

|           |                                                                                                                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | やま ざき しん いち<br>山 崎 眞 一                                                                                                                                              |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                                                           |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1236 号                                                                                                                                                        |
| 学位授与の日付   | 平 成 14 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    | 農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻                                                                                                                                           |
| 学位論文題目    | Bioelectrochemical analysis on quinone-induced modification of the metabolism in bifidobacteria and lactic acid bacteria<br>(キノン類によって誘起されるビフィズス菌・乳酸菌代謝変化の生物電気化学的解析) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 池 田 篤 治    教 授 清 水    昌    教 授 加 藤 暢 夫                                                                                                                 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

ビフィズス菌は腸内の有用細菌の一種であり、その選択的増殖は腸内細菌学の主要な課題である。この観点からオリゴ糖などの様々なビフィズス菌増殖促進因子が発見・研究されてきた。2-Amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ) はこのようなビフィズス菌特異的増殖促進因子として発見されたが、その作用機序はよくわかっていない。ACNQ はキノン骨格を持ち、かつ、0.5nM という極低濃度で増殖を促進するというこれまでの増殖因子にはみられない特徴を持っている。キノン類は多様な電子伝達特性を持ち、好気性微生物のエネルギー代謝に関与していることが知られているが、ビフィズス菌のような嫌気性菌の代謝に対する役割に関する研究例は少ない。本研究では、ACNQ が電子伝達メディエータとして機能し、ビフィズス菌の糖代謝や酸素還元系などを変化させることにより増殖を促進しているというモデルを提唱した。生物電気化学的手法による ACNQ の物理化学的特性評価と関連諸反応の速度論解析により、このモデルを定量的に検証した。さらに、このモデルを用いて、キノン類による乳酸菌発酵産物の定量的な制御法への展開を試みた。

1. ビフィズス菌のような嫌気性菌においては  $\text{NAD(P)}^+$  の再生が糖代謝を決定づける大きな因子と考えられている。そこで本研究では、ACNQ が外的電子受容体による  $\text{NAD(P)}^+$  再生を媒介すると考え、この反応系を検証した。ビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*) 細胞破碎液中において、ACNQ は  $\text{NAD(P)H}$  によって破碎液の diaphorase 活性に依存して触媒的に還元され、生じた ACNQ 還元型は酸素によって直接再酸化されることを明らかにした。この反応系は微量の ACNQ が媒介する新規な  $\text{NAD(P)}^+$  再生経路と考えられる。ACNQ 還元型の再酸化に伴って過酸化水素が生じるが、この過酸化水素も ACNQ 還元型によって酵素的に還元されることを過酸化水素センサにより実験的に証明した。また、これらの ACNQ が媒介する  $\text{NAD(P)}^+$  再生反応の速度は、ビタミン  $\text{K}_3(\text{VK}_3)$  などの他のナフトキノン類あるいはベンゾキノン・アンスラキノン類が媒介する反応の速度より、非常に大きいことを示した。反応の速度が関与するキノンの酸化還元電位に大きく依存する事実を鑑み、速度の大きさは、ACNQ が他のナフトキノン類に比べてやや負な酸化還元電位 ( $-71\text{mV vs. SHE}$ ) を有することによるものと結論づけた。

2. ACNQ による  $\text{NAD(P)}^+$  再生経路が存在している条件において、ビフィズス菌 (*B. longum*, *B. breve*) 休止菌体の糖代謝産物を解析し、ACNQ のビフィズス菌糖代謝に対する役割を考察した。ACNQ 還元型を再酸化する外的電子受容体としては、分析的簡便性を考え  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  を用いた。ACNQ- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  が無い条件では、解糖系で生じた NADH はピルビン酸、アセチル CoA、アセトアルデヒドなどによって再酸化され、代謝産物として乳酸・エタノールなどが生じる。しかし、ACNQ と  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  の存在下では、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  によって  $\text{NAD(P)H}$  が再酸化されるので、これらの代謝産物の割合が大きく減少し、代わりにピルビン酸由来の代謝系の活性化が見られた。このような代謝変化がビフィズス菌の増殖に関与しているものと考えられる。同様の代謝産物の変化は乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*) においても見いだされたが、ビフィズス菌に比べてその変化は小さかった。また、乳酸菌 (*L. lactis*) 代謝産物の割合の調節は食品工学の立場からニーズがあるが、培養条件や ACNQ 濃度を変えることにより、休止菌体のレベルにおいては、*L. lactis* の代

謝産物を大きく変えうることを見いだした。

3. ACNQ還元型は酸素・過酸化水素以外に食品中の成分によって再酸化される可能性がある。ここでは食品中のデヒドロアスコルビン酸(DHA)やポリフェノール酸化重合体などのジケトン類によるACNQ還元型の再酸化反応を検討した。サイクリックボルタンメトリー法により、ACNQ還元型はDHAによって再酸化され( $k=9.2\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$  at pH7.0), アスコルビン酸が再生されることを示した。ACNQのアミノ基がジケトンのカルボニル基に求核置換するこの反応の機構を提唱した。また、ビフィズス菌破碎液によるアスコルビン酸生成がACNQの投与により、大きく促進されることを見出し、ACNQがDHAによる $\text{NAD(P)}^+$ 再生を媒介できることを示した。同様に、ポリフェノールの酸化重合体もACNQ還元型を酸化することにより、 $\text{NAD(P)}^+$ 再生の外的電子受容体として機能すること示した。この反応には酸化重合体の $o$ -キノン構造を、抗酸化能を持つカテコール構造へと戻す反応としても意味を持つ。このようにACNQは食品中の成分によるビフィズス菌内 $\text{NAD(P)}^+$ 再生を促進するばかりでなく、食品・腸内における生理活性物質の再生系としても意味のある系であると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

1994年、2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ) がビフィズス菌増殖促進因子としてプロピオン酸菌の発酵粉末より発見された。ACNQはこれまでの増殖促進因子とは異なり、キノン骨格を持ち0.5nMという非常に薄い濃度で増殖を促進する。このような増殖促進作用の解明にはこれまでの酵素レベルの研究以外に、ビフィズス菌代謝全体に焦点を当てた研究が必要となる。本論文では、ACNQが電子伝達メディエータとして $\text{NAD(P)}^+$ 再生に関与し、ビフィズス菌の糖代謝・酸素還元系を変化させることにより増殖を促進しているとのモデルを提唱した。そして、生物電気化学的手法による関連諸反応の速度解析と糖代謝産物の分析から、この考えを定量的に検証している。キノンなどの微量化合物によって嫌気性菌の代謝が大きく変化することを示した例は少なく、また、その変化を定量的に解析した例はほとんどない。評価すべき点は以下の通りである。

1. 本論文ではビフィズス菌による酸素・過酸化水素の還元が、ACNQの投与で大きく促進されることを示している。酸素毒の消去や(外的電子受容体による) $\text{NAD(P)}^+$ 再生は嫌気性菌の増殖に大きな意味を持つが、ACNQという微量化合物によりこの二つの反応が促進されることは興味深い。また、このような反応系の速度情報とACNQの物理化学的特性から、ACNQの増殖促進特性やACNQの構造・物性の必然性を議論したことは評価に値する。

2. ACNQによる $\text{NAD(P)}^+$ 再生経路が存在している条件での、ビフィズス菌・乳酸菌の代謝産物を解析し、ACNQによる経路が内的な $\text{NAD(P)}^+$ 再生経路を競争的に抑制し、乳酸やエタノールの生成を抑制することを明らかにしている。この反応系によりピルビン酸由来の代謝系が活性化されることを示している。代謝産物の割合の変化を定量的に解析することで、ACNQの作用機序やビフィズス菌に対する特異性について議論を進めている。一方で、ここで得られた知見に基づきACNQによる乳酸菌代謝産物調節の可能性を示している。

3. 食品由来の成分であるデヒドロアスコルビン酸やポリフェノールの酸化重合体によってACNQ還元型が再酸化されることを示し、ACNQの投与によりビフィズス菌が利用できる電子受容体の幅が広がることを明らかにしている。また、この反応でアスコルビン酸など、宿主にとって有用な物質が再生されることを示している。また、ACNQ還元型とデヒドロアスコルビン酸との反応機構に関しても議論している。

以上のように本論文は、ACNQが電子伝達メディエータとしてビフィズス菌の糖代謝・酸素還元系を大きく変化させることを、主に生物電気化学手法を用いて定量的に明らかにしている。ここで得られた知見はACNQの作用機序解明につながるばかりでなく、応用微生物学並びに生物電気化学の分野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14年1月10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。