

適応して、大型の卵を産み、卵黄栄養による発生を行う方式を身につけたと推測される。しかし、一方で、抱卵数が多く、多数の幼生を一度に放出してプランクトン栄養発生を行う種も認められる。このような現象は、異なった生活様式でこの海域の環境に適応した、種それぞれの繁殖戦略の結果であると考えられる。

本研究は、遠州灘の大陸棚外縁部に生息する十脚目甲殻類の幼生の発生様式について、初めてその一端を解明したものであり、得られた知見は陸棚環境への生物の多様な適応を明らかにしており、同海域に生息する各動物種の適応の種特異性を予想させ、今後の、この海域の生物生産に関する研究の基礎資料になると考えられる。

氏名	嶋田 貴志
学位記番号	生博 乙第 20 号
学位記授与の日付け	平成 13 年 3 月 26 日
学位論文題名	Enterococcus faecalis 菌体の機能性食品としての血圧低下および I 型アレルギー抑制作用
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・久松 眞 助教授・栗冠 和郎 助教授・木村 哲哉 帝京大学医真菌研究センター 教授・山口 英世

## 要 旨

乳酸菌を含む食品は健康保持に役立つとされ、国内外で広く利用されている。我々はヒトの腸管から分離された乳酸菌の一種である *Enterococcus faecalis* FK-23 株の加熱処理菌体（FK-23 標品）および酵素処理菌体（FK-23 抽出物）の機能性食品としての有用性の科学的検証を目的とする研究の一環として、食品の三次機能のなかで特にニーズの高い血圧低下作用および I 型アレルギー抑制作用について検討した。

### 高血圧自然発症ラット（SHR）に対する作用

高血圧動物モデルとして、SHR を用い、1 日量として 30～120mg の FK-23 標品を 28 日間連日経口投与すると、用量依存的な血圧低下効果がみられた。また、1 日量として 120～240mg の FK-23 標品を 270 日間経口投与した場合も、血圧低下作用は維持され、心疾患の一因とされる心臓肥大の抑制が確認された。一方、これらの用量の FK-23 標品は、正常血圧ラットの血圧には明らかな影響を示さなかった。FK-23 標品に含まれる血圧低下作用物質を単離・同定するため、SHR に対する血圧低下活性を指標として FK-23 株生菌体を用いて分画を行った。菌体の加熱抽出、限外濾過膜による分子量分画および陰イオン交換樹脂による分画を逐次行い、活性物質を単離した。さらに、この物質をアガロースゲル電気泳動法および薄相クロマトグラフィー法によって分

析した結果、分子量 10,000 以上の RNA と同定された。RNA の血圧低下作用機序として、RNA 投与の前にアデノシンレセプターの拮抗剤であるテオフィリンを投与することで消失することから、アデノシンによる血管拡張作用によると示唆された。さらに FK-23 株の RNA を効率よく抽出する方法として、菌体をリゾチーム処理した後、加熱処理を行うという抽出法を開発した。この方法によって得られる FK-23 抽出物は FK-23 標品の 1/3（乾燥重量）の用量で同等の血圧低下作用を示した。

### I 型アレルギーモデル実験系に対する作用

マウスにおける能動型皮膚アナフィラキシー（ACA）およびブタクサ抗原誘発腹腔炎を実験系として用い、FK-23 抽出物の効果を検討した。ACA については 28 日間、抗原誘発腹腔炎については 21 日間、FK-23 抽出物を連日経口投与した。いずれの実験系においても、FK-23 抽出物は用量依存的に抑制作用を示し、1 日量 60mg の場合には有意なレベルに達した。一方、同じ用量の FK-23 標品は、いずれの実験系においても明らかな作用を示さなかった。

### 安全性

以上の実験成績より、FK-23 標品および FK-23 抽出物が、有用な生理学的機能を有することが示唆されたことから、機能性食品としての応用の可能性を検討するために、安全性を検討した。FK-23 標品については亜急性

毒性試験を、また FK-23 抽出物については急性、亜急性および慢性毒性試験、並びに変異原性試験を行った。その結果、いずれの試験においても FK-23 標品、FK-23 抽出物のいずれにも明らかな毒性は認められなかった。

#### 臨床試験

試験の主旨、考えられる作用および副作用を十分に説明し、同意を得たスギ花粉症患者を対象に試験を行った。試験群患者には、スギ花粉が飛散する前から、FK-23 抽出物 1 日量 1.0g を 28 日間経口摂取させ、鼻および眼の症状、並びに抗アレルギー薬の使用量を指標として、対照群患者と比較検討した。その結果、試験群では鼻の

症状、特に鼻閉が緩和され、治療薬の使用量が減少した。また、本態性高血圧症患者を対象とした試験において、FK-23 抽出物が明らかな血圧低下作用を示すことも報告している。

#### 結論

ヒト由来乳酸菌 *E. faecalis* FK-23 標品、特に FK-23 抽出物は、高血圧および I 型アレルギーのモデル実験系、並びに患者において、それぞれ血圧低下作用、並びに I 型アレルギー抑制作用を示すことが検証され、その安全性の確認と相まって、機能性食品としての有用性が示唆された。

氏名	河津 哲
学位記番号	生博 乙第 21 号
学位記授与の日付け	平成 13 年 7 月 18 日
学位論文題目	植物バイオマスを有効利用するための分子育種学的研究
論文審査委員	主査 教授・大宮 邦雄 教授・神山 康夫 助教授・栗冠 和郎 助教授・木村 哲哉 奈良先端科学技術大学院大学 教授・新名 惇彦

#### 要 旨

本論文は、再生産可能な植物バイオマスを有効に利用することを目的として行った分子育種学的研究をまとめたものである。概要は以下のとおりである。

##### (1) *Bacillus polymyxa* 由来 $\beta$ -amylase 遺伝子の解析

デンプン分解酵素の  $\beta$ -amylase 遺伝子を、細菌 *Bacillus polymyxa* からクローニングし、その遺伝子構造を明らかにした。大腸菌にクローニングできた 4.8kb の DNA 断片からは、3 種の多型 ss-amylase が生産され、そのうちの 70kDa の  $\beta$ -amylase 遺伝子をコードする 3.1kb の DNA 断片の塩基配列を決定した。この遺伝子領域には終始コドンを見いだすことはできなかったが、2,808bp からなる一つの遺伝子読枠があり、N 末端に 33 あるいは 35 アミノ酸残基からなる分泌シグナルを含む 936 アミノ酸残基からなる  $\beta$ -amylase 遺伝子の構造が明らかになった。元菌である *Bacillus polymyxa* を chymostatin の存在下でプロテアーゼを阻害して培養した結果、約 160kDa の巨大な  $\beta$ -amylase が生産され、多型  $\beta$ -amylase はプロテアーゼの加水分解によって生産されることが示唆された。

##### (2) セルラーゼ遺伝子発現によるセルロースバイオマスの利用

セルロースバイオマスを有効利用する酵素としてルーメン細菌 *Ruminococcus albus* が生産する endo-1,4-ss-glucanase (EgI) を用いた。この EgI はエンド型のセルラーゼ活性に加えて、 $\beta$ -xylosidase 活性も持つ植物細胞壁分解酵素であることが判明している。この EgI 遺伝子の分泌配列と成熟蛋白質の N 末端より 15 アミノ酸に相当する遺伝子領域を欠失させた改良遺伝子 (t-EgI 遺伝子) をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御によってタバコ培養細胞で発現させたところ、形質転換細胞は内在性セルラーゼの約 30 倍の強い活性を示した。そのセルラーゼ活性の 95% は細胞質内に存在したためか、形質転換したタバコ培養細胞の生育にはほとんど影響しなかった。得られた形質転換タバコは細胞質内に可溶性蛋白質の 0.1~0.5% に相当する量の t-EgI を蓄積していたが、形態も、生育も正常であった。さらに、形質転換タバコ細胞を破碎すると t-EgI は、タバコの細胞壁成分を基質として分解反応を行った。従って、t-EgI 遺伝子を発現している植物体は“セルラーゼをカ