

氏名	伊東 昌洋		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5923号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Rhizopus stolonifer NBRC 30816 を用いて作製した大豆発酵食品テンペに含まれる 抗菌性物質の単離と同定		
論文審査委員	吉田 竜介 教授	森田 学 教授	十川 千春 准教授

## 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

### 【緒言】

近年、我が国において、高齢化の進展に伴う要介護高齢者の増加が問題となっており、口腔内の感染管理を簡便に行う必要性が高まっている。世界的にも、今後半世紀で急速に高齢化が進行すると予測されており、同様の問題に対応する必要性が生じると考えられる。そこで、簡便かつ長期的に口腔感染症を制御するために、日常の食事によって口腔常在菌の付着や増殖を制御するというphytochemicalを利用したアプローチを考えた。

過去に抗菌性が報告されている食品は数多くある。その中でも本研究では栄養価が高いこと、安価に生産できること、加工が容易であること等から世界中の各地域（特に人口増加が予測される東南アジア）で関心が高まっており、広い範囲に応用できると考えられる、インドネシア原産の大豆発酵食品であるテンペに着目した。

テンペは、様々な生理的機能を有することに加え、*Bacillus subtilis*など数種類のグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つことが報告されている。そこで本研究では、*Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, そして*R. stolonifer*を用いて調製したテンペの口腔内グラム陽性球菌に対する抗菌性を検討し、さらにテンペに含まれる抗菌性物質を単離・同定した。

### 【材料と方法】

- 食品**：マッシュルーム、ニンニク、パセリ、タイム、ショウガ、テンペ（発酵菌は *Rhizopus* 属 3 種類）のパウダー（池田糖化工業より供与）を用いた。各パウダーを Phosphate Buffered Saline (PBS) に溶解させ、室温で1時間攪拌した。その後、遠心分離して上清を採取し、粗抽出液として使用した。
- 細菌**：*S. mutans* ATCC25175 株を使用した。培養条件は 37°C、好気培養とし、培養培地は Brain Heart Infusion 培地 (BHI) を用いた。各実験の際には、対数増殖期まで培養した後に、吸光度計を用いて波長 660 nm における濁度を測定し、終濃度  $1 \times 10^6$  cfu/mL となるように BHI で希釈して用いた。
- 濁度の測定**：96 穴マイクロプレート上で食品抽出液と *S. mutans* の培養液を混合し、37°C で 24 時間、静置培養した。溶液中の細菌数は、マイクロプレートリーダーを用いて 2 時間ごとに濁度（吸光度 660 nm）を測定した。
- ATP 量の測定**：12 穴マイクロプレート上で食品抽出液と *S. mutans* の培養液を混合し、37°C で 12 時間、静置培養した後に、ルシフェラーゼを用いて、細菌の ATP 量を測定した。
- 抗菌性物質の精製**：粗抽出液を限外濾過した（3kDa 未満透過液、3-10 kDa 濃縮液、10-100 kDa 濃縮液）。

縮液，100 kDa 以上濃縮液)。また，オクタデシルシリル (ODS) カラムクロマトグラフィー精製を行なった { (ステップワイズ法：10%，20%，50%，80%および100%メタノール溶出画分) (グラジエント法：80%~100%を44分割したメタノール溶出画分) }。グラジエント溶出液を，高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析にて検出された抗菌性物質のピークを中心に，3つのフラクション (フラクション1~3) に分離した。

6. **タンパク質の検出**：タンパク質の検出は，非還元下での native polyacrylamide electrophoresis 法および還元下での sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis 法によって行った。
7. **タンパク質の分解**：粗抽出液にエンド型プロテアーゼ，およびエンド・エキソ混合型プロテアーゼを加え，酵素処理を行った。
8. **抗菌性物質の同定**：HPLC 分析，エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) およびラマン分光分析にて物質の同定を行なった。
9. **統計解析**：3群間以上の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA)，多重比較検定には Tukey's test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 【結果】

1. **抗菌性を有する食品**：発酵時に *R. stolonifer* を使用したテンペ Rs は，終濃度 1 mg/mL 以上で *S. mutans* の増殖を抑制した。同様に，同濃度以上で，ATP 量を有意に低下させた ( $p < 0.01$ )。
2. **限外濾過分画が *S. mutans* の増殖と ATP 量に与える影響**：100 kDa 以上濃縮液では増殖を抑制し，その増殖抑制効果は粗抽出液と同程度であった。また，同様に，同濃度以上で，ATP 量を有意に低下させた ( $p < 0.01$ )。
3. **粗抽出液中のタンパク質**：テンペ Rs 中からは 100 kDa 以上のタンパク質は検出されなかった。
4. **タンパク質変性後の ATP 量に与える影響**：プロテアーゼで処理したテンペ粗抽出液は，陰性対照と比較して，ATP 量を有意に低下させ，その ATP 量は，無処理のテンペ Rs 粗抽出液と同等であった ( $p < 0.01$ )。
5. **ODS カラム精製分画が *S. mutans* の増殖と ATP 量に与える影響**：80%メタノール溶出液および 100%メタノール溶出液は，陰性対照と比較して，ATP 量を有意に低下させた ( $p < 0.01$ )。
6. **HPLC 分析**：フラクション 2 のみが陰性対照と比較して ATP 量を有意に低下させた ( $p < 0.01$ )。また，フラクション 2 のみが保持時間 7.8 分に特徴的なピークが確認できた。
7. **ESI-MS 分析**：フラクション 2 から，ネガティブモードの ESI-MS 分析で  $m/z$  279.234 が検出された。リノール酸から，ネガティブモードの ESI-MS 分析で  $m/z$  279.231 が検出された。
8. **ラマン分光分析**：フラクション 2 およびリノール酸のラマン分光分析を行った結果，両者は類似するピークを有した。
9. **標準品との抗菌性の比較**：リノール酸，フラクション 2 共に終濃度 100  $\mu\text{g/mL}$  において，陰性対照と比較して，ATP 量を有意に低下させた ( $p < 0.01$ )。

## 【考察】

本研究から，テンペRs粗抽出液は1 mg/mL以上の濃度でう蝕病原細菌である*S. mutans*に対して増殖抑制効果を有することが分かり，粗抽出液中の抗菌性を持つ物質はリノール酸であった。

他の食品と比較した際，テンペRsは，より低濃度でPBSによる粗抽出で抗菌性を有したため，口腔内に長期間，安全に使用するという観点から，有用性があると考えられる。

抗菌性物質として同定したリノール酸は，炭素数18の長鎖不飽和脂肪酸である。すでに食用油として食経験があり，世界的に広く使用されている。オメガ-6系の必須脂肪酸としても知られており，人体には欠かせない脂肪酸である。粗抽出液中におけるリノール酸の動態は本研究では解明できておらず，今後の研究課題としたい。

また，テンペRsは，他の菌種を用いて製造したテンペよりも多くのイソフラボンアグリコンを含んでいることが報告されている。本研究の結果と併せて，テンペ製造における*R. stolonifer*の重要性は一層高まる

と考えられる。上記の研究課題に加えて、*R. stolonifer*の特徴をさらに検討し、テンペRsの口腔感染症を制御する食品としての有効性を追求したい。

#### **【結論】**

テンペRs粗抽出液は1 mg/mL以上の濃度で*S. mutans*に対して抗菌性を有する。また、テンペRs中に含まれる抗菌性物質はリノール酸である。

## 論文審査結果の要旨

近年、我が国において、高齢化の進展に伴う要介護高齢者の増加が問題となっており、口腔内の感染管理を簡便に行う必要性が高まっている。世界的にも、今後半世紀で急速に高齢化が進行すると予測されており、同様の問題に対応する必要性が生じると考えられる。そこで、簡便かつ長期的に口腔感染症を制御するために、日常の食事によって口腔常在菌の付着や増殖を制御するという *phytochemical* を利用したアプローチを考えた。過去に抗菌性が報告されている食品は数多くある。その中でも本研究では栄養価が高いこと、安価に生産できること、加工が容易であること等から世界中の各地域（特に人口増加が予測される東南アジア）で関心が高まっており、広い範囲に応用できると考えられる、インドネシア原産の大豆発酵食品であるテンペに着目した。テンペは、様々な生理的機能を有することに加え、*Bacillus subtilis* など数種類のグラム陽性菌に対して抗菌活性を持つことが報告されている。そこで申請者は、*Rhizopus oligosporus*、*R. oryzae*、および *R. stolonifer* を用いて調製したテンペの口腔内グラム陽性球菌 *Streptococcus mutans* に対する抗菌性を検討し、さらにテンペに含まれる抗菌性物質を単離・同定した。

発酵時に *R. stolonifer* を使用したテンペ Rs 粗抽出液は、終濃度 1 mg/mL 以上で *S. mutans* の増殖を抑制した。同様に、同濃度以上で、菌体由来 ATP 量を有意に低下させた。そこで特性追求のため、粗抽出液を限外濾過により分画したところ、100 kDa 以上濃縮液では増殖を抑制し、その増殖抑制効果は粗抽出液と同程度であった。また、同様に、同濃度以上で、ATP 量を有意に低下させた。抗菌性物質はタンパク質であるという仮説をたて、タンパク質電気泳動を行なったが、テンペ Rs 中からは 100 kDa 以上のタンパク質は検出されなかった。また、プロテアーゼで処理したテンペ粗抽出液は、陰性対照と比較して、ATP 量を有意に低下させ、その ATP 量は無処理のテンペ Rs 粗抽出液と同等であった。これらの結果、抗菌性物質がタンパク質以外である可能性が考えられた。次に疎水性相互作用により分離する ODS カラム精製を行い、各分画の抗菌性を検討した。その結果、80%メタノール溶出液および 100%メタノール溶出液は、陰性対照と比較して、ATP 量を有意に低下させた。さらに、100%メタノール溶出液を 3 つのフラクションに分け、それぞれの抗菌性を検討した結果、フラクション 2 のみが陰性対照と比較して ATP 量を有意に低下させた。また、フラクション 2 のみが HPLC において保持時間 7.8 分に特徴的なピークが確認できた。そこで、フラクション 2 に関してさらに化学的性質を分析した。その結果、フラクション 2 から、ネガティブモードの ESI-MS 分析で  $m/z$  279.234 が検出された。テンペ Rs に含まれる物質のうち、リノール酸である可能性が示唆されたため、リノール酸の ESI-MS 分析を行った。リノール酸から、ネガティブモードの ESI-MS 分析で  $m/z$  279.231 が検出された。さらに、フラクション 2 およびリノール酸のラマン分光分析を行った結果、両者は類似するピークを有した。最後に、リノール酸およびフラクション 2 の抗菌性を比較した。共に終濃度 100  $\mu\text{g/mL}$  において、陰性対照と比較して、ATP 量を有意に低下させた。以上の結果より、テンペ Rs の粗抽出液は 1 mg/mL 以上の濃度で *S. mutans* に対して抗菌性を有することがわかった。また、テンペ Rs 中に含まれる抗菌性物質はリノール酸であった。

本申請論文は大豆発酵食品であるテンペ Rs の口腔内細菌 *S. mutans* に対する抗菌性を初めて明らかにしたものであり、その抗菌性成分の同定まで行われている。分析手法に関しては分析化学および抗菌性までの多面的な評価がされており、適切な考察も行われている。

よって、本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。