

(学位第9号様式)

No. 1

| 最終試験結果の要旨  |                      |
|--|----------------------|
| 学位申請者<br>氏名  | 謝 莖                  |
| 審査委員   | 主査 鹿児島大学（農）・教授 侯 徳興  |
|  | 副査 鹿児島大学（農）・助教 坂尾こず枝 |
|  | 副査 琉球大学・教授 屋 宏典      |
|  | 副査 佐賀大学・教授 永尾晃治      |
|  | 副査 鹿児島大学（水）・教授 小松正治  |
| 審査協力者  |                      |
| 実施年月日  | 令和3年1月18日            |
| 試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答   |                      |
| <p>主査及び副査は、令和3年1月18日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p> |                      |

|             |   |
|-------------|---|
| 学位申請者<br>氏名 | 謝 堃   |
| [質問 1]      | 藤茶は市販されているか？全体の20%と言うポリフェノール含量は非常に高い濃度だが、一般的か？藤茶は普通お湯で抽出して飲むのか、その場合、今回の実験のように高濃度で抽出できるのか？実験でエタノールを使用しているが、エタノールだからこそ高濃度で抽出できるのか？  |
| [回答 1]      | 中国では藤茶は市販されており、一般的にはお湯で飲む。藤茶の特徴はポリフェノール含量が高いことであり、本研究で用いた乾燥藤茶中ポリフェノール量は19.35%であった。他の緑茶の研究では、ポリフェノール含量は14.32-21.02%と報告されていたことより、藤茶のポリフェノール含量の方が高いと思われる。また、本研究では各種の溶媒で藤茶ポリフェノールを抽出した。お湯の抽出率は8.52%でエタノールの抽出率は18.34%であったことより、脂溶性ポリフェノールも抽出できたのだと思う。   |
| [質問 2]      | 腸管の微生物の変化を調べており、脂質代謝への影響、特に肝臓の脂質代謝への影響で良い結果が得られているが、そのキーファクターは何であるか？  |
| [回答 2]      | 本研究において藤茶ポリフェノールを摂取したマウスは高脂肪食マウスにより Bacteroidetes 菌の増加及び Firmicutes 菌の減少が認められ、さらに Indole およびエンドトキシンを生産する Ruminococcus 菌及び Prevotella 菌も減少された。脂質代謝指標と腸内細菌との相関を解析した結果、Bacteroidetes 菌は血清脂質レベルと負の相関を示し、Firmicutes 菌及び Proteobacteria 菌は血清脂質レベルと正の相関を示した。従って、藤茶ポリフェノールは主に高脂肪食でバランスが崩れた腸内細菌 Bacteroidetes と Firmicutes の比例を修復すると共に、エンドトキシンを生産する Ruminococcus 及び Prevotella 菌を減少することで、肝臓の脂質代謝に影響を及ぼしたと思う。 |
| [質問 3]      | HMGCR のドッキングシミュレーションのデータが出ているが、In vitro などで実際に HMGCR が阻害されるなどの測定はしているか？   |

[回答 3] マウス実験及び培養細胞実験の両実験において藤茶ポリフェノールが HMGCR の活性を阻害することは明らかになったが、In vitro における HMGCR 酵素阻害の実験はまだ行っていない。しかし、その作用機序としては DMY が AMPK 活性を活性化することにより HMGCR を阻害する、または DMY が直接 HMGCR を阻害する可能性があると考えられ、今後解明したいと思う。

[質問 4] HPLC の結果、藤茶の成分は 60% が DMY となっているが残り 40% の成分は何かわかるか？

[回答 4] 残りの 40% の成分については本研究では解析していないが、他の研究から植物繊維と多糖類であるという報告がある。本研究において脂質代謝に対する影響は DMY と藤茶の全抽出物がほぼ同じであったため、藤茶の機能性成分は DMY であると考えられた。

[質問 5] FFA のみの添加により NAD<sup>+</sup> が減少するが、FFA + DMY 添加により NAD<sup>+</sup> が回復、もしくは増加する。その時に NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway の他のほとんどの酵素が同じ傾向で動いているようにみえるが、DMY が最初に作用するのは、NAD<sup>+</sup> なのか、もしくは、DMY が NAD<sup>+</sup> Salvage Pathway の他の酵素にも同時に作用しているのか？ DMY の作用ポイントとして、どの酵素に影響を与えているのか分かるか？

[回答 5] DMY は NAD<sup>+</sup> の代謝において Salvage 経路に影響を与え、NAD<sup>+</sup> のフィードバック制御を増加させた。アミノ酸からの NAD<sup>+</sup> 合成経路には影響なかった。NAD<sup>+</sup> の Salvage 経路に、NAD<sup>+</sup> を利用する酵素によって生成されたニコチンアミド (Nicotinamide) をリサイクルすること、また、Salvage 経路の律速酵素は NAMPT であり、肥満患者において NAMPT の活性が低下した報告がある。本研究は DMY を添加させ、NAMPT の活性回復を示し、それに応じて代謝経路の全体が変化した可能性が高い。しかし、実際には Salvage 経路におけるほぼすべての反応は酸化還元反応（電子の交換）であり、DMY 自身の抗酸化力がその酸化還元反応に影響を与える可能性もある。植物体内では DMY が NAD<sup>+</sup> のフィードバック制御に関与する報告はされているが、動物体内での動向は明らかではない。以上のことから考えて、NAD<sup>+</sup> Salvage 経路に対する DMY の作用点はまだ

完全に確認できないが、NAMPTがDMYの作用ポイントである可能性が強い。

[質問6] 藤茶の機能性と一般の緑茶の機能性の類似点および相違点を教えて欲しい。また、藤茶に含有されているDMYは緑茶にも入っているか？

[回答6] DMYは様々な日本茶にも含有されているが、その含有量は低い。機能性における藤茶と緑茶との類似点は、生体内の抗酸化酵素の誘導、代謝性疾患の改善、腸内細菌組成への影響であると考えられる。相違点は、生物学的利用能及び生体内での代謝経路並びに代謝産物に相違があると思う。

[質問7] Western blottingの結果、ウェスタンダイエットモデルにおいて、藤茶を添加することでKeap-1に変化はないのにNrf2は増加している。その理由は何か？

[回答7] Keap1はNrf2の阻害剤であるだけでなく、がんの抑制遺伝子でもあることから、一般的にKeap1レベルはあまり急激に低下しない。また、Nrf2を活性化する経路は少なくとも二つあり、一つはKeap1の阻害を解除し、Nrf2のユビキチン化を減少させる。もう一つはNrf2をリン酸化させ、核内に移行し、転写因子としてDNAの転写を活性化する経路である。本研究では藤茶ポリフェノールはKeap1への直接的な影響がWestern blotting実験では示されなかったが、Nrf2のリン酸化を増加させ、転写活性化により下流のタンパク質の発現を増加したと考えた。

[質問8] DMYの代わりにMyricetinを使っても同じ結果が得られると思うか？

[回答8] 本研究では、DMYは細胞内NAD<sup>+</sup>発現レベルの調整に関連しており、AMPKのリン酸化を誘導することが示された。植物内においても、DMYがNAD<sup>+</sup>産生に関与する報告がなされている。一方、Myricetinはこの反応を起こさない。よって、Myricetinによる脂質代謝の作用機序は恐らくDMYのメカニズムと異なると思われる。しかし、様々なflavonoidはAMPKを活性化する報告があり、AMPK活性化の原因はflavonoidによる細胞内NAD<sup>+</sup>レベルの増加ではなく、他の代謝経路によるものと報告されている。

- [質問 9] DMY が細胞に取り込まれているという報告はあるか？
- [回答 9] DMY の細胞への取り込みについてはまだ詳細が明らかにされていないが、DMY は脂溶性が強いので、細胞膜脂質二重層に入ると考えている。今後の詳細研究が必要である。
- [質問 10] 細胞実験の結果から、DMY を  $20\mu\text{M}$  以上添加すると細胞毒性が出るようだが、藤茶としてどのくらいの量までは摂取しても安全か？
- [回答 10] 藤茶の半数致死濃度 (LC50) についての資料はまだないが、マウス実験における試料で 2% の藤茶ポリフェノールを添加していたが毒性作用は認められなかった。また、DMY の生物学的利用能は 4% 前後であることから藤茶の普通摂取による毒性はあまり考えられない。
- [質問 11] DMY のミトコンドリア内の  $\beta$  酸化への影響を確認しようとしたとのことだが、その時点でのミトコンドリアの活性状態は確認したのか？
- [回答 11] 本研究では、ミトコンドリア内の  $\beta$  酸化に関連する遺伝子発現を解析したが、ミトコンドリアの活性状態は確認していない。今後確認していきたいと思う。