

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12726

研究課題名(和文)免疫賦活活性を示す食品成分の創出

研究課題名(英文)Study for food factors inducing immunostimulating activity

研究代表者

三好 規之(Miyoshi, Noriyuki)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70438191

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のゲノム上に大腸菌のリピドA生合成遺伝子クラスターのオーソログが存在すると報告されたが、植物におけるリピドA生合成経路の最終産物は同定されていない。本研究では、アブラナ科植物由来リピドA様分子の新規同定と、免疫賦活活性評価を目的に解析を行った。シロイヌナズナ実生からリピドAが含まれると想定される画分を抽出し、thin layer chromatographyおよび質量分析より、候補化合物を検出した。また、抽出したリピドA画分をヒト単球由来THP-1細胞へ曝露し、サイトカイン発現量変化をRT-qPCR法にて解析し、免疫賦活活性を評価した。

研究成果の概要(英文): Although it has been recently reported that *Arabidopsis thaliana* contains nuclear genes encoding orthologs of key enzymes of bacterial lipid A biosynthesis, the end product of lipid A biosynthesis pathway in plant is not identified. In this study, we performed experiments to identify novel lipid A-like molecules in *Arabidopsis thaliana* and evaluate the immunostimulating activities. The seedlings of *Arabidopsis* were treated to extract the fraction including lipid A, which was then applied to thin layer chromatography (TLC) and mass spectrometric (MS) analysis. Some unidentified molecules were detected in TLC and MS analysis. Also, mRNA expression of cytokines in human monocyte THP-1 cell after the treatment with extracted lipid A fraction were evaluated.

研究分野：食品機能学

キーワード：機能性食品

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌細胞壁成分の lipopolysaccharide (LPS) は、O 抗原およびコア多糖と呼ばれる糖鎖と、リピド A と呼ばれる脂質から成る分子量 5000~8000 程度のリポ多糖であり、パターン認識受容体 (PAMPs) を介した免疫系の過剰な活性化による致死性のショックを誘導する内毒素 (エンドトキシン) である。リピド A は、LPS のエンドトキシン活性を担う最小単位構造であり、リン酸基が結合したグルコサミン 2 分子に脂肪酸が複数結合した複雑な化学構造をとる。菌種や生育条件 (培養温度、pH など) に依存したリピド A 構造の違い (リン酸基の有無、結合しているアシル基炭素鎖の数、長さなど) はリピド A 活性に強く影響しており、一般的に、リン酸基が 1 つのものや脂肪酸部分が小さく円錐状の立体構造を取らないものは無毒あるいは弱毒性である。このような 1 リン酸化型のリピド A アナログは、子宮頸がんワクチンのアジュバントとして使用されており、さらに抗アルツハイマー病効果 (PNAS, 110, 2013) や抗インフルエンザ効果 (Nature, 497, 2013) などの薬理作用 (免疫賦活活性) を示すことは非常に興味深い。さらに、空気中のエンドトキシン濃度が比較的高い環境で乳幼児期を過ごした子供は、アレルギーへの感作率が低いことが知られている (Lancet, 355, 2000)。それゆえ、リピド A の生体に対する功罪活性を制御できれば、人類の QOL 向上に寄与する重要な分子となる。

一方、植物 (シロイヌナズナ) ゲノム上に大腸菌リピド A 生合成遺伝子のオーソログが最近同定された (PNAS, 108, 2011)。シロイヌナズナのリピド A 生合成遺伝子欠損株を用いた解析では、欠損させた生合成酵素に対する基質分子 (lipid A 前駆体) が蓄積することから、植物においても大腸菌と類似の生合成経路を利用していることが示された。さらに興味あることに、リピド A 生合成遺伝子クラスターはシロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物だけではなく、様々な植物種 (イネ・コムギ・トウモロコシなどの) ゲノム上にも存在することが報告されている。しかし、植物におけるリピド A 生合成経路の最終代謝産物に関しては未だ分析化学的に検出・同定されたという報告は無く、その構造、組織分布、生成量、さらに植物個体における生理的機能については全く不明である。本研究では食用アブラナ科植物からリピド A 様分子である 2 次代謝産物を新規に検出・構造解析し、動物個体に対する植物由来リピド A 様分子の功罪活性 (免疫賦活活性とエンドトキシン活性) を評価することによって、機能性食品因子による自然免疫制御の新規分子基盤確立を目指した。

## 2. 研究の目的

リピド A は、グラム陰性菌細胞壁を構成するリポ多糖 (LPS) の脂溶性部分構造であり、

LPS のエンドトキシン活性に必要な最小単位構造 (活性中心) であるが、分子内のリン酸基が脱離した弱毒性のリピド A アナログは、アルツハイマー病などで強力な免疫賦活活性を示す。近年、シロイヌナズナ (アブラナ科) のゲノム上に大腸菌のリピド A 生合成遺伝子クラスターのオーソログが存在することが最近報告された。リピド A 生合成遺伝子クラスターは、様々な植物に存在することがゲノム解析より明らかになっている。しかし、植物におけるリピド A 生合成経路の最終産物は同定されていない。本研究では、アブラナ科植物由来リピド A 様分子の新規同定と、免疫賦活活性評価に取り組み、食品機能の新規創出を目指した。

## 3. 研究の方法

滅菌したシロイヌナズナ種子を MS 寒天培地へ播種し、37°C で 10 日間培養後の実生を回収し凍結乾燥した。0.1 g の試料に 2 ml の PBS を加えすりつぶし、そのうち 0.8 ml にクロロホルム 1 ml、メタノール 2 ml を加えよく攪拌し、室温で 1 h 放置した (単相 Bligh-dyer 法)。遠心分離 (1500 rpm, 20 min) 後、上清を捨て、PBS 0.25 ml、クロロホルム 0.5 ml、メタノール 1 ml を加えよく攪拌し、室温で 30 min 放置した (単相 Bligh-dyer 法)。遠心分離 (1500 rpm, 20 min) 後、沈殿 A を回収した。沈殿 A に PBS 0.9 ml、クロロホルム 1 ml、メタノール 1 ml を加えよく攪拌し、遠心分離 (1500 rpm, 20 min) 後、有機層 (下層、 ) を回収した (二相 Bligh-dyer 法)。水層 (上層、 ) にクロロホルム 1 ml を加えよく攪拌し、遠心分離 (1500 rpm, 20 min) 後、有機層を と合わせた ( )。 を N<sub>2</sub> dry、真空エバポレーターにより乾固させたものをサンプルとした。また、沈殿 A を 1 ml の 10 mM TEA-citrate に懸濁し、100°C で 1 時間加熱 (加水分解) 後、二相 Bligh-dyer 法より有機層 (下層) を回収し、N<sub>2</sub> dry、真空エバポレーターにより乾固させた ( )。

標品 LPS (*E. coli* O55:B5, Sigma) 1 mg を加水分解 (10 mM Triethylamine (TEA)-citrate 0.3 ml, 100°C, 1 h) し、クロロホルム 0.3 ml、メタノール 0.3 ml を加えよく攪拌した。遠心分離 (13000 rpm, 5 min, 4°C) 後、有機層 (下層、 ) を回収した (二相 Bligh-dyer 法)。水層 (上層、 ) にクロロホルム 300 µl を加えよく攪拌し、遠心分離 (13000 rpm, 5 min, 4°C) 後、有機層を と合わせた。真空エバポレーターにより乾固させたものをサンプルとした。

## I. TLC

サンプル ( ) を 100 µl のクロロホルムにそれぞれ溶解し、2 µl づつスポットした。展開溶媒はクロロホルム : メタノール : 水 : TEA = 3 : 1.5 : 0.25 : 0.1 を使用した。検出試薬は 20% 硫酸 in エタノールを使用した。

## II. TOF-MS infusion

サンプル ( )、標品 lipid A (from *E. coli* F583 (Rd mutant), Sigma) をクロロホルム

△：メタノール=10 µl:90 µl に溶解し、MS-negative mode にて検出した。

### III. 細胞培養

ヒト単球 THP-1 細胞は、10% FBS/RPMI1640 培地で培養した。THP-1 細胞 ( $1.5 \times 10^6$  cells) に以下に示す各被検試料を、添加し、37°C で 6 時間インキュベートした。その後 RNA 抽出、RT-qPCR を行った。被検試料は、クロロホルム 1 µl (NC; negative control) 標品 lipid A 0.5 µl (終濃度 0.1 µg/ml) + 0.5 µl、標品 lipid A 0.5 µl + 0.5 µl、標品 lipid A 0.5 µl + 0.5 µl、標品 lipid A 0.5 µl + クロロホルム 0.5 µl (lipid A) 標品 lipid A 1 µl (lipid A×2、終濃度 0.2 µg/ml) の 6 つである。 、 、 は、100 µl のクロロホルムに溶解し、使用した。標品 lipid A の溶媒はクロロホルムである。

### IV. RT-qPCR

TNF-α および IFN-β の発現量を測定した。GAPDH を housekeeping gene として補正に用いた。

## 4. 研究成果

### I. TLC

各サンプル( 、 、 )を TLC により分離させた(図 1)。レーン (標品 lipid A) で検出された矢印と同じ Rf を示すスポットがサンプル (E. coli 水層画分) サンプル において検出された。サンプル では、lipid A よりもさらに低極性側にいくつかの化合物が検出されたことから、サンプル に lipid A あるいはリポド A 様分子が抽出されていることが示唆された。

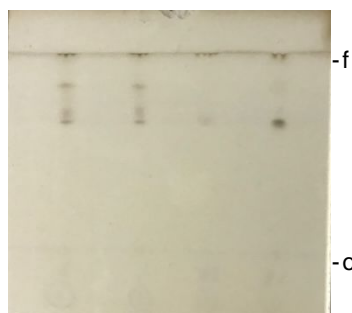


図 1 TLC による各サンプルの分離

### II. TOF-MS infusion

図 2 に各サンプルの MS スペクトル (infusion) を示す。二相 Bligh-dyer 法で調製した有機層 、 において、比較的高強度で複数の化合物が検出された。検出された主要な MS イオンピークは、いずれも 1 価であった。リン酸基を 2 つ有していた場合、2 価のピークとして検出されやすいため、 、 で検出された化合物は、リポド A の分解物、あるいは一リン酸型のリポド A 様分子である可能性が考えられる。

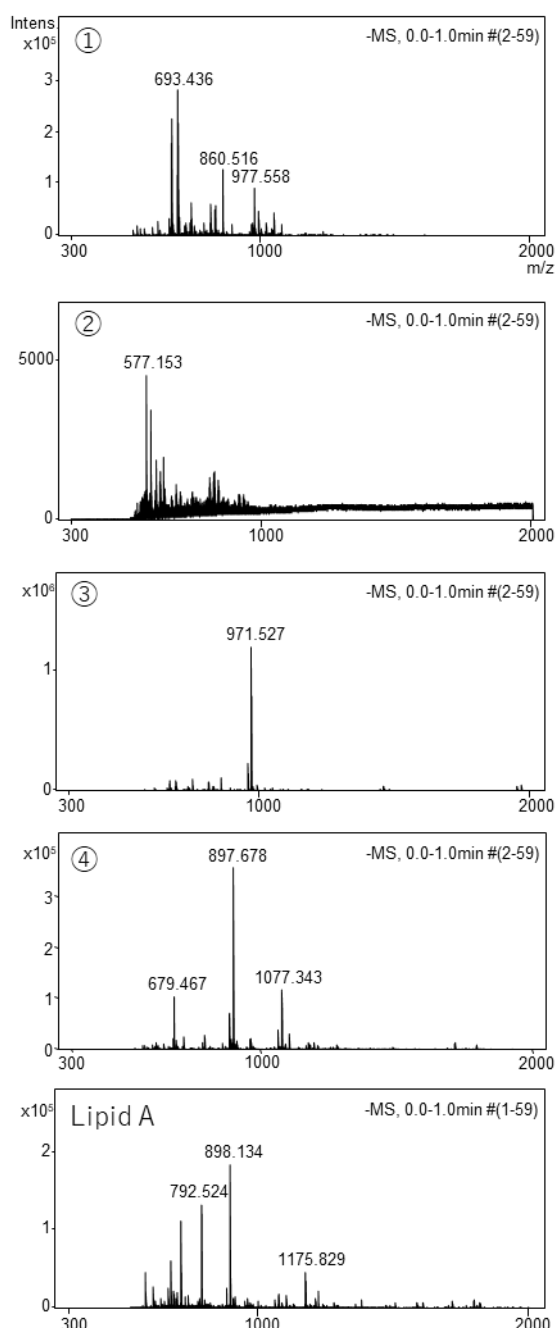


図 2 TOF-MS infusion による各サンプルの MS スペクトル

### III. RT-qPCR

炎症性サイトカイン (TNF-α、IFN-β) の mRNA 相対発現量を図 3 に示す。いずれの炎症性サイトカインもサンプル添加による顕著な発現変動は示さなかった。今後、幾つかの炎症応答遺伝子の発現変動を解析し、各サンプルに含まれることが示唆された lipid A 様分子の pro-inflammatory 作用および anti-inflammatory 作用について詳細に検討する。

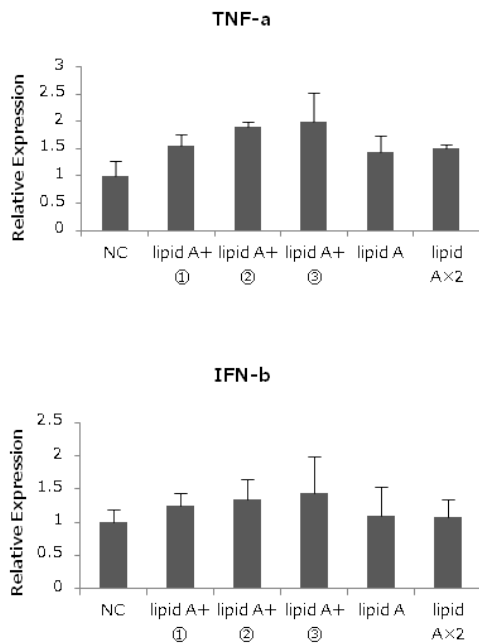


図 3 炎症性サイトカインの相対発現量 (n=4)

## 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 10 件)

Miyoshi N. Chemical alterations and regulations of biomolecules in lifestyle-related diseases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2016) **80**, 1046-53.

[学会発表](計 47 件)

グラム陰性菌リポ多糖構成分子 lipid A の LC-MS 分析法の開発、大橋咲香、橋詰力、三好規之、第 40 回日本分子生物学会、2017.12/6-9. 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/biochem/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三好規之 (MIYOSHI, Noriyuki)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70438191