

ロタウイルス増殖抑制活性を示す牛乳ラクトフォリンの 分子構造に関する研究

岐阜大学大学院連合農学研究科・博士研究員 稲垣 瑞穂

■ 目的

ロタウイルス下痢症は、世界中に蔓延する乳児罹患率ほぼ 100%の疾病である。その対策としてロタウイルスワクチンが導入されつつあるが、他のワクチンの接種時期と重なることもあり、ワクチンに頼るのではなく乳児の免疫系を支える食品成分の探索も重視されている。牛乳乳清糖タンパク質 18 kDa ラクトフォリン(LP)は、他の乳清由来タンパク質と比較しても非常に強いロタウイルス増殖抑制活性を示す。しかしながらその活性メカニズムの詳細は不明である。LPには、2カ所のO結合型糖鎖と1カ所のN結合型糖鎖が修飾されている。本研究では、LPの示すウイルス増殖抑制活性の基盤となる分子構造を特定することを目的とした。

■ 方法

① LPのアミノ酸高次構造が活性に与える影響を調べるため、protease Kによりタンパク質構造を破壊してproKを調製した。LPとproKについて活性を評価した。② LPに修飾されたN型糖鎖構造が活性に与える影響を調べるため、N-glycosidase F(EC 3.5.1.52)を用いてLPに修飾されたN型糖鎖を酵素的に切断した(Ngly)。このNglyをサイズ排除クロマトグラフィー(Sephadex G-25)に供することで、遊離したN型糖鎖(N-glycan)とO型糖鎖をもつLP(O-LP)のフラクションを分取した。

糖の定量にはオルシノール硫酸法、タンパク質の定量にはブラッドフォード法もしくはBCA法を用いた。抗ロタウイルス活性の測定には、サル腎臓細胞MA104にヒトロタウイルスMO株を接種して感染させる実験系を用いた。様々な濃度に段階希釈したLP派生サンプルとヒトロタウイルスMO株(G3P[8], m.o.i=0.01)を同時に添加した。感染から16時間後に固定し間接蛍光抗体法により感染細胞を検出した。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感染を50%阻害する被験物質の濃度を最小阻害濃度(MIC)で示した。

■ 結果および考察

① LPのアミノ酸構造を破壊したproKについて活性を評価したところ、酵素消化後も活性が保持されていた。しかしながら、proKについては、サンプルを希釈するとともに顕著な活性の低下が見られた(MIC;LP 43 μ g/ml, proK 63 μ g/ml)。

② Ngly(O-LPとN-glycanの混合物)、O-LP、N-glycanについて活性を評価したところ、Nglyについては、LPと比較して活性が低下していた。O-LPについてはLPとほぼ同等の活性が認められた。一方で、N-glycanについては感染阻害が見られなかった。(MIC;Ngly 157 μ g/ml, O-LP 18 μ g/ml, N-glycan not-detected)。

これらの結果より、N型糖鎖は活性への関与は低く、O型糖鎖が鍵となる分子構造であると考えられた。アミノ酸高次構造については必ずしも必要がないが、低濃度でも活性を示すためにはアミノ酸構造が必要であると考えられた。

■ 結語

LPのウイルス増殖抑制活性の基盤となる分子構造はO型糖鎖構である可能性が示された。本結果から、LPを経口で摂取した場合、その糖鎖構造が保持されたまま新生児の腸まで運ばれると推測される。今後は、糖鎖による宿主細胞へのウイルス抵抗性獲得の作用機序について更なる研究を継続していく。