

氏名	佐藤俊郎
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2384号
学位授与の日付	平成13年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on physiological activities of menaquinone-7 and its production by <i>Bacillus subtilis</i> (メナキノ-7の生理活性および枯草菌による発酵生産に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 内海 成 教授 吉川 正明 教授 村田 幸作

### 論文内容の要旨

ビタミン K (K) は、血液凝固および骨代謝に関わる K 依存性タンパク質中のグルタミン酸残基が  $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) に転換される際に必要な補酵素である。K には  $K_1$  と  $K_2$  (メナキノン, MK-n) があり、新生児ビタミン K 欠乏性出血症の予防薬として  $K_1$  や MK-4 が、骨粗鬆症の治療薬として MK-4 が利用されている。食品としては、納豆に著量の MK-7 (0.8 mg/100g) が含まれているがその生理作用は不明であった。本研究では、MK-7 の骨代謝や血液凝固に対する作用を明らかにし、納豆から分離した枯草菌による効率的な MK-7 発酵生産システムを確立した。その内容の主な点は以下のとおりである。

第1章では、ラット大腿骨骨幹端部の組織培養系を用いて、MK-7 の骨に対する作用を解析した。活性炭、順相および逆相カラムクロマトグラフィーにより納豆から MK-7 を純度99.8%に精製した。同様の方法により、大豆油を水蒸気蒸留して得られる脱臭留出物から  $K_1$  を精製した。MK-7 添加により、培養骨組織中のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性およびカルシウム量が有意に増加することを観察し、MK-7 が骨形成を促進する作用を有していることを明らかにした。この MK-7 の作用は、骨粗鬆症の治療薬として使われている MK-4 と同程度であった。一方、 $K_1$  には ALP 活性に対する効果が認められなかったことから、MK-4 と MK-7 の ALP 活性に対する作用は補酵素としての働きとは別であることを明らかにした。

第2章では、糞食を防止するためにアナルカップを装着させたラットに K 欠乏食を与えて K 欠乏ラットを作成し、肝臓と骨組織中でのビタミン K 代謝の特性を解析した。K 欠乏食を14—17日間摂取させると、血液凝固の指標であるプロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間が顕著に長くなり、K 欠乏症状が認められた。しかし、骨組織によって作られる血中オステオカルシンの Gla 化には変化が見られなかった。K 欠乏食17日間摂取後に肝臓中の K はほぼ枯渇したのに対し、大腿骨では実験開始時の約40%の K が残存していた。これらのことから、骨組織では肝臓におけるよりも K の代謝が遅く、K 欠乏が短期的には起こりにくいと考えられた。一方、K 欠乏ラットに  $K_1$ 、MK-4、MK-7 を単回投与し、各組織における K の蓄積を解析したところ、骨組織に K を蓄積させるためには肝臓に対するよりも多くの K を投与する必要があることが明らかとなった。また、脳や脾臓等におけるのと同様に、骨組織においても  $K_1$  が MK-4 に転換されることが判明した。さらに、K 欠乏ラットでの抑制された血液凝固を正常に戻す効果は、 $K_1$  や MK-4 よりも MK-7 の方が長時間持続することを明らかにした。

第3章では、納豆由来の枯草菌 (*Bacillus subtilis*) による MK-7 の効率的な発酵生産システムを確立した。第1節では、市販納豆から分離した *B. subtilis* MH-1 株を *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン処理することによって変異を誘導し、20 mg/L メナジオン耐性変異株を取得した。そして、その中から親株よりも約30%程度多く MK を生産する *B. subtilis* K3-176 株を得た。ジャーファーメンターによる培養条件を検討し、培地を最適化 [10%大豆エキス, 5%グリセロール, 0.5%酵母エキス, 0.05% $K_2HPO_4$ , pH 7.3] することによって、35 mg/L の MK-7 を得た。第2節では、メナキノンおよびカロチノイドの合成阻害剤であるジフェニルアミン (200 mg/L) に対する耐性変異株を作成し、MK-6 をほとんど

産生しない変異株 *B. subtilis* D200-41 株を得た。培養条件をさらに検討した結果、振とう培養よりも静置培養の方が MK-7 生産量が多くなることが判明した。そこで、37°C で 24 時間振とう培養した後、45°C で 5 日間静置培養することにより、今までに液体培養で報告されている MK-7 生産量 (約 10 µg/L) よりもはるかに多い約 60 mg/L の MK-7 を得ることに成功した。このとき、胞子化の進行が遅いことを見出した。枯草菌の MK 生産は、胞子形成期に活発化することが知られている。したがって、静置培養における良好な MK-7 生産は、胞子化が遅く進行することによると推定された。

#### 論文審査の結果の要旨

ビタミン K (K) は、血液凝固と骨代謝に必須の栄養素であり、高齢化社会を迎え、特に骨粗鬆症の予防・治療効果が注目されている。本論文では、納豆中に微量含まれるが、K 同族体のうちで作用が不明であったメナキノ-7 (MK-7) の骨代謝や血液凝固に対する作用を明らかにするとともに、納豆から分離した枯草菌 (*Bacillus subtilis*) による効率的な MK-7 発酵生産法を確立したものであり、評価される点は以下のとおりである。

1. ラット大腿骨骨幹端部組織培養系を用いて解析することにより、MK-7 は骨組織中のアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量を増加させる作用を持ち、この作用が  $K_1$  にはない MK-*n* に特有の作用であることを明らかにした。
2. K 欠乏ラットを作製し、プロトロピン時間や活性化部分トロンボプラスチン時間などを指標として K 代謝を解析した。大腿骨中では肝臓よりも K の減少が遅く、短期間の K 欠乏食摂取では K 欠乏状態になりにくいものの、骨組織に K を蓄積させるためには血液凝固を維持するために必要な量よりも多くの K を摂取しなければならないことを示した。
3. K 欠乏ラットへの  $K_1$ 、MK-4、MK-7 の単回投与の結果、K 欠乏により阻害された血液凝固を正常に回復させる効果は、新生児出血症の予防薬として利用されている  $K_1$  および MK-4 よりも MK-7 の方が長時間持続することを明らかにした。
4. 納豆から分離した *B. subtilis* MH-1 株から、MK-7 生産量が約 30% 増加したメナジオン耐性変異株 *B. subtilis* K3-176 株を取得した。さらに、通気攪拌培養の培地条件を最適化することによって約 35 mg/L の MK-7 を得た。
5. *B. subtilis* MH-1 株からジフェニルアミン耐性変異株を誘導し、MK-6 生産量が少なく、MK-7 を多く産生する変異株 *B. subtilis* D200-41 株を取得した。この変異株を、胞子化の進行が遅い静置状態で培養すると MK-7 生産が増加することを見出し、さらに培地条件を最適化することによって約 60 mg/L の MK-7 を得ることに成功した。

以上のように、本論文は、MK-7 の骨代謝並びに血液凝固に対する作用および肝臓と骨中での K の代謝の違いを明らかにするとともに、納豆由来の枯草菌による MK-7 の高生産システムを確立したものであり、新食糧設計学、食糧機能学、食品微生物学など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、平成 13 年 4 月 12 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。