

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	鄭 屹峰
論文題目	Studies on biological activities of low dose of phenethylamine from hot water extract of <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (クロレラ熱水抽出物中のフェネチルアミンの低用量での生物活性に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>クロレラ (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>) は淡水に生息する単細胞藻類の一種であり、粉末やその熱水抽出物は健康増進を目的として栄養補助食品に用いられている。動物実験およびヒト臨床試験において、クロレラ粉末およびその熱水抽出物の経口摂取により高コレステロール血症の改善などの有益な効能が報告されている。しかしながら、これらの生理活性に寄与する化合物についてはほとんど明らかになっていない。またその作用メカニズムについてもほとんど知られていない。そのため活性成分の同定に用いる <i>in vitro</i> 試験が確立されていない。一方、齧歯類への投与による活性測定はかなりの時間とサンプル量が必要であり、活性成分の同定には使用が困難である。ショウジョウバエ (<i>Drosophila melanogaster</i>) は飼育が簡単でサンプル量も少ない。さらに抗酸化酵素の一つである superoxide dismutase-1 (SOD-1)の機能変異体をもつショウジョウバエは寿命が短く(約1週間)、抗酸化ビタミンの投与で寿命が延長されることが知られている。しかし、このような短命ショウジョウバエを用いた食品中の活性成分の同定は行われていない。このような背景のもと、本論文ではSOD-1 変異ショウジョウバエの寿命延長効果を指標に用いて、クロレラ熱水抽出物中の活性成分を同定し、その活性成分が、哺乳類モデルにおいても有益な機能をもつことを示し、さらに活性成分の作用点を明らかにすることを目的としたものである。また活性成分の他の食品中での分布を調べ、有効量の活性成分の食経験についても調査している。本論文の内容は以下のように要約される。</p>			
<p>1. SOD-1 変異ショウジョウバエはクロレラ熱水抽出物の投与により50-800 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 餌の間で用量依存的に寿命が延長したが、3200 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>では寿命延長効果が低下した。SOD-1 変異ショウジョウバエの寿命延長試験と逆相およびサイズ排除クロマトグラフィーを用いたactivity-guided fractionationにより得た活性画分中に phenylalanineと phenylalanineと leucineの脱炭酸物であるphenethylamine と isopentylamineを同定した。phenethylamine は有効量のクロレラ熱水抽出物に含有される用量 (6-60 <math>\text{ng}/\text{mL}</math>餌) で寿命を延長したが、600 <math>\text{ng}/\text{mL}</math>ではむしろ寿命を短縮した。一方、leucineの脱炭酸物であるisopentylamine には寿命延長効果は認められなかった。そのためクロレラ熱水抽出物の phenethylamineがSOD-1変異ショウジョウバエの寿命延長効果を示す主要な活性成分と考えられた。phenethylamineはSOD様活性を示さず、他の抗酸化ビタミンと比べて1/1000以下の用量で寿命延長を示すため、直接的な抗酸化能によって寿命を延長しているのではなく、何らかの内因性成分の発現に影響して延長効果を示すことが示唆された。</p>			
<p>2. 高脂肪食誘発非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスを用いて、クロレラ熱水抽出物 (100 <math>\text{mg}/\text{kg}</math>体重)および phenethylamine (10 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>, 100 <math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>) の機能を評価した。高脂肪食により血漿中の低密度リポタンパク質コレステロールが有意に増加したが、熱水抽出物および両用量のphenylalanineで有意な減少が認められた。さらに高脂肪食により肝臓のSOD および glutathione peroxidase (GPX) 活性が低下し酸化ストレスを示す 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)値が上昇し、さらに血漿 aspartate aminotransferase (AST)および alanine aminotransferase (ALT) 値が上昇し肝機能の低下が認められた。熱水抽出物およびphenethylamineの投与によりTBARS 値が</p>			

有意に改善した。また通常変動しないとされている解糖系酵素の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) タンパク質量が投与により有意に増加した。先行研究により GAPDH 活性とグルコース由来の短鎖アルデヒド (methylglyoxal, glyoxal) の生成量は逆相関することが知られている。高脂肪食摂取により肝臓中の methylglyoxal および glyoxal 量は有意に増加したが、熱水抽出物および phenethylamine の投与により methylglyoxal および glyoxal 量は有意に減少した。そのため熱水抽出物およびその中の phenethylamine は肝臓中の GAPDH の発現を上昇させ、短鎖アルデヒドの生成を抑制し、その結果アルデヒドによる酸化ストレスを軽減したと考えられる。さらに低用量(10 µg/kg) の phenethylamine の投与では SOD および GPX 活性の有意な回復と血漿 ALT および AST 値の有意な改善を示した。GAPDH は弱い酸化ストレスで発現が増加することが知られている。そのため phenethylamine が弱い酸化ストレスを与え GAPDH の発現を増加させ、糖化ストレスを改善するが高用量では肝機能にダメージを与えた可能性が示された。

3. phenethylamine, isopentylamine, tyramine などの微量モノアミンは発酵食品中での存在が報告されている。そこで日本でよく消費されるいくつかの発酵食品中のモノアミン含量を測定した。その結果、日本酒、味噌、醤油、ヨーグルト、ビールなどに、これらのモノアミンは検出された。phenethylamine は日本酒、一部の味噌(豆味噌)に比較的多く含まれていた。一食(one serve)に用いられる発酵食品、および食品安全委員会の推奨上限量のアルコール飲料(日本酒160 mL, ビール500 mL)により、1日 500-1000 µg の phenethylamine を摂取していることが明らかになった。これらの値は動物実験で有益な効果を示した用量(10 µg/kg 体重)に相当するか、それ以上の値である。そのため phenethylamine は食経験のある用量で生体に有益な作用を示すことが示された。

以上のように本論文によって、SOD-1 変異ショウジョウバエの寿命延長物質としてクロレラ熱水抽出物中から phenethylamine が同定され、さらに phenethylamine が高脂肪食誘発非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおいても GAPDH 発現の増加により短鎖アルデヒドの生成を抑制し肝機能を改善することが初めて見出された。高脂肪食により短鎖アルデヒドが肝臓中に増加すること自体が新しい知見であり、高脂肪食誘発非アルコール性脂肪性肝炎の発症メカニズムの理解にも大きく寄与すると考えられた。また phenethylamine はこれまでの健康増進を示す食品成分と比べ極めて低用量(10 µg/kg 体重)で効果を発揮することが明らかとなった。本研究は食品中に存在するモノアミンの微量の投与での生理機能を初めて示したものであり、食品機能、食生活と健康を対象とした研究の発展に寄与するものである。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

クロレラの摂取により未病状態の健康が改善されるというエピソードがあり、また一部の効果については動物実験およびヒト試験で確認されている。しかし、その活性成分に関してはほとんど報告例がなかった。本論文ではクロレラ熱水抽出物中に **phenethylamine**を見出し、その評価を行うことで健康増進機能と作用メカニズムの一端を明らかにしたものである。成果として評価できる点は以下の4点である。

1. クロレラ熱水抽出物が *SOD-1*変異ショウジョウバエの寿命を延長し、さらにクロレラ熱水抽出物中の**phenethylamine** (60 ng/mL餌) が有意な寿命延長をおこすことを示した。
2. 微量の **phenethylamine** (10 µg/kg体重)の経口摂取が非アルコール性脂肪性肝炎マウスの血漿低密度リポタンパク質コレステロール値の低下、ASTおよびALT値の低下、さらに肝臓中の酸化ストレスの低下を示すことを明らかにした。
3. 微量の **phenethylamine**の投与でマウス肝臓中の解糖系酵素であるGAPDHのタンパク質量を有意に増加させ、さらに有毒な短鎖アルデヒドであるメチルグリオキサール、グリオキサールの生成を有意に抑制することが肝保護作用の一端であることを初めて見出した。
4. マウスで効果のあった **phenethylamine**用量は日本で消費される発酵食品の通常の摂取で得ることが可能であることを示し、**phenethylamine**が食品の摂取を通じてヒトの健康増進に影響し得る可能性を示した。

以上のように本論文はクロレラ熱水抽出物および発酵食品中に存在する微量 **phenethylamine**の新たな健康増進機能と作用メカニズムを見出したものであり、今後の応用への道を開くものといえ、海洋生物機能学、食品機能学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和2年9月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 令和3年1月8日以降（学位授与日から3ヶ月以内）