

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07466

研究課題名(和文) 内分泌因子および飼料成分による抗菌ペプチドの発現と自然免疫機能の向上

研究課題名(英文) Improvement of antimicrobial peptide expression and innate immune function by endocrine factors and feed ed ingredients

研究代表者

小林 哲也 (KOBAYASHI, Tetsuya)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：00195794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニホンウズラ(FA)のファブリキウス嚢(BF)から抗菌ペプチド(AMPs)の一種 Fowlicidin ファミリーをクローン化し、cRNAプローブを用いたCATH-B1 mRNA発現部位の同定、mRNA発現の調節、生理活性等の検証を行った。その結果、Fowlicidin 1-3 とCATH-B1のクローニングに成功し、CATH-B1 mRNAはBFの濾胞間上皮と髄質内で強く発現していること、そのmRNA発現量はグラム陰性菌内毒素(リポ多糖; LPS)投与並びにある種の脂肪酸投与により高まること、合成ペプチドは大腸菌に対して抗菌活性を示し、LPS結合活性とLPS中和活性等を有することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家禽類の飼育で抗生物質の不適切(過剰)な使用は、耐性菌の出現をもたらす、この家禽を食用とするヒトの健康面にも重大な影響を与えることから、動物が本来有する自然免疫機能を簡便な方法で強化することが可能となれば、産業面からも極めて有用と考え、申請者はウズラを用いて、自然免疫機能を担う抗菌ペプチド(AMPs; ペプチドが持つ物理化学的特性により抗菌性が生じることから耐性菌が生じにくい)の発現を、人為的にしかも簡便な方法で高める条件を探索した。飼育条件によるAMP発現の強化方法を検討し、飼料中のある種の脂肪酸を与えると、AMPs mRNA発現が有意に高まることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here, we cloned the Fowlicidin family of antimicrobial peptides (AMPs) originating from the bursa of Fabricius (BF) of the Japanese quail; we then identified the CATH-B1 mRNA expression site by in situ hybridization. We successfully cloned Fowlicidin 1-3 and CATH-B1, and showed that CATH-B1 mRNA strongly expressed in the interfollicular epithelium and medulla of BF; its mRNA expression level increased upon administration of gram-negative endotoxin (lipopolysaccharides; LPS) and certain fatty acids. These synthetic peptides showed antimicrobial activity against Escherichia coli and have LPS-binding and -neutralizing activity.

研究分野：形態・構造

キーワード：抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

抗菌ペプチドに関する研究は、新規抗菌ペプチドの探索、抗菌活性を發揮する細菌種、抗菌活性を發揮するしくみ等が多く、発現調節機構に関するものやその発展型である抗菌ペプチドの簡便な発現誘導法に関する研究はあまりなされていない。また、研究対象となっている器官も限定的であり、ファブリキウス嚢やハーダー腺といった免疫に関わる器官に注目した研究はほとんど見られない。申請者らは、鳥類の総排出腔背側に位置し体液性免疫に関わるファブリキウス嚢が抗菌物質を合成・分泌することで、侵入する細菌に対し迅速な防御を行っていると考え、fowlicidin-1~3、cathelicidin-B1 を同定し、グラム陰性菌や陽性菌に対して抗菌活性をもつことを明らかにしてきた。また、これらのペプチドは、嚢内の濾胞間上皮細胞で発現し、リポ多糖やリポテイコ酸といった細菌成分に応答して発現が高まること等を見出した。一方、両生類の眼球近傍に位置し眼の表面の保護や瞬膜の潤滑に関わるハーダー腺からは chensirin-2CBa、catesbeianalectin 等の抗菌ペプチドを同定し、抗菌活性を示してきた。

2. 研究の目的

我々が鳥類や両生類で同定した抗菌ペプチドの抗菌スペクトラムや多機能性および発現調節機構を明らかにするとともに、特定成分を飼料に添加することにより抗菌ペプチドの発現を誘導することで、動物の免疫機能を向上させ、感染への抵抗性を高める手法の開発につなげるため以下の目標を設定した。

1】抗菌ペプチドの多機能性：抗菌ペプチドは、ペプチドの持つ物理化学的性質に基づき抗菌活性を發揮するため耐性菌が生じにくい。今日、耐性菌の出現が問題となっているが、その解決法の 1 つとして抗菌ペプチドの医療への応用研究が盛んに試みられている。近年では、抗菌ペプチドの有する抗腫瘍作用や抗ウイルス作用についても注目されている。申請者らは、同定した抗菌ペプチドの抗菌活性を測定しているが、一部の菌種に限られており、また抗菌活性以外の活性については測定を行っていない。そこで、本研究では、応募者らが同定した抗菌ペプチドの抗菌スペクトラム(菌種に対する有効性の違い)を明らかにすることにした。また抗腫瘍作用についても検討した。

2】抗菌ペプチド遺伝子の発現調節機構：申請者らは、メラノサイト刺激ホルモン、性ステロイドホルモン、メラトニン等がファブリキウス嚢で発現していることを見出した。また最近の報告によると、ビタミン D や脂肪酸が哺乳類で抗菌ペプチド遺伝子の発現を促進すると報告されてきている。これらの背景から、鳥類や両生類の免疫器官における抗菌ペプチド遺伝子の発現に対するこれら内分泌因子、ビタミン D、脂肪酸の関与と、抗菌ペプチド産生細胞内におけるシグナル伝達機構を解析することで、抗菌ペプチドの発現調節機構について明らかにすることにした。

3】飼育条件の調節による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導：卵から孵化した動物のファブリキウス嚢が免疫器官として機能する迄には時間が必要である。同様に、成熟した動物においても、細菌の感染から抗体産生に至る迄には時間が必要である。したがって、これらの時期の動物は細菌に感染し易いと考えられる。そこで、この時期の動物の抵抗性を高めることができれば、産業上も有用と考えるに至った。それゆえ上記 2】の情報をもとに、ビタミン D や脂肪酸を飼料に加えることが抗菌ペプチド遺伝子の発現を高め自然免疫能を向上させるか、について検討することにした。

3. 研究の方法

1】抗菌ペプチドの多機能性：大腸菌 (*Escherichia coli*: *E. coli* JCM5491) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: *S. aureus* JCM2874) を理研バイオリソースセンターから購入した。96 穴マイクロプレート内で培養した *E. coli* JCM5491 と *S. aureus* JCM2874 を、fowlicidin-2 添加ミューラー・ヒントン培地 (最終濃度 0 - 128 µg/ml) 中で 12 時間培養することにより、その抗菌活性を評価した (37 °C、5% CO₂ 条件下)。

LPS に対する fowlicidin-2 の中和作用は、カプトガニ血球抽出成分 (*Limulus* amoebocyte lysate: LAL) 試験 (Endospecy ES-24S Set, 020170; SEIKAGAKU CORPORATION, Tokyo, Japan) を用いて、fowlicidin-2 を反応させた LPS の活性を測定することにより検討した。

fowlicidin-2 の LTA に対する結合能は、非変性-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-polyacrylamide gel electrophoresis: native-PAGE) を用いて、fowlicidin-2-LTA 複合体の形成による移動度の変化を観察することで検討した。

2】抗菌ペプチド遺伝子の発現調節機構：3 週齢の雄の日本ウズラを株式会社モトキから購入し、24L の連続照明下で餌と水を自由に摂取させて飼育した。脂肪酸処理群には 0.1 % の脂肪酸を水に溶かして与え、48 時間飼育した。その後、ファブリキウス嚢とハーダー腺を摘出し、常法により mRNA を抽出後、RT-qPCR を行った。哺乳類では、脂肪酸は FFAR に結合した後、mTOR と STAT3 経路を介してその効果を發揮する。そこで、脂肪酸受容体の拮抗薬 (GLPG0974) を経口投与しながら、飲用水を摂取させた群も作成した。

3】飼育条件の調節による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導：日本ウズラを用いて実験を行うことを当初予定していたが、飼育スペースの関係で難しくなったことから、ファブリキウス囊の株細胞 DT40 を培養し、これに対し活性型ビタミン D3 を添加し、培養後、細胞から、常法により mRNA を抽出後、RT-qPCR を行い評価した。

4. 研究成果

1】抗菌ペプチドの多機能性：培養下の *E. coli* JCM5491 と *S. aureus* JCM287 は fowlicidin-2 の添加したところ、濃度依存的に生菌数が減少した。

fowlicidin-2 濃度依存的に LPS 活性の低下が認められ、fowlicidin-2 が LPS に結合することでその活性を中和していることが明らかとなった。

一定量の fowlicidin-2 に対して反応させる LTA 量が増えると、染色後に検出されたバンドは陰極側へシフトし、またその染色性は濃くなったことから、fowlicidin-2 は LTA に対して結合能を有していることが明らかとなった。

2】抗菌ペプチド遺伝子の発現調節機構：脂肪酸を摂取させ 48 時間後に BF と HG における fowlicidin-2 の mRNA 発現を調べたところ、対照群に対して有意に上昇した。またこの上昇は、脂肪酸の受容体の拮抗薬の投与により完全に抑制された。

3】飼育条件の調節による抗菌ペプチド遺伝子の発現誘導：活性型ビタミン D3 を培養液に各種濃度(0-200ng/ml)添加し、DT40 を 3 時間培養したところ、Fowlicidin-1 と Cathelicidin - B1 の mRNA 発現量が濃度依存的に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano M, Hasunuma I, Minagawa A, Iwamuro S, Yamamoto K, Kikuyama S, Machida T, Kobayashi T.	4. 巻 267
2. 論文標題 Possible involvement of thyrotropin-releasing hormone receptor 3 in the release of prolactin in the metamorphosing bullfrog larvae.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gen Comp Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 36-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2018.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Rawangkan A, Wongsirisin, P., Namiki, K., Iida, K., Kobayashi, Y., Shimizu, Y., Fujiki, H., Sukanuma, M.	4. 巻 23(8)
2. 論文標題 Green tea catechin is an alternative immune checkpoint inhibitor that inhibits PD-L1 expression and lung tumor growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules23082071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iida K, Sakai R, Yokoyama S, Kobayashi N, Togo S, Yoshikawa HY, Rawangkan A, Namiki K, Sukanuma M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Cell softening in malignant progression of human lung cancer cells by activation of receptor tyrosine kinase AXL	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.,	6. 最初と最後の頁 1 - 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-017-18120-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujiki H, Sueoka E, Rawangkan A, Sukanuma M	4. 巻 143
2. 論文標題 Human cancer stem cells are a target for cancer prevention using (-)-epigallocatechin gallate.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 2401-2412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00432-017-2515-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 岩室祥一、小林哲也	4. 巻 43
2. 論文標題 魔弾の射手:両生類の先天的防御機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 比較内分泌学	6. 最初と最後の頁 85-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakada T, Toyoda F, Matsuda K, Nakakura T, Hasunuma I, Yamamoto K, Onoue S, Yokosuka M, Kikuyama S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Imorin: a sexual attractiveness pheromone in female red-bellied newts (<i>Cynops pyrrhogaster</i>).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/srep41334.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岩室 祥一、近藤 綾音、稲村 有里子、鈴木 麻奈美、川名 夏未、田中 夕理、小林 哲也、蓮沼 至、菊山 榮
2. 発表標題 細胞外ヒストンの普遍的細胞毒性
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会(大阪市大、大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤元威、Wongsirisin P、菅沼雅美
2. 発表標題 緑茶カテキンによるYAPを介したがん幹細胞の抑制
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会 (埼玉大、北浦和)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤玄基、金谷実咲、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 ウズラのハーダー腺内の抗菌ペプチドmRNA発現は短鎖脂肪酸の経口摂取に より上昇する
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会(大阪市大)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤玄基、金谷実咲、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 短鎖脂肪酸はウズラ免疫器官の抗菌ペプチド発現を高める
3. 学会等名 第44回日本比較内分泌学会(埼玉大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤玄基、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 短鎖脂肪酸の経口摂取はウズラの免疫器官における抗菌ペプチドmRNA 発現量を増加させる
3. 学会等名 第43回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野真樹、内山愛里、小林浩志、藤澤静香、望月拓也、小林哲也、菊山榮、蓮沼至、岩室祥一
2. 発表標題 両生類脳における生体防御ペプチドの機能探索
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム仙台大会, 2018年11月9 - 11日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野真樹、岩室祥一、小林哲也、山本和俊、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 アフリカツメガエル3型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体(TRHR3)の構造と機能性発言の検討
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム仙台大会, 11月9 - 11日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金谷実咲、伊藤真知、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 Cathelicidin-B1のウズラのファブリキウス嚢における発現部位の特定、ならびに生理機能の探索
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム仙台大会, 11月9 - 11日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川大輔、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一
2. 発表標題 サドガエル生体防御ペプチドの抗菌ならびに細胞毒性作用機構の解析
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム仙台大会, 11月9 - 11日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蓮沼至、中野真樹、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 ウシガエル下垂体前葉のプロラクチン放出に関わる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の同定
3. 学会等名 第33回下垂体研究会学術集会 2018年8月17 - 19日、高知
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金谷実咲、伊藤真知、蓮沼至、岩室祥一、菊山榮、小林哲也
2. 発表標題 ウズラのファブリキウス嚢におけるCathelicidin-B1 mRNA発現細胞の同定と合成Cathelicidin-B1ペプチドの生理機能
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（震災により12月9日、東京大学伊藤国際学術研究センターにて代替開催）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野真樹、岩室祥一、小林哲也、山本和俊、菊山榮、蓮沼至
2. 発表標題 3型甲状腺ホルモン放出ホルモン受容体(TRHR3)のリガンド応答性の検証
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（震災により12月9日、東京大学伊藤国際学術研究センターにて代替開催）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川大輔、蓮沼至、小林哲也、菊山榮、岩室祥一
2. 発表標題 サドガエル生体防御ペプチドの抗菌ならびに細胞毒性作用機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（震災により12月9日、東京大学伊藤国際学術研究センターにて代替開催）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日本動物学会 関東支部第70回大会
2. 発表標題 報酬獲得後にみられる側坐核を中心とした脳領域間のコヒーレント変化
3. 学会等名 廣田晴喜、小林哲也、古舘宏之
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ファムディン ユイ、蓮沼 至、岩室祥一、菊山 榮、小林哲也
2. 発表標題 ウズラの腎臓における -Defensin mRNAの発現解析
3. 学会等名 第41回 日本鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 ファムディン ユイ、蓮沼 至、岩室 祥一、菊山 榮、小林 哲也
2. 発表標題 ニホンウズラの腎臓における -Defensin-9 と-10 の発現
3. 学会等名 日本動物学会 第88回富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suganuma M
2. 発表標題 Biophysical approach to mechanisms of cancer prevention and treatment with green tea catechins and other phytochemicals.
3. 学会等名 International Conference on the 22nd Annual Meeting of the Korean Society of Cancer Prevention, Seoul, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suganuma M
2. 発表標題 Biophysical characteristics and anticancer immunity of green tea catechins and their effects of cancer prevention and treatment
3. 学会等名 International Conference on Innovations of Functional Foods in Asia, Phayao, Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊山 榮
2. 発表標題 ソデフリンに走りアイモリンを得るまで
3. 学会等名 日本動物学第88回大会シンポジウム「両生類はワンダーランド(5)」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林哲也、岩室祥一
2. 発表標題 抗菌ペプチドとその様々な生理的役割
3. 学会等名 日仏生物学会第186回例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野真樹, 小林浩志, 杉山恵利香, 藤澤静香, 小林哲也, 菊山榮, 蓮沼至, 岩室祥一
2. 発表標題 ウシガエル脳内におけるCatesbeianalectin の発現とその変態との関連性について
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野真樹、蓮沼至、皆川温子、岩室祥一、山本和俊、菊山榮、町田武夫、小林哲也
2. 発表標題 両生類3型甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体（TRHR3）の構造と機能の解析
3. 学会等名 第42回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2017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	菊山 榮 (Kikuyama Sakae) (20063638)	早稲田大学・教育・総合科学学術院・名誉教授 (32689)	
研究分担者	菅沼 雅美 (Suganuma Masami) (20196695)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	
研究分担者	岩室 祥一 (Iwamuro Shawichi) (70221794)	東邦大学・理学部・教授 (32661)	