京都工芸繊維大学

氏　　名	べっぷ　よしのり **別府　佳紀**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　６５９　号
学位授与の日付	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　生命物質科学専攻
学位論文題目	**乳酸菌の菌体外に産生する自律神経活動調節物質に関する研究**
審査委員	(主査)教授　中島敏博 教授　遠藤泰久 教授　鈴木秀之

論文内容の要旨

乳酸菌の菌体をラットの十二指腸内に投与することにより、自律神経活動へ影響を及ぼすことが報告されている。ところが乳酸菌の産生する物質の自律神経系への影響は不明であった。本論文は乳酸菌が菌体外に産生する物質から生理活性物質を精製、同定し、自律神経活動を用いてバイオアッセイし、生理作用を確認したものであり、第１章、第２章、第３章、第４章からなる。

第１章では、*Lactobacillus pentosus* Ｓ－ＰＴ８４株（Ｓ－ＰＴ８４）の培養上清をウレタン麻酔下のラット十二指腸内に投与して、自律神経活動への影響を調べた。Ｓ－ＰＴ８４培養上清の低分子画分（分子量 10,000 Ｄａ以下　）を十二指腸内に投与することにより、褐色脂肪組織を支配する交感神経活動の亢進、胃を支配する副交感神経活動の抑制が認められた。さらに、Ｓ－ＰＴ８４培養上清の低分子画分をラットに経口投与することにより、無麻酔ラットの褐色脂肪組織周囲の体温の上昇が認められた。本研究により、乳酸菌が菌体外に産生する物質が、哺乳類の自律神経活動に影響を及ぼすことを初めて明らかにした。

第２章では、まず、Ｓ－ＰＴ８４培養上清の低分子画分から逆相クロマトグラフィーにより 3 種類の物質（ピークＡ、ピークＢ、ピークＣ）を精製した。これら 3 種類の物質をウレタン麻酔下ラットの十二指腸内へ投与し、比較的記録が容易な腎交感神経活動への影響を調べた。その結果、ピークＡは交感神経活動を１３４％に増加させ、ピークＢは４０．１％に減少させ、ピークＣは４０８％に増加させることが判明した。この結果より、ピークＢを交感神経活動抑制性の物質として、ピークＣを交感神経活動促進性の物質と捉え、マススペクトロメトリーと^{1}Ｈ　ＮＭＲ、及び^{13}Ｃ　ＮＭＲを用いて構造決定した。その結果、ピークＢはフェニル乳酸、ピークＣは 2,3-Dihydro-3,5-dihydoroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one （ＤＤＭＰ）と構造を決定できた。ピークＢは光学異性体が２種類存在するので、光学分割カラムで分析し、Ｌ－フェニル乳酸が主成分であることを明らかにした。ＤＤＭＰが乳酸菌から産生されることが本研究により初めて明らかとなった。

第３章では、ＤＤＭＰを交感神経活動亢進物質と想定し、末梢臓器の調節作用（効能）のうち、褐色脂肪組織による熱産生に関して評価するために、ウレタン麻酔下のラットの十二指腸内にＤＤＭＰを投与し、褐色脂肪組織を支配する交感神経活動への影響を調べた。さらに、ラットにＤ

ＤＭＰを経口投与し、褐色脂肪組織周囲の体温への影響と酸素消費量への影響を解析した。その結果、褐色脂肪組織を支配する交感神経活動が亢進し、褐色脂肪組織周囲の体温が上昇し、酸素消費量も増加した。本研究により、経口投与したＤＤＭＰが褐色脂肪組織周囲の体温上昇及び酸素消費量の亢進を起こすことを明らかにした。これらの効果は交感神経活動の亢進により起こることが示唆された。

第４章では、乳酸菌が産生する物質の中枢作用を検討している。うつ病は大きな社会問題となっており、更なる抗うつ剤の開発が求められている。乳酸菌が産生する抗うつ物質に関する研究を進めるため、まず、Ｓ－ＰＴ８４の培養上清から 1-methyy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-1,3-dicarboxylic acid （（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡ）を生成し、構造決定した。つぎに、この物質のセロトニン再取り込み阻害作用を評価するため、（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡのイミプラミンのセロトニントランスポーターへの結合阻害活性を調べたところ、結合を阻害した。このことから（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡにはセロトニン再取り込み阻害作用があることが示唆され、現在広く用いられている選択的セロトニン再取り込み阻害剤（ＳＳＲＩ）の効果を有する可能性が考えられる。次に、行動実験で作用を確認した。強制水泳試験ではＳＳＲＩの効果を評価できないため、ＳＳＲＩの効果を評価できるモリス型水迷路試験により（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡの効果を評価したところ、（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡの投与により、避難台への到達時間が短縮し、抗うつ作用を示した。本研究は（１Ｓ，３Ｓ）-ＭＴＣＡが乳酸菌により産生されることを初めて明らかにし、さらに、抗うつ作用を有することを発見したものである。

論文審査の結果の要旨

乳酸菌には腸の蠕動運動の促進、腸内感染抑制、ビタミン産生などの作用があることが知られており、京都の「しば漬け」から分離され、本研究で用いられた *Lactobacillus pentosus* Ｓ－ＰＴ８４株にはナチュラルキラー細胞活性増強作用、インターロイキン－１２誘導力増加などの免疫系活性化作用を有することが近年解明されたが、これらの作用はすべて菌体の作用と考えられている。本論文は菌体ではなく菌体が分泌する物質に着目し、培養上清を十二指腸に投与し、その作用を自律神経活動変化で捉える手法を使用して解析している。

Ｓ－ＰＴ８４培養液上清を麻酔したラットの十二指腸内へ注入すると褐色脂肪組織を支配する交感神経活動が亢進し、胃を支配する副交感神経活動が抑制された。さらに、この培養液上清を無麻酔ラットに経口投与すると褐色脂肪組織周辺の体温が上昇することから、乳酸菌が菌体外に産生する物質がラットの消化管を経由して、自律神経を介し、体温を上昇させることをはじめて明らかにした。この培養液上清を逆相クロマトグラフィーにより精製し、ラット十二指腸内へ注入すると交感神経活動を抑制する物質と促進する物質を得た。マススペクトロメトリーとＮＭＲなどを用いて構造を決定した結果、抑制性物質はＬ－フェニル乳酸、促進性物質はＤＤＭＰであることを解明した。ＤＤＭＰが乳酸菌から産生されることを示したはじめての研究である。さらに、ＤＤＭＰをラットの十二指腸内へ注入すると交感神経活動が亢進し、無麻酔ラットに経口投与すると褐色脂肪組織周囲の体温が上昇し、酸素消費量も増加した。精製前の培養上清にはＤＤＭＰとＬ－フェニル乳酸が共に存在するが、ＤＤＭＰの作用が強力であるため交感神経活動促進が観察されたと考えられる。さらに、Ｓ－ＰＴ８４株が産生するもうひとつの物質（１Ｓ，３Ｓ）－ＭＴＣＡの中枢作用が調べられ、*in vitro* の実験により、イミプラミンのセロトニントランス

ポータへの結合を阻害したのでセロトニン再取り込み阻害作用が確認され、抗うつ剤として広く用いられている選択的セロトニン再取り込み阻害剤（ＳＳＲＩ）の効果を有する可能性が示唆された。さらに、ラットの行動実験により経口投与した（１Ｓ，３Ｓ）－ＭＴＣＡは抗うつ作用を有することを見出した。本成果は、食品が含有する有用な生理活性物質を精製、同定してバイオアッセイし、その有効性を明らかにしたものであり、学術的にも評価できる。

これらの研究成果は申請者を筆頭著者として下記の査読制のある国際科学雑誌２編に掲載されている他、２編の参考論文がある。

［公表論文］

1. Yoshinori Beppu, Takayuki Izumo, Yuko Horii, Jiao Shen, Yoshiyuki Fujisaki, Toshihiro Nakashima, Nobuo Tsuruoka, Katsuya Nagai (2012) Effects of Culture Supernatant from *Lactobacillus pentosus* Strain S-PT84 on Autonomic Nerve Activity in Rats. *In vivo* 26: 355-360.
2. Yoshinori Beppu, Hajime Komura, Takayuki Izumo, Jiao Shen, Mamoru Tanida, Toshihiro Nakashima, Nobuo Tsuruoka, Katsuya Nagai (2012) Identification of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4*H*-pyran-4-one Isolated form *Lactobacillus pentosus* Strain S-PT84 Culture Supernatants as a Compound That Stimulates Autonomic Nerve Activities in Rats. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* 60: 11044-11049.

参考論文

1. Mamoru Tanida, Nobuo Tsuruoka, Jiao Shen, Yuko Horii, Yoshinori Beppu, Yoshinobu Kiso, Katsuya Nagai (2009) Effects of Flavangenol on Autonomic Nerve Activities and Dietary Body Weight Gain in Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73: 2374-2378.
2. Nobuo Tsuruoka, Yoshinori Beppu, Hirofumi Koda, Nobutake Doe, Hiroshi Watanabe (2012) A DKP Cyclo(L-Phe-L-Phe) Found in Chiken Essence is a Dual Inhibitor of the Serotonin Transporter and Acetylcholinesterase. *PLOS ONE* 7 (11): 1-10.