

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02733

研究課題名（和文）食品由来の強力な自然免疫活性化能を示す新規物質の作用機序解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel substances from food materials showing strong abilities of innate immunity stimulation

研究代表者

関水 和久（Sekimizu, Kazuhisa）

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：90126095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：カイコに乳酸菌*W. hellenica*の培養上清を注射するとカイコは緑膿菌に対して感染抵抗性となった。マウスに対しても効果が認められた。感染抵抗性獲得には、注射後6時間以上の時間が必要であることから、免疫系を活性化することによる。我々はこの物質をワイセリカイコシン（WK）と名付け、培養上清から精製を試み、HPLCで単一のピークを示す画分を得た。さらに、NMRおよびESI-MS/MS解析により化合物の構造を決定した。その結果、WKは新規のペプチドグリカン類似化合物であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の研究により、自然免疫が感染防御に重要な役割を演じていることが判明している。しかしながら、自然免疫を活性化することにより感染防御を果たす食品成分の例は極めて限られている。本研究において我々は、乳酸菌*W. hellenica*の培養上清に見出した緑膿菌感染防御効果を示す成分を精製し、その構造を決定することに成功した。この物質は健康食品や医薬品としての応用が期待される。また、本研究の成果を基に、自然免疫の活性化による感染防御に働く食品中の物質について、今後他の例が明らかにされてゆくと期待される。また本研究は、実験動物としてのカイコの有用性を明らかにした点においても評価されるべきものである。

研究成果の概要（英文）：When silkworms were injected with the culture supernatant of the lactic acid bacterium *W. hellenica*, the silkworms became resistant to *Pseudomonas aeruginosa*. Effects were also observed on mice. Acquisition of infection resistance requires 6 hours or more after injection, so it depends on activating the immune system. We named this substance Weisseri kaikosin (WK), attempted to purify it from the culture supernatant, and obtained a fraction that showed a single peak on HPLC. Furthermore, the structure of the compound was determined by NMR and ESI-MS/MS analysis. As a result, WK was found to be a novel peptidoglycan-like compound.

研究分野：微生物学、生物系薬学

キーワード：カイコ 自然免疫 食品 乳酸菌 自然免疫 新規天然物 ペプチドグリカン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日の免疫学では、免疫システムは獲得免疫と自然免疫に大別され、いずれも感染防御に貢献すると考えられている。獲得免疫を刺激すれば、動物に個体レベルでの感染抵抗性を付与できることが知られている。病原体成分を接種するワクチンがその実用例である。一方で、自然免疫を増強すれば動物に個体レベルでの感染抵抗性を付与できる、という考えには、仮に強く反対でなくとも、科学的根拠を挙げて賛同できる人は多くない。実際、自然免疫を標的とした感染制御の方法論は確立されていないし、「自然免疫を高める」ことを謳った健康食品などに対して、たいいていの専門家は懐疑的である。

2. 研究の目的

自然免疫の増強を機序とする感染制御が可能かという疑問を検証するために、獲得免疫を欠落したモデル動物、すなわち無脊椎動物モデルの利用が有用である。近年の分子生物学的方法論の発展は、そのような多様な生物種における分子レベルでの研究を容易にした。ショウジョウバエ、マルハナバチ、ミールワーム、ミジンコ、そして私たちが研究しているカイコ(それらはいずれも自然免疫しか持たない)において、病原体成分の接種によって後天的に個体レベルでの感染抵抗性が向上する例が報告されている。しかしながら、そうした現象論を越えて、自然免疫の増強によって個体レベルでの感染抵抗性がもたらされるか(特にヒトに病原性を示す様な病原体に関して)について、分子レベルでの理解はほとんど達成されていない。本研究の目的は、食品由来の乳酸菌が産生する自然免疫活性化因子を生成し、それが個体レベルの明瞭な感染抵抗性を導くこと明らかにすることである。

3. 研究の方法

W. hellenica 属のなかでもカイコ緑膿菌感染死の抑制活性が最も高い *W. hellenica* 0916-4-2 株の培養上清から、カイコの緑膿菌感染死に対する抑制活性を指標に精製を試みた。まず培養上清にエタノールを終濃度 67% となるように加えて遠心し上清を得た。これを蒸発乾固させて水に溶解してメタノールを終濃度 95% となるように加えて遠心し上清を得た。この画分に対して逆相カラムクロマトグラフィー、Biogel P-6 によるゲル濾過を実施し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行って精製を進めた。最終的に、ODS カラムを用いた HPLC により分画した。HPLC でシングルピークを示した標品について、さらに、NMR および ESI-MS/MS 解析により化合物の構造を決定した。

4. 研究成果

1. カイコを用いた緑膿菌感染症モデルにおいて、発酵食品素材に用いられている微生物 (*Lactobacillus spp. and Weissella hellenica*) に、immune priming 活性(前投与によってカイコに感染抵抗性を付与する生理活性)が見出された。

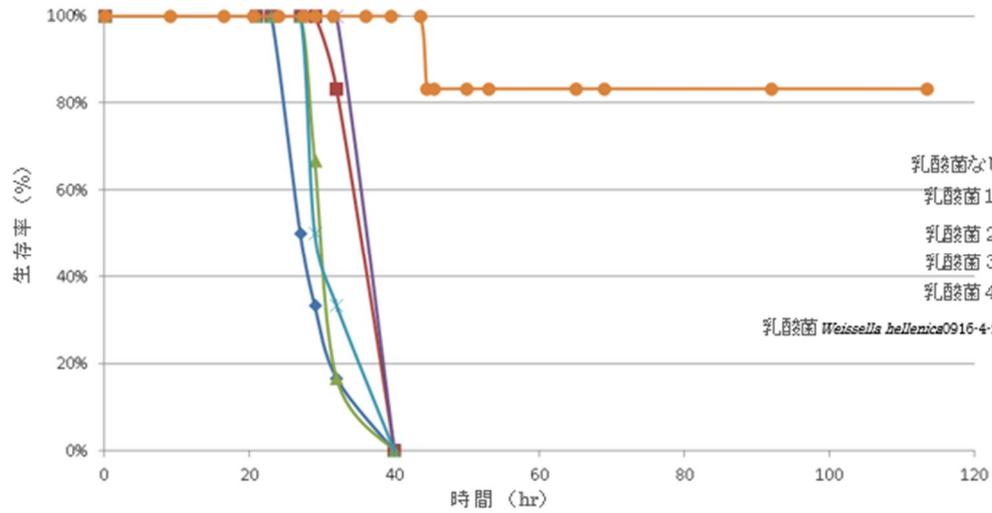


図1 緑膿菌感染カイコにおける乳酸菌 *Weissella hellenica* 0916-4-2 摂取の効果

2. 乳酸菌 *W. hellenica* 培養上清の上記生理活性は特に顕著で、経口でカイコおよびマウスに対して緑膿菌感染抵抗性を与える活性 (immune priming 活性) を示した。

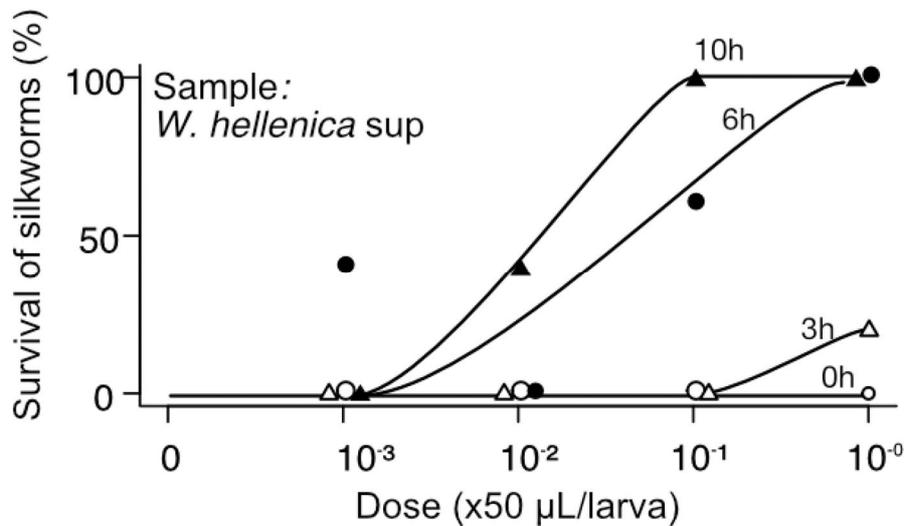


図2 *Weissella hellenica* 培養上清のカイコの緑膿菌感染死抑制に対する前投与の必要性

3. 上記の *W. hellenica* 由来の物質を精製したところ、四糖体ペプチドグリカン様化合物群 (Weissellikaikocin, WK) およびその類縁化合物と命名) が活性物質として同定され、その化学合成品に immune priming 活性が認められた。

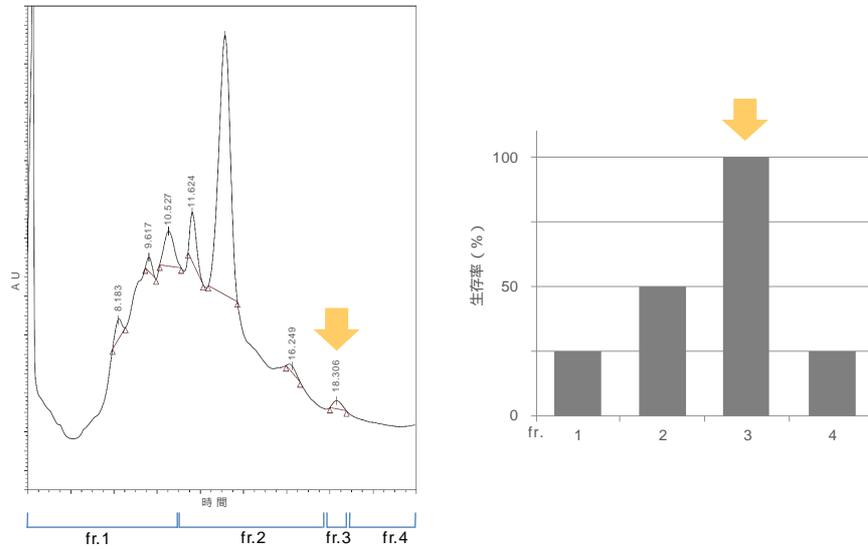


図3 最終画分の HPLC 分析結果

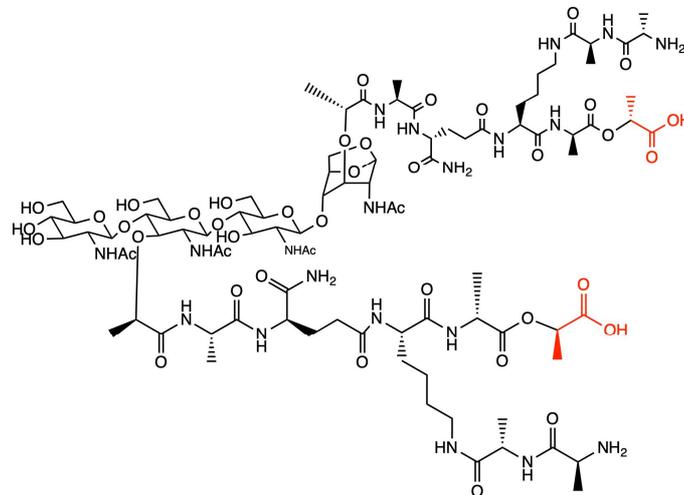


図4 ワイセリカイコシンの構造決定

4. *W. hellenica* 由来に対するカイコ脂肪体（免疫担当組織）の遺伝子発現変動を RNAseq 法により解析したところ、WK に応答して発現上昇する 16 の遺伝子が同定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Atsushi Miyashita, Keiko Kataoka, Toshio Tsuchida, Akihiko A. Ogasawara, Hiroto Nakajima, Megumu Takahashi, Kazuhisa Sekimizu Frontiers in Food Science and Technology 25 Jan 2023	4. 巻 3
2. 論文標題 High molecular weight glucose homopolymer of broccoli (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>) stimulates both invertebrate and mammalian immune systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/frfst.2023.1012121	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Hamamoto, Atsushi Miyashita, Koushiro Kamura, Ryo Horie, Kazuhisa Sekimizu	4. 巻 16
2. 論文標題 Sikworm arylsulfatase in the midgut content is expressed in the silk gland and fed via smearing the from the spinneret	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Discoveries&Therapeutics	6. 最初と最後の頁 280-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01088	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Geberemichal Geberetsadik, Akane Inaizumi, Akihito Nishiyama, Takehiro Yamaguchi, Hiroshi Hamamoto, Suresh Panthee, Aki Tamaru, Manabu Hayatsu, Yusuke Mizutani, Shaban Amina Kaboso, Mariko Hakamata, Aleksandr Ilinov, Yuriko Ozeki, Yoshitaka Tateishi, Kazuhisa Sekimizu, Sohkiichi Matsumoto	4. 巻 66
2. 論文標題 Lysocin E Targeting Menaquinone in the Membrane of Mycobacterium tuberculosis Is a Promising Lead Compound for Antituberculosis Drugs.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antimicrobial agents and chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e0017122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/aac.00171-22	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Miyashita, Shuhei Mitsutomi, Tohru Mizushima, Kazuhisa Sekimizu	4. 巻 3
2. 論文標題 Repurposing the PDMA-approved drugs in Japan using an insect model of staphylococcal infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbes	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2022.01058	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wenyuan Li, Atsushi Miyashita, Kazuhisa Sekimizu	4. 巻 12
2. 論文標題 Peanut triacylglycerols activate innate immunity both in insects and mammals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11494-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 関水 和久、宮下 惇嗣、李文淵、三上 雄大、Yu Yidong、浜本 洋
2. 発表標題 カイコを用いた敗血症性DIC (播種性血管内凝固症候群)モデルの構築
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	宮下 惇嗣 (MIYASHITA ATSUSHI) (40818308)	帝京大学・付置研究所・講師 (32643)	
研究分担者	浜本 洋 (HAMAMOTO HIROSHI) (90361609)	山形大学・医学部・教授 (11501)	

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
---------	---------