (MIC 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。この LP16 および PAS6/7 を含む F1 について、ウイルス接種の 1 時間前に 2.5 mg を単回投与することにより、乳のみマウスにおけるロタウイルス性胃腸炎の発症を予防可能であるという結果を得た。さらに実用化の可能性についても検討し、有効成分を含むチーズ製造時副産物の HRV 阻害活性の検証を行った。その結果、チーズ製造時副産物が HRV 感染阻害に有効であることを *in vivo* 及び *in vitro* で確認した。

最後に、ラクトフォリン (LP) の HRV 感染阻害メカニズムを生化学的に解析した。強い活性を示した LP が本来は牛乳乳清の加熱耐性タンパク質を含むプロテオースペプトン (PP) 画分に含まれることを示し、PP からの LP の回収及びその活性評価を試みた。その結果、二次元電気泳動において、HRV 感染阻害活性に差異のある、等電点の異なる少なくとも四つ以上のスポットで構成される 18 kDa のラクトフォリン (LP18) を検出し、阻害活性への修飾糖鎖の関与が示唆された。そこで N 型糖鎖構造について MALDI-QIT-TOF MS (AXIMA Resonance) を用いた MSⁿ 解析を行った。その結果、2, 3, 4 本鎖の N 型糖鎖多型を有すること、LacdiNAc (GalNAc-GlcNAc) 構造を持つことを明らかにした。さらに PNGase F を用いた N 型糖鎖切断が阻害活性に与える影響について検討したが、明確な結論を得るには至らなかった。また、LacdiNAc についても中和活性試験を行ったが、顕著な阻害活性は認めなかった。

以上、本研究は、明確な作用メカニズムの解明には至らなかったものの、ヒトロタウイルス感染の予防に有用な複数の牛乳成分を同定し、また、それらを含む牛乳由来素材の有用性を動物実験によって示しており、審査委員会は全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

以上の結果の一部は、1) Mizuho INAGAKI, Mayumi YAMAMOTO, Xijier, CairangZhuoMa, Kenji UCHIDA, Hiroshi YAMAGUCHI, Mihoko KAWASAKI, Kousaku YAMASHITA, Tomio YABE, Yoshihiro KANAMARU: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation of the Efficacy of Bovine Colostrum Against Human Rotavirus Infection, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010 (in press)、2) Mizuho INAGAKI, Shuuichi NAKAYA, Daisuke NOHARA, Tomio YABE, Yoshihiro KANAMARU, Tohru SUZUKI: The Multiplicity of N-glycan Structures of Bovine Milk 18 kDa Lactophorin (Milk GlyCAM-1), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010 (in press)にまとめられ、学位論文の基礎となる公表論文となっている。