

氏名（本籍）	菅原 賢也		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 9836 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Bioactivity and Molecular Mechanism of <i>Bifidobacterium longum</i> on Anti-aging in <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫(<i>Caenorhabditis elegans</i>)を用いたビフィズス菌 (<i>Bifidobacterium longum</i>)による抗老化作用とその作用機序の解析)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	博士（理学）	稲垣 祐司
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	桑山 秀一

論 文 の 要 旨

本論文は、ビフィズス菌の抗老化に関する新たな生理活性作用に着目し、「線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いたビフィズス菌(*Bifidobacterium longum*)による抗老化作用とその作用機序の解析」を行い、その成果について述べている。

ビフィズス菌はヒトに有益な微生物であるプロバイオティクスであり、成人の腸内では乳酸菌の 100～1000 倍存在し、腸内のプロバイオティクスのなかでは、最も割合が高い。そのため、宿主に対してはかなりの影響力があり、腸内フローラの改善などヒトの健康に有益な効果をもたらす。現在では、ビフィズス菌による免疫機能の亢進、アレルギーの緩和、がん発症の抑制作用など様々な生理効果が知られている。さらに近年では、腸と脳、腸と筋肉の相互作用に腸内細菌が関わるという報告もある。また、抗老化に対する生理作用も報告されているが、未解明な部分が多い。一方、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)は実験室内の 20° C の環境では大腸菌 (*Escherichia coli*)を餌として飼育可能で、実験モデル生物として用いられることが多い。線虫は寒天培地上で約一ヶ月生存し、卵から孵化後 4、5 日で次世代の卵を産むので世代交代が早い。また、基本的な腸や神経、生殖器などの器官をもつため、食物の抽出物や機能性物質が消化吸収されていく様を模ることができる。このような理由から、線虫は様々な物質の生理活性作用の解析に用いられることも多い。線虫を用いたビフィズス菌の生理活性作用を解析した先行研究はいくつか存在するが、抗老化に関する研究は著者の研究を含めても数少なく、老化や寿命に関して明らかになっていないことが多い。本論文において著者は、ビフィズス菌がもつ抗老化に対する新たな生理活性作用およびその作用機序を線虫を用いて解明することを目的としている。

本論文で著者は、抗老化作用をもつ生理活性物質の候補として殺菌ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* (BR-108 株)に着目し、線虫を用いて殺菌ビフィズス菌の抗老化作用とその作用機序を解析している。著者は、抗老化を解析する指標として、UV 耐性や熱ストレス耐性、酸化ストレス耐性、細胞内 ROS 量、寿命、老化に伴い変化する運動性などに着目し、殺菌ビフィズス菌の生理作用を解析した。また著者は、線虫の筋肉量や ATP 産生量、ミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位およびミトコンドリア内 ROS

の産生量なども解析した。さらに著者は、ビフィズス菌のミトコンドリアへの影響を解析するために、ミトコンドリア複合体 I~V の阻害剤である Rotenone、2-thenoyltrifluoroacetone、Antimycin A、Sodium azide、N,N'-dicyclohexylcarbodiimide を用い、老化に伴って変化する運動性とミトコンドリア膜電位を解析した。また先行研究により、ビフィズス菌は菌種の違いによって複数の異なるシグナル伝達経路を介して寿命延伸に関わることが明らかにされている。そこで著者は、各種遺伝子の欠損変異体を用いてストレス耐性や寿命、運動性の解析を行った。これらの解析から著者は、殺菌ビフィズス菌を与えた線虫では UV ストレス耐性や熱ストレス耐性、酸化ストレス耐性が上昇すること、また寿命が延伸すること、さらに老化に伴う運動性低下が抑制されたことを明らかにした。また著者は、RT-qPCR の結果からストレス耐性に関わる遺伝子の発現が殺菌ビフィズス菌により上昇することを明らかにした。また著者は、線虫の老化に伴う筋肉量や ATP 産生量、ミトコンドリアの量や膜電位および ROS の継時的な低下が殺菌ビフィズス菌により抑制されたことを明らかにしており、殺菌ビフィズス菌が筋肉やミトコンドリアに作用して運動性の維持に関与したものと考察している。さらに著者は、殺菌ビフィズス菌による筋肉量の変化の程度に比べて、ミトコンドリアの量と膜電位がより大幅に変化したことを明らかにした。そこで著者は、殺菌ビフィズス菌は筋肉自身よりも ATP を産生するミトコンドリアにより強く影響していると考え、ミトコンドリア複合体 I~V の阻害剤を用いた解析を行った。その結果、著者は、殺菌ビフィズス菌による運動性の上昇がミトコンドリア複合体 I~V 全ての阻害剤により抑制されたことを明らかにした。一方、ミトコンドリアの膜電位については、殺菌ビフィズス菌で誘導された膜電位の上昇がミトコンドリア複合体 I の阻害剤 Rotenone により抑制された。以上の結果から著者は、殺菌ビフィズス菌による生理活性作用にはミトコンドリア複合体 I~V の全てが関与するものの、中でもミトコンドリア複合体 I の強い関与が示唆されたと述べている。また著者は、複数の遺伝子の欠損変異体を用いた解析により酸化ストレス耐性や寿命、運動性などが抑制されたことから、殺菌ビフィズス菌による生理作用には AAK-2、HFS-1、p38MAPK などを経たシグナル経路の関与が示唆されたと述べている。

本論文において著者は、線虫を用いて殺菌ビフィズス菌 (*B. longum*) がもつ抗老化作用およびその作用機序を解析している。著者は、殺菌ビフィズス菌は線虫のストレス耐性を上昇させ、寿命を延伸し、老化に伴う運動性の低下を抑制し、さらにストレス耐性に関わる遺伝子の発現を上昇させたことを明らかにした。さらに著者は、殺菌ビフィズス菌が線虫の老化に伴う筋肉量低下を抑制し、ATP 産生量の増加とミトコンドリアの量/膜電位/ROS の上昇に関与することを明らかにしたと述べている。

審 査 の 要 旨

本論文は、殺菌ビフィズス菌の抗老化に対する生理活性作用に着目し、(1) ビフィズス菌が、線虫の活性酸素種の除去、ストレス耐性の上昇、寿命延伸に関与すること、(2) ビフィズス菌が線虫の筋肉とミトコンドリア活性を増加させ老化に伴う運動性の低下を抑制することなどを明らかにした。老化個体の運動性の向上や、筋肉の維持、ミトコンドリア機能の維持は、老化現象の抑制や健康寿命の延伸につながる。これらの研究成果は、学術的にも大きな意義があるばかりでなく、新たな抗老化やサルコペニアの改善薬や機能性食品などの開発の道を拓くもので、その功績は大きい。

令和3年1月25日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。