

氏 名	VO THI TU ANH ヴォー・チー・ツー・アン
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 1054 号
学 位 授 与 の 日 付	令和 4 年 9 月 26 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	工芸科学研究科 物質・材料化学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>Utilization of Vietnamese naturals for food production</b> (食品生産のためのベトナム産天然物の利用)
審 査 委 員	(主査)教授 亀井加恵子 教授 堀内淳一 准教授 金折賢二

### 論文内容の要旨

#### (論文内容の要旨)

健康寿命延伸のため、健康に害をおよぼさない安全な食品の生産に加え、健康状態を改善する機能性食品の開発が求められている。本論文は、天然物を利用して、食品生産におけるこの 2 つの課題を解決に導く研究成果をまとめている。本論文は、序論、第 1 章、第 2 章、結論から構成されている。

序論では、食品製造における課題とその克服のための天然物利用について概説している。次に、第 1 章でとりあげる病原性細菌(vibrio)、およびその抑制のために用いたバクテリオファージ(以下、ファージ)を解説している。ファージは細菌に菌種特異的に感染し、溶菌するウイルスである。その構造と分類、生活環、ゲノムのパッケージ機構などファージの基本的な事柄を紹介し、さらに抗菌剤の代替としてファージを用いるファージセラピーを解説している。続いて、第 2 章でとりあげた植物抽出物の機能性を説明している。植物は代謝産物など多くの化学物質を生産するため、感染症を含む種々の疾病的治療に有効な生理活性を有している。本研究では、ベトナムで食されているミリウサ・ウェリティナ(*Miliusa velutina*)の果実や花に、抗マラリア活性物質や抗菌活性物質が含まれており、それらの構造がすでに同定されていることを紹介している。最後に、本論文の目的、すなわち安全でかつ健康増進に役立つ機能性を持つ食品の生産方法の開発であると述べている。

第 1 章は、腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* を対象に、ファージを用いた感染症の制御について述べている。*V. parahaemolyticus* は、エビに Early Modality syndrome や Acute Hepatopancreatic Necrosis といった深刻な感染症をもたらす原因菌であり、ヒトにも感染して腸炎ビブリオ食中毒を発生させる。エビの養殖においてビブリオ感染症の抑制のために抗菌剤が使用されるが、残存薬剤による健康への影響とともに、耐性菌の発生が大きな問題となる。本章では、*V. parahaemolyticus* を安全に除去するためのファージ利用の可能性を明らかにするため、*V. parahaemolyticus* を溶菌するファージの探索と単離、特性解析、ゲノム解析を行なった。

第 1 章は Part A と Part B の 2 部で構成されており、part A では、*V. parahaemolyticus* を溶菌するファージの探索・単離と特性を解析した。ベトナム南部の 3 ケ所より採取したエビ養殖場

の水、泥および各種海産物合計 68 試料について、二重寒天法を用いて *V. parahaemolyticus* に対する溶菌活性を評価した。透明なプラークを形成したムール貝抽出物より、*V. parahaemolyticus* を溶菌する 2 種類のファージ KIT04 と KIT05 を単離した。宿主特異性解析の結果、両ファージはいずれも *V. parahaemolyticus* 特異的であり、KIT04 の方がやや広い特異性を有していることを明らかにした。

第 1 章 Part B では、KIT04 および KIT05 の全ゲノム配列を解析し、各種バイオインフォマティクス解析によって、ORF、tRNA、他のファージゲノムとの相同性、系統樹などを明らかにした。KIT04 ゲノムは 114.93kb、160 個のタンパク質、24 個の tRNA をコードしていると推定された。既知のファージゲノムとの相同性から *Ermolyeavirinae* に属することが明らかとなつた。一方、KIT05 ゲノムは 50.63kb、60 個のタンパク質、4 個の tRNA をコードしていると推定され、*podoviridae* に分類された。いずれのファージもそのゲノム配列から新規なファージであると同定された。KIT04 はホリン、KIT05 は endolysin といった溶菌に関わる遺伝子を有していた、一方、溶原性に関連する遺伝子は、毒素遺伝子を保有していないことが明らかとなつた。

以上より、両ファージは溶原性を持たない溶菌性ファージであり、*V. parahaemolyticus* に特異的な抗菌剤代替として利用可能であることが示唆された。ファージ利用の問題点の一つであるファージ耐性菌の発生を抑制するためには、感染機構が異なるファージを混合して、カクテルにすることが望ましい。KIT04、KIT05 は種類の異なるファージであり、両ファージのカクテル化が耐性菌発生の抑制に有効であると期待できる。

第 2 章では、抗菌活性が報告されているミリウサ・ウェリティナ花のエタノール抽出物について、その機能性を報告した。エタノール抽出物および各種溶媒での分画画分について、ポリフェノールおよびフラボノイドを定量した。さらに、ミリウサ・ウェリティナ花のエタノール抽出物には抗酸化活性および糖尿病抑制効果が期待できる糖質関連消化酵素  $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ活性に対する阻害活性が含まれることを明らかにした。

結論では、本論文を総括している。ファージ KIT04 と KIT05 を用いることによって *V. parahaemolyticus* 感染症を抑制できることを示し、残留抗菌剤に汚染されていない安全なエビの生産が可能になったことを述べている。さらに、抗菌活性が報告されているミリウサ・ウェリティナ花のエタノール抽出物を活用することによって、新たな抗酸化活性および抗糖尿病活性を合わせ持つ機能性食品が製造できることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、安全かつ健康増進に役立つ食品の製造を実現するため、天然物の利用を提案している。第 1 章でとりあげた腸炎ビブリオによる感染症は、エビなどの海産物の養殖に甚大な損失をもたらすとともに、ヒトにも胃腸炎を引き起こす。一方、エビ養殖現場における抗菌剤の使用は残留薬剤による健康被害や耐性菌の発生の可能性があり、安全なエビの生産には抗菌剤の代替を探索する必要がある。本論文では腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* を特異的に溶菌するバクテリオファージ（以下、ファージ）の活用を提案している。ファージは細菌特異的に感染するウ

イルスで、動植物には感染性を持たない。また、人体に投与しても害が無いことが証明されており、ファージを治療に用いるファージセラピーが注目されている。申請者は、2種類の *V. parahaemolyticus* 溶菌性ファージ KIT04 および KIT05 の単離に成功し、それらの特性および全ゲノム配列を明らかにした。いずれのファージも新規なファージであり、KIT04 は *Ermolyevavirinae*、KIT05 は *Podoviridae* に属していることを見出した。溶菌に関わる因子として KIT04 はホリン、KIT05 は endolysin を持つ。一方、溶原性に関連する遺伝子や毒素遺伝子を保有していないことが明らかとなった。これらの性質は、ファージを抗菌剤代替として実用化する上で重要な性質である。また、ファージに対する耐性菌の発生を抑制するためには、感染機構が異なるファージを混合して、カクテルにすることが求められる。KIT04 および KIT05 は異なる種類のファージであり、その感染機構も異なると考えられることから、両ファージのカクテルが *V. parahaemolyticus* の抑制に有効であると期待できる。これらは、エビの養殖におけるファージの実用化の可能性を示した意義のある成果である。

第2章では、抗菌活性が報告されているミリウサ・ウェリティナ花のエタノール抽出物について、抗酸化活性および糖尿病抑制効果が期待できる糖質関連消化酵素に対する阻害活性が含まれることを明らかにした。ミリウサ・ウェリティナはベトナムで食されており、抗菌活性、抗酸化活性および糖尿病抑制効果を併せ持つ機能性食品の開発に応用できることを示した点において、独創的であると評価できる。

総括において、申請者は食品製造におけるファージカクテルと植物抽出物の利用を提案している。これによって、海産物等に残留する抗菌剤による健康への悪影響および細菌感染による健康被害を抑制するとともに、さらに抗糖尿病や抗酸化といった機能性を食品に付与できることを示しており、本論文は社会的意義の高い研究成果をまとめたものと評価できる。

なお、本学位論文は、査読制度のある学術雑誌に掲載済みの以下の論文2編を基礎としており、いずれも申請者が筆頭著者である。

#### 学位論文の基礎となった学術論文

[1] Vo Thi Tu Anh, Nguyen Huan Pham-Khanh, Nguyen Song Han, Hirofumi Sunahara, Kaeko Kamei, Characterization and Complete Genomic Analysis of *Vibrio parahaemolyticus*-Infecting Phage KIT05, *Current Microbiology*, Vol. 79, 221 (2022) DOI:10.1007/s00284-022-02907-4

[2] Vo Thi Tu Anh, Dai Thi Xuan Trang, Kaeko Kamei, Tran Chi Linh, Nguyen Huan Pham-Khanh, Nguyen Trong Tuan, Luu Thai Danh, Phytochemicals, Antioxidant and Antidiabetic Activities of Extracts from *Miliusa velutina* Flowers, *Horticulturae*, Vol 7(12), 555 (2021) DOI: 10.3390/ horticulturae7120555