

論文内容要旨

報告番号	甲 総 第 14 号	氏名	Hoida Ali Badr Badr
学位論文題目	Studies on edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin and mutagens 食用海藻の志賀毒素並びに変異原性物質の吸着能に関する研究		
<p>内容要旨：腸管出血性大腸菌0157は、胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性を有すると共に、有害な志賀毒素(Stx1とStx2)を生産し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群を引き起こして死に至る場合もある危険な細菌である。本菌による感染症の治療において、抗生物質の使用は志賀毒素遺伝子の活性化や、細胞内ペロ毒素の大量放出を引き起こし、病態を悪化させる事例も報告されている。志賀毒素は、A-サブユニット1つとB-サブユニット5つで構成されるタンパク質であり、標的細胞表面のグロボトリオースにB-サブユニットが結合し、細胞内にA-サブユニットが侵入する。この機構から、グロボトリオースとキトサンの複合体をペロ毒素中和剤とする報告があるが、安価で安全な志賀毒素吸着剤に関する報告はない。</p> <p>第1章では、食用海藻の志賀毒素吸着性を検討した。食用海藻としては、ウスバアオノリ、アオサ、アラメ、モズク、アカモク、ツルモ、フノリ、アカバギンナンソウ、テングサ、エゴソウ、スギノリ、ワカメ、コンブ、ヒジキの乾燥海藻14種類を使用した。使用したすべての海藻の不溶性画分は志賀毒素吸着性を示さなかったが、水溶性の抽出液に志賀毒素吸着性が見られた。最も高い志賀毒素吸着性は、ウスバアオノリ(<i>Ulva linza</i> Linnaeus)抽出液に見られ、有効成分をイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製して機能解析を行った結果、本精製成分はStx1とStx2の両者を吸着し、それらに対する解離定数(K_d)は、それぞれ1.9 μM, 3.5 μMと算出された。また、電気泳動法においてクーマジープリリアントブルーで染色されず、メチレンブルーで染色され、平均分子量約800 kDaの酸性多糖と考えられた。続いて、本物質の構成成分を分析し、全糖量は60%、硫酸エステルは18%、ウロン酸含量は20%であることが判明した。さらに、精製物を酸加水分解後、構成糖をGCMSで分析したところ、ラムノース：キシロース；グルコースが検出され、それぞれのモル比は、3.87:1.0:0.12あった。また、グルクロン酸含量が17%であり、前述のウロン酸の多くはグルクロン酸であることが判明した。以上のことから、志賀毒素吸着性を示す物質は、ラムナン硫酸であると考えられた。一方、褐藻類(<i>Fucus vesiculosus</i>)由来の硫酸多糖であるフコイダンは、Stx2のみを吸着することが判明した。</p> <p>第2章では、食用海藻類の抗変異原性を明らかにした。食品の加工・調理加工において、種々の変異原性物質が生成することが知られている。これまで多くの食品成分が種々の変異原性物質を吸着することが報告されてきた。しかしながら、食用海藻の抗変異原性を体系的に調べた報告は乏しい。14種の乾燥海藻から熱水抽出液を調製して、<i>umuC-lacZ</i> 融合遺伝子を導入した <i>Salmonella typhimurium</i> を用いる <i>umuC</i> 法により抗変異原性を調べたところ、使用した直接変異原 {furylframide (AF-2), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)} と間接変異原 {3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-b) indole (Trp-P-2), 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline (IQ)} の全てに対して、アオサ抽出液が最も高い抗変異原性を示した。この活性は、既報のカラギーナンを含む紅藻類よりも高いことが明らかとなった。</p>			

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 総 第 14 号	氏 名	Hoida Ali Badr Badr
審査委員	主 査 小山 保夫 副 査 横井川 久己男 副 査 服部 武文		
学位論文題目	Studies on edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin and mutagens 食用海藻の志賀毒素並びに変異原性物質の吸着能に関する研究		
審査結果の要旨	<p>本論文は、安全な食用海藻を対象に、細菌毒素や化学物質の吸着性を明らかにしたものである。腸管出血性大腸菌の生産する志賀毒素 (Stx) は、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群など重い臨床症状の原因となるが、本菌による感染症の治療において、抗生物質の使用はStx遺伝子の活性化や、細菌細胞内Stxの大量放出を引き起こし、病態を悪化させる事例も報告されている。Stxは、標的細胞表層のグロボ三糖に結合することから、グロボ三糖とキトサンの複合体をベロ毒素中和剤とする報告があるが、安全性や吸着効率の問題から、未だ実用化には至っていない。</p> <p>本論文提出者は、安価で安全な食用海藻に着目し、Stxや有害化学物質の吸着性を検討した。</p> <p>第1章では、食用海藻の志賀毒素吸着性を検討している。食用海藻として、ウスバアオノリ、アオサ、アラメ、モズク、アカモク、ツルモ、フノリ、アカバギンナンソウ、テングサ、エゴソウ、スギノリ、ワカメ、コンブ、ヒジキの乾燥海藻14種類を使用し、Stx吸着性を検討したところ、使用したすべての海藻の不溶性画分はStx吸着性を示さなかったが、水溶性の抽出液に志賀毒素吸着性が見られた。最も高い志賀毒素吸着性は、ウスバアオノリ (<i>Ulva linza</i> Linnaeus) 抽出液に見られ、有効成分をイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製して機能解析を行った結果、本精製成分はStx1とStx2の両者を吸着し、それらに対する解離定数は、それぞれ1.9 μM、3.5 μMと算出された。また、電気泳動法においてクーマジープリリアントブルーで染色されず、メチレンブルーで染色され、平均分子量約800 kDaの酸性多糖と考えられた。続いて、本物質の構成成分を分析し、全糖量は60%、硫酸エステルは18%、ウロン酸含量は20%であることが判明した。さらに、精製物を酸加水分解後、構成糖をGCMSで分析したところ、ラムノース：キシロース；グルコースが検出され、それぞれのモル比は、3.87:1.0:0.12であった。また、グルクロン酸含量が17%であり、前述のウロン酸の多くはグルクロン酸であることが判明した。以上のことから、志賀毒素吸着性を示す物質は、ラムナン硫酸であると考えられた。一方、褐藻類 (<i>Fucus vesiculosus</i>) 由来の硫酸多糖であるフコイダンは、Stx2のみを吸着することが判明した。これらの成果は、European Food Research and Technology (2016)に掲載されていることを確認した。</p> <p>第2章では、食用海藻類の抗変異原性を明らかにした。食品の加工・調理加工において、種々の変異原性物質が生成することが知られている。これまで多くの食品成分が種々の変異原性物質を吸着することが報告されてきた。しかしながら、食用海藻の抗変異原性を体系的に調べた報告は乏しい。14種の乾燥海藻から熱水抽出液を調製して、<i>umuC-lacZ</i> 融合遺伝子を導入した <i>Salmonella typhimurium</i> を用いる <i>umuC</i> 法により抗変異原性を調べたところ、使用した直接変異原 {furylframide (AF-2)、4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)} と間接変異原 {3-amino-1-methyl-5H-pyrido (4,3-b) indole (Trp-P-2)、2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline (IQ)} の全てに対して、アオサ抽出液が最も高い抗変異原性を示した。この活性は、既報</p>		

のカラギーナンを含む紅藻類よりも明らかに高いことを示している。

本研究結果は、食用海藻の食物繊維が Stx を吸着する最初の研究例であり、Stx 産生細菌による感染症の予防と治療にラムナン硫酸が有用であることを示唆するものであり、また高い抗変異原活性も有することから、食品衛生学や食品微生物学の基礎領域においても、感染予防や治療の応用的観点からも、きわめて有益な知見を与えたものである。従って、本論文は総合科学教育部の博士論文として一定の水準に達するものであり、博士（学術）の学位に相当するものと考ええる。