

論文内容要旨

植物乳酸菌による生薬発酵で生ずる抗炎症性物質の
構造と機能に関する研究

主指導教員：杉山 政則 共同研究講座教授
(医系科学研究科 未病・予防医学)

副指導教員：小池 透 教授
(医系科学研究科 医薬分子機能科学)

副指導教員：野田 正文 特任准教授
(医系科学研究科 未病・予防医学)

岡本 知子

(医歯薬保健学研究科 薬科学専攻)

生薬は、ヒトへの投与の長い歴史の中で、その薬効と安全性が評価されてきた。その薬効成分は、医薬品リード化合物となっているが、生薬中に含まれる有効成分量は、低いものもしばしば認められる。

生薬に含まれる薬効成分の多くは、植物二次代謝物であり、これらは元の植物中に主に配糖体として保存されている。さらに、配糖体はその糖鎖が切断された形の活性型「アグリコン」よりも生物学的利用率が低いため、結果として弱い生物活性しか示さないことが多い。すなわち、植物二次代謝物の生物活性を最大限に活かすためには、活性型「アグリコン」への変換が重要である。

近年、漢方薬の研究を通じて、植物二次代謝物が、腸内細菌による配糖体加水分解などを受け、活性型に変換されるものがあることが明らかとなってきた。また、これらの活性型への変換には、特定の腸内細菌が関わっていることが見出された。このように、植物二次代謝物を生物学的に活性なアグリコンに変換する腸内細菌は、薬効を上昇させるために大きな役割を果たしている。また、通常、配糖体を加水分解する酵素として知られる β -グルコシダーゼを持つ微生物による生薬の発酵は、生物活性物質をその前駆体から変換するための有用な方法であるとの報告がなされるようになった。

植物由来の乳酸菌（植物乳酸菌）の1つ *Lactobacillus (Lb.) plantarum* SN13T は、予備実験から、生薬の水抽出液中での増殖性が良好であることが判明した。すなわち、SN13T 株は、生薬の発酵微生物として使用できる可能性があることが明らかとなった。そこで、本研究では、「SN13T 株が発酵によって、生薬中の物質から新たな生物活性物質を生成させる」という仮説を立て、その検証を行うことを目的とした。

その際、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデル細胞における炎症反応に対する抑制活性を指標として、生薬発酵液中に含まれる抗炎症性物質のスクリーニングを行った。この細胞モデルは、脂肪酸の投与により、細胞培養液中の Interleukin (IL)-8 の量が増加することが確認されたことから、発酵生薬の生物活性を IL-8 遊離量に対する阻害度を測定することで評価した。

SN13T 株を用いて 10 種類の生薬を発酵させ、その発酵抽出物の抗炎症活性を調査した結果、艾葉（ガイヨウ）発酵液に抗炎症活性が確認された。次にゲノム配列の明らかな SN13T 株、SN35N 株、および LP28 株の 3 種類の乳酸菌株で発酵させた艾葉抽出物の抗炎症活性を未発酵の艾葉抽出物と比較した。その結果、SN13T 株、および SN35N 株で発酵させた場合は、未発酵艾葉抽出物よりも抗炎症活性が上昇したが、LP28 株の場合は、未発酵艾葉抽出物と同程度であることが分かった。また、SN13T 株で発酵させた艾葉抽出物の抗炎症活性は、SN35N 株のそれより強かった。

これらの株の全ゲノム情報を比較した結果、SN13T 株、SN35N 株、LP28 株の順に、 β -グルコシダーゼをコードする Open reading frame (ORF) が多いことが分かった。さらに、これらの ORF のアミノ酸配列に基づいて系統樹を作成した結果、SN13T 株は他の 2 株とは異なり、本株特有の β -グルコシダーゼを保有する可能性が高いことが示唆された。すなわち、SN13T 株のように多様性に富んだ β -グルコシダーゼを持つ乳酸菌株は、より多くの植物二次代謝物を基質として認識

し、配糖体を加水分解できると考えられる。

次に、SN13T 株による発酵艾葉抽出物から抗炎症性物質の単離を試みた。活性を有する 90% (v/v) メタノール画分の成分を HPLC で分析した結果、発酵艾葉抽出物では、未発酵艾葉抽出物にはない 2 つのピークが確認された。これらのピークは、SN35N 株で発酵させたものでもわずかに検出されたが、LP28 株で発酵させた場合には、全く検出されなかった。この結果は、抗炎症活性試験の結果と相関しており、活性の増強は発酵により新たに生成した 2 つのピークに由来する化合物である可能性が強く示唆された。さらに活性物質の分離・精製を続けた結果、これら 2 つのピークに由来する活性化合物は、catechol と seco-tanaparholide C であると同定された。ちなみに、得られた両化合物の量は、185 g の乾燥艾葉粉末からそれぞれ 22.3 mg および 18 mg であった。

得られた 2 つの化合物は、どちらもキク科に豊富に含まれる化合物群であり、配糖体として植物中に存在することが報告されている。したがって、catechol と seco-tanaparholide C は、SN13T 株が保有する β -グルコシダーゼによる配糖体加水分解で生じた化合物であると推測された。

以上、SN13T 株によって、生薬艾葉中に含まれる配糖体が加水分解された結果、活性物質へと変換され、活性物質本体の量が増加したと結論付けられる。すなわち、植物乳酸菌 *Lb. plantarum* SN13T による生薬の発酵は、生薬中の活性物質を生成する有用な方法であることが示唆された。