

博士学位論文

特異抗体を用いた新規免疫賦活活性測定法の
構築と高免疫賦活活性微生物製剤の開発

**Development of a new method for measuring
immunostimulatory activity using specific
antibodies and development of highly
immunostimulatory microbial preparations**

秋田大学大学院 理工学研究科 博士後期課程

総合理工学専攻 生命科学領域

保坂 善仁

2021

目次

	ページ
第1章 緒言	1
1-1 健康寿命	1
1-2 免疫	3
1-3 腸管免疫	3
第2章 特異抗体の特製	5
2-1 研究目的	5
2-2 サイトカイン	6
2-2-1 IL-12	6
2-2-2 IFN- γ	8
2-3 抗菌ペプチド	8
2-3-1 Human β -defensin (hBD)	9
2-4 実験方法	10
2-4-1 SDS-PAGE	10
2-4-2 Western blot 法	12
2-4-3 Recombinant proteins の発現	14
2-4-4 遺伝子クローニングとプラスミド構築	14
2-4-5 大腸菌による IL-12p35 および IFN- γ の発現	16
2-4-6 発現タンパク質の精製	17
2-4-7 抗体の特製	17
2-5 結果	18
2-5-1 IL-12p35 の発現と精製	18
2-5-2 IL-12p35 ポリクローナル抗体特製	18
2-5-3 IFN- γ の発現および精製	23
2-5-4 IFN- γ 抗体特製	23
2-5-5 hBD2 ポリクローナル抗体	27
2-6 小括	27
第3章 免疫賦活能を有する発酵食品及び微生物の探索	29
3-1 研究目的	29
3-2 <i>Rhizopus</i> 属	31
3-3 Tempeh	33
3-4 供試サンプル調製	34
3-4-1 納豆	34
3-4-2 Tempeh	34
3-4-3 <i>R. oligosporus</i> および <i>A. oryzae</i>	35
3-4-4 大豆	35

3-5	供試細胞	36
3-5-1	Caco-2 細胞	36
3-5-1-1	Caco-2 細胞の培養	37
3-5-1-2	Caco-2 細胞の分化誘導	37
3-5-2	THP-1 細胞	38
3-5-2-1	THP-1 細胞の培養	38
3-5-2-2	THP-1 細胞の分化誘導	39
3-6	腸管免疫モデル	39
3-7	実験方法	40
3-7-1	SDS-PAGE	41
3-7-2	Western blot 法	41
3-7-3	内在性コントロール (β -actin) の測定	41
3-7-4	Dot blot 法	42
3-7-5	Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 産生誘導の検討	43
3-7-6	IL-12、IFN- γ および hBD2 産生誘導能の測定	43
3-7-7	乳酸菌との比較試験	44
3-8	実験結果	44
3-8-1	Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 産生誘導の検討	44
3-8-2	IL-12、IFN- γ および hBD2 産生誘導能の探索	44
3-8-2-1	IL-12 産生誘導能	44
3-8-2-2	IFN- γ 産生誘導能	44
3-8-2-3	hBD2 産生誘導能	45
3-8-3	乳酸菌との比較試験	45
3-9	小括	52
第4章	THP-1 細胞を用いた貪食試験 (Phagocytosis assay)	55
4-1	貪食試験	55
4-2	実験方法	55
4-2-1	貪食試験用腸管免疫モデル	55
4-2-2	<i>Escherichia coli</i> TOP10 の FITC 標識 (1 well 分)	55
4-2-3	貪食試験	56
4-2-4	貪食後残存 <i>E. coli</i> TOP10 CFU 測定試験	57
4-3	実験結果	57
4-4	小括	59
第5章	総括	61
	参考文献	65
	研究業績	73
	謝辞	74

第1章 緒言

1-1 健康寿命

日本人の平均寿命は、男女共に世界でもトップクラスである反面、日常生活に支障をきたさない健康寿命は、男性で約8年、女性で約12年の乖離がある (Fig. 1)。さらに、少子高齢化の影響から、超高齢化社会における問題も多く抱えている[1]。海外の研究では、2007年に生まれた子供が103歳まで生きる確率が50%とも言われており[2]、いわゆる人生100年時代の到来が間近に迫りつつある。これを受けて日本政府も、2017年から「人生100年時代構想推進室」の看板を掲げ、様々な対策について議論がされている。

2000年に世界保健機関 (WHO) が提唱した健康寿命という概念を、日本では「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」と定義付けて、様々な取り組みを行い、2016年を起点として2040年までに、3年以上の健康寿命延伸を目標としている。その結果、男女共に健康寿命は年々延びている傾向にあるが、平均寿命との差は縮まらないのが現状である。この差は健康寿命の定義から見ると、日常生活に制限のある「不健康期間」を意味する。人生100年時代を迎えるにあたって、この差を縮める事は、個々人だけではなく社会においても非常に大きな意味を持つ。

厚生労働省が発表した令和元年 (2019) 人口動態統計月報年計[3]によると、日本人の死因は悪性新生物が最も多く27.3%、次いで心疾患15.0%、老衰8.8%、脳血管疾患7.7%、肺炎6.9%、誤嚥性肺炎2.9%である (Fig. 2)。中でも悪性新生物は50歳代~70歳代に多く、肺炎は60歳代から年齢が高くなるにつれて多くなる傾向にあり (Fig. 3)、加齢による免疫力の低下が否めない結果であると考えられる。免疫力は20歳代をピークとして低下が始まり、40歳代で50%程度、70歳代で10%程度まで低下すると言われている。つまり、免疫力を強化する事は、健康寿命の延伸だけではなく、平均寿命との差を縮める重要な因子であると考えられる。

健康寿命と平均寿命の推移

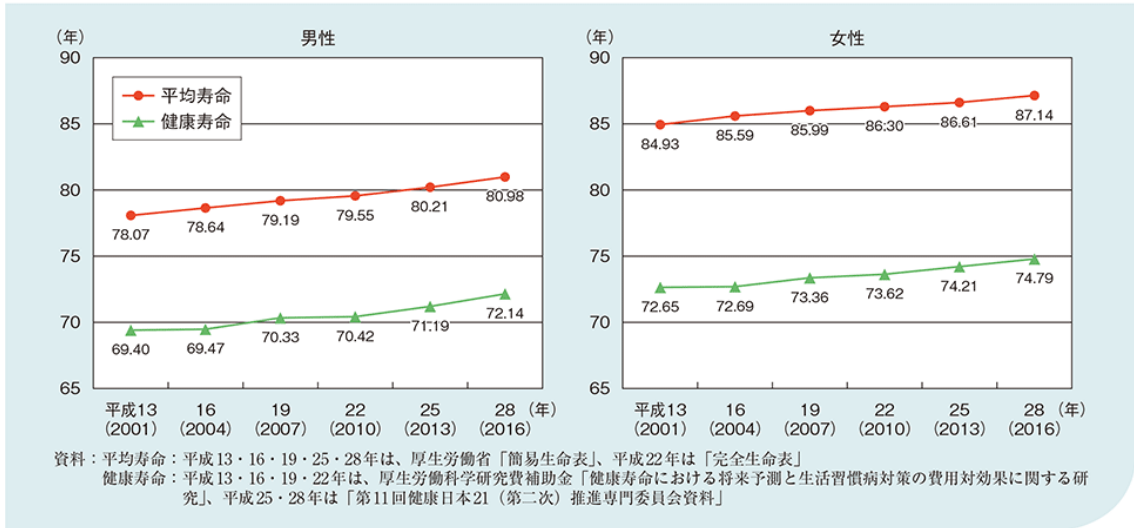


Fig. 1 健康寿命と平均寿命の推移

出展：内閣府 令和元年版高齢社会白書

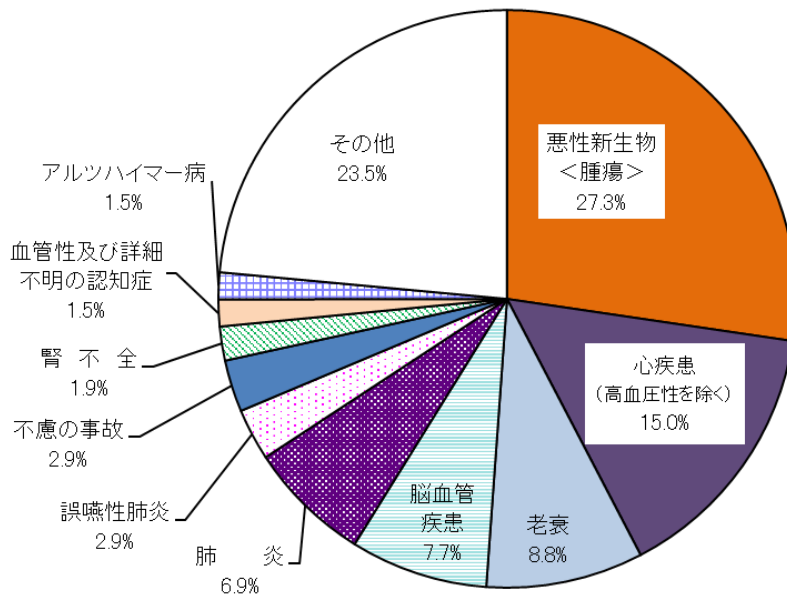


Fig. 2 主な死因別死亡数の割合

出展：厚生労働省 令和元年(2019)人口動態統計月報年計

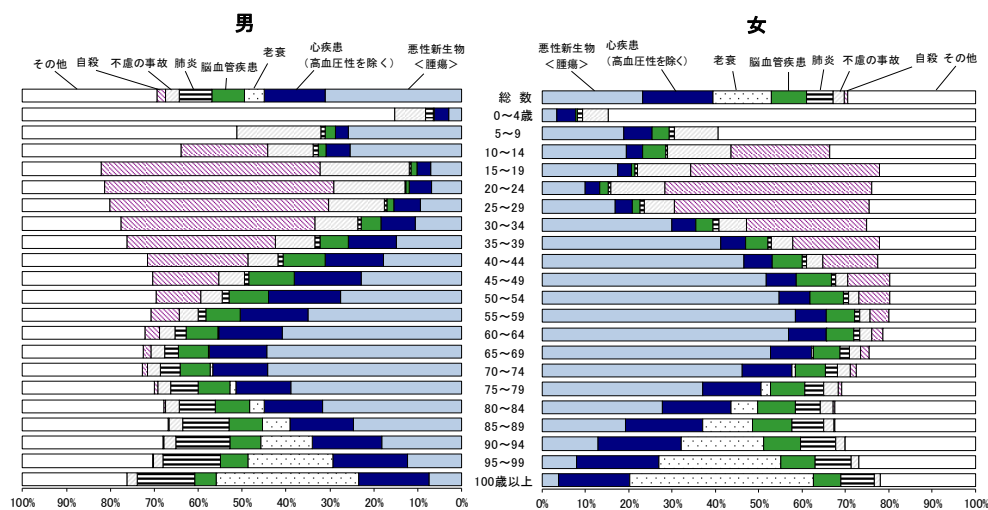


Fig. 3 性・年齢階級別にみた主な死因の構成割合 (2019)

出展：厚生労働省 令和元年（2019）人口動態統計月報年計

1-2 免疫

免疫には、自然免疫（非特異免疫）と獲得免疫（特異免疫）の2種類があり、自然免疫には、natural killer (NK) 細胞による防御、好中球やマクロファージによる貪食が含まれる。NK 細胞は大型のリンパ球で、細胞を傷害するための顆粒を有しており、がん細胞やウイルスに感染した細胞等、異常な細胞を発見して排除する。好中球やマクロファージのような貪食を行う細胞は食細胞と呼ばれ、感染初期に血管外で貪食を行い、リンパ球による特異的な免疫機構が活性化するまでの間の生体防御に働く。マクロファージには、貪食した抗原をリンパ球に提示することで獲得免疫を始動する役割もあり、反対にリンパ球の産生する液性因子が食細胞を活性化する等、両者は連動して免疫機構に関与している。

一方で、細菌・ウイルス等を抗原として認識し、特異的に攻撃する機能を獲得免疫という。初回接触時に抗原を認識・記憶することで成立し、再接触時には速やかに抗原を排除するように働く。この機構は、細胞性免疫と液性免疫で成り立っている。細胞性免疫は、キラーT細胞やマクロファージ等が主役となって抗原を排除する反応である。活性化ヘルパーT細胞の産生するサイトカインは、キラーT細胞の活性化やマクロファージの貪食能を促進する。液性免疫は、抗体が主役となって抗原を排除する反応である。活性化ヘルパーT細胞から分泌されるサイトカインは、B細胞の抗体産生を促進する。獲得免疫系では、細胞性免疫と液性免疫が補い合って、様々な抗原に対処している。

1-3 腸管免疫

ヒトの腸管には、全体の約70%もの免疫細胞が集中しており、腸管免疫と呼

ばれるシステムが構築されている。腸管には、リンパ球の密集構造であるリンパ小節があり、パイエル板と呼ばれる集合体を形成している。パイエル板は、上皮に覆われているが、その上皮には M 細胞という特殊な上皮細胞が散在している。M 細胞は細胞質が薄く、基底側にマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞や、リンパ球を抱え込んでいる。上皮下には、B 細胞の集団からなるリンパ小節があり、その周辺には T 細胞が多く存在している。M 細胞を通して侵入してきた抗原は、マクロファージ等の抗原提示細胞によって貪食され、T 細胞に抗原提示されることで免疫応答が誘導される。また、免疫細胞には toll-like receptor (TLR) や C-type lectin receptor (CLR) による免疫応答機構が存在している。これらは、細菌や真菌の構成成分、ウイルスの DNA、RNA 等を認識する受容体の一つで、細胞表面や細胞内小胞、エンドソームに局在し、細菌やウイルスに特有の構造を認識して、細胞内シグナル伝達を介してサイトカイン等の遺伝子発現を誘導する。例えば、グラム陰性菌の細胞壁構成成分である lipopolysaccharide (LPS) は TLR 4 + MD 2 複合体に、グラム陽性菌のペプチドグリカン、TLR 1 / TLR 2 および TLR 2 / TLR 6 ヘテロダイマー、酵母等の細胞壁成分 β -glucan は、CLR である Dectin-1 という様に、ターゲットごとに認識受容体異なる (Fig. 4)。

さらに、腸内には数千種、100 兆個を超える腸内細菌が存在するといわれており [4]、アミノ酸や炭水化物等の栄養素や胆汁酸の代謝、短鎖脂肪酸等の代謝産物の産生、ビタミン合成、病原菌に対する感染防御、腸管上皮細胞や免疫細胞の分化や成熟化等に関与している。腸管内では、これらの細菌叢と多くの免疫細胞により、様々な病原体や感染症による防御システムが構成されている。

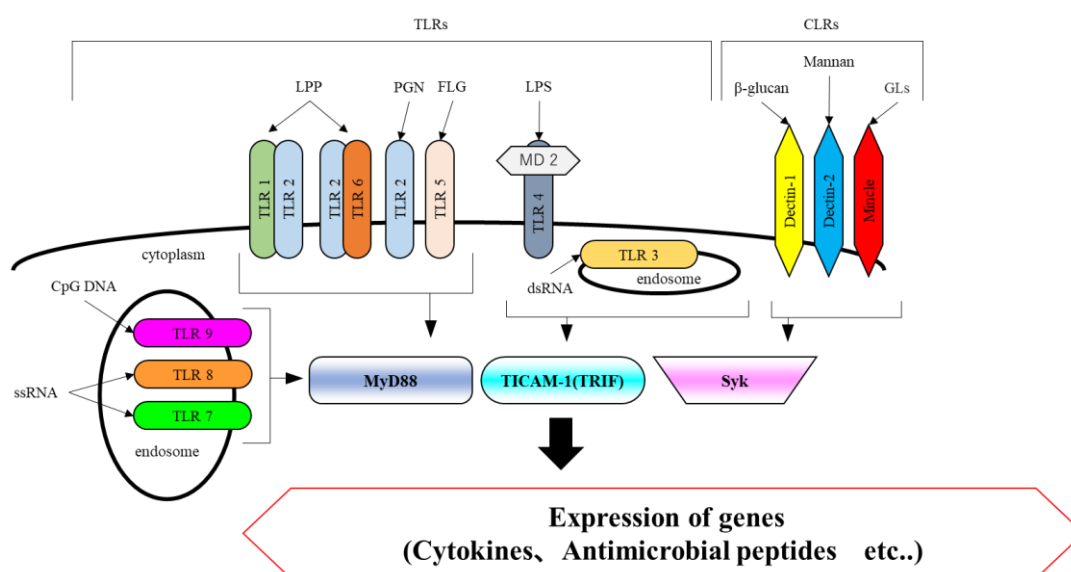


Fig. 4 腸管における TLRs および CLR

第2章 特異抗体の作製

2-1 研究目的

本研究では、食品を摂取することによる自然免疫への関与を評価するために、サイトカインである interleukin-12 (IL-12) および interferon-gamma (IFN- γ)、抗菌ペプチドである human β -defensin 2 (hBD2) の産生誘導を、抗体を使って評価することにした。IL-12 は p35 と p40 のヘテロダイマーであり、一般的に p40 抗体を用いて測定が行われているのだが、p40 は IL-23 のサブユニットも担っている。感染が起きた時、IL-23 は IL-12 よりも遅く産生される傾向がある。自然免疫と獲得免疫両方に関与する IL-12 に対して、IL-23 は獲得免疫にのみ関与するとも言われており[5]、IFN- γ の産生誘導も IL-12 より低いと言われている。また、p40 は IL-12 の拮抗作用を示すホモダイマーの形成も報告されているため[6]、p40 の測定による IL-12 の産生誘導評価では、同時に IL-23 や p40 ホモダイマーも検出されてしまうことが懸念される。そこで本研究では、IL-12 の産生誘導評価を p35 抗体によって行うことを考え、まずは大腸菌を用いて IL-12p35 組み換えタンパク質の発現を行い、抗原として実験動物に注射してポリクローナル抗体を得ることを本章の目的とした。

また、抗体は微量ながら非常に高価であるため、多検体スクリーニングに用いた場合はコスト面で問題が出てくる。そのことから本研究では、IFN- γ 、hBD2 についても IL-12p35 抗体と同様に作製して、スクリーニングが可能な手法を構築することとした。

抗体は目的タンパク質の検出はもちろんのこと、細胞内での発現量、その動態や局在性の有無まで、様々な実験に用いることができる。実験に適した抗体を作製する手段の一つとして、目的タンパク質を実験動物に注射して抗体を得る方法がある。これには、ある程度のタンパク質量が必要であるため、大腸菌を用いた組み換えタンパク質が用いられることが多い。大腸菌による組み換えタンパク質の発現は、真核生物を用いた時に比べて収集効率が良いというメリットがある。しかし、interleukin や interferon といったサイトカイン系のタンパク質や、大腸菌にとって毒性のある抗菌ペプチド等は、大腸菌による発現が困難とされている。そこで本研究では、目的サイトカインに glutathione S-transferase (GST) タグを結合させた融合タンパク質として発現させ、タグを切断して精製することで、実験動物に免疫するための精製タンパク質を得た。

2-2 サイトカイン

サイトカインは、様々な細胞によって産生される分子量数十 kDa 以下の可溶性糖タンパク質の総称であり、様々な生理活性を持つ細胞間伝達物質である。免疫細胞の遊走性を引き起こすケモカイン (IL-8、MCP-1、MCP-2)、造血幹細胞の分化・増殖を誘導する造血因子 (G-CSF、M-CSF)、細胞の分化・増殖を誘導する細胞増殖因子 (EGF、FGF、NGF、TGF)、腫瘍細胞の necrosis や apoptosis を誘導する細胞壊死因子 (TNF- α 、TNF- β) 等がある。免疫機能に大きく関与するサイトカインとしては、30 種類以上の存在が確認されている interleukin や、病原体の侵入や腫瘍細胞等の異物に対して分泌される interferon がある。これらは細胞性免疫や抗体産生、炎症反応、アレルギー反応等、ヒトの免疫調節に深く関与するサイトカインであり、Table 1 に示すように、それぞれ増強もしくは抑制する働きを持っている。すべてのサイトカインが単一の活性を示すとは限らず、レセプターやレセプターサブユニットを共有することで、複数のサイトカインが同じ活性を示すことも少なくない。

Table 1 生体内において増強もしくは抑制効果を示すサイトカイン

	増強	抑制
細胞性免疫	IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IL-21、IL-23、IL-27、IFN- γ	IL-4、IL-10
抗体産生	IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13	IFN- γ
炎症反応	IL-1、IL-6、IL-8、IL-16、IL-17、IL-18、IL-20、IL-22、IL-23	IL-4、IL-9、IL-10、IL-13、IL-35
アレルギー反応	IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、IL-16、IL-25	IL-8、IL-12、IL-18、IL-35 IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、

笠倉新平、松島綱治編「サイトカイン・ケモカインのすべて」株式会社日本医学館より抜粋、一部改変

2-2-1 IL-12

IL-12 は、分子量約 70 kDa (p70) の糖タンパク質であり、お互いに相同性のない 2 つのサブユニット (分子量約約 35 kDa の p35 と 40 kDa の p40) が、ジスルフィド結合によってヘテロダイマーを形成している (Fig. 5)。病原体が食細胞や顆粒球、樹状細胞の TLR を介して接触することで産生される。IL-12 は、主に T 細胞および NK 細胞における signal transducers and activator of transcription 4 (STAT4) を介した IFN- γ の誘導に作用するだけでなく [7]、T 細胞、NK 細胞の活性化を誘導する結果、免疫反応を促進する作用がある。ナイーブ T 細胞は IL-

IL-12 存在下で刺激を受け、Th1 細胞に分化して細胞性免疫が促進され、様々な細菌性感染症への抵抗性を高める。IL-12 が属するサイトカインファミリーには、他に IL-23、IL-27、IL-35、IL-39 があり、これらは 5 種類のサブユニットである p19、p28、p35、p40、epstein-barr virus induced-3 (Ebi3) の組み合わせにより、異なる作用を示すサイトカインとなっている (Table 2)。

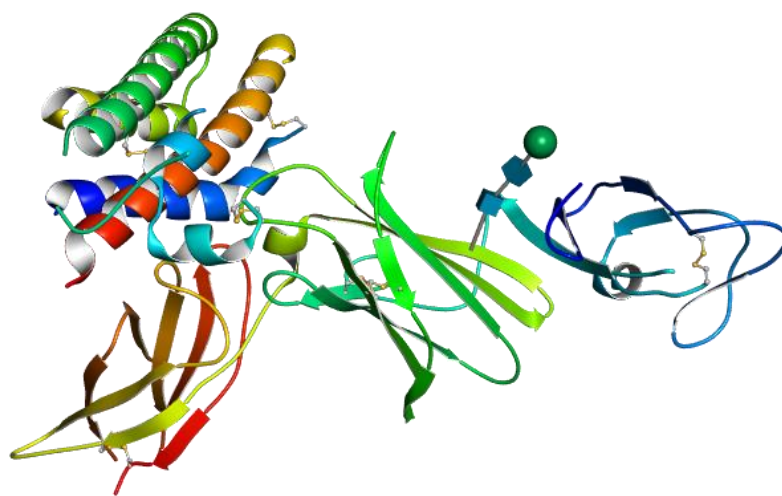


Fig. 5 IL-12

© 日本蛋白質構造データバンク (PDBj) licensed under CC 表示 4.0 国際 PDBID : 1F45

Table 2 IL-12 サイトカインファミリー

サイトカイン	α サブユニット	β サブユニット	作用
IL-12	p35	p40	免疫賦活、自然 / 獲得免疫
IL-23	p19	p40	炎症性サイトカイン、獲得免疫
IL-27	p28	Ebi3	免疫抑制
IL-35	p35	Ebi3	免疫調整、抗炎症
IL-39	p19	Ebi3	炎症誘導

2-2-2 IFN- γ

IFN- γ は、分子量約15 kDaの糖タンパク質もしくはタンパク質である(Fig. 6)。ウイルス感染やLPS刺激により、NK細胞やTh1細胞等から分泌される。NK細胞の活性化を誘導することで自然免疫を活性化し、ウイルス抗原を特異的に認識することで、細胞性免疫を活性化する。さらには、マクロファージの活性化を促して貪食能や殺菌能を高めることから[8]、自然免疫だけでなく獲得免疫においても重要な役割を持っている。

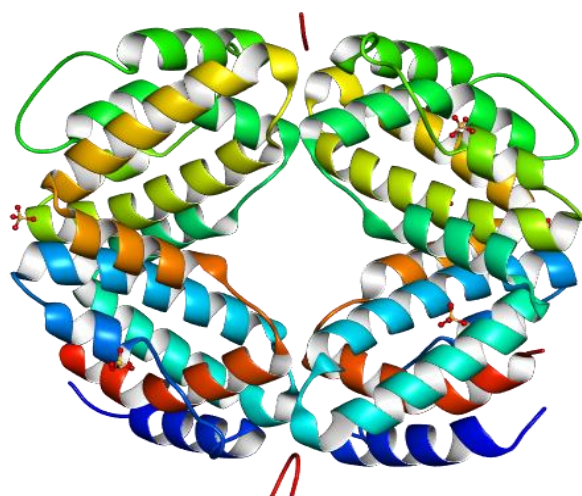


Fig. 6 IFN- γ

© 日本蛋白質構造データバンク (PDBj) licensed under CC 表示 4.0 国際 PDBID : 1EKU

2-3 抗菌ペプチド

抗菌ペプチドは、20~60程度のアミノ酸から成る、カチオン性ペプチドである。菌の細胞壁を直接破壊して殺菌作用を示し、抗生物質の様な耐性菌が生み出されにくい特徴がある[9]。生物が元来持ち合わせている生体防御機構として知られており[10]、感染初期に病原体の排除を行うといった自然免疫だけでなく、ケモカイン様作用や樹状細胞の分化誘導等、自然免疫と獲得免疫の架橋となる生体防御分子として考えられている。主に皮膚や口内等、外部との接触が起こる部位において産生されるが、中でも腸は、様々な病原菌との接触が頻繁に起こる部位であるため、多くの免疫細胞や腸管上皮細胞から、絶えず様々な抗菌ペプチドが産生されている。

ヒトの抗菌ペプチドには、唾液成分に含まれる *cystatin* や *histatin*、抗菌作用に加えて炎症の抑制もしくは促進作用を有する LL-37 の他に、様々な臓器や免疫

細胞で発現が見られる defensin がある。細菌や真菌だけでなく、原虫やウイルスといった広い抗菌スペクトラムを有しており、生体で産生が確認される部位と粘膜免疫が作用する部位、すなわち、病原菌の侵入が起こりやすい部位や、細菌叢が形成されている部位がほぼ一致している[11]。このことから、抗菌ペプチドは、生体防御機構の最前線で作用していると考えられている。

2-3-1 Human β -defensin (hBD)

Defensin は、大きく分けて α -defensin と β -defensin の二種類に分類されている。 α -defensin は好中球や粘膜上皮細胞 (paneth cell) に発現がみられ、 β -defensin は皮膚、肺、気管、腎臓、生殖器等の粘膜上皮に発現がみられる。比較的新しく発見された defensin は β -defensin に分類され、human β -defensin 1 (hBD1)、human β -defensin 2 (hBD2)、human β -defensin 3 (hBD3) が発見されている。hBD1 は恒常的に発現がみられ、外来菌の侵入防御を担っている[12]。hBD2 は皮膚、肺、気管だけでなく、全身の臓器で発現がみられる[13] (Fig. 7)。細菌感染や炎症性サイトカインによって発現が誘導されるという特徴があり[12][14]、肺炎等と密接な関係があると示唆されている。hBD1 や hBD2 は主にグラム陰性菌や真菌に対する抗菌作用を示す一方、hBD3 はグラム陽性菌に対しても強い抗菌作用を示す特徴がある[15]。また、hBD2 は樹状細胞や T 細胞の遊走性を引き起こすケモカインとしての作用も明らかとなっており、自然免疫と獲得免疫の両方において重要な役割を担っていると考えられている[16]。

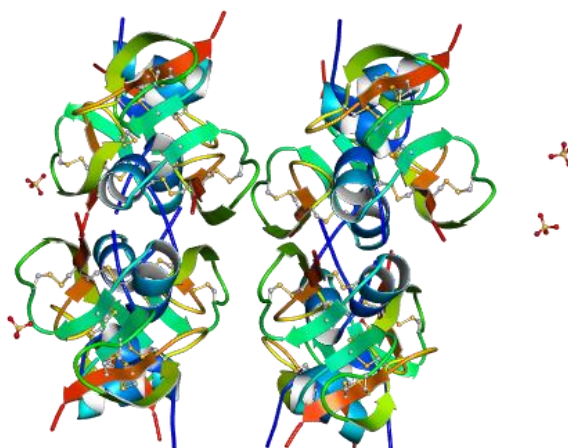


Fig. 7 hBD2

© 日本蛋白質構造データバンク (PDBj) licensed under CC 表示 4.0 国際 PDBID : 1FD4

2-4 実験方法

2-4-1 SDS-PAGE

SDS-PAGE は、タンパク質を分離する手法の一つである。タンパク質の荷電は種類によって異なるが、sodium dodecyl sulfate (SDS) を付加することによって、全体として負に荷電する。複合タンパク質のジスルフィド結合を、2-mercaptoethanol や dithiothreitol (DTT) 等の還元剤を用いて切断し、ポリアクリルアミドゲルのメッシュ構造を利用して、分子量の違いで分離することが可能である。ゲルは separating gel と stacking gel の 2 層からなり、separating gel を作製した後、stacking gel を重層する。一般に、分子量の小さいタンパク質ほど移動度が大きく、分子量の大きいタンパク質ほど移動度は小さい。そのため、目的とするタンパク質の分子量によって、ゲル中のアクリルアミドの濃度を変えなければならない。分離したタンパク質は銀染色や coomassie brilliant blue (CBB) 染色で可視化することができる。本研究では、Laemmli 法[17]に従った。

操作手順

- ・ separating gel を Table 3-1 の通り調製する
- ・ ゲル板に流し込む
- ・ 蒸留水を重層して固化
- ・ 蒸留水を除き、Table 3-2 の通り調製した stacking gel を流し込む
- ・ コームを差し込んで固化
- ・ 泳動装置 (BIO CRAFT) にセットし、(+) 極および (-) 極側に Laemmli buffer を入れる
- ・ コームを抜き、等量の 2× Sample buffer を添加して、100°C で 2 分間ヒートショックした泳動サンプルを適量アプライ
- ・ 1 時間電気泳動 (100 V-15 分、200 V-45 分)

CBB 染色

- ・ ゲルをゲル板から剥がし、CBB 染色液に浸す
- ・ 染色を促すために電子レンジで数秒加熱
- ・ 弱振盪
- ・ バンドが染色されたのを確認後、脱色液に浸す
- ・ バックグラウンドが脱色されるまで弱振盪
- ・ ゲルの撮影

Table 3-1 separating gel 組成表

separating gel	濃度 x %
Acrylamide : N,N'-bis Methylene Acrylamide (Bis) 30 : 0.8	$x/2$ ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	3.75 ml
10% SDS	0.15 ml
10% Ammonium persulfate (AMPS)	0.10 ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0.10 ml
Distilled water	$(11 - x)$ ml

Table 3-2 stacking gel 組成表

stacking gel	
Acrylamide:Bis 30 : 0.8	1.00 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	2.50 ml
10% SDS	0.10 ml
10% AMPS	0.10 ml
TEMED	0.05 ml
Distilled water	6.00 ml

—試薬調整—

Laemmli buffer

- 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane
- 384 mM Glycine
- 0.1% SDS

2× Sample buffer

- 0.5 M Tris-HCl buffer (pH6.5) 3.5 ml
- Glycerol 5 ml
- 10% SDS 5 ml
- Bromophenol Blue 10 mg
- Milli-Q 1.5 ml

*使用時、2-mercaptoethanol を 10%量添加

CBB 染色液

- 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250
- 25% 2-Propanol
- 10% 酢酸

脱色液

- 10% 2-Propanol
- 10% 酢酸

2-4-2 Western blot 法

Western blot 法は、タンパク質の検出法の一つである。複合タンパク質を SDS-PAGE 等により分離させた後、ゲルに電圧をかけてメンブレンに転写する。その後、目的とするタンパク質に特異的な一次抗体を反応させ、horseradish peroxidase (HRP) や alkaline phosphatase (AP) 等の酵素標識された二次抗体を反応させる。標識酵素に応じた発色基質を添加することで、間接的に特定のタンパク質を検出することができる。また、細胞培養液等の夾雑タンパク質が多く含まれるサンプルの場合、非特異的な交差反応が起こる可能性が考えられるが、そのような場合でも、Western blot 法を用いることで、特異的に目的タンパク質を検出することが可能である。

転写に用いるメンブレンは、主にニトロセルロースと polyvinylidene fluoride (PVDF) の 2 種類が使われる。ニトロセルロースメンブレンはバックグラウンドが出にくく、きれいなブロッティングを得られることが多い。しかし PVDF メンブレンと比較してタンパク質の結合能力が弱く、特に分子量の小さいタンパク質や、微量な内在性タンパク質等は検出しにくいことがある。そのため、目的タンパク質の性質等を考慮して、メンブレンの種類を選ぶ必要がある。

メンブレンに転写したタンパク質は、抗原抗体反応を用いて、発色法、化学発光法等で検出する。化学発光法は、各メーカーから超高感度な試薬が開発・市販されており、発色法よりもはるかに感度が高い。しかし、化学発光法には暗室と現像装置、あるいは CCD 撮影装置等の設備が必要となるため、簡便さという点では発色法の方が優れている。本研究では、Towbin 法[18]に従った。

操作手順

- ・ SDS-PAGE 終了後、Blot buffer で満たされた転写装置 (BIO CRAFT) を用いて PVDF メンブレン*にタンパク質を転写 (100 V、30 分)

* PVDF メンブレンは、ゲルの大きさに合わせて適当な大きさにカットし、メタノールに 1 分以上浸した後、Blot buffer に 5 分以上浸しておく。

- ・ 一次抗体を 7% skim milk in TBS に添加し、メンブレンを浸して室温で一晩反応 (弱振盪)
- ・ 一次抗体溶液を除去
- ・ Wash buffer を加えて 5 分洗浄 (弱振盪) × 3 回
- ・ Wash buffer を除去
- ・ 二次抗体を 7% skim milk in TBS に添加し、メンブレンを浸して室温で 60 分反応 (弱振盪)

- ・ 二次抗体溶液を除去
- ・ Wash buffer を加えて 5 分洗浄（弱振盪）× 3 回
- ・ 検出操作へ（AP 検出 or HRP 検出）

検出操作

→ AP 検出

- ・ AP buffer に各 0.33%量の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) solution および nitro blue tetrazolium (NBT) solution を添加
- ・ 暗所でインキュベート（室温）
- ・ メンブレンを蒸留水で洗浄後、乾燥
- ・ メンブレンをスキャナで PC に取り込む
- ・ ImageJ (NIH) で解析

→ HRP 検出

- ・ ECL chemiluminescence detection kit (GE healthcare lifesciences) の検出溶液 A と B を 1:1 で混合してワーキング溶液を作製
- ・ ワーキング溶液にメンブレンを浸す。
- ・ 暗所で 5 分インキュベート（室温）
- ・ ChemiDoc XRS⁺ (Bio-Rad) でメンブレンの撮影
- ・ ImageJ (NIH) で解析

—試薬調整—

Blot buffer

- ・ 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane
- ・ 192 mM Glycine
- ・ 5% Methanol

Wash buffer

- ・ 1 mM Tris-HCl buffer
- ・ 150 mM NaCl
- ・ 0.1% Tween-20

AP buffer

- ・ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH9.5)
- ・ 0.1 M NaCl
- ・ 5 mM MgCl₃

BCIP solution

- ・ 115 mM BCIP
- ・ *N,N*-dimethylformamide

TBS

- ・ 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)
- ・ 150 mM NaCl

NBT solution

- ・ 61 mM NBT
- ・ 70% *N,N*-dimethylformamide

2-4-3 Recombinant proteins の発現

宿主にとって毒性のあるタンパク質を発現する際、融合タンパク質として発現させる手法が多々用いられる。融合タンパク質とは、目的タンパク質の一部に、人為的にタグを導入することで、2種類以上の遺伝子が一体となって転写され、1つのタンパク質を形成している状態である。ポリペプチドタグである GST、maltose binding protein (MBP)、thioredoxin (TRX) 等は、不溶化しやすいタンパク質を、可溶化タンパク質として発現しやすくする働きがある。中でも GST は、目的とするタンパク質の N 末端に結合させた場合、安定した可溶性タンパク質を回収できることが多い。また GST は、毒性タンパク質を抱合して排出することで解毒化を図る酵素であり、毒性タンパク質の無毒化や、積極的に沈殿させて系外に排出するために利用されることが多い。

発現した目的タンパク質を抗原として抗体を作製する際には、タグ部分を特定の protease で切断する必要がある。Protease の認識配列は、発現ベクターの種類により異なり、Thrombin、Tobacco Etch Virus (TEV)、Factor Xa、PreScission protease 等の認識配列がある。このうち PreScission protease は、認識配列が比較的長いことから、切断精度が高いだけでなく、至適反応温度が 5°C 程度と低く、反応処理時における目的タンパク質の変性を防ぐことができる。

2-4-4 遺伝子クローニングとプラスミド構築

当初、pET-15b ベクターを用いた polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis 法により、Factor Xa の認識配列を TEV protease で切断可能な配列に置換したが、ヒト IL-12p35 に結合した TEV 配列は、TEV protease で良好に切断できず、精製することができなかった。そこで、GST 融合タンパク質として発現するために、GST を発現する pGEX-5X-3 ベクター (Cytiva) を用い (Fig. 8)、このベクターが持つ Factor Xa 認識配列を、human rhinovirus 3C (PreScission) protease で切断可能な配列 (PreScission protease 認識配列) に置き換えた。PreScission protease 認識配列は長鎖であることから、2回に分けて PCR を行うことで置換した (Table 4、Table 5)。

IL-12p35 遺伝子 (Table 6) および IFN- γ 遺伝子 (Table 7) を PCR で増幅し、In-Fusion システムを用いて、pGEX-5X-3 の PreScission protease 認識配列に挿入した。

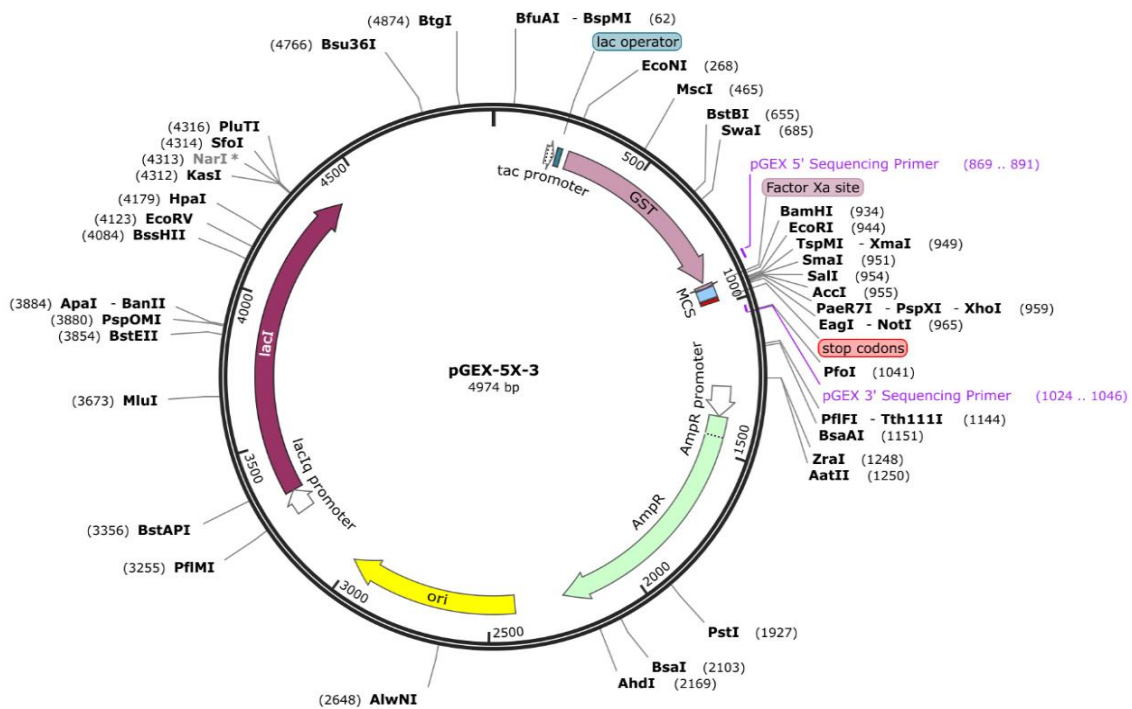


Fig. 8 pGEX-5X-3 plasmid

[https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pgex_vectors_\(ge_healthcare\)&plasmid=pGEX-5X-3&format=png](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pgex_vectors_(ge_healthcare)&plasmid=pGEX-5X-3&format=png)

Table 4 1st PCR

-Primer- (Greiner Japan)	
Forward : 5'-TCCTTGAAGTCCTTTTTCAAGGTCGTGGGATCC-3'	
Reverse : 5'-AAAGGACTTCAAGGATCAGATCCGATTTTGGAG-3'	
denaturation	98 °C、 10 sec
annealing	55 °C、 15 sec
extension	72 °C、 30 sec
	35 cycles

Table 5 2nd PCR

-Primer- (Greiner Japan)	
Forward : 5'-CAAGGTCCCGGATCCCCAGGAATTCC-3'	
Reverse : 5'-GATCCCGGACCTTGAAAAAGGACTT-3'	
denaturation	98 °C、 10 sec
annealing	55 °C、 5 sec
extension	72 °C、 30 sec
	35 cycles

Table 6 IL-12p35 遺伝子

-Primer- (Greiner Japan)	
Forward : 5'-GGATCCCCAGGAATTCCATGTGGCCCCCTGGGTCA-3'	
Reverse : 5'-AGTCACGATGCGGCCTTAGGAAGCATTTCAGATAGC-3'	
denaturation	94 °C、30 sec
annealing	59 °C、30 sec
extension	72 °C、35 sec
	35 cycles

Table 7 IFN- γ 遺伝子

-Primer- (Greiner Japan)	
Forward : 5'-GGATCCCCAGGAATTCCATGAAATATACAAGTTATATCT-3'	
Reverse : 5'-AGTCACGATGCGCCTTACTGGGATGCTCTTCGA-3'	
denaturation	94 °C、30 sec
annealing	59 °C、30 sec
extension	72 °C、20 sec
	35 cycles

2-4-5 大腸菌による IL-12p35 および IFN- γ の発現

毒性タンパク質の発現に適した大腸菌株である OverExpress C41 (DE3) pLysS (Lucigen) の competent cell に、2-4-4 で構築した pGEX-5X-3 ベクターを組み込んだ。1 mg/ml の ampicillin を含む培地で、プラスミドを取り込んだ大腸菌を増殖させ、isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して、GST タグ付き IL-12p35 および IFN- γ を発現した。

操作手順

- ・ LB 培地 (DIFCO) をオートクレーブ滅菌 (121°C、20 分)
- ・ 適宜冷却後、0.1 mg/ml の ampicillin を添加
- ・ OverExpress C41 (DE3) pLysS を接種
- ・ 37°C、16 時間、250 rpm で振盪培養 (前培養)
- ・ 同培地 1.2 L に (ampicillin 0.1 mg/ml 含有 LB 培地) 前培養液を接種
- ・ 37°C、16 時間、250 rpm で振盪培養 (拡大培養)
- ・ OD₆₆₀ 測定 (0.6 以上)
- ・ IPTG 添加 (IL-12p35 : 0.5 mM、IFN- γ : 0.1 mM)
- ・ 37°C、3 時間、250 rpm で振盪培養

- ・ 遠心分離 (4°C、13,000 rpm、15 分)
- ・ 上清除去
- ・ 沈殿を 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁
- ・ 冷凍保存 (-30°C)

2-4-6 発現タンパク質の精製

発現した各タンパク質 (IL-12p35、IFN- γ) は、大腸菌を超音波破碎し、カラム精製した後に SDS-PAGE (2-4-1) で分離した。目的バンドを切り出し、電気泳動で溶出することで目的タンパク質を得た。

操作手順

- ・ 回収菌体を超音波破碎
- ・ 遠心分離 (4°C、13,000 rpm、15 分)
- ・ 上清除去
- ・ 不溶性画分を 1 M arginine を含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) に懸濁
- ・ 遠心分離 (4°C、13,000 rpm、10 分)
- ・ 上清を脱塩カラム (Bio-Gel p10 gel, BioRad) に通して arginine を除去
- ・ PreScission 消化バッファー (終濃度 : 50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、10 mM EDTA、1 mM DTT、pH 7.0) と PreScission protease を添加
- ・ インキュベーション (4°C、16 時間)
- ・ 2× Sample buffer を添加
- ・ ヒートショック (100°C、2 分)
- ・ SDS-PAGE で分離
- ・ CBB 染色
- ・ 脱色
- ・ 目的タンパク質のバンドを切り出し、Laemmli buffer で透析 (4°C、16 時間)
- ・ ゲルをカッターで細かく刻む
- ・ 電気泳動でタンパク質を溶出

2-4-7 抗体の作製

SDS-PAGE ゲルから溶出した IL-12p35、または IFN- γ を、complete freund's adjuvant と混合して乳化させ、1 ml をウサギに筋肉内注射した。追加免疫は 2 ml で行い、2 週間ごとに同じ方法で 3 回注射した。3 回目の免疫から 10 日後に、全採血してポリクローナル抗体を得た。動物実験のプロトコルは、秋田大学医学部動物研究委員会によって事前に承認されており、当大学の「動物実験ガイドライン」を遵守して行った。

作製した IL-12p35 および IFN- γ のポリクローナル抗体の特異性および力価は、IL-12p70 ヒト組換え体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) もしくは IL-12 Recombinant Human Protein (Gibco)、Human IFN-gamma Recombinant Protein (Gibco) と細胞培養液上清を用いて、Western blot 法 (2-4-2) により評価した [19]。

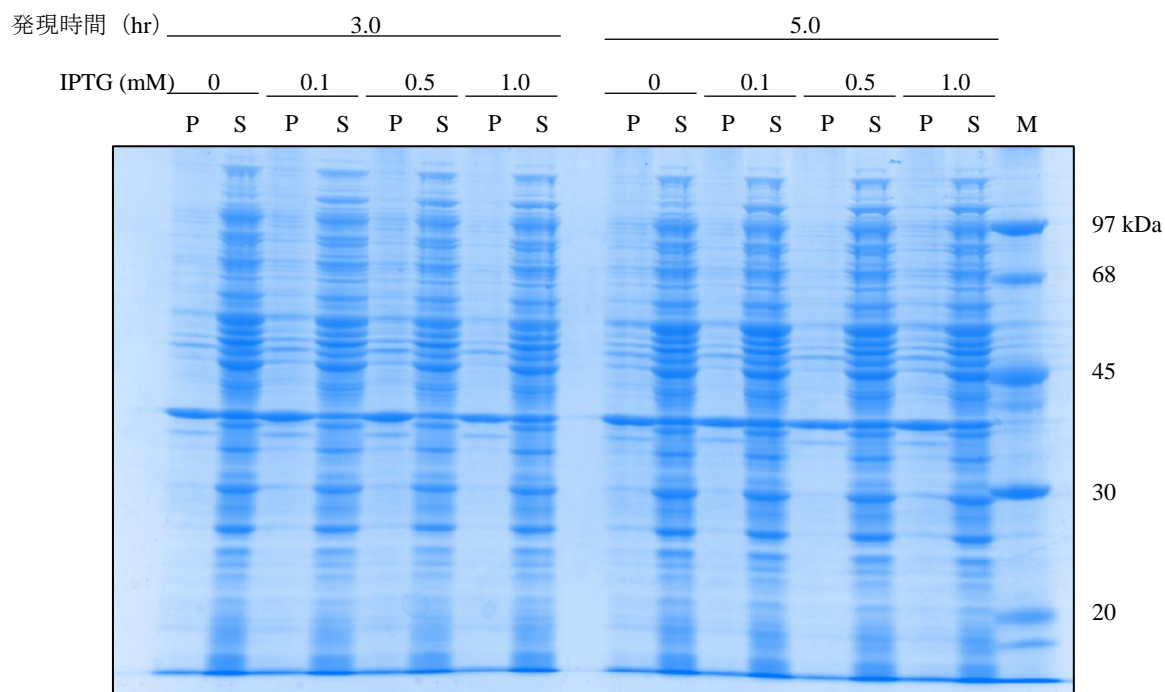
2-5 結果

2-5-1 IL-12p35 の発現と精製

IL-12p35 に対する特異的なポリクローナル抗体を得るために、このタンパク質を発現するベクターを構築し、大腸菌により発現させて精製した。pET-15b ベクターと OverExpress C41 (DE3) pLysS competent cell を用いた系では、約 35 kDa のバンドは確認されず、IL-12p35 は全く発現しなかったと考えられた (Fig. 9)。そこで、pGEX-5X-3 ベクターを用いて、GST 融合タンパク質として IL-12p35 の発現を試みた。p35 は約 35 kDa、GST は約 26 kDa であるので、約 60 kDa 付近に出現したバンドが GST 融合 IL-12p35 であると推測される。その結果、不溶性画分において目的とするバンドの出現が確認された (Fig. 10)。このバンドを arginine で可溶化処理後、脱塩カラムで arginine を除去し、GST タグを PreScission protease で消化した (Fig. 11)。GST タグの外れた IL-12p35 のバンドを切り出して、電気泳動で精製した (Fig. 12)。

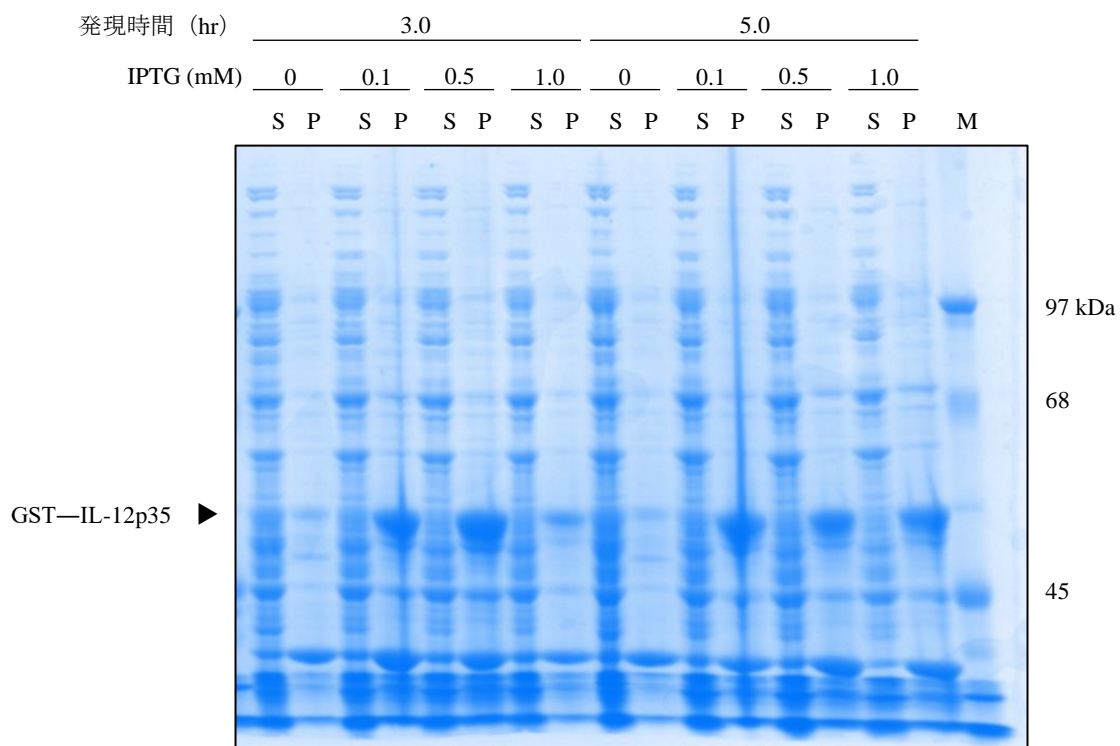
2-5-2 IL-12p35 ポリクローナル抗体作製

精製した IL-12p35 をウサギに免疫し、IL-12p35 ポリクローナル抗体を得た。IL-12p70 ヒト組換え体 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて Western blot した結果、シングルバンドとして検出が可能であった (Fig. 13)。同タンパク質について、IL-12p40 抗体 (NOVEX) を用いた場合に検出される p40 のバンド (Fig. 14) は、p35 ポリクローナル抗体では確認されなかったことから、IL-23 や p40 ホモダイマーとの交差反応による偽測定を回避できる可能性が示唆された。また、濃度依存的に検出することが確認され (Fig. 15)、直線性の高い検量線を得ることができ、決定係数 (R^2) は 0.9992 であった (Fig. 16)。この時供試した IL-12 (Gibco) は、chinese hamster ovary (CHO) 細胞由来であることから、糖鎖修飾と思われるバンドパターンが確認されたが、IL-12p35 を特異的に検出することが可能であると示唆される。夾雑タンパク質が多い細胞培養液上清についても、交差反応が起こらずに、特異的に IL-12p35 の検出が可能であった (Fig. 17)。



S : supernatant、P : precipitate、M : marker

Fig. 9 pET-15b ベクターを用いた IL-12p35 の発現



S : supernatant、P : precipitate、M : marker

Fig. 10 pGEX-5X-3 を用いた IL-12p35 の発現

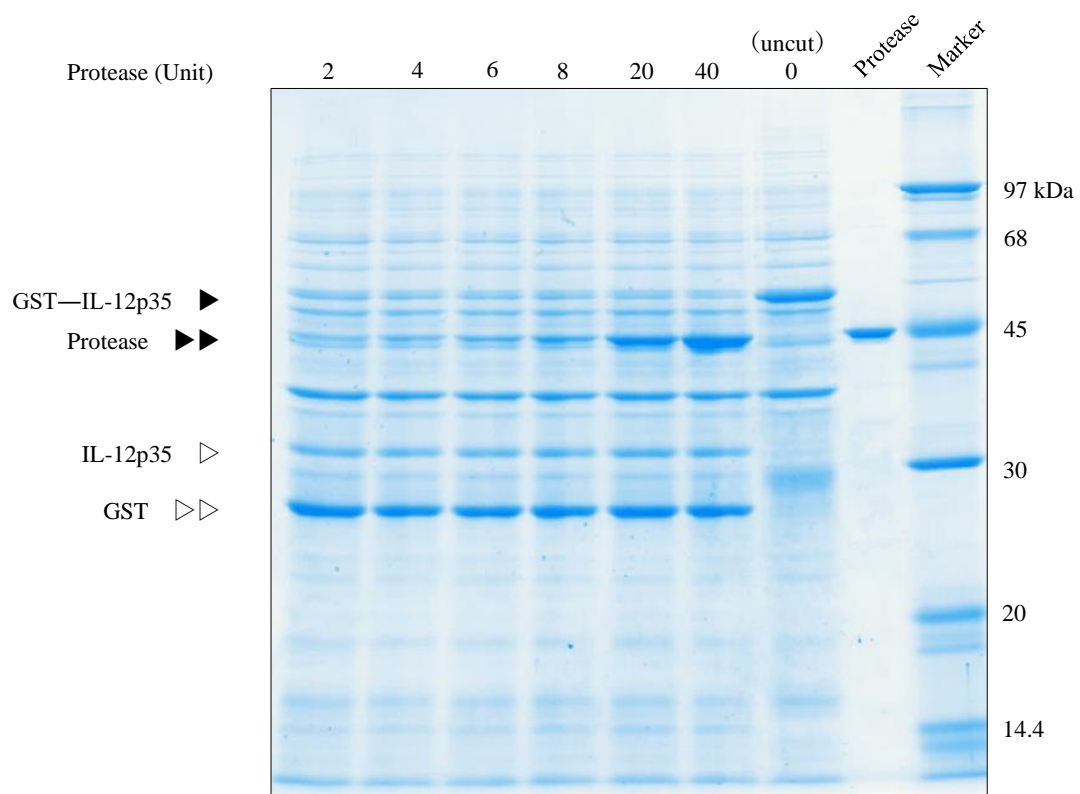


Fig. 11 GST 融合 IL-12p35 の PreScission protease 処理

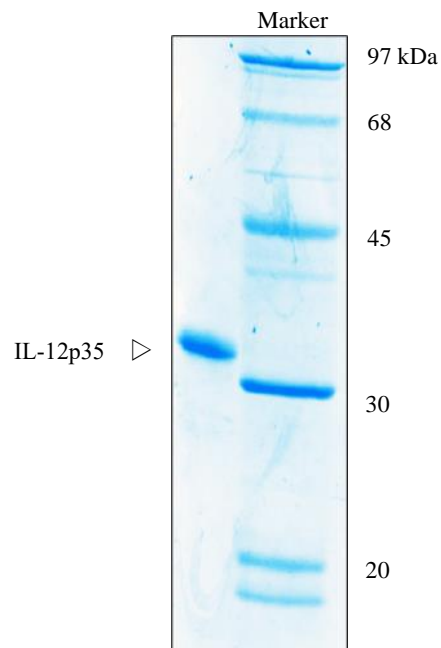


Fig. 12 PreScission protease 処理後の IL-12p35

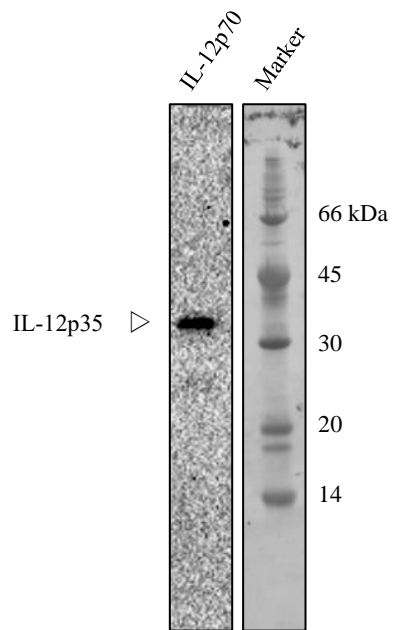


Fig. 13 IL-12p35 ポリクローナル抗体

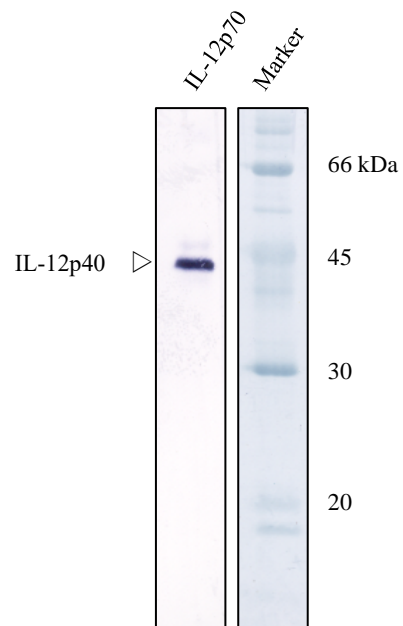


Fig. 14 IL-12p40 モノクローナル抗体 (NOVEX)

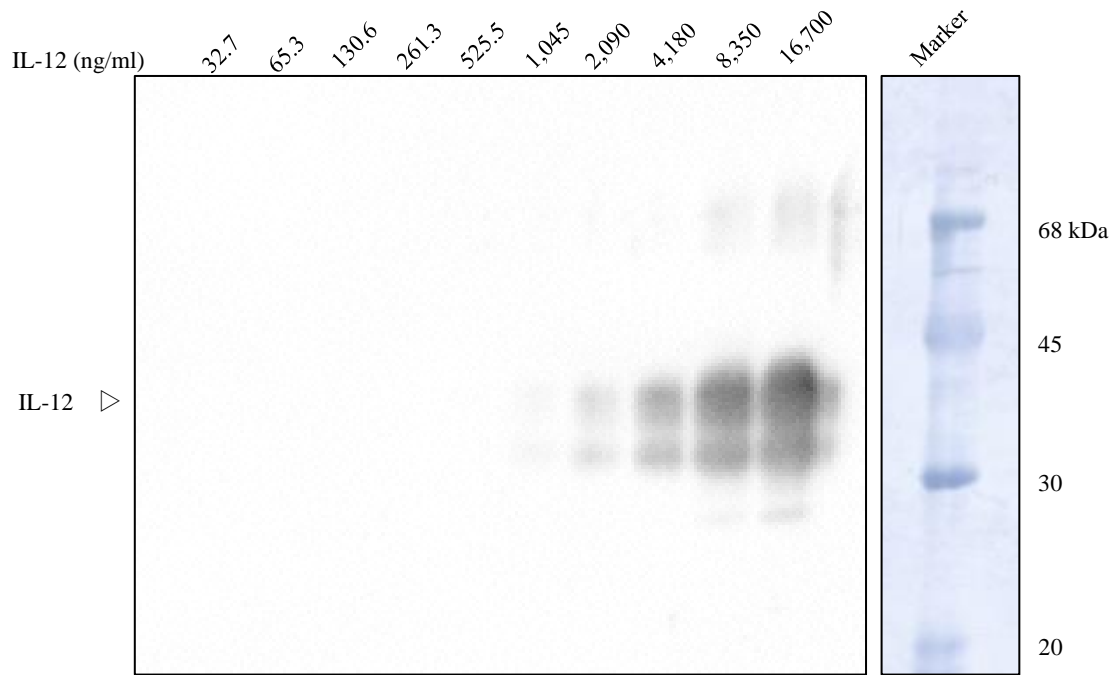


Fig. 15 IL-12p35 ポリクローナル抗体を用いた IL-12 の濃度別 Western blot 結果

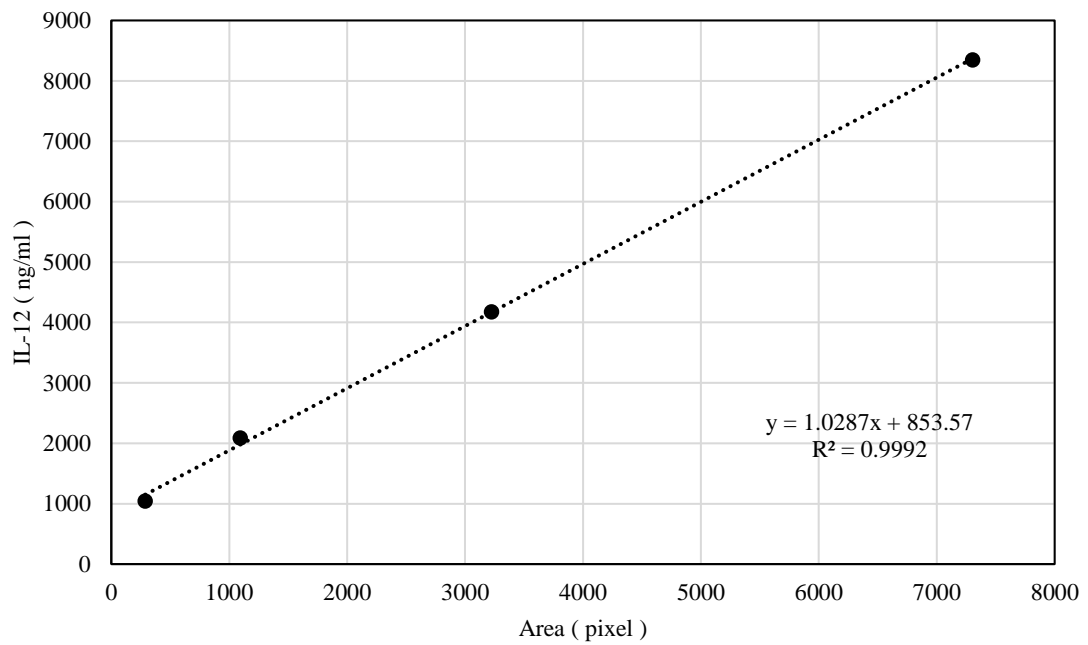


Fig. 16 IL-12p35 ポリクローナル抗体検量線

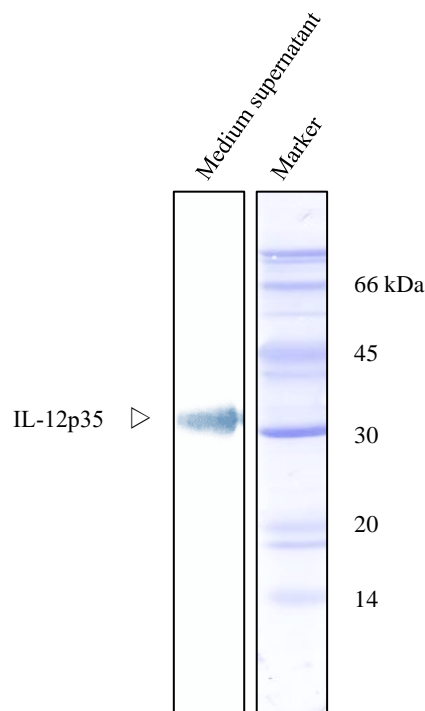


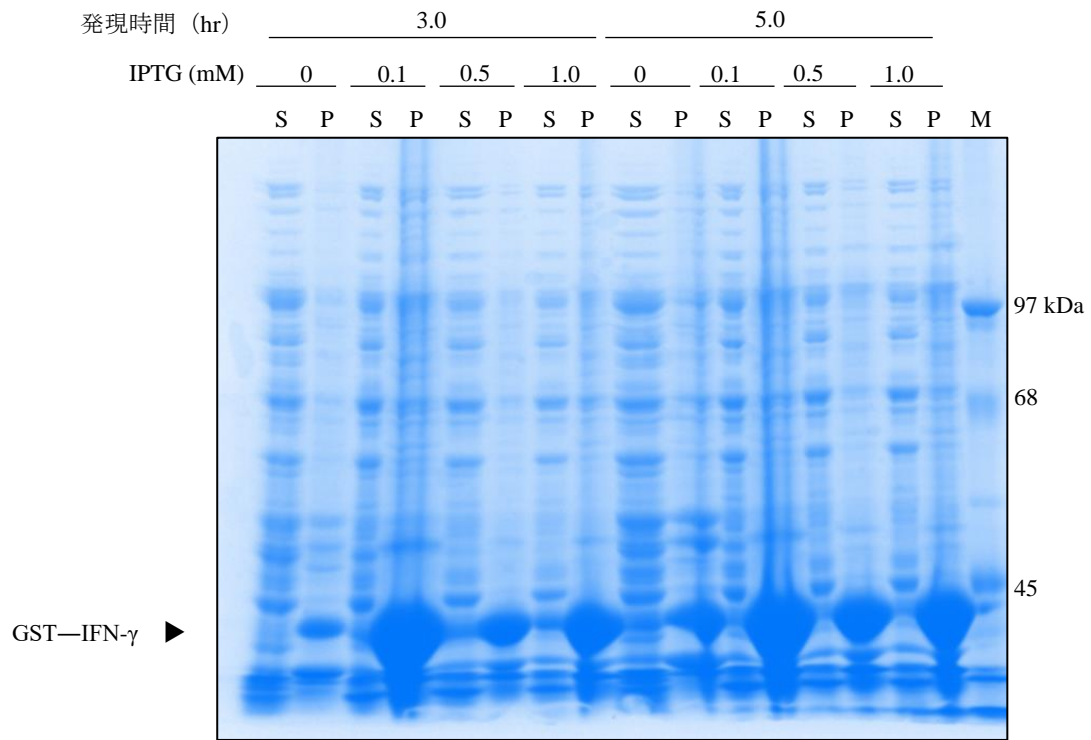
Fig. 17 細胞培養液上清を用いた Western blot (IL-12p35)

2-5-3 IFN- γ の発現および精製

IFN- γ は約 15 kDa、GST は約 26 kDa であるので、約 40 kDa 付近に出現したバンドが GST 融合 IFN- γ であると推測される。Fig. 18 に示すように、GST 融合 IFN- γ は主に不溶性画分で発現が確認された。IL-12p35 同様に arginine にて可溶化処理後、脱塩カラムで arginine を除去し、GST タグを PreScission protease で消化した (Fig. 19)。GST タグの外れた IFN- γ のバンドを切り出し、電気泳動で精製した。

2-5-4 IFN- γ 抗体作製

精製した IFN- γ をウサギに免疫し、IFN- γ ポリクローナル抗体を得た。ヒト組換え IFN- γ (Gibco) を用いて Western blot した結果、シングルバンドとして検出が可能であった (Fig. 20)。用量依存的にヒト組換え IFN- γ の検出が確認され、(Fig. 21) 直線性の高い検量線を得ることができ、決定係数 (R^2) は 0.9996 であった (Fig. 22)。細胞培養液を用いても、夾雑タンパク質との交差反応は見られず、特異的に検出することが可能であった (Fig. 23)



S : supernatant、P : precipitate、M : marker

Fig. 18 pGEX-5X-3 を用いた IFN- γ の発現

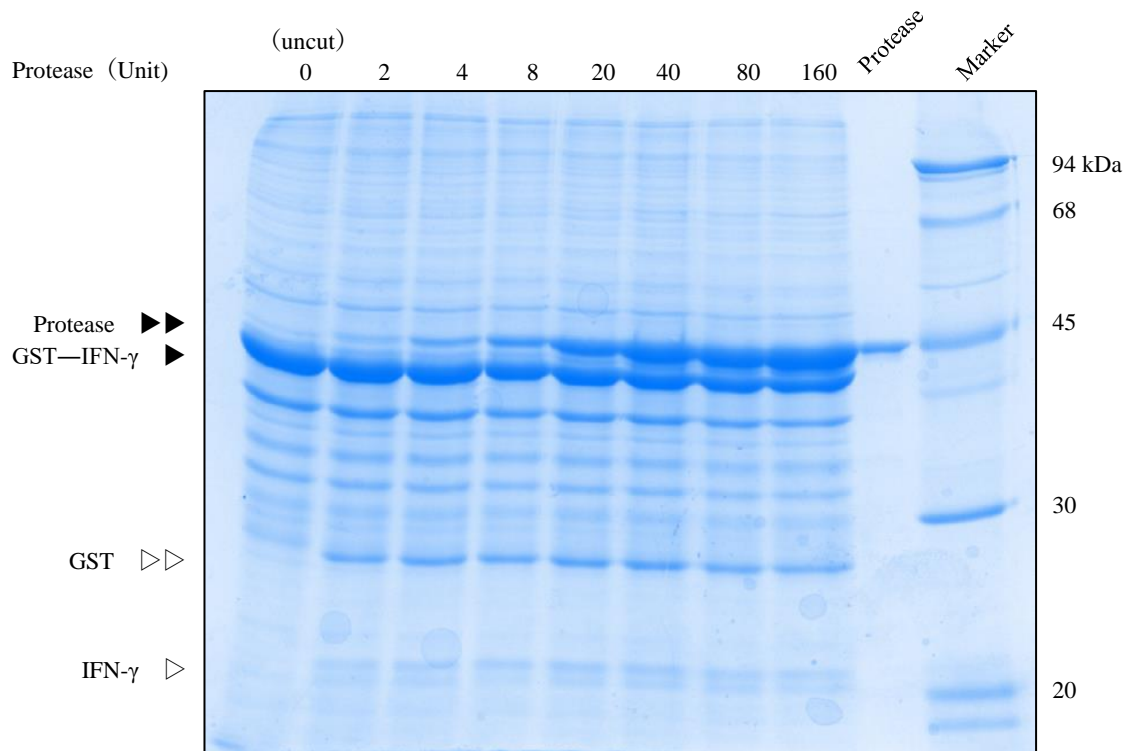


Fig. 19 GST 融合 IFN- γ の PreScission protease 処理

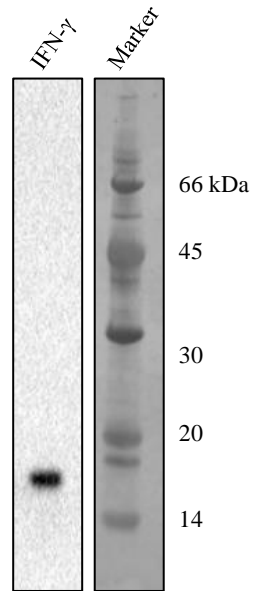


Fig. 20 IFN- γ ポリクローナル抗体

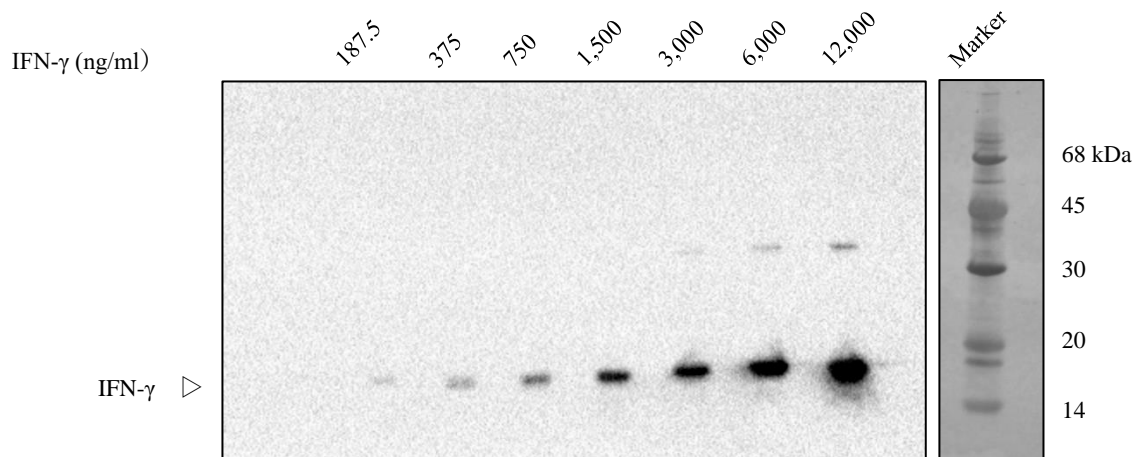
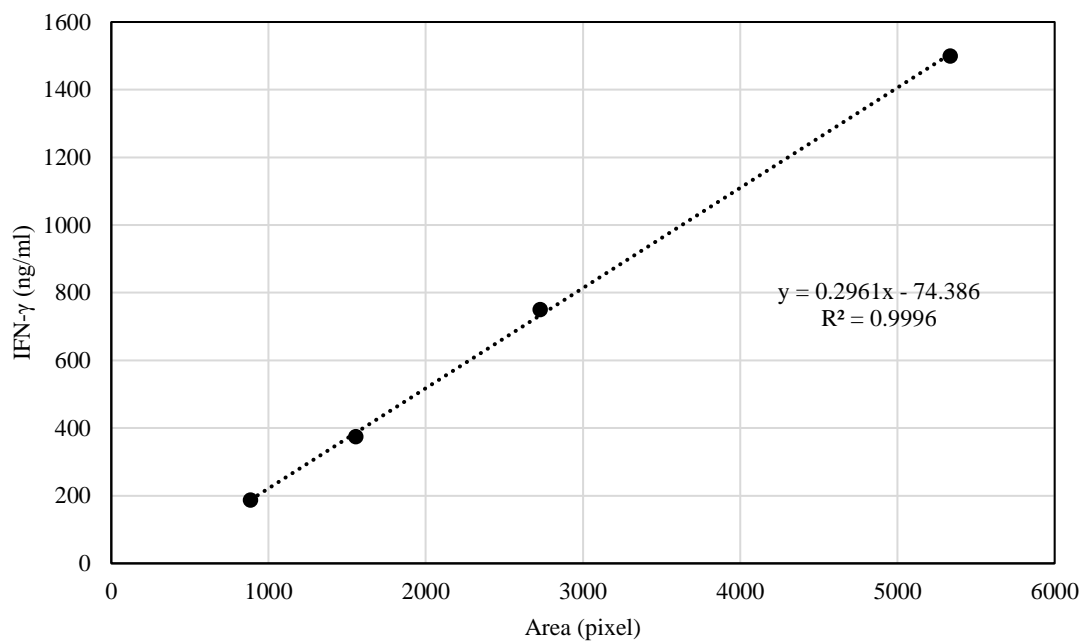
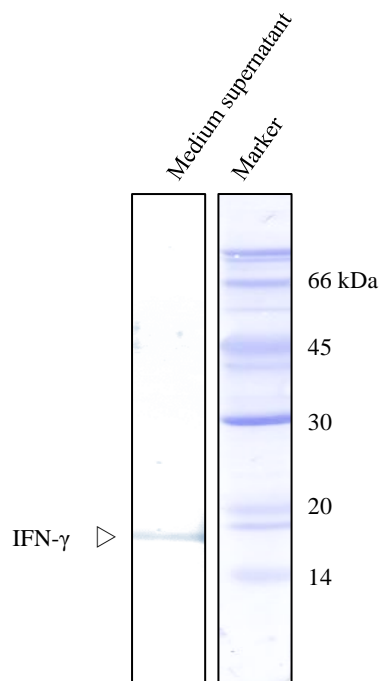


Fig. 21 IFN- γ ポリクローナル抗体を用いた IFN- γ 濃度別 Western blot 結果

Fig. 22 IFN- γ ポリクローナル抗体検量線Fig. 23 細胞培養液上清を用いた Western blot (IFN- γ)

2-5-5 hBD2 ポリクローナル抗体

抗菌ペプチドである hBD2 は、pGEX-5X-3 ベクターを使った GST 融合タンパク質発現法でも発現することができなかった。そこで、合成ペプチド（株式会社ペプチド研究所）（Table 8）を入手し、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を得た。（2-4-7）

Table 8 β -Defensin-2 (Human) アミノ酸配列

<p>β-Defensin-2 (Human) (Code: 4338-s)</p>	<p>Gly-Ile-Gly-Asp-Pro-Val-Thr-Cys-Leu-Lys-Ser-Gly-Ala-Ile-Cys-His-Pro-Val-Phe-Cys-Pro-Arg-Arg-Tyr-Lys-Gln-Ile-Gly-Thr-Cys-Gly-Leu-Pro-Gly-Thr-Lys-Cys-Cys-Lys-Lys-Pro</p> <p>(Disulfide bonds between Cys8-Cys37, Cys15-Cys30, and Cys20-Cys38)</p> <p>(M.W. 4328.2) C188H305N55O50S6</p>
---	--

引用：株式会社ペプチド研究所

2-6 小括

IL-12 は、p40 と p35 がジスルフィド結合したヘテロダイマーで、分子量約 70 kDa のサイトカインである。細胞性免疫の増強効果や、T 細胞や NK 細胞からの IFN- γ 産生を誘導する作用がある[7]。免疫賦活効果のある機能性食品の開発の際に指標にされることが多く、immunoassay をするための抗体も多く市販されている。サブユニットである p40 は、感染防御において非常に重要な役割をもつと考えられている[20][21][22]。この p40 は、p19 と結合すると IL-23 と呼ばれるサイトカインになる。IL-23 は、組織特異的自己免疫の発症に関わるサイトカインであるが、p40 をサブユニットとしていることから、IL-12 と似たような感染防御に関与する一面もある。ただし、生体に感染源が侵入した際には、IL-12 のほうが IL-23 よりも先に産生される[5]。また、自然免疫には関与せず、獲得免疫のみに関与するといわれている一方、IL-12 は両方の免疫反応に関与する。

p40 は、感染時に p35 や p19 よりも多く産生される傾向がある。過剰産生された p40 はホモダイマーを形成し、IL-12 レセプターの一つである IL-12R β 1 と結合することで、生理活性を抑制する可能性が示唆されている[6]。

これまでの IL-12 測定法は、p40 をターゲットとして評価されてきた。しかし、IL-23 や、p40 ホモダイマーの同時検出も懸念されることから、免疫賦活活性の評価として IL-12 を測定する際は、p35 の測定が重要と考えた。ところが、市販されている IL-12 抗体の多くは p40 抗体であるため、本研究では p35 抗体の作製を試みた。そこで、pET-15b ベクターと OverExpress C41 (DE3) pLysS competent cell を用いて、IL-12p35 の発現を試みたが、大腸菌の増殖にとって有害である IL-12p35 は、この系では発現しなかった。そこで、毒性タンパク質の解毒化作用を

有する GST を目的タンパク質にタグ付けすることができる pGEX-5X-3 ベクター (Cytiva) を用いて、IL-12p35 の GST 融合タンパク質の発現を試みた。その結果、不溶性画分で発現が確認され (Fig. 10)、結合配列 (PreScission protease 認識配列) を PreScission protease 処理により切断することで、IL-12p35 を精製することに成功した (Fig. 11、Fig. 12)。精製した組み換えタンパク質をウサギに繰り返し免疫し、特異的なポリクローナル抗体を得ることができた。IL-12p70 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて、このポリクローナル抗体を評価したところ、市販の IL-12p40 抗体 (NOVEX) で確認された約 40 kDa のバンドは出現せず、p35 と思われる約 35 kDa のバンドが確認された (Fig. 13、Fig. 14)。CHO 細胞由来であるヒト IL-12 (Gibco) を適宜希釈して Western blot した結果、直線性の高い検量線を得ることができた (Fig. 16)。この時は約 40 kDa 付近のバンドが確認されたが、Fig. 13 で p40 との交差反応が見られなかったことから、糖鎖修飾を受けているタンパク質であると推測される。細胞培養液上清を用いた時も、夾雑タンパク質との交差反応が見られなかったことから (Fig. 17)、特異性の高いポリクローナル抗体を得ることができたと考えられる。

IFN- γ は、肝炎や癌治療等の製剤としての利用や、肝炎の病態把握への応用が報告されている[23]。Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) と呼ばれるサイトカインは、マクロファージ前駆体細胞を破骨細胞へと分化させる働きがあるが、IFN- γ はこの RANKL シグナル分子である TNF receptor-associated factor 6 を阻害することから、骨代謝との関連も報告されている[24]。このように、IFN- γ は免疫賦活活性の指標としてだけでなく、様々な利用が期待されている。

そこで、IFN- γ についても同様に pGEX-5X-3 ベクターを構築して、GST 融合タンパク質として発現することに成功し (Fig. 18)、精製した IFN- γ をウサギに繰り返し免疫することで、IFN- γ ポリクローナル抗体も得ることができた (Fig. 20)。ヒト IFN- γ (Gibco) を適宜希釈して Western blot した結果、直線性の高い検量線を得ることができた (Fig. 22)。細胞培養液上清についても交差反応が見られず、IL-12p35 同様に特異性の高いポリクローナル抗体であった (Fig. 23)。

このタンパク質発現法は、当研究室においてヒト全長 Arylhydrocarbon receptor (AhR) のような、発現の悪いタンパク質の発現・精製に成功した報告から応用されたものであり[25]、他の難発現タンパク質の発現にも非常に有効な手法となることが期待される。

hBD2 についても同様に、GST 融合タンパク質としての発現を試みたが、発現させることができなかった。この原因としては、hBD2 が大腸菌を含むグラム陰性菌に対して強い抗菌作用を示すことや、分子量が小さいために、精製できるほどの発現量を得られなかった可能性が示唆される。

第3章 免疫賦活能を有する発酵食品及び微生物の探索

3-1 研究目的

食品には、3つの大きな機能性があると言われている。生命を維持するのに必要不可欠な栄養素（糖質、脂質、タンパク質等）を補給する一次機能[26]。食品成分あるいは食品自体がヒトの五感を刺激し、嗜好性を高める二次機能[27]。食品成分（食物繊維、ポリフェノール等）の持つ生体調節機能（三次機能）[28]である。中でも、三次機能が働くように設計、加工された食品を機能性食品と呼び、作用の違いから、プロバイオティクス、プレバイオティクス、バイオジェニックスの3つに分類されている（Table 9）[29]。バイオジェニックスは生体に直接作用し、免疫賦活作用、抗変異原作用、抗酸化作用、ストレス抑制、高血圧・高コレステロール症の予防といった、様々な生理活性作用を示す。機能性のメカニズムは、免疫系を刺激することでサイトカインが分泌され、神経系、内分泌系に働くことで、効果が発揮されると考えられている（Fig. 24）[30]。

機能性食品はその効果の多様性から、健康維持や健康寿命の延伸に非常に大きな貢献が期待されており、様々な研究開発の結果、多くの商品が市場に出回っている。中でも乳酸菌は顕著な例で、20種類を超える乳酸菌の菌株が、機能性表示食品として届け出されている。乳酸菌は非常に多くの発酵食品に用いられる微生物であり、味噌、醤油、酒、漬物といった日本古来のものから、チーズ、ヨーグルトへの利用等、世界中で馴染みの深い微生物である。しかし、発酵には他にも数多くの微生物が関与しているが、乳酸菌以外の微生物による免疫賦活活性については、まだ研究が少ないのが現状である。一方、これらの発酵食品が持つ多くの機能性について評価している報告もある[31][32]。永尾らは、味噌の原料である大豆のイソフラボン類が、IL-12の産生を促進すると報告しており[33]、発酵食品が免疫賦活能を有する結果となっている。つまり、発酵食品は微生物や食品成分によるバイオジェニックス効果が期待される、非常に身近な食品であると考えられる。

そこで本章では、乳酸菌と同等もしくはそれ以上のIL-12産生誘導に加え、高いIFN- γ およびhBD2産生誘導能を有する微生物、もしくは発酵食品の探索を目的とし、発酵食品に用いられる糸状菌に着目した。糸状菌は麹菌である*Aspergillus*属や、海外で多く利用される*Rhizopus*属、*Penicillium*属等が代表的である。*R. oligosporus*は、味噌と同じ大豆発酵食品である、インドネシア発祥のTempeh（テンペ）の製造に用いられており、非常に多くの機能性が報告されている。

Table 9 機能性食品の分類

プロバイオティクス	腸内フローラのバランス改善に有効な生菌	乳酸菌 酪酸菌 <i>Bacillus</i> 属 酵母 etc.
プレバイオティクス	腸内フローラのバランス改善により、生体機能を調節する食品成分	難消化性デンプン 食物繊維 ビフィズス菌増殖刺激物質 (BGS) オリゴ糖 etc.
バイオジェニクス	腸内フローラを介さず、直接生体の調節機能に作用する成分	死菌体 DHA フラボノイド casein phosphopeptide (CPP) etc.

参考：第1回バイオジェニクスセミナー講演録（2009年）

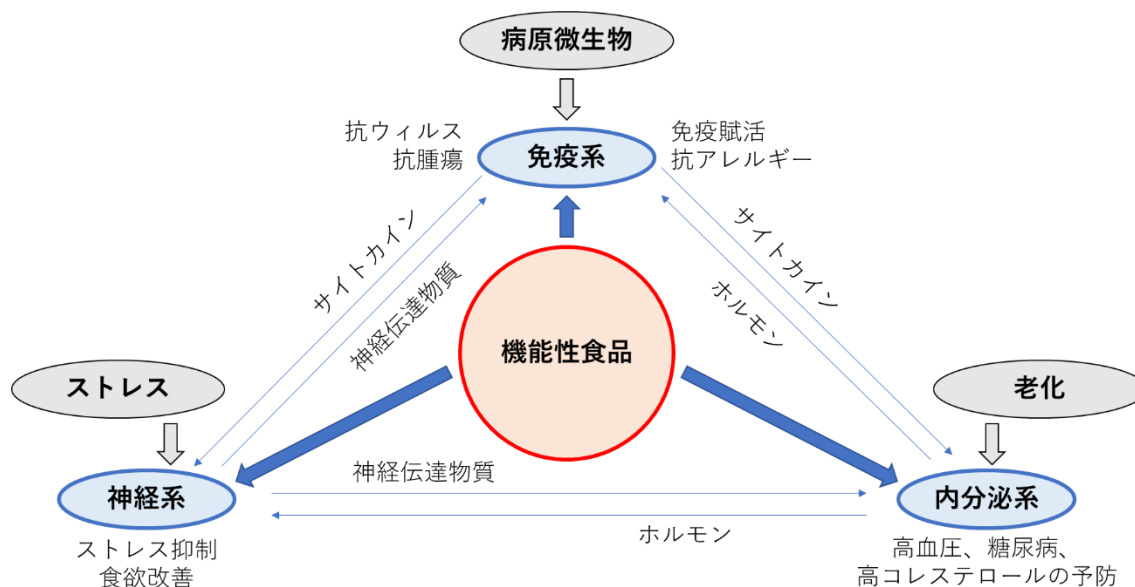


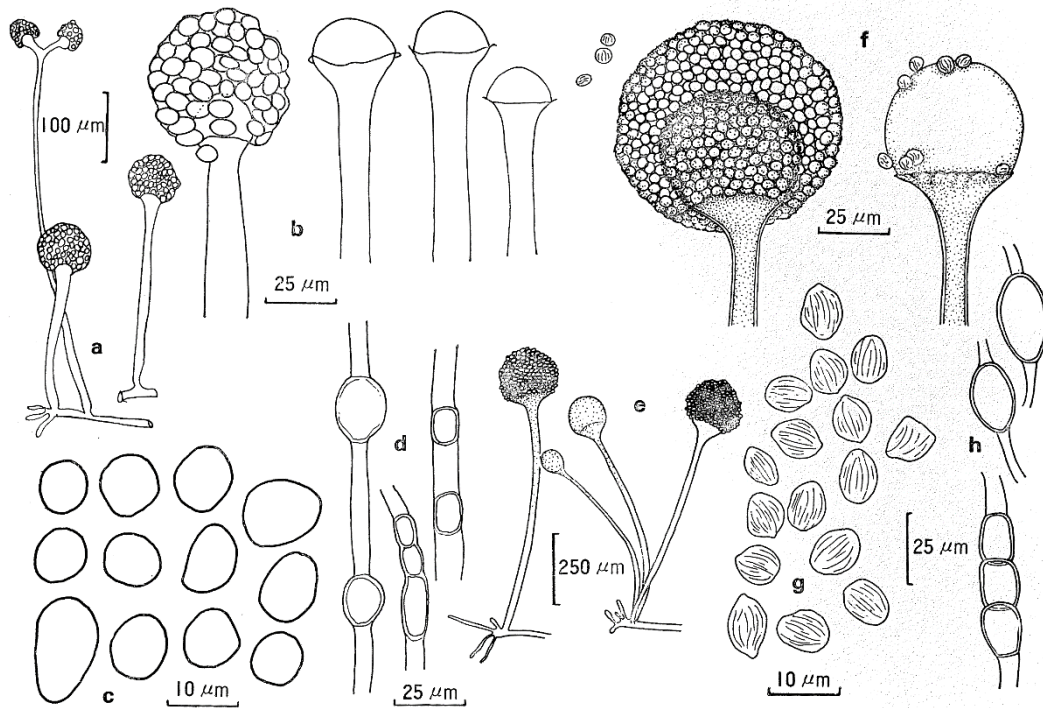
Fig. 24 生体ホメオスタシスと機能性食品

出展：第1回バイオジェニクスセミナー講演録（2009年）

3-2 *Rhizopus* 属

Rhizopus 属は、真菌に分類される接合菌綱クモノスカビ科に属するカビであり、生育スピードが非常に早く、匍匐枝、仮根、孢子囊柄が形成される (Fig. 25)。真菌は、細胞壁成分としてキチンを含有しているが、*Rhizopus* 属を含む接合菌はキトサンを多く含有しているという特徴がある[34]。キトサンは、コレステロール低下作用が数多く報告されており[35][36][37]、コレステロールの体内への吸収をし難くする食品として、特定保健用食品の関与成分として認定されている。キチンの脱アセチル化処理で製造されるキトサンだが、*Rhizopus* 属は希少な天然のキトサンを、細胞壁に多く含有している。キトサンは、マウスマクロファージ表層の TLR 2 に結合することで、自然免疫および獲得免疫応答において中心的な働きをする、細胞質アダプタータンパク質である MyD88 が活性化するという報告もされていることから[38]、免疫賦活活性を有する、バイオジェニクスとしての有用性が期待される。

Rhizopus 属の中にはムコール症やイネ苗枯れ病といった病原性を示す株も多く存在しており、*R. microsporus* は、共生細菌である *Burkholderia rhizoxinica* による二次代謝物として、植物毒素であるリゾキシシンやリゾニンの産生が確認されている[39]。*R. oligosporus* (Fig. 26) は *R. microsporus* グループに属しているが、家畜化された変種であると考えられており、上記の毒素産生はしないとされている。セルラーゼ、キシラナーゼ、アミラーゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、リパーゼなどの加水分解酵素を生産することが知られており[40]、大豆に接種をしてテンペを製造することで、大豆たんぱく質の分解による遊離アミノ酸の増加をもたらす。その他にも、抗真菌目的での使用がされており、*R. oligosporus* の chitinase I 遺伝子をタバコ葉に導入することで抗真菌活性が増加した報告例もある[41]。



a~d *R. oligosporus*

- a: 孢子囊柄
- b: 孢子囊および柱軸
- c: 孢子囊孢子
- d: 厚膜孢子

e~h *R. oryzae*

- e: 孢子囊柄
- f: 孢子囊および柱軸
- g: 孢子囊孢子
- h: 厚膜孢子

Fig. 25 *Rhizopus* 属

「食品菌類ハンドブック」医歯薬出版株式会社、p.18 図6より転載

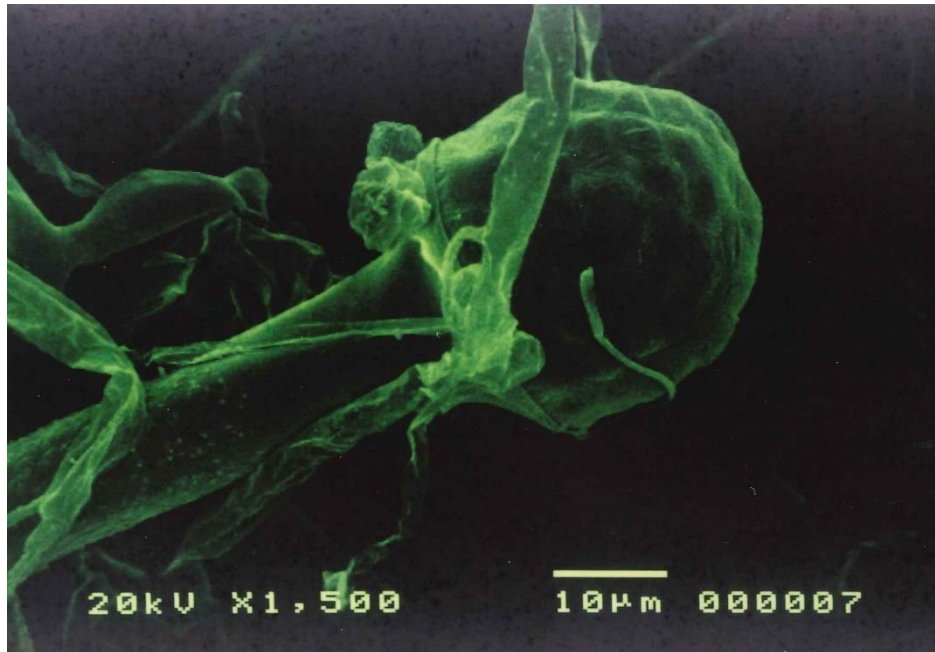


Fig. 26 *R. oligosporus* 電子顕微鏡写真

出展：株式会社秋田今野商店

3-3 Tempeh

Tempeh は、*R. oligosporus* を利用したインドネシアの伝統的な大豆発酵食品である。日本においては、納豆業界を中心に事業が拡げられており、岡山県、広島県等で広く普及している。大豆を原料とすることから、食品として非常に多くの三次機能が知られており (Table 10)、肉の代替品として、世界中のベジタリアンやヘルシー志向の人に食されている。昨今の日本でも、ナチュラルフードとして注目されつつある。

大豆発酵食品であることから、味噌同様に免疫賦活活性があるものと考えられるが、研究報告はされていない。また高い栄養価を有しており、食による健康維持・増進に注目が集まっている昨今と、ヒトの免疫力低下が懸念される現在および未来において、非常に有用な食品の一つになり得ると考えられる。

Table 10 Tempeh の三次機能性

機能性成分	期待される効果
イソフラボン	骨粗鬆症の予防、抗酸化作用、活性酸素の除去（SOD 様作用） etc.
不飽和脂肪酸	生活習慣病（動脈硬化性疾患）予防 etc.
食物繊維	生活習慣病の予防[42][43]、血清コレステロール低下作用、整腸作用 etc.
植物性ステロール	血清コレステロール低下作用 etc.
γ-アミノ酪酸	血流改善[44] etc.
その他	抗変異原性[45]、納豆キナーゼ様作用[46]、抗溶血作用[47]、抗菌作用[48] etc.

3-4 供試サンプル調製

供試サンプルは下記の通り殺菌粉末を調製し、phosphate buffered saline (PBS) に懸濁して用いた。

3-4-1 納豆

- ・ 市販の納豆（株式会社ヤマダフーズ）をオートクレーブ滅菌（121℃、20分）
- ・ 100℃、48時間乾燥
- ・ ミルで粉砕

3-4-2 Tempeh

- ・ 大豆の洗浄
- ・ 0.1% 乳酸水溶液に一晩浸漬
- ・ 水切り
- ・ 脱皮（種皮を取り除く）
- ・ 60分蒸煮
- ・ 適宜冷却
- ・ *R. oligosporus*（株式会社秋田今野商店）を接種
- ・ 有孔ポリ袋（φ5～6）に入れる
- ・ 28～30℃で22～24時間培養
- ・ オートクレーブ滅菌（121℃、20分）
- ・ 100℃、48時間乾燥
- ・ ミルで粉砕

3-4-3 *R. oligosporus* および *A. oryzae*

- ・ オートクレーブ滅菌（121°C、20分）した Potato Dextrose 液体培地に *R. oligosporus* および *A. oryzae*（共に株式会社秋田今野商店）を一白金耳接種
- ・ 28°C、72時間振とう培養（100 rpm）
- ・ ブフナー漏斗を用い、吸引ろ過で菌糸体を回収
- ・ 蒸留水で数回洗浄
- ・ オートクレーブ滅菌（121°C、20分）
- ・ 凍結乾燥
- ・ ミルで粉砕

3-4-4 大豆

- ・ 大豆の洗浄
- ・ 0.1% 乳酸水溶液に一晩浸漬
- ・ 水切り
- ・ 脱皮（種皮を取り除く）
- ・ 60分蒸煮
- ・ オートクレーブ滅菌（121°C、20分）
- ・ 100°C、48時間乾燥
- ・ ミルで粉砕

—試薬調整—

PBS

- ・ 140mM NaCl
- ・ 2.7mM KCl
- ・ 4.3mM Na₂HPO₄·12H₂O
- ・ 1.4mM KH₂PO₄

Potato Dextrose 液体培地

- ・ ジャガイモを洗浄して皮を剥く
- ・ 角切りにする
- ・ 5倍量の水を入れて煮沸（40分）
- ・ 滲液を回収
- ・ 欠損分を加水
- ・ 滲液の2%量の glucose を溶解

3-5 供試細胞

3-5-1 Caco-2 細胞

腸管上皮様に分化する細胞として、Caco-2 細胞、HT-29 細胞、T84 細胞等が知られている。中でも Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株であり、多孔性メンブレン上で極性培養を行い分化させると、tight junction (TJ) や微絨毛の形成、トランスポーターの発現等、非常に多くの腸管上皮様の特徴を有すると考えられており[49][50][51]、様々な微生物や成分の刺激に対する、サイトカイン類の産生応答試験等に多く用いられている[52][53][54][55]。

本研究では、孔径 0.4 μm の多孔性メンブレンを有するセルカルチャーインサート (Falcon) 上に Caco-2 細胞を播種し、酪酸ナトリウムを添加することで腸管上皮様に分化誘導をした (Fig. 27, Fig. 28)。こうすることで、供試サンプルを摂取した際に、腸管上皮細胞の TLR や CLR に認識されて、IFN- γ の産生促進や、T 細胞、NK 細胞の活性化を誘導する IL-12 の産生が誘導される経路が想定される。

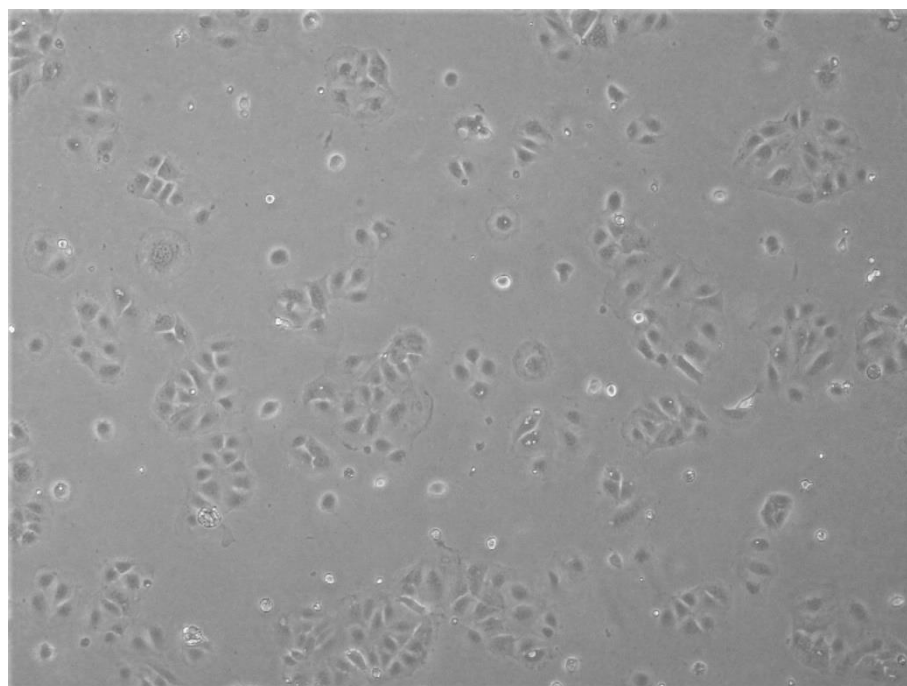


Fig. 27 Caco-2 細胞 (分化前)

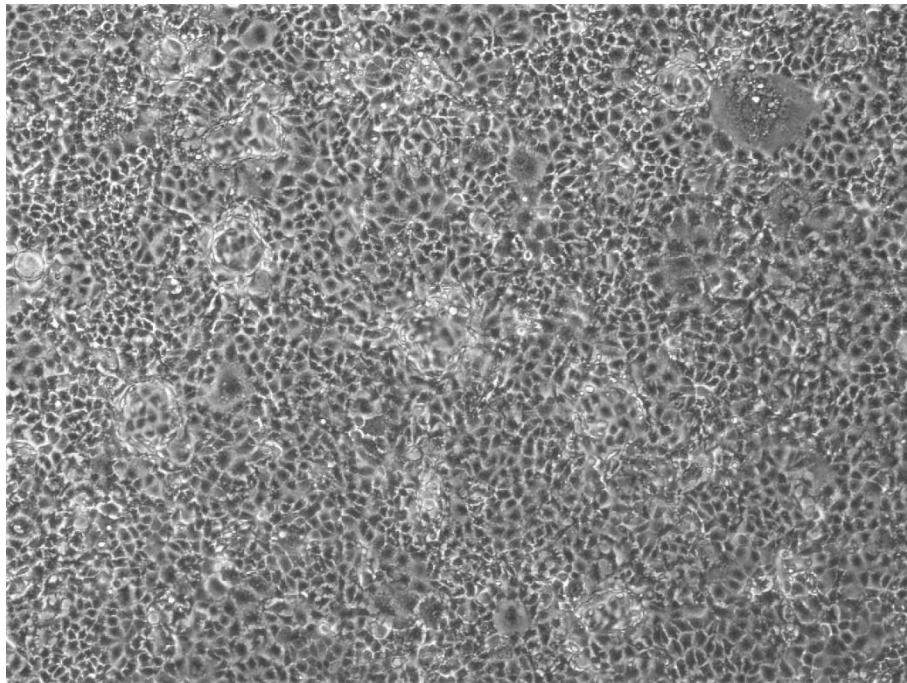


Fig. 28 Caco-2 細胞（分化後）

3-5-1-1 Caco-2 細胞の培養

Caco-2 細胞は、札幌医科大学医学部横田伸一教授より分譲を受けた。5% Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries) および 0.2% Penicillin-Streptomycin (PS) (Gibco) を添加した、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (SIGMA) を用いて、5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベーターにて、37°C の条件下で培養した。Caco-2 細胞は細胞密度が高くなると分化を開始するため[56]、80%程度のコンプルエント状態を上限として、トリプシン処理で細胞を剥離し、適宜継代培養を行った。

3-5-1-2 Caco-2 細胞の分化誘導

トリプシン処理で剥離した Caco-2 細胞を、2,000 rpm、3 分の遠心分離で回収し、DMEM 培地 (5% FBS + 0.2% PS) に懸濁した。24 well 細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) にセットしたセルカルチャーインサート (Falcon, 0.4 μm) に、 1.5×10^5 cells 播種して 72 時間培養した。培地量はマルチウェルプレート : 1 ml、セルカルチャーインサート : 0.3 ml で行った。72 時間後に 5 mM 酪酸ナトリウムを含む同培地に交換して、96 時間の分化誘導を行った。培地交換は 48 時間毎に行った。

3-5-2 THP-1 細胞

THP-1 細胞は、ヒト急性単球性白血病細胞株である。通常の培養条件では、浮遊細胞 (Fig. 29) として単球様の性質を示す。Cholecalciferol (Vitamin D₃) および phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で刺激することにより接着細胞 (Fig. 30) となり、マクロファージ様へと分化・成熟して貪食能を有する[57]。本研究では、Caco-2 細胞と共培養することで、供試サンプルが Caco-2 細胞を刺激して分泌された IL-12 により、マクロファージ様化した THP-1 細胞が活性化することで、IFN- γ の産生促進および貪食能の増加を想定して実験に用いた。

3-5-2-1 THP-1 細胞の培養

THP-1 細胞は、理研 cell バンクより購入した (RCB 1189)。10% FBS (Biological Industries) および 0.2% PS (Gibco) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (nacalai tesque) を用いて、5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベーターにて、37°Cの条件下で培養した。THP-1 細胞は、 $3.0 \sim 8.0 \times 10^5$ cells/ml (最大 1×10^6 cells/ml) を維持するように留意し、適宜継代培養を行った。

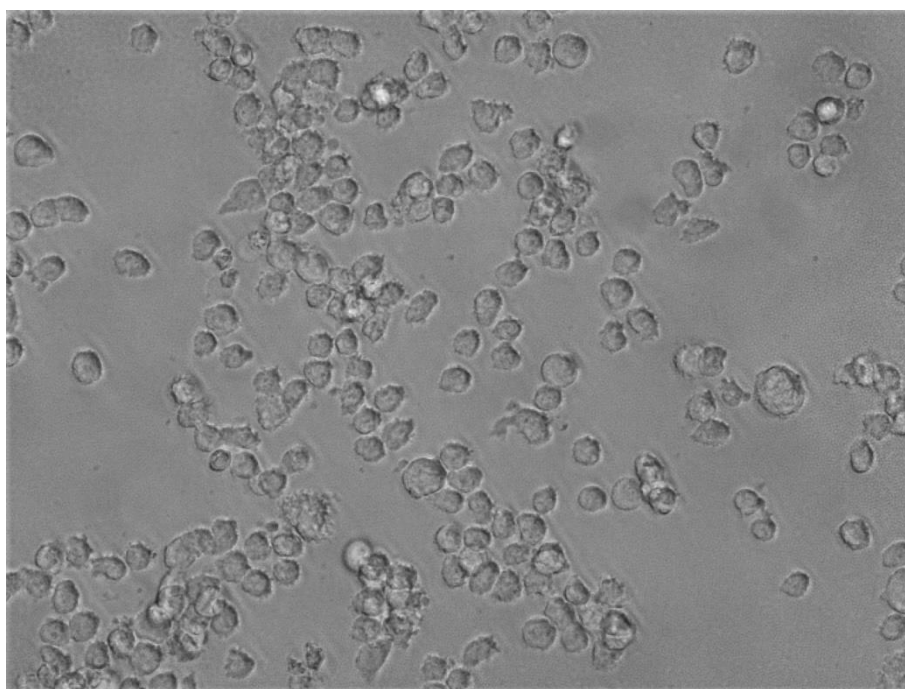


Fig. 29 THP-1 細胞 (分化前)

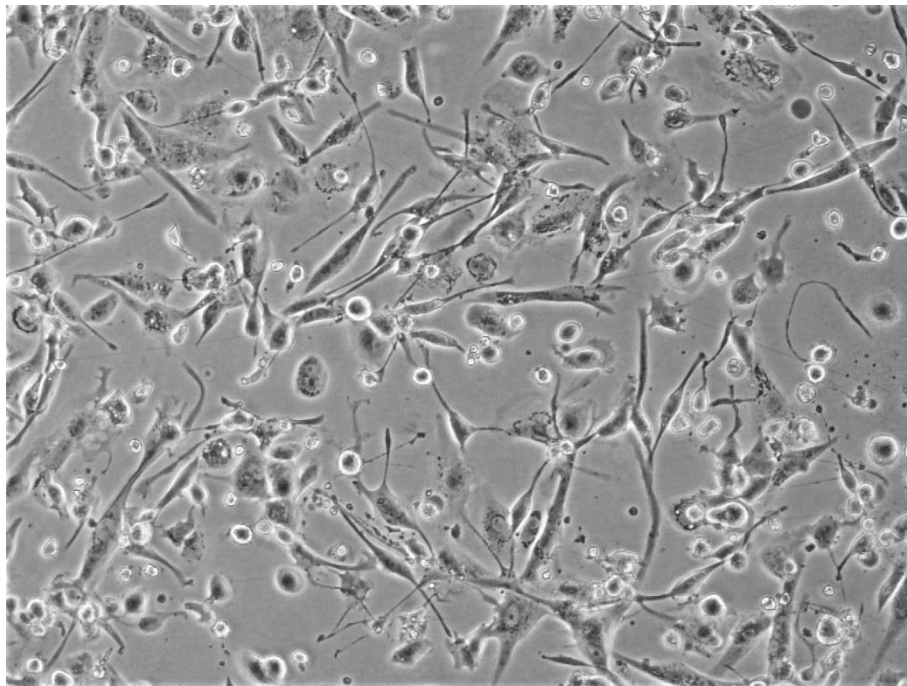


Fig. 30 THP-1 細胞（分化後）

3-5-2-2 THP-1 細胞の分化誘導

2,000 rpm、3 分の遠心分離で THP-1 細胞を回収し、RPMI 1640 培地（10% FBS + 0.2% PS）に懸濁して、 2.0×10^5 cells/ml に調整した。24 well 細胞培養用マルチウェルプレート（Falcon）の各 well に 1 ml 播種し、分化誘導剤として、100 ng/ml Vitamin D₃ と 10 nM PMA を含む培地で 72 時間培養した。

3-6 腸管免疫モデル

多孔性メンブレンを有するセルカルチャーインサートを使い、腸管上皮様細胞とマクロファージ様細胞を共培養することで、実際の腸管を模した *in vitro* の腸管免疫モデル（Fig. 31）を構築することが可能である[58]。このモデルを応用し、apical 側用には腸管上皮様に分化した Caco-2 細胞（3-5-1-2）、basal 側用にはマクロファージ様に分化した THP-1 細胞（3-5-2-2）を準備した。各細胞を FBS、PS 無添加の RPMI 1640 培地で 2 回洗浄し、同培地を apical 側には 0.3 ml、basal 側には 1 ml 添加した。分化誘導した Caco-2 細胞培養済みセルカルチャーインサートを、マクロファージ様に分化誘導した THP-1 細胞培養済みマルチウェルプレートにセットして、腸管免疫モデルとした。刺激を与える供試サンプルを apical 側に添加し（終濃度 0.5 mg/ml）、5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベータ

一にて、37°Cの条件下で刺激を与えた。培養後に basal 側の培地を回収し、12,000 rpm、20 分の遠心分離後に上清を回収することで夾雑物を除去した。上清と同量の 2× Sample buffer を添加して 100 °C、2 分加熱処理し、培地中の IL-12 および IFN- γ 、hBD2 の測定に用いた。

当腸管免疫モデルは、Caco-2 細胞を介したサイトカインの産生を評価する共培養系であり、サンプルが Caco-2 細胞間から basal 側にリークすると正しい評価をすることができない。これを防ぐために、セルカルチャーインサート上の Caco-2 細胞は、コンフルエントの状態です十分に分化させ、強固な細胞間の TJ を形成させる必要がある。TJ は上皮細胞間からの病原菌、毒素等の侵入を防ぐバリア機能を有する。TJ のバリア性は Millicell ERS-2 抵抗値測定システム (Millipore) を用いて、apical 側と basal 側に挿入した電極間に、微弱な電場を与えた際の経上皮電気抵抗 (TEER) によって測定することができる。TEER 値は、細胞の培養条件や継代数によって大きく変化するが、Caco-2 細胞の場合、150 Ω/cm^2 ~ 800 Ω/cm^2 程度のものが使われている。本研究では、400 Ω/cm^2 以上の細胞を用いた。

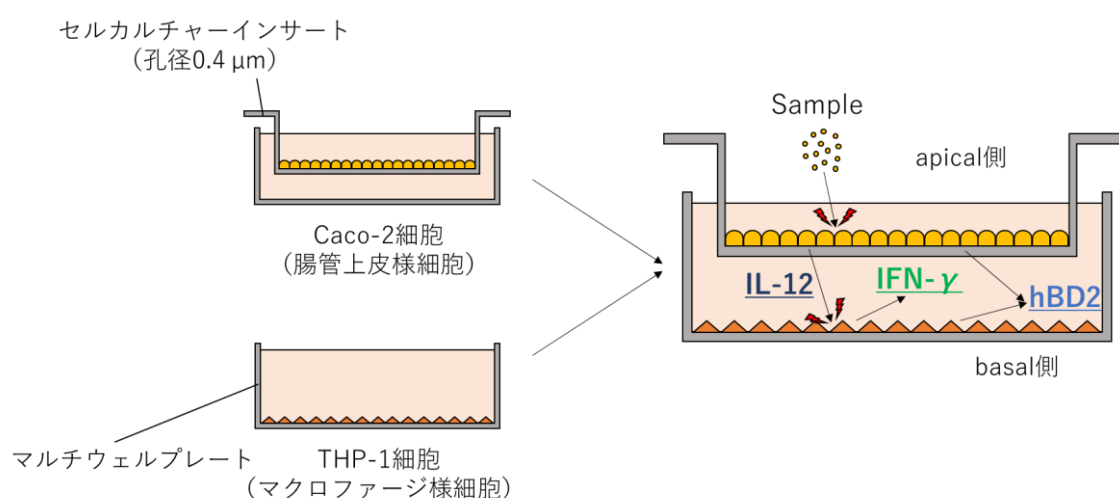


Fig. 31 *in vitro* 腸管免疫モデル

3-7 実験方法

IL-12 および IFN- γ は、SDS-PAGE (2-4-1) による分離後、Western blot 法 (2-4-2) で検出し、内在性コントロールとして β -actin を測定することで産生量を補正した。hBD2 は Dot blot 法で測定し、CBB 染色による総タンパク質量から、hBD2 産生量を補正した。各抗体濃度は、Table 11 および Table 12 に示した。

Table 11 一次抗体濃度

抗体	動物種	メーカー	希釈
IL-12p35 (ポリクローナル)	rabbit	伊藤研	1 / 10,000
IFN- γ (ポリクローナル)	rabbit	伊藤研	1 / 500
hBD2 (ポリクローナル)	rabbit	伊藤研	1 / 100
β -actin (モノクローナル)	mouse	SIGMA	1 / 10,000

Table 12 二次抗体濃度

抗体	メーカー	希釈
anti-rabbit AP IgG	Biorad	1 / 10,000
anti-rabbit HRP IgG	Biorad	1 / 15,000
anti-mouse AP IgG	SIGMA	1 / 10,000

3-7-1 SDS-PAGE

2-4-1 参照

3-7-2 Western blot 法

2-4-2 参照

3-7-3 内在性コントロール (β -actin) の測定

β -actin は、細胞の骨格を形成し、ほとんどの実験条件下で安定して高発現する、分子量約 42 kDa のタンパク質である。タンパク質量を比較定量する場合には、SDS-PAGE におけるローディングや、Western blot における転写ミス等を正常化するために、内部標準となるデータが不可欠となる。本研究では、BCA Protein Assay (Thermo Fisher) を用いてタンパク質量を定量し、一定タンパク質量中の β -actin を測定して、内在性コントロールとした。

操作手順

- ・ 細胞を PBS で洗浄
- ・ PBS を添加して、セルスクレーパーで細胞を回収
- ・ 遠心分離 (2,000 rpm、4°C、5 分)
- ・ 上清を除去
- ・ 沈殿を 40 μ l の Lysis buffer に懸濁
- ・ 氷上に 10 分静置
- ・ 遠心分離 (12,000 rpm、4°C、10 分)

- ・ 上清を回収 (β -actin 測定サンプル)
- ・ 上清 2.5 μ l を Lysis buffer 22.5 μ l に懸濁し (10 倍希釈)、BCA 溶液 (A 液 200 μ l : B 液 4 μ l) を 200 μ l 添加
- ・ インキュベート 1 (37°C、30 分)
- ・ インキュベート 2 (室温、10 分)
- ・ 96 well マイクロプレートに 200 μ l 分注
- ・ OD₅₆₂ 測定
- ・ タンパク質量が 200 μ g/ml となるように β -actin 測定サンプルを Lysis buffer で希釈
- ・ 同量の 2× Sample buffer を添加して 100°C、2 分のヒートショック処理 (終濃度 : 100 μ g/ml)
- ・ SDS-PAGE (2-4-1) で分離
- ・ Western blot (2-4-2) で転写
- ・ 検出後、ImageJ (NIH) で解析

—試薬調整—

Lysis buffer

- ・ 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4)
- ・ 1% NP-40
- ・ 100 mM NaCl
- ・ 5% Glycerol
- ・ 5 mM EDTA

3-7-4 Dot blot 法

ニトロセルロースメンブレンや PVDF メンブレン上に直接固定したタンパク質を、酵素標識抗体等で特異的に定量する方法である。DNA や RNA の定量に用いられることもある。固定化したタンパク質に、特異な一次抗体を反応させ、AP や HRP 等の酵素標識二次抗体を反応させた後、標識酵素に応じた発色基質を添加して、間接的に特定のタンパク質を検出することができる。Westan blot 法との違いは、SDS-PAGE による分離やメンブレンへの転写操作を必要としないため、非常に簡便な定量方法である。ただし、Western blot 法に比べてシグナルが高く出る点や、特異性の低い抗体を使用した場合に、非特異反応の区別ができない点に注意が必要である。細胞培養液上清を測定する場合は、同様にメンブレン上に固定後、CBB 染色液で総タンパク質を染色・測定することで、目的タンパク質量を補正する必要がある。

操作手順

- ・ PVDF 膜をメタノールに 1 分以上浸漬して親水化
- ・ Blot buffer に 5 分以上浸漬
- ・ ドットブロッター (ADVANTEC) で培地上清をメンブレン上に吸引固定
- ・ 一次抗体を 7% skim milk in TBS に添加し、メンブレンを浸して室温で一晩反応 (弱振盪)
- ・ 一次抗体溶液を除去
- ・ Wash buffer を加えて 5 分洗浄 (弱振盪) × 3 回
- ・ Wash buffer を除去
- ・ 二次抗体を 7% skim milk in TBS に添加し、メンブレンを浸して室温で 60 分反応 (弱振盪)
- ・ 二次抗体溶液を除去
- ・ Wash buffer を加えて 5 分洗浄 (弱振盪) × 3 回
- ・ AP 検出 (2-4-2)
- ・ メンブレンをスキャナで PC に取り込む
- ・ ImageJ (NIH) で解析

3-7-5 Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 産生誘導の検討

腸管免疫モデル (Fig. 31) を用い、Tempeh、*R. oligosporus* および大豆を Caco-2 細胞側に 0.5 mg/ml となるように添加した。5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベーターにて、37°C の条件下で 24 時間、48 時間、72 時間、96 時間刺激を与えた。培養後に basal 側の培地を回収し、12,000 rpm、20 分の遠心分離で上清を回収して夾雑物を除去した。上清に同量の 2× Sample buffer を添加して 100°C、2 分加熱処理し、SDS-PAGE (2-4-1) で分離後に、培地中の IL-12 を Western blot 法 (2-4-2) で測定した。

3-7-6 IL-12、IFN- γ および hBD2 産生誘導能の測定

腸管免疫モデル (Fig. 31) を用い、Caco-2 細胞側に供試サンプルを 0.5 mg/ml となるように添加した。5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベーターにて、37°C の条件下で 24 時間刺激を与えた。培養後に basal 側の培地を回収し、12,000 rpm、20 分の遠心分離で上清を回収して夾雑物を除去した。上清に同量の 2× Sample buffer を添加して 100°C、2 分加熱処理し、SDS-PAGE (2-4-1) で分離後に、培地中の IL-12 および IFN- γ を Western blot 法 (2-4-2)、hBD2 を Dot blot 法 (3-7-4) で測定した。供試サンプルは、*R. oligosporus*、Tempeh、*A. oryzae*、大豆、納豆を用いた。PBS を添加した無刺激区をコントロールとした。

hBD2 は、腸管免疫モデルとは別に、分化誘導した THP-1 細胞に直接サンプル

を添加し、24 時間刺激を与えた培地上清も同様に測定した。hBD2 は、PBS に対する相対活性で評価を行った。

3-7-7 乳酸菌との比較試験

腸管免疫モデル (Fig. 31) を用い、Caco-2 細胞側にサンプルを添加した。5% CO₂、飽和湿度の気相インキュベーターにて、37°C の条件下で 24 時間刺激を与えた。培養後に basal 側の培地を回収し、12,000 rpm、20 分の遠心分離で上清を回収して夾雑物を除去した。上清に同量の 2× Sample buffer を添加して 100°C、2 分加熱処理し、SDS-PAGE (2-4-1) で分離後に、培地中の IL-12 を Western blot 法 (2-4-2) で測定した。供試サンプルには、*R. oligosporus*、Tempeh、大豆、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*、株式会社秋田今野商店)、EC12 (*Enterococcus faecalis*、株式会社コンビ) を用いた。無刺激区として、PBS を添加した試験区をコントロールとした。

3-8 実験結果

3-8-1 Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 産生誘導の検討

乳酸菌は、24 時間の刺激による IL-12 産生誘導能が高く、当研究室の過去のデータでも、同様の傾向が見られている (溝浦)。しかし、Tempeh および *R. oligosporus* の場合は、応答メカニズムが異なると予想される。そこで、最適な刺激時間を検討した結果、Tempeh は 24 時間～48 時間、*R. oligosporus* は 48 時間で最も産生量が多い結果となった (Fig. 32、Fig. 33)。ともに 72 時間では急激に減る傾向にあった。

3-8-2 IL-12、IFN- γ および hBD2 産生誘導能の探索

3-8-2-1 IL-12 産生誘導能

R. oligosporus、Tempeh、*A. oryzae*、大豆、納豆の、IL-12 産生誘導能を検討した結果を、Fig. 34、Fig. 35 に示した。無刺激である PBS 試験区に比べて、*R. oligosporus* は約 1.5 倍、Tempeh は約 2.1 倍となる IL-12 産生誘導が確認された。*R. oligosporus* と同じ糸状菌体サンプルである *A. oryzae*、Tempeh の原料である大豆や、同じ大豆発酵食品である納豆は、PBS よりも低い結果となった。

3-8-2-2 IFN- γ 産生誘導能

供試したサンプルは、いずれも PBS よりも高い IFN- γ 産生誘導が確認された (Fig. 36、Fig. 37)。中でも高い傾向にあったのは、*R. oligosporus* と Tempeh で、PBS の 2.3～2.5 倍に値する IFN- γ の産生を誘導した。

3-8-2-3 hBD2 産生誘導能

腸管免疫モデルにおける結果では、*R. oligosporus* は PBS の約 3.3 倍の誘導能を示し、最も高かった。納豆と大豆も比較的高い傾向にあった。Tempeh、*A. oryzae* は PBS よりも若干高い誘導能を示したが、供試サンプルの中では低い傾向にあった (Fig. 38、Fig. 39)。

THP-1 細胞に直接刺激を与えた結果でも、*R. oligosporus* は顕著に高い結果を示した。腸管免疫モデルの時に低い値だった *A. oryzae* は、THP-1 細胞に直接刺激を与えることで、hBD2 の誘導能が上がる結果となった (Fig. 40、Fig. 41)

3-8-3 乳酸菌との比較試験

IL-12 の産生誘導が高かった *R. oligosporus* および Tempeh と、乳酸菌 (*L. plantarum*)、EC12 (*Ent. faecalis*) の比較試験結果を、Fig. 42、Fig. 43 に示した。*R. oligosporus* の IL-12 産生誘導能は、乳酸菌および EC12 とほぼ同等、もしくは若干低い結果となったが、Tempeh は約 1.5 倍高い結果であった。

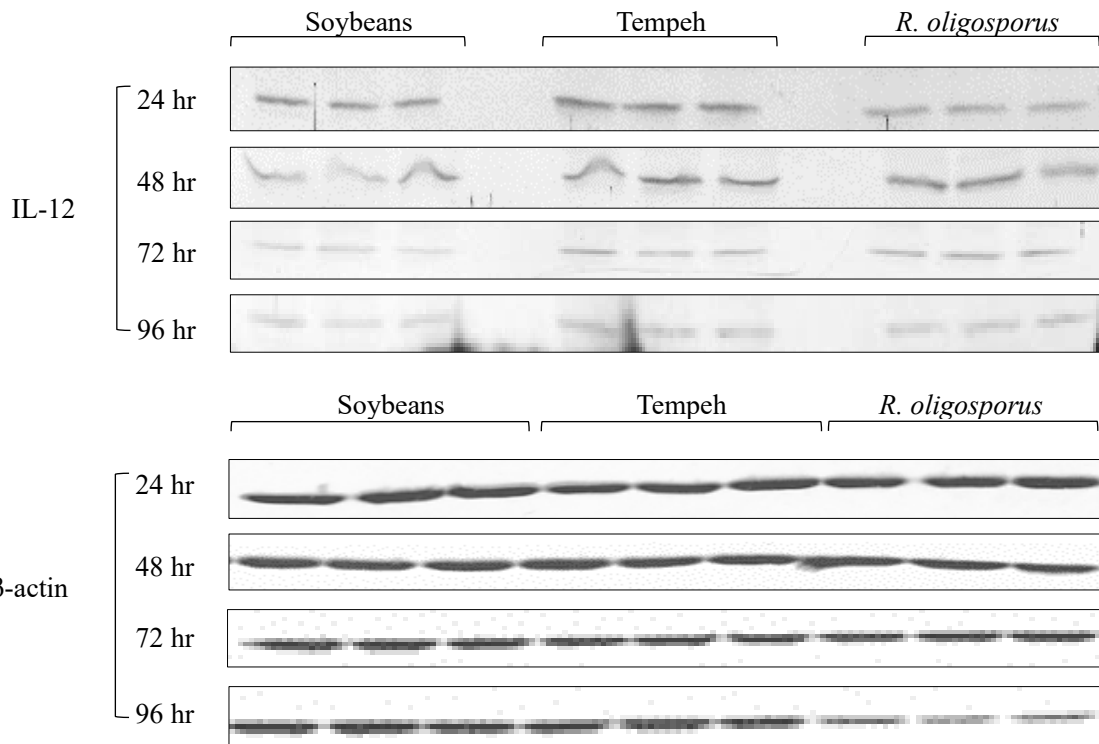


Fig. 32 Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 產生誘導能 (Western blot)

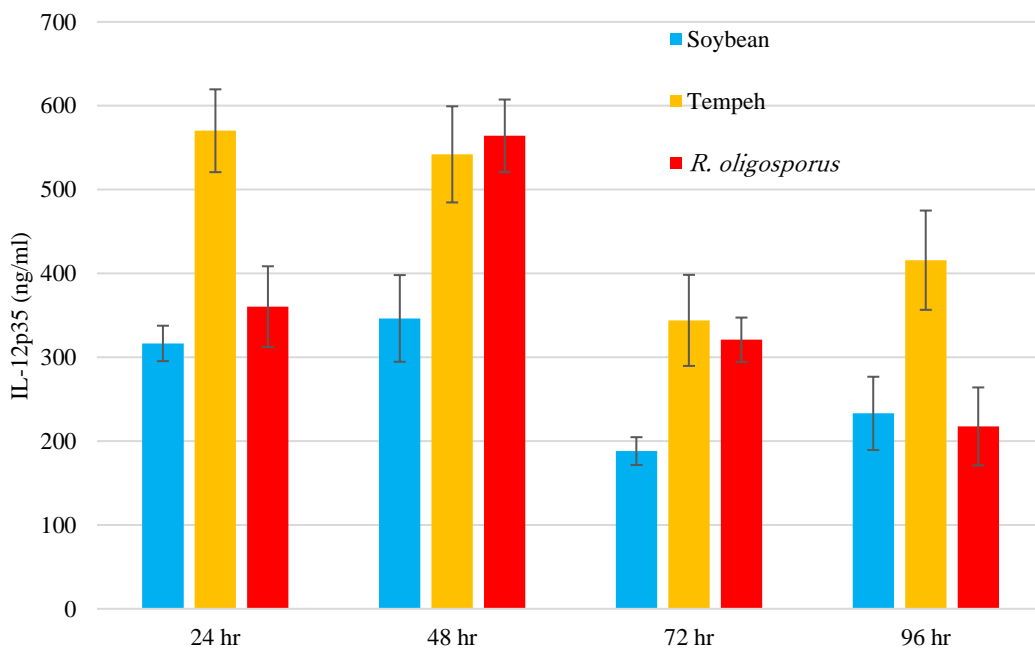


Fig. 33 Caco-2 細胞刺激時間別 IL-12 產生誘導能

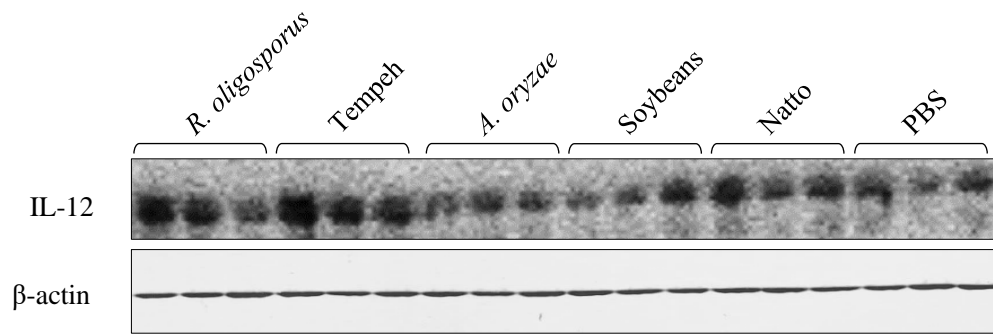


Fig. 34 IL-12 産生誘導能 (Western blot)

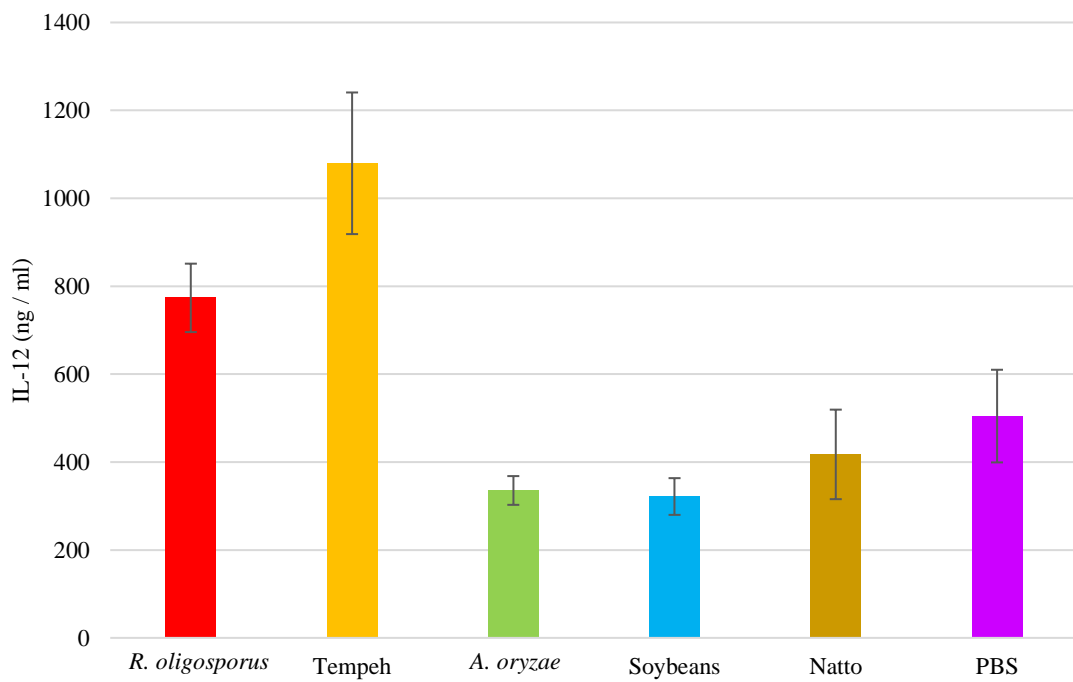
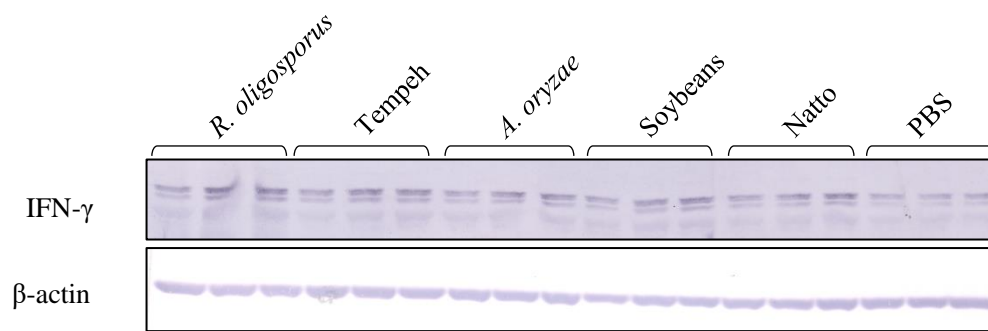
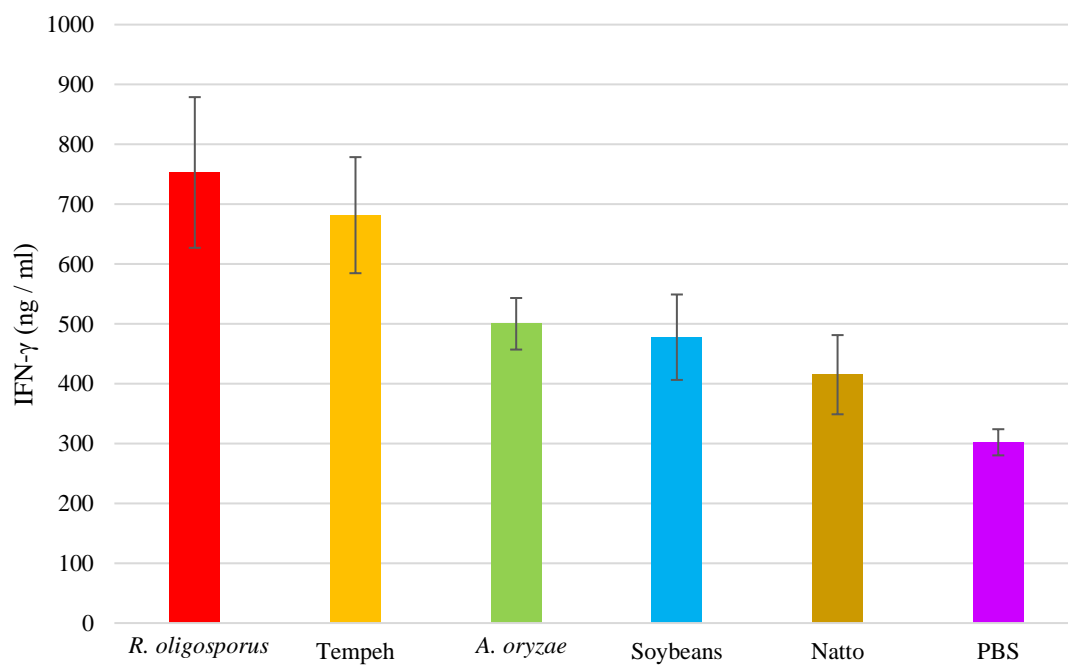


Fig. 35 IL-12 産生誘導能

Fig. 36 IFN- γ 産生誘導能 (Western blot)Fig. 37 IFN- γ 産生誘導能

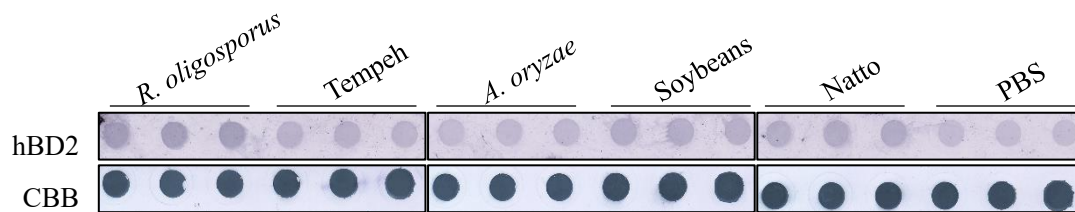


Fig. 38 腸管免疫モデルにおける hBD2 産生誘導能 (Dot blot)

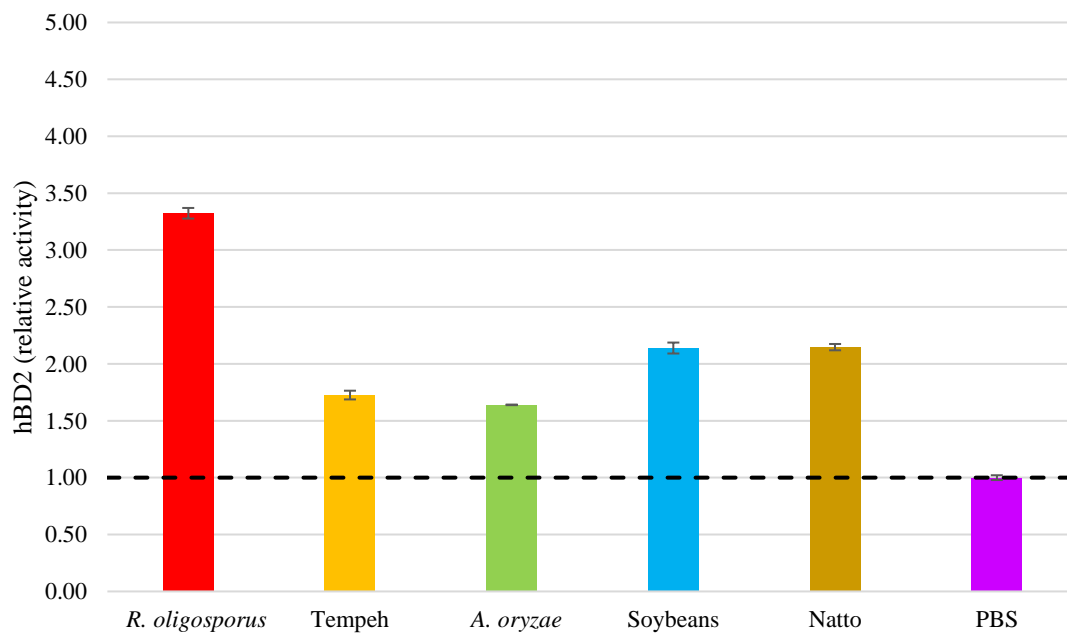


Fig. 39 腸管免疫モデルにおける hBD2 産生誘導能

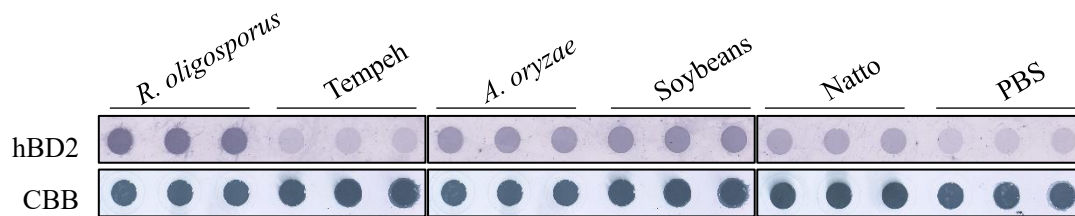


Fig. 40 THP-1 細胞への刺激における hBD2 産生誘導能 (Dot blot)

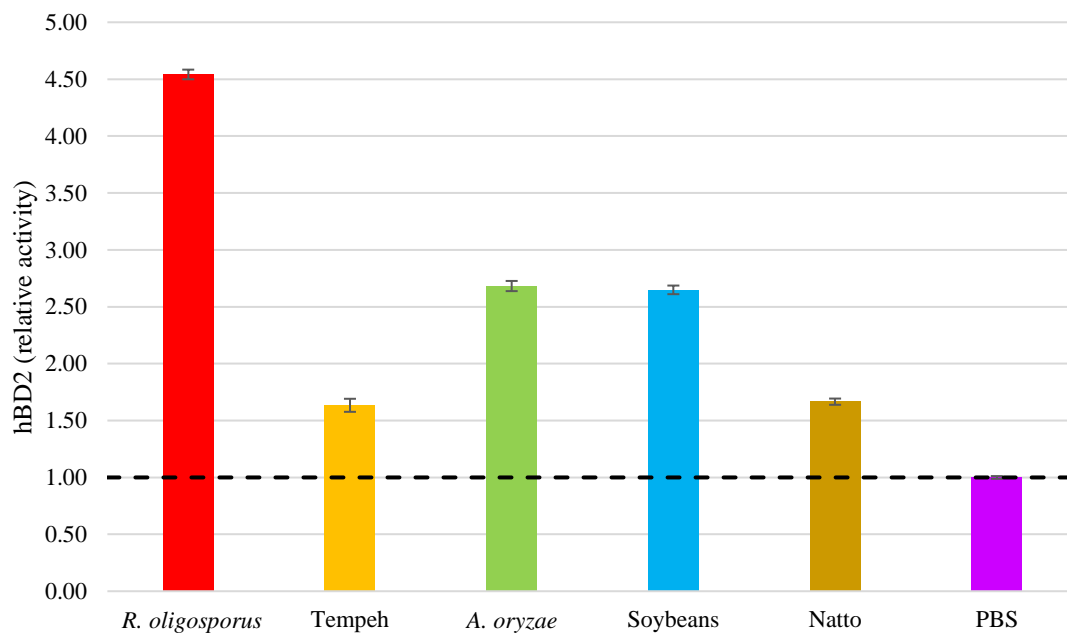


Fig. 41 THP-1 細胞への刺激における hBD2 産生誘導能

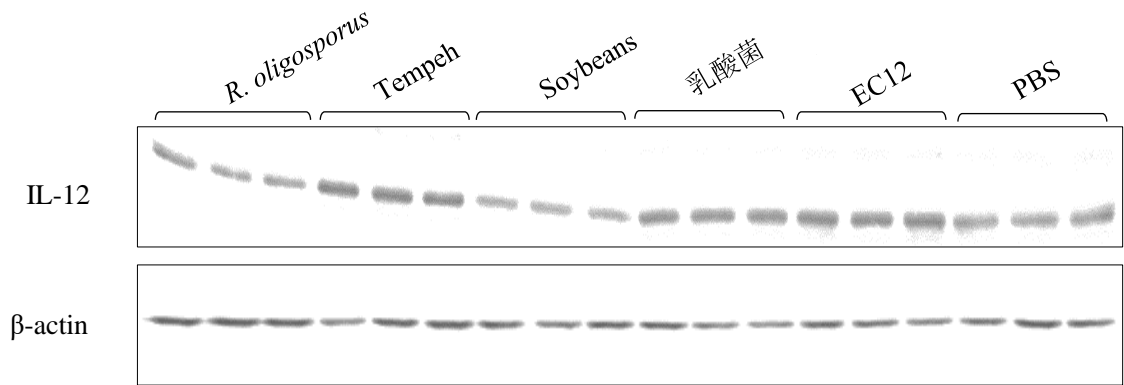


Fig. 42 *R. oligosporus* および Tempeh と乳酸菌の IL-12 産生誘導産生誘導能比較
(Western blot)

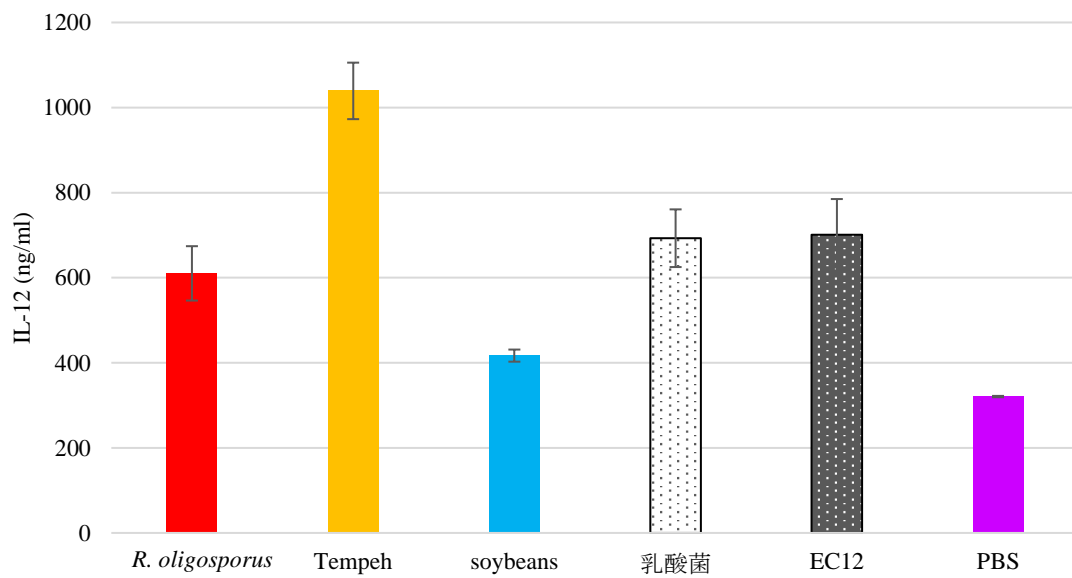


Fig. 43 *R. oligosporus* および Tempeh と乳酸菌の IL-12 産生誘導産生誘導能比較

3-9 小括

味噌や納豆、ヨーグルト等の発酵食品は、健康食品と考えられている。ヨーグルトを作る乳酸菌や大豆を原料とした味噌は、サイトカインである IL-12 の産生を誘導することが知られている[33][59]。そこで本章では、大豆を原料とした発酵食品である Tempeh、およびその製造菌である *R. oligosporus* の、IL-12、IFN- γ 、hBD2 産生誘導能を検討した。

これまで、乳酸菌の IL-12 産生誘導は数多く報告されており、その多くは 24 時間の刺激で評価されている。当研究室の過去の結果（溝浦）でも同様の傾向が見られたが、本章で供試したサンプルは、リガンドとなる成分が乳酸菌と異なると考えられる。つまり、作用する受容体も異なる可能性があることから、IL-12 を産生する最適な条件検討が必要であると思われ、Caco-2 細胞への刺激時間別による、IL-12 産生誘導能の違いを検討した。その結果、Tempeh は 24 時間～48 時間、*R. oligosporus* は 48 時間で最も産生量が多い結果となった (Fig. 33)。ともに 72 時間以降は急激に減る傾向にあった。乳酸菌も 24 時間の刺激で高い IL-12 産生誘導を示したことが、当研究室の溝浦の結果でも報告されており、ほぼ同様の刺激応答時間であると示唆された。Tempeh の原料大豆も同様の傾向が見られたものの、いずれの刺激時間でも Tempeh、*R. oligosporus* よりも低い結果を示した。このことは、Tempeh の結果が大豆成分による産生誘導に起因せず、発酵により変化もしくは増加した他の成分によるものであったと示唆される。

次に、Tempeh と同じ大豆発酵食品である納豆と、*R. oligosporus* と同じく発酵食品に関わりの深い麹菌である *A. oryzae* を用いて、IL-12、IFN- γ 、hBD2 産生誘導能の検討を行った。Tempeh および *R. oligosporus* は、それぞれコントロールとなる納豆、*A. oryzae* に比べて高い IL-12 産生誘導能が確認され、Tempeh は 1080 ng/ml、*R. oligosporus* は 773 ng/ml の IL-12 を産生誘導した結果となった (Fig. 35)。大豆は、イソフラボンによる IL-12 産生誘導が報告されているが[23]、本実験結果における大豆の誘導能は、PBS よりも低くほぼ見られなかった。イソフラボン含有量は大豆の品種で大きな差があることが要因の一つと考えられる。納豆は、腸内細菌叢のバランスを改善する、プロバイオティクスとしての活用が多く知られているが、免疫賦活というバイオジェニックス効果の面から見てみると、Tempeh は約 2.6 倍の IL-12 産生誘導能を示した。同じ大豆発酵食品間でこの差が出たことの要因としては、発酵代謝物や菌種の違いが考えられる。糸状菌の菌体サンプルである *R. oligosporus* と *A. oryzae* を比較すると、*R. oligosporus* が約 2.3 倍の IL-12 産生誘導能を示した。このことは、菌体構成成分の違いに起因するものと考えられ、特に *R. oligosporus* 特有の成分であるキトサンが関与しているものと示唆された。

IFN- γ 産生誘導能は、すべてのサンプルにおいて PBS よりも高い結果となっ

た (Fig. 37)。ここでも特に *R. oligosporus* (753 ng/ml) と Tempeh (682 ng/ml) が高かったことに注目したい。特に Tempeh は、原料の大豆 (478 ng/ml) に比べても約 1.4 倍量の IFN- γ を産生誘導している。同じように比較すると、納豆 (415 ng/ml) は大豆に比べて微減であった。同じ大豆を原料とした発酵食品でも、納豆と Tempeh では大きな差が生まれる結果となり、この結果は発酵する微生物の違いによるものと推測される。テンペ製造菌の *R. oligosporus* も、高い産生誘導能を示したことから、*R. oligosporus* の菌体成分が IFN- γ の産生誘導を引き起こしている可能性が示唆される。

Tempeh に含まれる *R. oligosporus* の菌体数は、重量比で約 0.1% 程度という報告があり [60]、これを踏まえて、大豆と Tempeh の IL-12 と IFN- γ 産生誘導差を比較してみると、大豆に *R. oligosporus* が増殖して Tempeh 化されることで、IL-12 や IFN- γ 産生誘導能を有する発酵代謝物が産生され、さらに増殖した *R. oligosporus* の菌体による誘導が起り、Tempeh の免疫賦活活性が増加すると考えられる。

腸管上皮様細胞を介した hBD2 産生誘導能も、*R. oligosporus* が最も高い結果となり、PBS の約 3.3 倍であった (Fig. 39)。Tempeh は逆に原料大豆よりも低い結果となっている。納豆と原料大豆も結果に差は出ていないことから、hBD2 産生誘導と大豆成分や発酵はあまり深く関りが無いように考えられ、*R. oligosporus* 菌体成分が影響を及ぼした結果が示唆された。しかし、同じ糸状菌サンプルである *A. oryzae* が低い産生誘導であったことから、共通の成分では無く、*R. oligosporus* 特有の菌体成分による誘導が起っていると示唆された。マクロファージ様に分化誘導した THP-1 細胞に、直接 (Caco-2 細胞を介さずに) サンプルを添加して刺激を与えたところ、腸管免疫モデルと同様に、*R. oligosporus* が特に高い産生誘導を示す結果となったが、*A. oryzae* による産生誘導が上がった点が、異なる結果となった (Fig. 41)。hBD2 は、TLR2 および CLR である Dectin-1 レセプターを介して産生誘導されるといわれており [61][62][63]、キチンやキトサンは、マウスマクロファージ表層の TLR2 に結合することで、MyD88 が活性化するという研究結果が報告されている [38]。すなわち、*R. oligosporus* のキトサンや、*A. oryzae* の β -glucan、キチン等がリガンドとなり、これらのレセプターを刺激することで、hBD2 の産生誘導を引き起こすと推測される。これらの受容体は、腸管上皮細胞よりもマクロファージに多く発現する傾向があることから、THP-1 細胞に直接刺激を与えた時に、*A. oryzae* による産生誘導が増えた結果につながると思われる。しかし、上皮細胞に刺激を与えた腸管免疫モデルにおいても、顕著に *R. oligosporus* が高い結果を示したことは、感染防御の増強という観点から、有用性が見られる結果になったと考えられる。

Tempeh および *R. oligosporus* と乳酸菌との IL-12 産生誘導能比較試験でも、両

者は乳酸菌と同等、もしくは高い IL-12 産生誘導能を示した (Fig. 43)。乳酸菌は様々な株で高い免疫賦活活性が報告されており、供試した EC12 は IL-12 産生誘導による免疫調節機能[64]だけでなく、非常に多くのバイオジェニックス効果が報告されている。*L. plantarum* は、漬物を中心に多くの発酵食品に利用されており、株式会社秋田今野商店の実験結果から、IL-12 の産生誘導能を有することが確認されている。これら乳酸菌と比べると、*R. oligosporus* はほぼ同等、Tempeh は約 1.5 倍の IL-12 産生誘導能が見られた。乳酸菌はペプチドグリカン、Tempeh はイソフラボンや食物繊維等の原料成分や発酵代謝物、*R. oligosporus* はキチン、キトサンもしくは微量の β -glucan が、TLR もしくは CLR に認識されて IL-12 を産生誘導すると考えられ、メカニズムは異なるが、乳酸菌に匹敵する結果が見られたことは、非常に有意な結果であると考えられる。

第4章 THP-1細胞を用いた貪食試験 (Phagocytosis assay)

4-1 貪食試験

食作用 (phagocytosis) は、貪食性白血球等が外的異物やバクテリア等を取り込んで無毒化するという、生体防御を担う機能である。食作用には、細胞骨格や膜輸送の変化、炎症やアポトーシス関連の情報伝達系の活性化等、多くの生体現象が関与している。

Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) は、蛍光試薬である fluorescein に、アミノ基反応性である NCS 基を結合させたもので、水に溶けて強い黄緑色蛍光 (λ_{ex} - 495 nm、 λ_{em} - 520 nm) を発する。アミノ基と容易に反応するので、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、酵素、ホルモン、多糖類、細菌、原虫、真菌、ウイルス、リケッチア等の蛍光ラベルに適し、これらによって引き起こされる膠原病や、梅毒、抗核抗体等の蛍光抗体法による診断に利用される。

IL-12 で刺激を受けて活性化したマクロファージは IFN- γ を産生し、貪食能が高くなることが知られている。そこで本章では、それぞれの産生誘導が高かった *R. oligosporus* および *Tempeh* について大腸菌貪食試験を行った。腸管免疫モデル (Fig. 31) を改変した貪食試験用腸管免疫モデルを用いて、Caco-2 細胞に各サンプルで刺激を与えた後、THP-1 細胞側に FITC 標識した大腸菌を添加した。貪食試験後の THP-1 細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより、食作用によって取り込まれた大腸菌の確認を行い、貪食後の試験培地中に残存する大腸菌の colony forming unit (CFU) を測定することで、貪食能を数値化して評価した。

4-2 実験方法

4-2-1 貪食試験用腸管免疫モデル

Caco-2 細胞は、6 well 用セルカルチャーインサート (Millipore) に 1.0×10^6 cells、THP-1 細胞は、カバーガラス (18 mm \times 18 mm) を入れて UV 照射殺菌 (15 分) した 6 well マルチウェルプレート (Falcon) に 5.0×10^6 cells 播種し、それぞれ個別に分化誘導した (3-5-1-2、3-5-2-2)。RPMI 1640 培地 (w/o FBS、PS) に培地交換後、co-culture にすることで、貪食試験用腸管免疫モデルとした (Fig. 44)

4-2-2 *Escherichia coli* TOP10 の FITC 標識 (1 well 分)

- ・ FITC を PBS に溶解 (0.1 mg/ml)
- ・ *E. coli* TOP10 (2.5×10^9 cells) を懸濁
- ・ 遮光、室温で 30 分振盪
- ・ 遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分)
- ・ 上清除去
- ・ 0.2 ml の PBS に懸濁

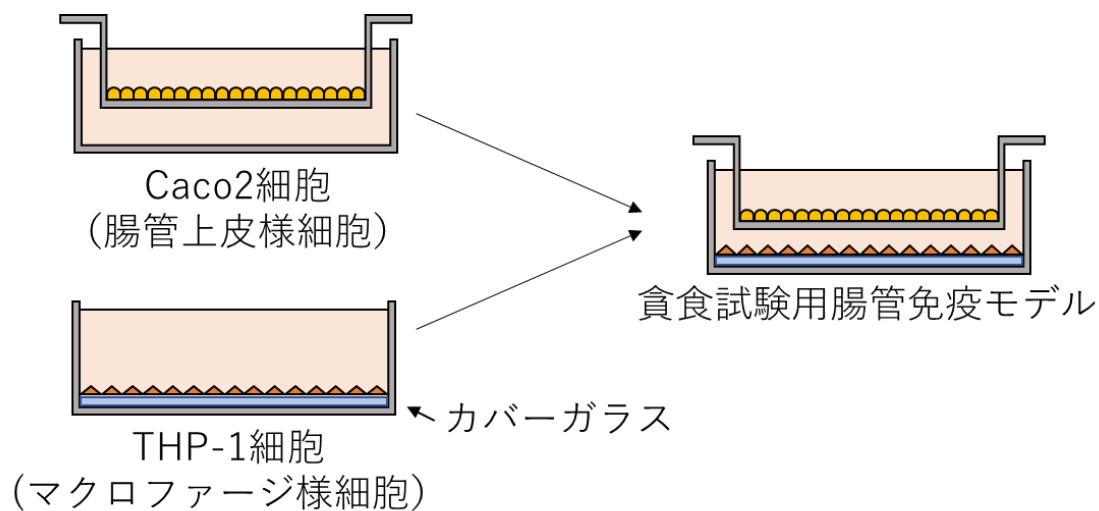


Fig. 44 食食試験用腸管免疫モデル

4-2-3 食食試験

- ・ 分化誘導した Caco-2 細胞および THP-1 細胞を用いて、食食試験用腸管免疫モデル (Fig. 44) を作製
- ・ Caco-2 細胞側にサンプルを添加 (終濃度 : 0.5 mg/ml)
- ・ 24 時間培養 (37°C、5% CO₂、飽和湿度)
- ・ セルカルチャーインサート (Caco-2 細胞) を廃棄
- ・ THP-1 細胞側に *E. coli* TOP10 / FITC サンプル (4-2-2) を添加 (Multiplicity of infection (MOI) = 1 : 500)
- ・ 37°C、15 分培養
- ・ 上清を回収 (→*E. coli* TOP10 CFU 測定試験に使用)
- ・ カバーガラスを PBS で洗浄
- ・ DAPI 染色
- ・ PBS で洗浄
- ・ スライドガラスにマウント剤を滴下
- ・ 細胞接着面を下にしてプレパラート作製 (余分なマウント剤は拭き取る)
- ・ 乾燥 (遮光)
- ・ カバーガラスをシール
- ・ HS All-in-One Fluorescence Microscope BZ-8000 (KEYENCE) で撮影

4-2-4 食食後残存 *E. coli* TOP10 CFU 測定試験

- ・ LB 寒天プレート (2% LB broth、1.5% Ager) を調製
- ・ 食食試験の上清を適宜希釈してコンラージ棒で塗布
- ・ 培養 (37°C、24 時間)
- ・ コロニーカウント

4-3 実験結果

マクロファージは IL-12 を産生し、ナイーブ T 細胞を Th1 細胞に分化させる。Th1 細胞から産生される IFN- γ は、マクロファージを活性化して殺菌活性を発揮するという食食作用プロセスがある。この食食能を評価するために、FITC で標識した *E. coli* TOP10 を食食ターゲットとして、THP-1 細胞に食食させた。Fig. 45 ~ Fig. 47 に示すように、THP-1 細胞中の緑の蛍光は、食食された *E. coli* TOP10 であり、核は DAPI 染色で青く染色されている。PBS 添加系の細胞に取り込まれた *E. coli* TOP10 に比べ、*R. oligosporus* や Tempeh 添加系では、多くの *E. coli* TOP10 が取り込まれている様子が確認された。マクロファージによる食食を受けなかった *E. coli* TOP10 の、CFU 測定結果を Fig. 48 に示した。*R. oligosporus* を添加した際の *E. coli* TOP10 生菌数はコントロール (PBS 添加系) よりも少なく、Tempeh 添加系ではさらに減少した結果となった。

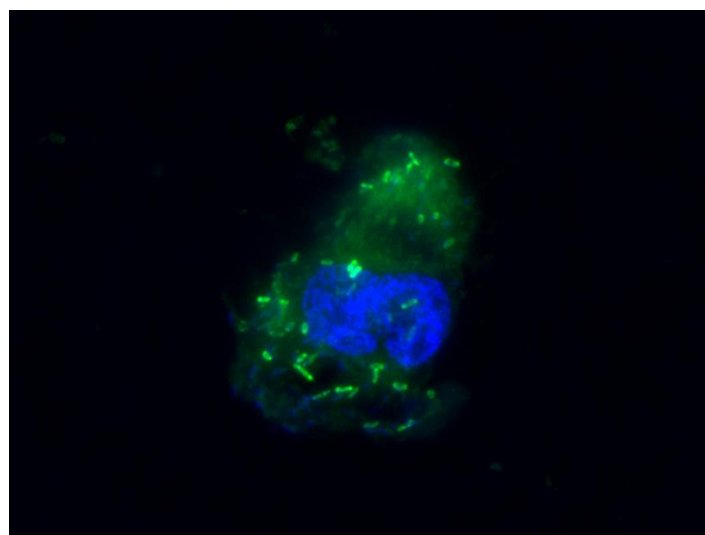


Fig. 45 *E. coli* TOP10 食食試験 (*R. oligosporus* 添加系)

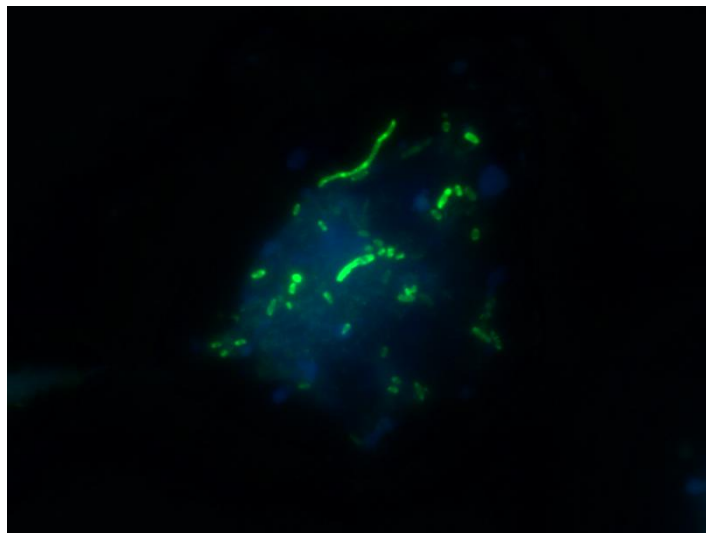


Fig. 46 *E. coli* TOP10 貪食試験 (Tempeh 添加系)

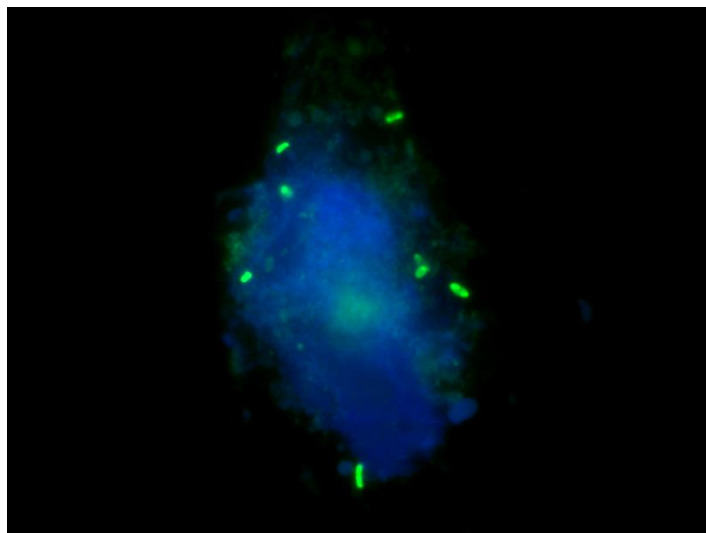


Fig. 47 *E. coli* TOP10 貪食試験 (PBS 添加系)

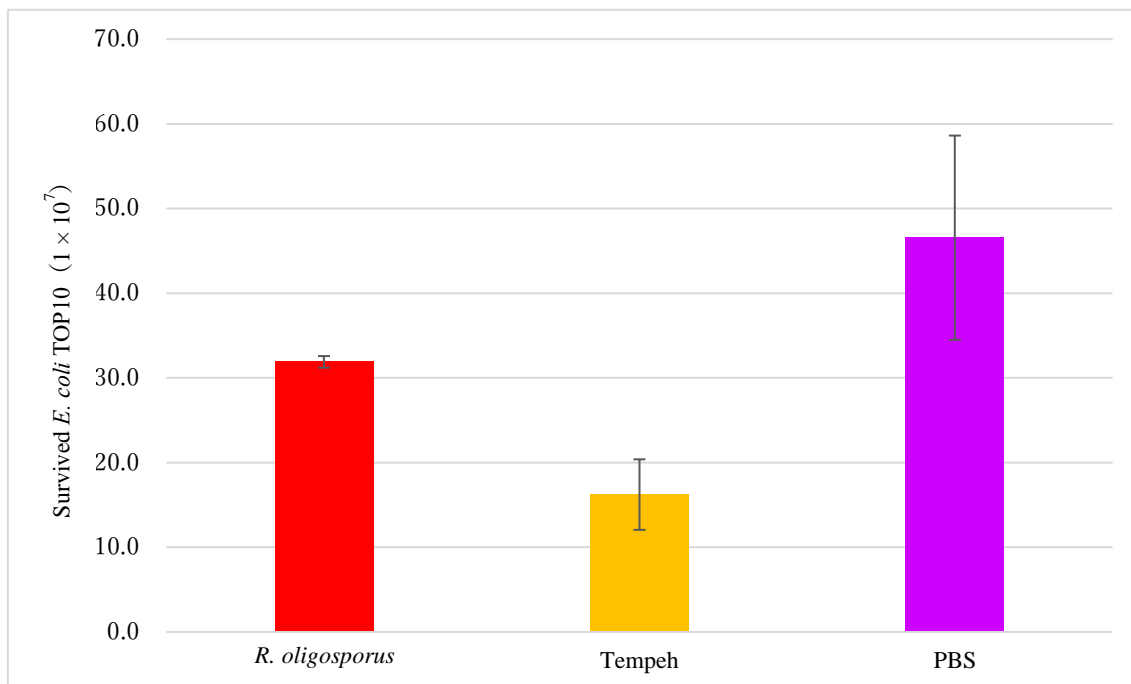


Fig. 48 食食試験後の *E. coli* TOP10 CFU

4-4 小括

R. oligosporus および Tempeh の IFN- γ 産生誘導能の結果から、マクロファージ様に分化した THP-1 細胞による大腸菌食食試験を行った。Fig. 45、Fig. 46 に示したように、多くの FITC 標識された *E. coli* TOP10 が、THP-1 細胞内に取り込まれている様子が観察された。対して、コントロールとなる PBS 添加系は取り込まれている菌体数が少なかった (Fig. 47)。食食を受けなかった *E. coli* TOP10 の CFU を測定したところ、*R. oligosporus* と Tempeh 添加系の試験区では、CFU が PBS よりも低い結果となった (Fig. 48)。マクロファージは IL-12 を産生し、ナイーブ T 細胞を Th1 細胞に分化させる。Th1 細胞から産生される IFN- γ は、マクロファージを活性化して殺菌活性を発揮するという食食作用プロセスがある。食食試験の結果は、IL-12 および IFN- γ 産生誘導能の結果と近い傾向が見られたことから、*R. oligosporus* および Tempeh に産生誘導された IL-12 および IFN- γ により、間接的に THP-1 細胞が活性化され、食食能上昇が促された可能性が示唆された。

Tempeh は、IL-12、IFN- γ 、hBD2 の産生を誘導し、さらにマクロファージの食食能を増加する作用があり、免疫力を高める可能性が示唆される結果となった。特に Tempeh は、IL-12 を産生誘導するだけでなく、それに伴うマクロファージの食食能を高める結果が得られた。納豆は Tempeh と同じく大豆を原料とした発

酵食品であるが、腸内細菌である乳酸菌を増やすことが知られており、その腸内乳酸菌が IL-12 の産生を誘導して免疫系を高めると考えられている[65][66][67]。このように、IL-12 誘導のメカニズムはそれぞれ異なるものの、納豆も Tempeh も、健康食品として免疫機能を高めることが示唆された。また、Tempeh 製造菌である *R. oligosporus* は、IFN- γ と hBD2 の産生誘導能が特に高く、自然免疫の増強に関与すると示唆されたことから、健康食品への利用の可能性も示唆された。

第5章 総括

IL-12 (p40/p35) は、1989年に natural killer cell stimulatory factor : NKSF として同定され[68]、1990年には、cytotoxic T lymphocyte : CTL を活性化する cytotoxic lymphocyte maturation factor : CLMF として同定されている[69]。IL-12 は、IFN- γ 産生に関わるサイトカインであり、感染症に対する防御免疫や腫瘍免疫の誘導、Th1 応答の誘導に不可欠である。IL-23 (p19/p40)、IL-27 (p28/Ebi3)、IL-35 (p35/Ebi3)、および IL-39 (p19/Ebi3) と共に IL-12 ファミリーに属しており、T 細胞の増殖や分化に関与している[70]。このうち IL-23 は、IL-12 のサブユニットである p40 と p19 により構成されている[71]。多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、または乾癬等の慢性炎症性疾患の発症において重要な炎症性サイトカインであり、IL-23 の増加は乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎の患者の生体検査で発見されている[72][73]。実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) やコラーゲン誘導性関節炎 (collagen induced arthritis : CIA) といった、組織特異的自己免疫の発症が、実は IL-23 によって引き起こされていることも明らかになっている[74]。p40 をサブユニットとしていることから、IL-12 と似たような感染防御に関与する一面もある。ただし、生体に感染源が侵入した際には、IL-23 よりも IL-12 のほうが先に産生される[5]。また、自然免疫には関与せず、獲得免疫のみに関与するといわれている一方、IL-12 は両方の免疫反応に関与する。IL-12 と IL-23 は共にマクロファージから分泌される[71]ことから、当研究の *in vitro* 腸管免疫モデルで、p40 をターゲットにして IL-12 を測定すると、同時に IL-23 が検出される可能性が懸念される。

p40 は、感染時に p35 や p19 よりも多く産生される傾向があり、過剰産生された p40 はホモダイマーを形成する。p40 ホモダイマーは、IL-12 レセプターの一つである IL-12R β 1 と結合することで、IL-12 の生理活性を抑制する可能性が示唆されている[6]。

このことから、免疫賦活活性の評価として IL-12 を測定する際は、p35 の測定が重要と考えたが、p35 は IL-35 のサブユニットも担っている。IL-35 は、1997年に epstein-barr ウイルス感染によって発現が誘導される分子である Ebi3 が、IL-12p35 のサブユニットの1つに結合していることが報告され、発見された非炎症性サイトカインである[75]。宿主免疫の重要な調節因子として報告されており[70]、重度の炎症が起こると、樹状細胞や、IL-35、IL-27 を産生する他の抗原提示細胞のリクルートを誘発する。それによって調節性リンパ球の分化を促進し、自己免疫疾患の原因となる過剰な免疫反応を抑制する[76]。IL-35 誘導性 Treg 細胞は、より多くの IL-35 を産生し[77]、Type 1 Treg 細胞は、IL-35 により免疫応答を抑制する [78]。IL-35 は IL-12 や IL-23 とは異なり、様々なサイトカインを調節して炎症反応を抑制することで、STAT シグナル伝達を制御している[79]。

このように、IL-35はTreg細胞によって産生されるサイトカインであり、当研究のCaco-2細胞 / THP-1細胞を用いた *in vitro* 腸管免疫モデルでは、分泌されないものと考えられる。つまり、p35をターゲットにすることで、IL-23およびp40ホモダイマーの同時検出を避けることができ、真のIL-12産生誘導能を評価することが可能であると示唆される。

そこで、IL-12p35の特異抗体を利用してIL-12の測定をしようと計画したが、市販されている抗体の多くは、IL-12p40に対する抗体のみであった。そこで、大腸菌を用いてIL-12p35組み換えタンパク質の発現を行い、抗原として実験動物に注射してIL-12p35ポリクローナル抗体を得ることとしたが、pET-15bベクターにIL-12p35遺伝子を挿入しても大腸菌による発現はされなかった。そこで、毒性タンパク質の解毒化作用を有するGSTを発現するpGEX-5X-3ベクターにIL-12p35遺伝子を組み込んで、GST融合タンパク質として発現させたところ、不溶性画分に発現が確認された。GSTは、PreScission protease認識配列でIL-12p35と結合しているため、PreScission proteaseを用いて容易に精製することが可能であった。IFN- γ についても、同様の手法で発現・精製することができ、宿主にとって有害なタンパク質でも、融合タンパク質としてマスクすることで、発現困難なタンパク質を発現させることができた結果となった。しかし、抗菌ペプチドであるhBD2は、この手法を用いても発現することができなかった。抗菌ペプチドは、大腸菌にとって自己を死滅させる作用を持つため、発現に至らなかったと考えられる。本発現、精製方法は、当研究室においてヒト全長AhRのような、発現の悪いタンパク質の発現・精製に成功した報告から応用されたものであるが[25]、この方法が、大腸菌では困難とされてきた難発現タンパク質の発現に有効的な手法であることが期待される結果となり、他の難発現タンパク質の発現にも応用可能であることが示唆された。

発現・精製したIL-12p35、IFN- γ および合成ペプチドを抗原とし、得られたhBD2ポリクローナル抗体を用いて、それぞれの産生誘導能を評価した。その結果、大豆発酵食品であるTempehと、その製造に用いられる接合菌の*R. oligosporus*について高い誘導能を見出すことができた。これまで、発酵食品や微生物、特に乳酸菌は、高い免疫賦活活性が見出されており、様々な形態で市場に出されている。乳酸菌による免疫力向上のメカニズムは数多く研究されており、代表的な成分は、細胞壁成分のペプチドグリカンであるといわれている[80]。TLR1/TLR2およびTLR2/TLR6ヘテロダイマーが、ペプチドグリカンを認識して強いIL-12産生応答をする一方、菌株によっては、産生抑制に働く構造のペプチドグリカンも報告されている[81]。LightfootらやKajiらは、同じく細胞壁構成成分であるLipoteichoic acidによるIL-12、IL-6、TGF- β の産生誘導や、IL-10/IL-12の産生バランスの制御を報告している[82][83]。ただし、発酵食品は必ずしも単一の

微生物によるものではなく、IL-12 産生誘導が確認されている味噌のように、乳酸菌、酵母、麹菌等の複合微生物による発酵食品が数多く存在する。酵母や麹菌といった真菌の細胞壁は、主にマンナンとキチン、 β -glucan で構成されており、真菌による免疫応答は、これらが認識されることで引き起こされると考えられる[84]。*R. oligosporus* が含まれる接合菌も、細胞壁成分に β -glucan を含んでいるが、他の真菌に比べて非常に微量であるが[85]、接合菌は他の真菌にはない、キトサンを細胞壁に多く含むという特徴がある[34]、樹状細胞の活性化や MyD88 の活性化等により、免疫応答に関与すると考えられる[38][86]。

IFN- γ は先に説明した通り、抗原刺激により NK 細胞や Th1 細胞等から分泌されることから、細胞性免疫反応の指標にもなっている。Sugata らは塩基性ロイシンジッパー型転写因子ファミリーの一つである Batf2 の機能を解析し、IFN- γ 刺激によって Batf2 発現が上昇し、マクロファージの活性化につながると報告している[87]。マクロファージは貪食能を有しており、老化した細胞や不要細胞等の apoptosis や、がん細胞だけではなく体内に侵入した微生物やウイルス等の貪食も知られている。Hashimoto らは、インフルエンザに感染した細胞がマクロファージに貪食されることで、ウイルス増殖が抑制されると報告している[88]。また、貪食後の分解物を樹状細胞が認識し、MHC 分子を細胞表層に出現させることで、獲得免疫を誘導する報告がされている[89]。

自然免疫に関わりの深い hBD2 については、腸管上皮細胞に *R. oligosporus* 菌体が接触することで、強い応答反応を示す可能性が示唆された。微細化された菌体断片が、腸管上皮のパイエル板等を介して基底膜側に入り込むことも考えられるが、そうするとマクロファージの働きによって、さらに hBD2 が産生されることも示唆される結果となった。発酵物である Tempeh の、hBD2 産生誘導能の増加は大きなものではなかったが、自然免疫の増強に関与する可能性は十分にあるものと示唆された。この応答は、特に菌体成分によって強く引き起こされる結果となり、*R. oligosporus* および *A. oryzae* 自体がもつ機能性の一つになるであろうと考えられる。

貪食メカニズムについては、Totsuka らが MAIR-II 分子に着目して、炎症性単球による感染時の貪食メカニズムを以下の様に解明している。炎症性単球細胞表面の TLR 4 が抗原を認識すると MAIR-II と結合し、VLA-4 という接着分子の活性化を誘導する。その炎症性単球は血管内壁に接着し、感染部位に局所的に集積して貪食すると考えられている。炎症性単球は血管から組織内に入ると、マクロファージや樹状細胞に分化する細胞であり、マクロファージにも MAIR-II 分子の存在が報告されている[90][91]。当研究結果における貪食のメカニズムは、これと同様であるとは断定できないが、少なくとも Tempeh や *R. oligosporus* が生体内に入り、マクロファージが活性化して、貪食能が増加するメカニズムの一

つとして考えられる。

本研究を通じて、これまで発現が困難とされてきた、大腸菌を用いた IL-12、IFN- γ の発現に成功し、特異的な抗体を得ることに成功した。また、これまで研究されてこなかった、Tempeh および *R. oligosporus* の免疫賦活能については、IL-12、IFN- γ 、hBD2 の高い産生誘導能に加え、マクロファージの貪食作用を促進することが確認された。Tempeh は様々な機能性を持つ大豆発酵食品であるが、そのほとんどは大豆成分によるものである。*R. oligosporus* は、可食微生物で唯一キトサンを含有している。本研究結果は、様々な有用成分が関与していると考えられるが、その一つとして、キトサンの MyD88 活性化作用が、IL-12、IFN- γ 、hBD2 産生誘導能を増強していることも考えられ、Tempeh および *R. oligosporus* について、微生物の観点から、自然免疫の増強への関与という新たな機能性が示唆された。

機能性食品とは、「食品成分のもつ生体防御、体調リズム調節、疾病の防止と回復等に係わる体調調節機能を、生体に対して十分に発現できるように設計し、加工された食品であること」と、機能性食品懇談会（厚生労働省）で定義付けされている。そのため、現状の Tempeh はこれに含まれないが、ヒトの免疫力低下問題だけでなく、食に求められている健康維持や健康増進、健康寿命の延伸に関して、非常に有用な発酵食品である。また、Tempeh 製造菌である *R. oligosporus* も自然免疫を増強させる可食微生物であることから、独立して健康食品素材になり得る可能性があるとして示唆される。

参考文献

- ・ 「史上最強図解 安保 徹のこれならわかる！免疫学」著：安保徹 出版社：ナツメ社 発行年月：2010年08月
- ・ 「もっとよくわかる！免疫学」著：河本宏 出版社：羊土社 発行年月：2011年02月
- ・ 「改訂第2版 カラー図解 人体の正常構造と機能 [全10巻縮刷版]」編集者：酒井建雄、河原克雅 出版社：事新報社 発行年月：2008年3月
- ・ 「サイトカイン・ケモカインのすべて：基礎から最新情報まで」編集者：笠倉新平、松島綱治 出版社：日本医学館 発行年月：2004年8月

[1] 内閣府 令和2年版高齢社会白書

[2] L. Gratton, A. Scott: LIFE SHIFT 100年時代の人生戦略.

[3] 厚生労働省 「令和元年(2019)人口動態統計月報年計(概数)の概況」
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai19/dl/kekka.pdf>

[4] Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837-848.

[5] Van Seventer J. M., Nagai T., Van Seventer G. A. (2002) Interferon- β differentially regulates expression of the IL-12 family members p35, p40, p19 and EB13 in activated human dendritic cells. *J. Neuroimmunol.*, **133**(1-2), 60-71.

[6] Mondal S., Kundu M., Jana M., Roy A., Rangasamy S. B., Modi K. K., Wallace J., Albalawi Y. A., Balabanov R., Pahan K. (1995) Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.*, **154**(1), 116-127.

[7] Guo Y., Cao W., Zhu Y. (2019) Immunoregulatory functions of the IL-12 family of cytokines in antiviral systems. *Viruses*, **11**(9), 772.

[8] Masuda T., Kimura M., Okada S., Yasui H. (2010) *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 329-335.

[9] Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**(6870), 389-395.

[10] Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. (1990) Defensins. *Eur. J. Haematol.*, **44**(1), 1-8.

[11] 中村公則, 菊池摩仁, 綾部時芳 (2019) 抗菌ペプチド α ディフェンシンによる腸内細菌叢の制御. *腸内細菌学雑誌*, **33**(3), 129-135.

- [12] Singh P. K., Jia H. P., Wiles K., Hesselberth J., Liu L., Conway B. A., Greenberg E. P., Valore E. V., Welsh M. J., Ganz T., Tack B. F., McCray P.B. Jr. (1998) Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(25), 14961-14966.
- [13] Bals R., Wang X., Wu Z., Freeman T., Bafna V., Zasloff M., Wilson J. M. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.*, **102**(5), 874-880.
- [14] Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J. M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, **387**(6636), 861-861.
- [15] Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J. M. (2001) Isolation and Characterization of Human μ -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.*, **276**(8), 5707-5713.
- [16] Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N., Chen Q., Buffo M. J., Shogan J., Anderson M., Schröder J. M., Wang J. M., Howard O. M., Oppenheim J. J. (1999) β -defensins : linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*, **286**(5439), 525-528.
- [17] Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-685.
- [18] Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**(9), 4350-4354.
- [19] Hosaka Y., Matsutani S., Kawate S., Itoh S., Miura A., Mizoura Y., Yamada S, Uemura S., Konno H., Grave E., Wakui H., Itoh H. (2021) Expression of difficult-to-express proteins, human IL-12 and IFN- γ . *Am. J. Mol. Biol.*, **11**(2), 29-37.
- [20] Brombacher F., Dorfmueller A., Magram J., Dai W. J., Köhler G., Wunderlin, A., Palmer-Lehmann K., Gately M. K., Alber, G. (1999) IL-12 is dispensable for innate and adaptive immunity against low doses of *Listeria monocytogenes*. *Int. Immun.*, **11**(3), 325-332
- [21] Decken K., Köhler G., Palmer-Lehmann K., Wunderlin A., Mattner F., Magram J., Gately M. K., Alber G. (1998) Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, **66**(10), 4994-5000.
- [22] Cooper A. M., Kipnis A., Turner J., Magram J., Ferrante J., & Orme I. M. (2002) Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J. Immunol.*, **168**(3), 1322-1327.

- [23] Fuji A., Kakumu S., Ohtani Y., Murase K., Hirofuji H., Tahara H. (1987) Interferon- γ production by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic liver disease. *Hepatology*, **7**(3), 577-581.
- [24] Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K., Takaoka A., Yokochi T., Oda H., Tanaka K., Nakamura K., Taniguchi T. (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, **408**(6812), 600-605.
- [25] Uemura S., Nakajima Y., Yoshida Y., Furuya M., Matsutani S., Kawate S., Ikeda S., Tsuji N., Grave E., Wakui H., Itoh, H. (2020) Biochemical properties of human full-length aryl hydrocarbon receptor (AhR). *J. Biochem.*, **168**(3), 285–294.
- [26] 岩井和夫 (1987) 食品成分による膵酵素の分泌調節機構. *化学と生物*, **25**(6), 392-395.
- [27] 小林彰夫 (1987) 外因性および内因性の食欲調節因子. *化学と生物*, **25**(3), 203-206.
- [28] 文部省（現文部科学省）特定研究「食品機能の系統的解析と展開」（昭和 59～61 年）
- [29] 和田昭允 (2003) 「プロバイオティクスとプレバイオティクス-21 世紀の食と健康を考える-」 学会センター関西 pp. 4-8
- [30] 光岡知足「バイオジェニックスの時代へ-乳酸菌の真のメカニズム解明の幕開け-」 バイオジェニックス連絡協議会編 pp.2-16
- [31] 中村好志, 江崎秀男 (2013) 食品の機能性と発酵による変化. *日本醸造協会誌*, **108**(1),16-24.
- [32] Hamajima H., Matsunaga H., Fujikawa A., Sato T., Mitsutake S., Yanagita T., Nagao K., Nakayama J., Kitagaki H. (2016) Japanese traditional dietary fungus koji *Aspergillus oryzae* functions as a prebiotic for *Blautia coccooides* through glycosylceramide: Japanese dietary fungus koji is a new prebiotic. *SpringerPlus*, **5**(1), 1-10.
- [33] 永尾雅哉 (2018) 味噌による免疫系の活性化を介したがん予防. *中央味噌研究所研究報告*, (39), 83-86.
- [34] Bartnicki-Garcia S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, **22**(1), 87-108.
- [35] 中永征太郎, 佐藤孜郎, 吉良尚平, 前崎祐二, 三田典子, 水落一雄, 田淵満幸, 中川靖枝, 辻啓介 (1995) キトサン摂取による人血清コレステロール値の改善. *キチン・キトサン研究*, **1**(3), 175-182.
- [36] ト蔵浩和, 小林祥泰 (2003) キトサンのコレステロール低下作用と安全性: 二重盲検試験での検討. *キチン・キトサン研究*, **9**(2), 98-99.

- [37] Gallaher D. D., Gallaher C. M., Mahrt G. J., Carr T. P., Hollingshead C. H., Hesslink R. Jr, Wise J. (1993) Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**(9), 1439-1444.
- [38] Da Silva C. A., Hartl D., Liu W., Lee C. G., Elias J. A. (2008) TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. *J. Immunol.*, **181**(6), 4279-4286.
- [39] Partida-Martinez L. P., Hertweck C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, **437**(7060), 884-888.
- [40] 岡留美穂, 岡田弥生, 大野信子 (2004). テンペ製造菌 *Rhizopus oligosporus* による加水分解酵素の生産. *和洋女子大学紀要 家政系編*, **44**, 147-158.
- [41] Terakawa T., Takaya N., Horiuchi H., Koike M., Takagi M. (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, **16**(7), 439-443.
- [42] 松浦栄治 (2007) テンペと生活習慣病： ヒト試験よりテンペを考える. *日本テンペ研究会誌*, **7**.
- [43] 岡本基 (2012) はとむぎテンペの機能性. *日本テンペ研究会誌*, **9**, 20-25.
- [44] 松岡麻男, 古場一哲 (2005) *活水論文集*, **48**, 87-101.
- [45] 松岡麻男, 古場一哲 (2007) *日本テンペ研究会誌*, **7**, 21-22.
- [46] 須見洋行 (2011) *温故知新 株式会社秋田今野商店*, **48**, 87-92.
- [47] 福山美穂, 平井和子, 村田希久 (1975) *生化学*, **477**, 71.
- [48] Esaki H., Onozaki H., Kawakishi S., Osawa T. (1996) New antioxidant isolated from tempeh. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(3), 696-700.
- [49] Traber M. G., Kayden H. J., Rindler M. J. (1987) Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *J. Lipid Res.*, **28**(11), 1350-1363.
- [50] Brandsch M., Miyamoto Y., Ganapathy V., Leibach F. H. (1994) Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H⁺ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem. J.*, **299**(1), 253-260.
- [51] Harris D. S., Slot J. W., Geuze H. J., James D. E. (1992) Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**(16), 7556-7560.
- [52] Haller D., Bode C., Hammes W. P., Pfeifer A. M. A., Schiffrin E. J., Blum S. (2000) Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, **47**(1), 79-87.

- [53] Hosoi T., Hirose R., Saegusa S., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogawa S. (2003) Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium *Bacillus subtilis* (natto). *Int. J. Food Microbiol.*, **82**(3), 255-264.
- [54] Jung H. C., Eckmann L., Yang S. K., Panja A. S. I. T., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M. F. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Investig.*, **95**(1), 55-65.
- [55] Koyama Y., Suzuki T., Kajiya A., Isemura M. (2005) Stimulation of IL-8 production by *Aralia cordata* lectin in human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(1), 202-205.
- [56] ECACC General Cell Collection : 86010202 CACO-2. https://www.phc-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86010202&collection=ecacc_gc
- [57] Daigneault M., Preston J. A., Marriott H. M., Whyte M. K., Dockrell D. H. (2010) The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLOS ONE*, **5**(1), e8668.
- [58] Tanoue T., Nishitani Y., Kanazawa K., Hashimoto T., Mizuno M. (2008) *In vitro* model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264. 7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **374**(3), 565-569.
- [59] 牧野聖也 (2015) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 が産生する多糖体の免疫賦活効果. *Milk science*, **64**(3), 271-277.
- [60] 松本伊左尾, 今井誠一 (1990) テンペ発酵中の成分変化. *日本食品工業学会誌*, **37**(2), 130-138.
- [61] Shin J. E., Choi Y. (2010) *Treponema denticola* suppresses expression of human β -defensin-2 in gingival epithelial cells through inhibition of TNF α production and TLR2 activation. *Mol. Cells*, **29**(4), 407-412.
- [62] Shin J. E., Kim Y. S., Oh J. E., Min B. M., Choi Y. (2010) *Treponema denticola* suppresses expression of human β -defensin-3 in gingival epithelial cells through inhibition of the toll-like receptor 2 axis. *Infect. Immun.*, **78**(2), 672-679.
- [63] Kobayashi M., Yoshiki R., Sakabe J., Kabashima K., Nakamura M., Tokura Y. (2009) Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.*, **160**(2), 297-304.

- [64] Yoshikawa T., Inoue R., Yoshida Y., Watanabe T., Bukawa W., Ushida, K. (2009) Diverse immune responses to orally administered heat-killed cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 in murine immune tissues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(6), 1439-1442.
- [65] Hosoi T., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogawa, S. (2000) Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisin. *Can. J. Microbiol.*, **46**(10), 892-897.
- [66] Horie M., Koike T., Sugino S., Umeno A., Yoshida Y. (2018) Evaluation of probiotic and prebiotic-like effects of *Bacillus subtilis* BN on growth of Lactobacilli. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **64**, 26–33. doi: 10.2323/jgam.2017.03.002
- [67] Nishibayashi R., Inoue R., Harada Y., Watanabe T., Makioka Y., Ushida K. (2015) RNA of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 is a major component inducing interleukin-12 production from human monocytic cells. *PLOS ONE*, **10**(6), e0129806.
- [68] Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R. M., Clark S. C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B., Trinchieri G. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **170**(3), 827-845.
- [69] Gately M. K., Desai B. B., Wolitzky A. G., Quinn P. M., Dwyer C. M., Podlaski F. J., Familletti P. C., Sinigaglia F., Chizzonite R., Gubler U. (1991) Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.*, **147**(3), 874-882.
- [70] Vignali D. A., Kuchroo V. K. (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.*, **13**(8), 722.
- [71] Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J. C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y., Abrams J. S., Moore K. W., Rennick D., de Waal-Malefyt R., Hannum C., Bazan J. F., Kastelein R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, **13**(5), 715-725.
- [72] Gaffen S. L., Jain R., Garg A. V., Cua D. J. (2014) The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**(9), 585-600.
- [73] Patel D. D., Kuchroo V. K. (2015) Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*, **43**(6), 1040-1051.

- [74] Cua D. J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C. A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S. A., Gorman D., Kastelein R. A., Sedgwick J. D. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, **421**(6924), 744-748.
- [75] Devergne O., Birkenbach M., Kieff, E. (1997) Epstein–Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**(22), 12041-12046.
- [76] Riquelme P., Haarer J., Kammler A., Walter L., Tomiuk S., Ahrens N., Wege A. K., Goetze I., Zecher D., Banas B., Spang R., Fändrich F., Lutz M. B., Sawitzki B., Schlitt H. J., Ochando J., Geissler E. K., Hutchinson J. A. (2018) TIGIT⁺ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. *Nat. Commun.*, **9**(1), 1-18.
- [77] Xiang X. G., Xie Q. (2015) IL-35 : a potential therapeutic target for controlling hepatitis B virus infection. *J. Dig. Dis.*, **16**(1), 1-6.
- [78] Choi J., Leung P. S., Bowlus C., Gershwin M. E. (2015) IL-35 and autoimmunity: a comprehensive perspective. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **49**(3), 327-332.
- [79] Liu M. X., Liu Q. Y., Liu Y., Cheng Z. M., Liu L., Zhang L., Sun, D. H. (2019) Interleukin-35 suppresses antitumor activity of circulating CD8⁺ T cells in osteosarcoma patients. *Connect. tissue res.*, **60**(4), 367-375.
- [80] Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 159–184.
- [81] Shida K., Kiyoshima-Shibata J., Kaji R., Nagaoka M., Nanno M. (2009) Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology*, **128**(1pt2), e858-e869.
- [82] Lightfoot Y. L., Mohamadzadeh M. (2013) Tailoring gut immune responses with lipoteichoic acid-deficient *Lactobacillus acidophilus*. *Front. Immunol.*, **4**, 25.
- [83] Kaji R., Kiyoshima-Shibata J., Nagaoka M., Nanno M., Shida K. (2010) Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain lactobacillus strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *J. Immunol.*, **184**(7), 3505-3513.
- [84] Levitz S. M. (2010) Innate recognition of fungal cell walls. *PLOS Pathog.*, **6**(4), e1000758.

- [85] Odabasi Z., Paetznick V. L., Rodriguez J. R., Chen E., McGinnis M. R., Ostrosky-Zeichner L. (2006) Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med. Mycol.*, **44**(3), 267-272.
- [86] Gow N. A., Hube B. (2012) Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, **15**(4), 406-412.
- [87] Roy S., Guler R., Parihar S. P., Schmeier S., Kaczkowski B., Nishimura H., Shin J. W., Negishi Y., Ozturk M., Hurdayal R., Kubosaki A., Kimura Y., de Hoon M. J., Hayashizaki Y., Brombacher F., Suzuki H. (2015) Batf2/Irf1 induces inflammatory responses in classically activated macrophages, lipopolysaccharides, and mycobacterial infection. *J. Immunol.*, **194**(12), 6035-6044.
- [88] Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. (2007) Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.*, **178**(4), 2448-2457.
- [89] Ackerman A. L., Cresswell P. (2004) Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.*, **5**(7), 678-684.
- [90] Yotsumoto K., Okoshi Y., Shibuya K., Yamazaki S., Tahara-Hanaoka S., Honda S., Osawa M., Kuroiwa A., Matsuda Y., Tenen D. G., Iwama A., Nakauchi H., Shibuya A. (2003) Paired activating and inhibitory immunoglobulin-like receptors, MAIR-I and MAIR-II, regulate mast cell and macrophage activation. *J. Exp. Med.*, **198**(2), 223-233.
- [91] Totsuka N., Kim Y. G., Kanemaru K., Niizuma K., Umemoto E., Nagai K., Tahara-Hanaoka S., Nakahasi-Oda C., Honda S., Miyasaka M., Shibuya K., Shibuya A. (2014) Toll-like receptor 4 and MAIR-II/CLM-4/LMIR2 immunoreceptor regulate VLA-4-mediated inflammatory monocyte migration. *Nat. Commun.*, **5**(1), 1-10.

研究業績

発表論文（査読付き）

・ Hosaka Y., Matsutani S., Kawate S., Itoh S., Miura A., Mizoura Y., Yamada S., Uemura S., Konno H., Grave E., Wakui H., Itoh H. (2021) Expression of difficult-to-express proteins, human IL-12 and IFN- γ . *Am. J. Mol. Biol.*, **11**(2), 29-37.

学会発表

・ 保坂 善仁, 伊藤 佳, 三浦 温子, 松谷 俊, Ewa Grave, 涌井 秀樹, 今野 宏, 伊藤 英晃 : IL-12p35 特異抗体を用いた測定法の構築と高産生誘導能を有する機能性食品素材の探索. 第 93 回日本生化学会大会, 演題番号 P-493, 2020 年 9 月 15 日. web 開催

・ 保坂 善仁, 伊藤 佳, 三浦 温子, 松谷 俊, Ewa Grave, 涌井 秀樹, 今野 宏, 伊藤 英晃 : IL12p35 特異抗体を用いた Tempeh の免疫賦活作用解析. 日本生化学会東北支部第 87 回例会, 演題番号 A-14, 2021 年 5 月 29 日. web 開催

謝辞

本論文は、著者が株式会社秋田今野商店に在職中、秋田大学の社会人博士後期課程に入学した3年間の研究成果をまとめたものです。この3年間、仕事と研究の両立のために、大変多くの方々にご協力をいただき、また大変ご迷惑をおかけしました。とりわけ、伊藤英晃教授からは、私が入学する3年前からご指導いただき、入学してからの3年間と合わせて6年間、ご指導とご助言を賜りました。残念ながら、最終年度は直接ご指導をいただく機会が減ってしまいましたが、離れた地からもご配慮いただき大変感謝しております。

また、本論文の執筆にあたり、中間審査および最終審査では、涌井秀樹教授、藤原憲秀教授、疋田正喜教授、尾高雅文教授より、貴重なご指導とご助言を賜り、大変勉強させていただきました。

社会人博士課程の取得において、ご理解ご協力いただいた弊社の今野宏社長をはじめ、社員の皆様には本当にご迷惑をおかけしました。学位取得に多くのご理解とご支援、ご協力をいただけたこと、大変感謝しております。

最後に、所属する伊藤研の皆様へ。本研究テーマは、皆様のご協力なくしては遂行することができませんでした。忙しい中、実験の手伝いや解析を快諾いただいたことは、心から謝意を表します。皆様のこれからのご活躍を応援しています。

3年間の博士後期課程を振り返り、本当に皆様のご支援ご協力なくしては成し遂げることができなかつたものと痛感しております。ここで得た知識と経験を、今後遺憾なく発揮していくことが、皆様への恩返しと思っておりますので、微力ながら精一杯努力していこうと思っております。

皆様、本当にどうもありがとうございました。