

称号及び氏名	博士（農学）前田 浩明
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 10 日
論文名	「Production, structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> WT-2BT (<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> WT-2BT の産生する菌体外多糖ケフィランの生産技術と構造解析および生理活性に関する研究)」
論文審査委員	主査 教授 北村 進一 副査 教授 新田 康則 副査 教授 川崎 東彦 副査 教授 辻 啓介

論文要旨

序論

スターター種菌としてのケフィール粒は、乳酸菌、酢酸菌、酵母など数種類の微生物から構成される。ケフィール粒はホモ発酵型乳酸桿菌 *L. kefiranofaciens* によって産生される多糖の粘質性により塊状となったものである。この多糖はケフィランと命名されており、グルコースとガラクトースから構成される 6 糖の繰り返し構造を有している。

近年、ケフィランの抗腫瘍作用や免疫賦活作用などに関する研究が進められ報告されている。しかし、ケフィランは生理活性を有する機能性多糖として有望であるにもかかわらず、工業的規模での生産は困難であり、十分な評価がなされていない。本研究においては、*L. kefiranofaciens* によるケフィラン生合成効率の向上のための新しい培地の開発と得られたケフィランの構造ならびに生理活性について検討した。

第一章 多糖生産菌 *L. kefiranofaciens* による粘性多糖の生産技術

1. 培地に関する研究

用いた菌株は藤沢らによりケフィール粒から単離、同定された乳酸菌株であり、本来炭素源は乳糖である。本研究では先ず生産性の向上を目的として乳糖以外の炭素源による *L. kefiranofaciens* WT-2BT の培養の可否と多糖産生の効率について検討した。その結果、グルコースで培養が順調に進行し、多糖の産生は乳糖と同等かそれ以上であることを確認した。グルコースの供給源としてコメデンプンを用いた。

粉碎した精白米をデンプン画分と、タンパク質画分に分画した。デンプン画分を液化した後、*glucoamylase* を用いて低分子化し、タンパク質は *pepsin* を用いて低分子化した。得られた加水分解物をそれぞれ炭素源と窒素源として培地を作成し、菌の生育と多糖の生産量を測定し、最適培地組成を次のように決定した。すなわち、その組成は 10% コメデンプン分解物、0.35% コメタンパク質分解物、1% 酵母エキス、0.1% Tween80、0.2% リン酸水素二カリウム、0.5% 酢酸ナトリウム、0.2% クエン酸三アンモニウム、0.02% 硫酸マグネシウム、0.005% 硫酸マンガンである。

2. 多糖の工業生産法の確立

ジャーファーメンターを用いて、培養条件を検討した。培養はジャーファーメンターに 2.5 L コメ成分培地を充填し、滅菌、接種した後、炭酸ガスで置換し、33 °C、攪拌速度 25rpm で行った。コメ培地の組成、接種量、培養 pH、培養時間などを検討した結果、33 °C、pH 5.0、7 日間の培養で 2.16 g/L の多糖を得た。この生産量は変法 MRS 培地での培養による結果の約 4 倍であった。コメ成分培地中のコメタンパク質分解物 (0.35%) の含量が変法 MRS 培地中のポリペプトン (1.5%) より 4.3 倍低かったが、コメ成分培地を用いた培養により高い多糖

生産量を得たことから、コメ由来のペプチドが多糖の生産に有効に作用していることが示唆された。続いて 500L 容タンクを用い、*L. kefiranofaciens* の工業生産規模での培養を試みた。その結果、ジャーフェーマンターでの培養と同程度の生産量が得られ、工業生産の可能性が裏付けられた。

第二章 多糖の一次構造の解析

本研究の培養の特徴は、コメの加水分解物が培地主成分として使われていることである。本培養で産生された粘質多糖の構造とケフィランとの相違の確認が生理活性を検討する上で重要であると考え、3種類の培地（コメ成分培地、変法 MRS 培地、スキムミルク培地）を調製し、それぞれの培養で産生した多糖の構造解析を行った。

構成糖分析、メチル化分析、比旋光度及び ^1H と ^{13}C NMR スペクトルの結果より、3種類の異なる培地から得た多糖が基本的に同一の構造を持っていることがわかり、コメ成分培地から得られた多糖が従来報告されているケフィランの構造と同じであることが明らかとなった。

第三章 生理活性

1. 血圧上昇抑制ならびに抗動脈硬化作用

高脂肪食を負荷した脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット（SHRSP/H65 系）を用いて試験対象物を 30 日間投与することによる血圧上昇抑制ならびに抗動脈硬化作用について検討を行なった。

本飼育期間中は高脂肪食を自由摂取させた。試験対象物投与群には、各濃度に調整したケフィラン水溶液を胃ゾンデを用いて強制投与した。投与量は 100mg/kg 体重と 300mg/kg 体重である。15 日、30 日目に行った血圧測定では投与前に比較し、投与群が control 群に対して有意に低値を示した。また昇圧因子

である ACE 活性も control 群に対して有意な低値を示した。

抗動脈硬化作用を検討する生化学検査値において、総脂質、総コレステロール、トリグリセライドにおいては投与群が control 群に対して低値を示した。コレステロール、トリグリセライド、リン脂質におけるリポタンパク画分の VLDL、LDL の 2 画分については投与群が低値を示し、有意差も認められた。肝臓脂質濃度、胸部大動脈と腸管膜動脈組織の ACE 活性については投与群に生化学検査と同様な改善結果が得られた。

2. 血糖降下作用

8 週齢の雄性自然発症糖尿病モデルマウス KK^{Ay} を用いてケフィランの経口投与による血糖降下作用を検討した。投与期間は 30 日間とした。投与開始前、15、30 日目に血糖値を測定した。

投与開始後、15、30 日目に測定した血糖値の経日的変化では満腹時血糖値において control 群が試験期間を通じて高血糖状態を維持していたが、ケフィラン投与の 2 群では 15、30 日目と血糖上昇抑制が認められ、30 日目におけるケフィラン 300mg/kg 群では有意に低値を示した。また、空腹時血糖値については満腹時血糖値と同様にケフィラン投与群の 2 群が control 群に対して低い値を示した。

3. 整腸作用

低繊維食を 21 日間与えて便秘を誘発させたラット（6 週齢、雄性 SD 系）に、22 日目以降よりケフィランを 14 日間投与し、整腸作用について検討を行った。本飼育期間中には低繊維食を自由摂取させた。2 つのケフィラン投与群（100、300mg/kg 体重）には、ケフィランを蒸留水にて各濃度に調製し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。なお、control 群については蒸留水を投与した。投与開始前、7、14 日目に自然に排便した新鮮な糞を採取し、糞の水分量及び重量を測定した。

糞の排泄量、水分含量は、ケフィランの濃度に依存して有意に増加すること

が確認された。試験終了後の解剖時に行った肉眼的観察では、control 群において大腸部分に硬化した糞の蓄積が観察されたが、ケフィラン投与群の2群では、糞の蓄積は観察されなかった。

第四章 脂質代謝改善作用の作用機序に関する検討

コレステロール生合成に関与する重要な調節酵素の一つが3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素である。ラットを用いてケフィランの肝臓 HMG-CoA 還元酵素に対する阻害作用の有無について検討を行った。SD 系ラットにケフィラン (30、300mg/kg) を4日間投与した後、血漿を阻害剤として用いて HMG-CoA 還元酵素活性を測定した。その結果、2つの投与群とも HMG-CoA 還元酵素に阻害作用が認められなかった。ケフィランが肝臓でのコレステロール生合成に関与していないことが示唆された。続いて腸管粘膜におけるコレステロールの吸収に関する試験を行った。腸管粘膜における膜結合酵素 ACAT (acyl CoA : cholesterol acyltransferase) はコレステロール吸収に重要な役割を果たしている。ACAT に対してケフィランは濃度依存的な阻害作用を示した。ケフィランがコレステロールのエステル化を阻害し、腸管粘膜におけるコレステロールの吸収を抑制することにより、血清脂質代謝の改善が得られることが推測された。

次にコレステロールの排泄促進作用をコレステロール負荷とオロチン酸授与の2つの実験系で検討した。コレステロール負荷試験では糞採取期間中の乾燥糞重量が1.5%粗 kefiran 群で減少した。総コレステロール、胆汁酸、総ステロールの排泄量と排泄率は2実験群でいずれも対照群より高値を示し、3%粗ケフィラン群で有意に高値を示した。オロチン酸投与試験では、乾燥糞重量、コレステロール排泄量、胆汁酸排泄量、総ステロール量のいずれについても対照群に比べて3%kefiran 群、さらには5%kefiran 群と投与量に依存して有意に高い値を

示した。これらの結果から、ケフィランの示す生理作用のメカニズムの一端は腸肝循環性コレステロールの腸管内腔でのトラッピング作用によるものであることが示唆された。胆汁酸に関しては食餌性コレステロール酸の吸収阻害が主因とみなされた。また、オロチン酸による内因性ステロール増加への改善作用からも腸肝循環性ステロールへの影響が強く示唆された。

審査結果の要旨

ケフィール (Kefir) は旧ソ連邦のコーカサス地方を原産として伝統的に生産されてきた発酵乳で、現在ではヨーロッパをはじめとして世界中に普及している。ケフィランはケフィールから単離された *Lactobacillus kefiranofaciens* が産生する菌体外多糖であり、抗腫瘍作用や免疫賦活作用を示すことが知られている。しかし、ケフィランは生理活性を有する機能性食品素材として有望であるにもかかわらず、工業的規模での生産はこれまで困難であり、また生理活性の評価も充分には行われていなかった。本研究では、*L. kefiranofaciens* によるケフィラン生合成効率を向上するための新しい培地の開発と、得られたケフィランの構造ならびに生理活性について検討した。

第一章では粘性多糖の生産技術の確立を目指して培地に関する研究を行った。その結果、コメ成分を含む培地が多糖の生産に適していることを見出した。コメ成分培地では、コメデンプン画分を液化した後、*glucoamylase* を用いて低分子化したものを炭素源とし、タンパク質は *pepsin* を用いて低分子化し窒素源として用いた。これら炭素源や窒素源の濃度やミネラル成分をはじめとしたその他の成分の濃度を変えて、菌の生育と多糖の生産量を測定し、最適培地組成を決定した。最終的に 500L 容タンクを用い、工業生産規模での培養を試みた。その結果、ジャーファーメンターでの培養と同程度の生産量 (2.5 g/L) の多糖が生産され、工業生産への見通しが得られた。

第二章では生産多糖の一次構造の解析を行ない、構成糖分析、メチル化分析、比旋光度及び ¹H と ¹³C NMR スペクトルの結果より、コメ成分培地から得られた多糖が従来報告されているミルク培地から得られたケフィランの構造と同じであることを明らかにした。

第三章ではケフィランの生理活性についてまとめている。脳卒中易発症性の自然発症高血圧ラット (SHRSP/H65 系) を用いて血圧上昇抑制ならびに抗動脈硬化作用について検討を行なった結果、血圧上昇は投与群が対照群に対して有意に低値を示し、動脈硬化の症状も投与群では観察されなかった。なお、投与量は 100mg/kg 体重と 300mg/kg 体重である。また、昇圧因子である *angiotensin I-converting enzyme (ACE)* 活性も対照群に対して有意な低値を示した。血中脂質の検査値においては、コレステロール、トリグリセライド、並びにリン脂質におけるリポタンパク画分の VLDL と LDL の 2 画分について投与群が低値を示した。

自然発症糖尿病モデルマウス *KKAy* を用いて経口投与による血糖降下作用を検討した結果、ケフィラン投与群では 15 日目で血糖上昇抑制が認められ、空腹時血糖値についても満腹時血糖値と同様にケフィラン投与群が対照群に対して低い値を示した。整腸についても有意な改善作用が認められた。

第四章では、脂質代謝改善作用の作用機序が検討され、腸管粘膜におけるコレステロールの吸収に関する知見が得られた。ケフィランの示す生理作用のメカニズムの一端は、腸肝循環性コレステロールの腸管内腔でのトラッピング作用による糞便中への排泄促進によるものであることが示唆された。すなわち、外因性のコレステロールや胆汁酸の増加に関

しては食餌性コレステロールの吸収阻害が主因とみなされた。また、オロチン酸による内因性ステロール増加への改善作用からも、併せて腸肝循環性ステロールへのケフィランの影響が強く示唆された。腸管粘膜における膜結合酵素 ACAT (acyl CoA : cholesterol acyltransferase) に対してケフィランは濃度依存的な阻害作用を示し、コレステロール吸収に対しての関与が示唆された。ケフィランがコレステロールのエステル化を阻害し、その結果腸管粘膜におけるコレステロールの吸収を抑制することも見出した。

第五章では、変異原性試験と急性毒性試験の結果が示され、いずれの結果も食品としての安全性を示すものであった。

審査委員会の所見

本研究の成果は、これまで工業規模での生産が不可能であったケフィランの生産の可能性を見出し、構造、生理活性についても新たな重要な知見を得たものであり、ケフィランの効率的な工業的生産と機能性食品への応用に向けた貢献は大きい。本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。