

論文内容要旨

機能性植物乳酸菌の探索分離とその 生物活性物質に関する研究

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

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：古武 弥一郎 教授
(医系科学研究科 生体機能分子動態学)

井上 裕介

(医系科学研究科 総合健康科学専攻)

第 I 章 植物乳酸菌のパイナップル果汁発酵によるオルニチン及びシトルリンの高産生

乳酸菌がアルギニン (Arg) を基質として、シトルリン (Cit) を介してオルニチン (Orn) を産生するアルギニンデアミナーゼ (ADI) 経路の代謝能を有していることは既に報告されており、当研究室においても植物由来の *Weissella confusa* K-28 株が Orn 及び Cit を産生することを報告している。その菌株含め報告されている Orn 及び Cit の生成には化学培地が使用されており、果汁のような天然素材による発酵を介した機能性アミノ酸 (FAA) 生成の報告は少ない。本研究では、動物由来乳酸菌で必要とされる乳製品以外の発酵で Orn 及び Cit を産生する能力を有する乳酸菌をサトウキビ及びてん菜から探索分離し、それら FAA を高収率で産生するための最適条件を調査した。

15 種類の果汁、さとうきび及びてん菜から分離した 12 種の乳酸菌株を用いて、Orn 及び Cit の高産生培養条件を検討した結果、ストレート濃度のパイナップル果汁を培地としサトウキビ由来 *Lactococcus lactis* MSC-3G を用いて培養温度 28℃、培地 pH6.5、嫌気培条件で発酵することで、Orn (98.9 ± 2.2 mM) 及び Cit (211.1 ± 35.7 mM) の高産生することができた。また、その際の ADI 経路の酵素であり Arg を Cit に変換する ADI 活性が非常に増加したが、Cit を Orn に変換する OTC 活性はそれほど増加をしなかったことから、Orn だけでなく Cit も蓄積される状態であることがわかった。発酵パイナップル果汁の濃縮液を用いた経口投与毒性試験、変異原性試験、染色体異常試験 (*in vitro*) についてはいずれも無毒性と評価できた。また薬剤感受性及び全ゲノム解析により、MSC-3G 株の特性も確認できた。

第 II 章 植物乳酸菌による発酵生薬抽出物の抗酸化機能

活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスは細胞や遺伝子にダメージを与え、老化や生活習慣病、がんや動脈硬化といった様々な病気の要因になるといわれている。紫外線やストレス、加齢等により生じるが、腎障害を誘発することで知られる食品中のカビ毒マイコトキシンによっても ROS が生じることが報告されており、また脂肪肝や高血圧をもたらす肥満によっても ROS が増加する。生薬は漢方薬の原料であり、様々な種類があり症状に合わせて使用されているが、薬効を示さない成分もいくつも含んでおり、それらが新たに生理活性を示す物質の基質として期待されている。そこで、生薬を植物乳酸菌で発酵することで抗酸化能を付与し、保健機能を増強できる素材を研究した。

41 種の乾燥生薬の抽出物を用いて H₂O₂ 処理に対する抗酸化能を確認したところ、サトウキビ由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* MSC-5T 株を用いた枇杷葉 (*Eriobotrya Folium*) の発酵液に強い活性を確認できた。また、この発酵液を添加した後に HEK293 細胞を OTA 及び CTN で処理するとカビ毒による HEK293 細胞の生存率低下が抑制された。続けて、MSC-5T 株の枇杷葉発酵液を添加することで酸化ストレスを与えた細胞内の ROS、SOD、酸化状態の指標である GSSG/GSH 比がいずれも低下すると共に、アポトーシスを誘導するカスパーゼ-3 活性も低下することが分かった。これらのことから、MSC-5T 株の枇杷葉発酵液により細胞内の酸化ストレスが緩和し、生存率低下を抑制されていることが確認できた。この抗酸化物質については、分

液抽出し、酢酸エチル画分をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー及び TLC で単離した。次に、MSC-5T 株の枇杷葉発酵液による肥満及び高血圧改善効果を確認した。MSC-5T 株の枇杷葉発酵液を肥満マウスに 5 週間投与し、体重および血圧を測定した結果、HFD 群と比較して HFD-f 群には有意に体重および血圧の低下がみられた。また肝臓中の TG 及び T-CHO 量についても HFD-f 群は有意に低下しており、MSC-5T 株の枇杷葉発酵液の効果が確認できた。

RT-PCR による遺伝子発現解析においては、HFD-f 群において、肝臓及び腎臓において高脂肪食の摂取により低下していた PPAR- α の発現が、枇杷葉発酵液の投与により増加した。有意差はなかったが、腎臓では podocin 及び UCP2 の発現が増加した一方、腎臓の炎症性サイトカイン IL-1 β の発現に抑制傾向があったことから、脂質代謝や炎症、抗酸化への効果が示唆された。マウスの糞便より腸内細菌を解析したところ、HFD-f 群でのみ Lactobacillaceae 科の割合が増加しており、摂取した MSC-5T 株がマウスの腸内に定着したことが推察された。また HFD を摂取することで割合が減少していた *Turicibacter* 属及び Lachnospiraceae 科が、HFD-f 群では有意に増加していた。*Turicibacter* 属と Lachnospiraceae 科はいずれも酪酸産生に関与しており、肥満状態の改善に寄与したと考えられた。以上の結果より、脂質代謝の改善より抗肥満効果がみられたと推察した。

植物から分離された乳酸菌は動物由来乳酸菌とは異なり、果汁や生薬のような天然植物素材を培地とした場合でも生育が可能で、有用な生理活性物質を産生する。第 I 章では、パインアップル果汁を MSC-3G 株で発酵した際に Orn 及び Cit を高産生する条件を調査した。第 II 章では、枇杷葉を MSC-5T 株で発酵することで抗酸化能を有し、細胞の保護や動物実験において抗肥満効果が確認された。