

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	Takeuchi Daniel Makoto
論文題目	Studies on astragaloside IV metabolism in lactic acid bacteria and bifidobacteria (乳酸菌およびビフィズス菌におけるアストラガロシドIVの代謝に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>The thesis describes the astragaloside IV (AIV) metabolisms by lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria. AIV is a chemical compound derived from the plant <i>Astragalus membranaceus</i>, commonly known as Mongolian milkvetch, used in traditional Chinese medicine. AIV possesses multiple beneficial physiological effects, including anti-inflammatory and antioxidative properties. The pharmacokinetics of AIV suggests that it is metabolized by a consortium of bacteria derived from the intestinal environment. However, little is known about how specific gut derived microbes metabolize AIV. Investigation into human derived gut microbes showed two representative gut microbes, bifidobacteria and LAB, readily metabolize AIV.</p> <p>Chapter 1 describes the screening of bacteria designed to mimic the bacterial abundance of the human gut microbiome. AIV is a saponin consisting of C-3 xylose and C-6 glucose moiety. The aglycone of AIV, cycloastragenol (CA), is formed when the two glycosides are removed. The screened results indicated that multiple bacteria showed the metabolism of AIV. The results also indicated that gut microbes metabolize AIV through two different pathways. The microbes removed either the C-3 xylose or C-6 glucose moiety of the AIV; however, simultaneous removal of both sugar moieties was not observed.</p> <p>Furthermore, a deeper investigation of two representative gut microbes, bifidobacteria and LAB, showed AIV metabolism utilizing different metabolic pathways. Bifidobacteria metabolized AIV <i>via</i> eliminating the C-3 xylose to produce the intermediate brachyoside B (BraB) and subsequently produced the aglycone CA. Unlike bifidobacteria, LAB metabolized AIV <i>via</i> eliminating the C-6 glucose to produce the intermediate cyclogaleginoside B (CycB). LAB also produced the aglycone CA but produced a higher concentration of CA-2H (dehydrogenated product of CA). In the time course analysis of AIV metabolism, a LAB strain <i>Streptococcus citrovorum</i> NBRC 3397 produced CA-2H with a trace amount of CA, but <i>Pediococcus pentosaceus</i> NBRC 3182 produced CA-2H without producing CA throughout the entire analysis. These findings suggest that the LAB strain metabolizes AIV to CA-2H through an unknown pathway previously not observed.</p> <p>Chapter 2 describes developing a method to efficiently produce CA by utilizing LAB and bifidobacteria. CA, unlike AIV, has a high bioavailability and is readily absorbed into the human body. In addition, CA also has beneficial physiological properties not seen in</p>			

AIV, like telomere elongation and telomerase activation desired for antiaging products. Utilizing a traditional method of microbial transformation of AIV to CA by fermentation using bifidobacteria resulted in a low-yield production of CA. However, a two-step reaction catalyzed by resting cells of LAB and bifidobacteria showed a targeted and efficient production of CA.

AIV was first transformed to CycB *via* C-6 glucose-elimination with resting cells of LAB and adding resting cells of bifidobacteria resulted in the efficient production of CA *via* C-3 xylose-elimination of CycB. The two-step reaction sequence was vital because LAB did not remove the C-6 glucose from the intermediate BraB. However, bifidobacteria showed the removal of the C-3 xylose from the intermediate CycB. Multiple combinations of LAB and bifidobacteria produced a high yield of CA from AIV. The dual cell reaction with *Weissella cibaria* RD 12578 and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 7041 showed the highest production of CA (0.21 mM) from 0.25 mM AIV with an 84 % molar yield.

Chapter 3 describes the purification of astragaloside IV-hydrolyzing β -D-xylosidase from *B. pseudocatenulatum* JCM 7041, which showed the ability to remove C-3 xylose from AIV and CycB readily. The detailed analysis of the enzymatic properties to remove the C-3 xylose moiety from AIV was desired because previous transformations of AIV have mainly focused on the C-6 glucose deglycosylation resulted in less information on the C-3 xylose deglycosylation. The highest catalytic activity of *B. pseudocatenulatum* JCM 7041 was observed at 48 hours of growth. As the results of purification of corresponding enzyme by combining ammonium sulfate precipitation, Butyl -Sepharose, and Canto HiRes Q column chromatography, a protein band with M_r of roughly 80,000 on SDS-PAGE was suggested to be the target protein. LC-MS analysis of peptide fragments of the candidate protein band revealed a high score match of the amino acid sequences of the peptides with those of an uncharacterized protein derived from *B. pseudocatenulatum* JCM 7041.

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)

アストラガロシドIV (AIV) は、黄耆 (オウギ) 由来のサポニンであり、漢方薬として多くの研究がなされている。AIVのアグリコンであるシクロアストラゲノール (CA) は、多くの有益な生理作用を有しているため、医薬品業界での需要が高い。しかし、AIVの代謝は不明な点が多く、現状ではCAの効率的な生産について十分な知見はない。本論文では、腸内細菌である乳酸菌とビフィズス菌におけるAIVの代謝を明らかにし、AIVをCAに変換する能力を利用して、CAを効率的に生産する方法を構築したものであり、評価すべき点として、以下の3点が挙げられる。

1) ヒトの腸内細菌を対象とした解析の結果、AIVからCAへの代謝に関して、ビフィズス菌と乳酸菌がそれぞれ異なる経路を有することを見いだした。すなわち、ビフィズス菌ではC-3キシロースの脱グリコシル化を初発反応として中間体ブラキオシドB (BraB) を経る経路が主であり、乳酸菌ではC-6グルコースの脱グリコシル化を初発反応として中間体シクロガレギノシドB (CycB) を経る経路が主であることを見いだした。乳酸菌によるAIV代謝の経時的解析から、ある種の乳酸菌はCAを生産せずにCA-2H (CAの脱水素生成物) を生産することがわかり、AIV代謝についてこれまで知られていなかった新規な代謝経路の存在を示唆した。

2) 乳酸菌とビフィズス菌のそれぞれの脱グリコシル化活性を組み合わせ、まず乳酸菌によりAIVのC-6グルコースを脱グリコシル化することでCycBを生成し、続いてビフィズス菌によりCycBのC-3キシロースを脱グリコシル化することでCAを生成する2段階反応法を構築した。本法により、0.25 mMのAIVから収率84 %にて0.21 mMのCAを生産することができた。

3) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCM 7041からAIVのC-3キシロースの脱グリコシル化を触媒する β -D-xylosidase様酵素の精製を行い、そのアミノ酸配列を解読することにより、本酵素をコードすると予想される遺伝子を*B. pseudocatenulatum*ゲノム上の機能未知遺伝子として同定した。

以上のように、本論文は、腸内細菌である乳酸菌とビフィズス菌における漢方薬成分AIVの代謝を詳細に解明するとともに、これらの菌株を用いてAIVのアグリコンであるCAを効率的に生産する方法を構築することで、AIVならびにCAの医薬品応用を拡張するものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化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 5年 2月9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。

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： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)