

## 研究経過報告書

1. 研究課題名： 自然免疫を標的とした感染制御
2. 研究代表者氏名： 宮下 惇嗣
3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

- (1) 宮下惇嗣「カイコを用いた感染症の理解と克服」日本細菌学会関東支部会 インターラボセミナー 2023年12月
- (2) 宮下惇嗣「カイコモデルを使った自然免疫応答の解明」日本生化学会大会 2023年11月
- (3) Atsushi Miyashita. Primed immune responses in the silkworm (*Bombyx mori*) enhance the immune barrier to fungal and bacterial pathogens. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2024年9月
- (4) 宮下惇嗣「カイコを用いた自然免疫活性化物質の探索」第21回生命科学研究会 2024年06月
- (5) 三上雄大、田淵史晃、石井雅樹、宮下惇嗣「キチン由来オリゴ糖による、カイコの Immune Priming の誘導」第97回日本細菌学会総会 2024年08月
- (6) 丸山奈保、宮下惇嗣「自然免疫系を介して感染抵抗性を付与する植物精油の探索」第97回日本細菌学会総会 2024年08月

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

### (1) 免疫調整作用に必要な抗菌ペプチドの構造的特徴

本研究では下記に示す3種類のペプチド化合物について、カイコに対する免疫増強作用の有無を検討した。それぞれのペプチド化合物を500 µg/mLの濃度で溶解した注射用液体サンプルを調製し、カイコの血管内に50 µLを投与した。サンプルの投与から2.5時間後に、カイコの血管に緑膿菌の生菌 ( $1 \times 10^3$  CFU/mL) を50 µL接種した。その後20時間、37°Cで飼育を続け、カイコの生存数をもとに各サンプルの自然免疫増強作用を判定した。その結果、下記に配列を示したペプチドのうち、ペプチド1と2を前投与されたカイコは緑膿菌の接種後20時間経過しても全頭が生きており、一方でペプチド3を前投与されたカイコは全数が死亡していた。

今回用いたペプチドサンプル（アミノ酸配列）：

1. NH<sub>2</sub>-RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAI-CONH<sub>2</sub>
2. NH<sub>2</sub>-KLLKLLLLLKLK-CONH<sub>2</sub>
3. NH<sub>2</sub>-MRMVTTPAMRTLAILAAILLVALQAQAEPLQARADEVAAPEQIA  
ADIPEVVVSLAWDESLAPKHPGSRKNMACYCRIPACIAGERRYGTCIY  
QGRLWAFCC-COOH

これらの結果から、ペプチド1と2に共通して存在し、かつペプチド3に存在しないような構造的特徴が、カイコに対する自然免疫増強活性に重要であると考えられた。そのような特徴としては、まず全長が短いこと、さらにリジン（K）やアルギニン（R）などの塩基性アミノ酸に富んでいること、またその予想立体構造においてアルファヘリックス構造に富んでいること、が挙げられる。今後、こうした構造モチーフと自然免疫増強活性との関連についてより詳細に検討していく予定である。

### (2) 抗菌ペプチドの免疫増強作用に関する分子メカニズムの解明に向けて

本研究ではさらに、抗菌ペプチドの作用メカニズムに糖鎖が関与しているか否かを検討した。具体的には、糖鎖切断酵素（ムタノライシン）を抗菌ペプチドと同時に投与することによって、抗菌ペプチドによる自然免疫増強作用が阻害されるか否かを検討した。本実験では、上記のペプチド1（1. NH<sub>2</sub>-RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAI-CONH<sub>2</sub>）と同時に、ムタノライシンをカイコに投与した。対象群では、ペプチド1と生理食塩水を投与した。その後 2.5 時間後に、緑膿菌の生菌（1×10<sup>3</sup> CFU/mL）を 50 μL 接種した。その後 20 時間、37°C で飼育を続け、カイコの生存数をもとにムタノライシンの阻害効果を判定した。その結果、ムタノライシンとペプチド1を前投与されたカイコは緑膿菌感染によって全頭死亡し、ペプチド1を単独で前投与されたカイコは緑膿菌感染後も全頭生存するような条件が見出されたことから、当該ペプチドによる自然免疫増強作用をもたらす分子メカニズムの一端に糖鎖が関与していることが示唆された。

また、本研究期間において、上記ペプチド化合物（あるいは同様の生理活性をカイコで示す物質）の作用機序を明らかにするための実験計画を策定した。具体的には、細胞・組織内で長期に免疫記憶を保持する機構としてエピジェネティック機構に着目し、活性物質の投与後に引き起こされる DNA メチル化パターンの変化や、ヒストン修飾の関与について実験プロトコルを策定した。本計画期間中の実施はできなかったが、今後継続して検討を進めていく予定である。

### （3）その他の研究成果

上記の他に、本研究の開始時には想定していなかった研究成果として、食品素材中に含まれるペプチド化合物による自然免疫増強効果を報告したい。本研究の結果から、おそらく特定の構造モチーフが活性に重要な役割を果たしていると予想されるものの、多様なペプチドが自然免疫増強活性を有していることが予想された。そこで、将来的に医薬品だけではなく、感染制御への寄与が期待できる食品（機能性食品）開発への展開も見据えて、食品素材由来のペプチドを豊富に含むサンプル中に、カイコの自然免疫を増強し、緑膿菌感染抵抗性をもたらすようなものが存在しないかを検索した。その結果、通常微生物学分野において培地の材料として用いられる「ポリペプトン」（カゼインや大豆タンパク質等をタンパク質分解酵素で消化したものの混合物）に当該活性が存在することが見出された。従って、本研究が対象とするような自然免疫増強活性を有するペプチド化合物は、我々が食品として日常的に摂取するような素材の中にも存在すると考えられる。経口で摂取する食品の生体作用を考える場合には、腸管透過性や腸管そのものへの作用解明が課題となるが、まずは上記サンプル中に含まれる活性物質の精製・同定を行い、ついでその作用メカニズムと応用可能性を検証していく所存である。

### （4）研究成果による今後の展望

これからの数年をかけて、本研究が提唱する「抗菌ペプチドは免疫調整作用をもつシグナル分子である」という仮説を、様々な角度から検証する必要がある。ただ科学的知見を開拓するだけでなく、技術的な応用可能性も追求すべきである。私は「抗菌ペプチドの免疫調整作用を担う分子基盤」を、生化学的および遺伝学的手法で追求し、哺乳動物における作用の検証と、将来的なヒト試験の実施に向けた科学基盤の構築を目指す。このような研究成果を、インパクトのある論文として発表し、「抗菌ペプチドと呼ばれる分子は、実は細胞間情報伝達を担う分子である」という新しい知見を広く主張したい。さらに、一度「抗菌ペプチドは免疫調整作用をもたらす分子である」というパラダイムが形成されれば、「抗菌ペプチド製剤を自然免疫活性化剤として感染制御に応用できるのではないかと」発想することが容易である。「自然免疫を標的とした感染制御」という本研究の中長期的目標はまさにそこにあり、ペプチド工学を専門とする研究者、臨床家、バイオ企業などとの協業を通じて感染症を克服するための新しい創薬を達成したいと考えている。