



講師
宮下 惇嗣

経歴

2017 年 東京大学大学院薬学系研究
科博士課程 修了
博士（薬学）
2017 年 ダルハウジー大学博士研究
員
2019 年 帝京大学医真菌研究センタ
ー 講師

自然免疫活性化機能を有する酵母エキスの調製法、 およびその作用メカニズムの理解

要旨

市販の漬物などの発酵食品から酵母並びに乳酸菌を分離し、ribosomal DNA のシーケンスから種を同定し、食経験が報告されている酵母株を得た。さらにそれらの自然免疫促進活性をカイコの筋肉収縮系を用いて測定した。その結果、比活性が高い酵母株を得ることができた。また、上記サンプルに対するカイコの分子応答基盤を知るために、カイコの血球細胞における遺伝子発現を RNA シーケンス法によって解析する技術を当研究室において確立することができた。以上の結果は、本研究において分離された酵母並びに乳酸菌は、分子レベルでの知見に基づいた免疫活性が高い発酵食品の製造に有用であることを示唆している。

イントロダクション

現代免疫学は種痘（ジェンナー、1796 年）に端を発し、今日「獲得免疫」として知られるリンパ球の分化と抗体産生に基づく感染抵抗性の獲得という概念を確立した。これを応用したワクチン法は世界レベルでの感染制御に大きく貢献したが、人類は未だ感染症に脅かされている。臨床現場で常に問題となる薬剤耐性菌の出現に

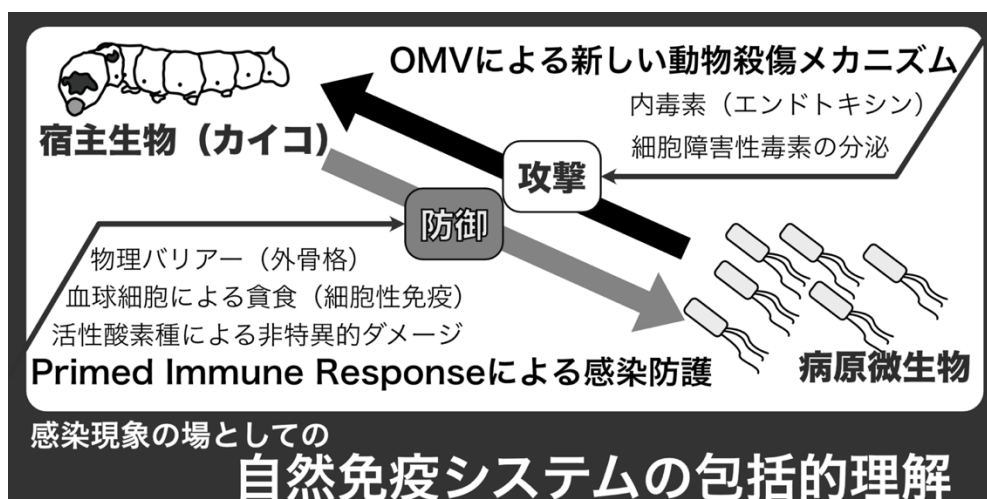
加えて、新型コロナウイルス感染症（Covid-19）のような新興感染症に対しては、治療効果が立証されている化合物や、確立されたワクチン法が極めて限定的となる。現代の感染予防・感染制御が抱えるこうした課題を克服するには、化学療法やワクチンを補完する新しい感染制御戦略が必要である。

我々はこれまでに、化学療法やワクチンを補完しうる新しい免疫学的コンセプトとして「自然免疫応答の増強による感染抵抗性の獲得(Primed Immune Responses; PIR)」を報告してきた。PIR は、環境中の多種多様な分子群による自然免疫応答の増強であり、広範な無脊椎動物モデル（リンパ球による抗体産生システムを持たず、自然免疫システムに依存している生物種）において近年報告が続いている。しかし、PIR の生理学意義や分子メカニズムには不明点が多く、ヒトにおける感染制御に適用するには依然として科学的知見が不足している。特に、一部の菌体由来成分を除いて PIR を誘導する分子群が不明なため、PIR の適応・生理的意義や、誘導の分子機構はよく判っていない。

我々はこれまでに、PIR を誘導する分子群を網羅的に探索・精製してきた。すでに申請者らは、食品由来サンプルの中から複数の PIR 誘導物質を見出している（未発表）。本研究では、PIR の分子基盤の解明、並びにその応用可能性を追求すべく、酵母エキスに対する Primed Immune Response（後述）を明らかにし、その分子メカニズムを明らかにすることを通して、酵母利用食品の新しい健康機能・生体調節機能を提唱することを目指して研究に着手した。

本研究で扱う Primed Immune Response は、申請者が近年報告した「抗体を持たない無脊椎動物が、後天的に感染抵抗性を獲得する機能」であり、申請者が世界の Primed Immune Response 研究を先導する立場にある(Miyashita et al. J Biol Chem 2014; Miyashita et al. PLOS ONE 2015)。私は現在、Primed Immune Response の全貌解明に向けて文部科学省科研費（若手研究）の助成をうけて研究を遂行している（下図）。当該研究テーマでは、Primed Immune Response を基軸として、感染現象の場としての自然免疫システムの包括的理解という課題に挑戦している。

これまでに、酵母エキ스가カイコにおいて Primed Immune Response を引き起こし、主要な免疫臓器の一つである脂肪体からの抗菌ペプチドの誘導をもたらし、緑膿菌の様な病原性細菌に対する感染抵抗性を個体レベルで付与することを見出している（未発表）。さらに、当該活性物質の精製に着手しており、酵母エキス中に含まれる活性物質の分子量が数千以下であることがサイズ排除カラムクロマトグラフィーの結果から示唆されている。また、緑膿菌に対する感染予防活性を指標とした Primed Immune Response に加えて、カイコでは筋肉収縮を指標にサイトカインの活性化を測るアッセイ系（筋肉収取アッセイ）も確立されている。これらの背景に基づき、本申請課題では特に、酵母由来物質によるカイコの筋肉収縮活性に着目し、食経験のあるサンプルから、筋肉収縮活性の高い菌株を分離することを試みた。



材料と方法

植物からの酵母の分離

植物材料（葉など）に水 15mL を加え、30℃にて 5 日間培養した。微生物の増殖を確認し、培地 200 μ l に 30%グルコース、0.01%クロラムフェニコール（細菌の増殖を抑えるために加えた）含む YPD 液体培地 5mL を加え 30℃にて 5 日間培養した。培養液を YPD（0.01%クロラムフェニコール及び 0.2%プロピオン酸ナトリウム(酵母以外の微生物の増殖を抑える)を含む寒天培地上で 30℃2 日間培養してコロニーを得た。

乳酸菌の分離

キムチや漬物などの発酵食品の液体部分を採取し、炭酸カルシウムを添加した MRS 寒天培地上に塗布し、30°Cにて 2 日間培養した。コロニーの周囲に透明体が形成されていることを確認し乳酸菌とした。

結果

食経験のある真菌の探索、並びに免疫促進活性

私たちは、植物の葉を液体培地中で培養し、さらに YPD 寒天培地に塗布し、生じたコロニーについて rDNA のシーケンスを実施した。その結果、63 株、13 種の酵母が分離されていることが判明した。いずれも文献上、ワインやチーズ、アルコール飲料などの発酵食品に使われており、食経験があるとされる菌であった。それぞれについて、カイコの筋肉収縮を指標とした自然免疫促進活性を定量した。その中で、活性が高い 4 株、3 種を選択した。中でも、100units/mg 以上の活性を示した 2 株 (*Debaryomyces* sp.と *Torulaspora* sp.)については活性定量を繰り返し、それぞれ 76 ± 24 及び 130 ± 25 units/mg であることを確認した。

カイコ血球細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

カイコは免疫学研究にモデル動物として近年用いられているが、細胞内における網羅的遺伝子発現解析が行われた例は必ずしも豊富とは言えない。そこで私たちは、カイコの血球細胞から total RNA を抽出し、RNA シーケンス法による網羅的遺伝子発現解析を行うこととした。カイコ一頭あたり、400 ng の RNA を得ることができ、ついでオリゴ dT ビーズを用いて mRNA を精製したのち、次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行った。その結果、2GB の解析寮で全遺伝子産物 16871 種のうち、10111 種の発現を確認することができた。また、2 個体から独立に得た遺伝子発現パターンは高い相関を示し、当該実験手法に再現性がみられることを確認した。

考察

今回私たちは、食経験のある酵母、並びに乳酸菌の中に、カイコの筋肉収縮を指標とした系で、活性が高い菌を同定した。酵母や乳酸菌は、発酵食品中で共生することが知られている。したがって今回新たに同定した菌は、発酵食品に加えれば、他の菌と同時に増殖すると期待される。さらにこれらの菌が増殖した発酵食品は、自然免疫促進活性が高くなると期待される。また、本研究期間内に確立した網羅的遺伝子発現解析手法を用いて、今後分子レベルでの知見に基づいた免疫活性が高い発酵食品を目指した研究の加速が期待される。

謝辞

本研究の実施において、ご支援を賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。

関連文献

- (1) Miyashita et al. (2014) J Biol Chem 289 (20), 14412-14421.
- (2) Miyashita et al. (2015) PLOS ONE e0130486.
- (3) Ishii K. et al. (2008) J Biol Chem. 25;283(4):2185-91.
- (4) Fujiyuki T. et al. (2012) Drug Discove. Ther. 2012; 6(2):88-93.
- (5) Nishida S. et al. (2017) Front Microbiol. 20;8:436.
- (6) Nishida S. et al. (2016) Drug Discov. Ther. 10(1):49-56.
- (7) Ishii M. et al. (2017) Drug Discov Ther 11(1):25-29.