

氏名 (本籍)	山口 裕 司 (岐阜)
学位の種類	博士 (工学)
学位授与番号	甲第496号
学位授与日付	平成28年3月25日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	人工培養された食用藍藻が産生する強いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖の解析 (Analysis of the polysaccharide having high hyaluronidase inhibition from cultured edible blue-green algae)
学位論文審査委員	(主査) 竹内 豊英 (副査) 松居 正樹、瀨瀬 守

### 論文内容の要旨

藍藻類は海藻と同じ藻類の仲間分類され、国内外で古くから食用にされてきた。しかし、その多くの種は特殊な環境下に生息していることから、限られた地域の住民によってのみ利用されてきた。

タイ北部の河川などに生息する食用藍藻の一種である *Noctochopsis lobatus* をタイのナン川から採取、単離し、人工培養に成功した。この熱水抽出物のエタノール不溶性画分に強いヒアルロニダーゼ阻害活性があることを明らかにしたが、その活性物質は明らかにされていなかった。

*N. lobatus* の熱水抽出物を 80%エタノール処理し、生じた沈殿を透析した。この抽出物の収率は乾燥藻体に対して 39.5%で、ヒアルロニダーゼに対する 50%阻害濃度 IC<sub>50</sub> は 12.3 µg/ml であった。この値は抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) の IC<sub>50</sub> の 1/8 以下で、強いヒアルロニダーゼ阻害活性を示した。この抽出物を DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーで精製した結果、3 つのフラクションが得られた。その中で、収量が最も多かったフラクションⅢの乾燥藻体に対する収率は 17.9%で、ヒアルロニダーゼに対する IC<sub>50</sub> は 7.18 µg/ml で他の画分より強い活性を示し、DSCG の 14.5 倍の活性であった。

各フラクションを 2M の TFA で加水分解後、ウロン酸も同時分析可能なジエチルジチオアセタール化後、TMS 化し、GC-MS を用いて糖組成を調べた。その結果、フラクションⅢの糖組成はキシロース 2.6%、フコース 20.3%、グルクロン酸 22.1%、グルコース 25.2%、マンノース 10.2%、およびガラクトース 3.9% であった。しかし、マススペクトルがフコースに似た未同定物質も 15.7% 検出された。他のフラクションも同じ糖で構成されたが、その組成比は若干異なっていた。*N. lobatus* 熱水抽出物の加水分解物から TLC を用い、未同定物質を単離し、NMR による構造解析を行った結果、未同定物質は 2-O-methylfucose であった。これまでに、バクテリアから 2-O-methylfucose は検出されていたが、藻類からの検出は初めてであった。

さらに、藍藻の *Nostoc* 属には数種の食用種が知られている。日本ではイシクラゲ (*N. commune*) やアシツキ (*N. verrucosum*) が知られており、海外ではペルーの Cushuro (*N. sphaericum*)、中国の髪菜 (*N. flagelliforme*) などである。これらの食用 *Nostoc* 属はスピルリナ (*Spilurina platensis*) のような大量培養ができていないため、天然品を採取して食用にされており、その採取量にも限りがあることから希少な食材となっている。したがって、これらの食用 *Nostoc* 属の大量培養を行い、生理活性を調べることで、その商業利用の可能性が開かれる。そこで、中国産の *N. commune* #31 株、日本産の *N. commune* YK-04 株、中国産の *N. flagelliforme* NXU 株、日本産の *N. verrucosum* KU005 株、および、ペルー産の *N. sphaericum* MAC09PER 株の 4 種 5 株の *Nostoc* 属の 80%エタノール処理した熱水抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。*N. commune* #31 株、同 YK-04 株、*N. flagelliforme*、*N. verrucosum*、および *N. sphaericum* の抽出物の収率はそれぞれ、8.3、14.5、9.1、14.5、および 35.8% であった。さらに、*N. flagelliforme*、*N. verrucosum* および *N. sphaericum* の抽出物のヒアルロニダーゼに対する IC<sub>50</sub> はそれぞれ、46.5、56.2、および、14.4 µg/ml であった。*N. commune* 2 株のヒアルロニダーゼに対する最大阻害率は 20% 未満だったので、IC<sub>50</sub> は求められなかった。*N. sphaericum* の抽出物の収率とヒアルロニダーゼ阻害活性はいずれも 5 株の中で最も高かった。*N. sphaericum* の抽出物の構成糖のモル比はグルコース 28.9%、ガラクトース 25.5%、マンノース 20.1%、グルクロン酸 13.3%、およびキシロース 12.1% で、グルクロン酸の割合は他の 4 株より多い値であった。グルコース、ガラクト

ース、マンノース、およびキシロースは他の4株にも共通する糖で、フコースは *N. commune* #31株と *N. verrucosum* から、ラムノースは *N. sphaericum* 以外の4株から検出された。*N. lobatus*、および *N. sphaericum* は高いヒアルロニダーゼ阻害活性を有する多糖を多く産出する食用藍藻として、利用価値の高い食用藍藻であることが明らかとなった。さらに、大量培養が可能となった食用藍藻のその他の生理活性を調査することは、それらの実用化の可能性を広げることに繋がるものと考えられる。

### 論文審査結果の要旨

本申請者は、タイ北部の河川などに生息する食用藍藻の一種である *Noctochopsis lobatus* をタイのナン川から採取、単離し、人工培養に成功した。さらに *N. lobatus* のヒアルロニダーゼ阻害活性物質を精製し、その科学的解析を行った。この抽出物のヒアルロニダーゼに対する50%阻害濃度 IC<sub>50</sub> は 12.3μg/ml であった。この値は抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウム (DSCG) の IC<sub>50</sub> の 1/8 以下で、強いヒアルロニダーゼ阻害活性を示した。この抽出物を対応するクロマトグラフィーで精製した結果、3つのフラクションを得た。その中で、収量が最も多かったフラクションⅢの乾燥藻体に対する収率がより強い活性を示し、DSCG の 14.5 倍の活性であった。

活性を有するフラクションⅢの糖組成を確認した。マススペクトルがフコースに似た未同定物質が検出された。他のフラクションも同じ糖で構成されたが、その組成比は若干異なっていた。*N. lobatus* 熱水抽出物の加水分解物から TLC を用い、未同定物質を単離し、NMR による構造解析を行った結果、未同定物質は 2-O-methylfucose であった。藻類からの検出は初めてであった。

藍藻の *Nostoc* 属にはイシクラゲ (*N. commune*) やアシツキ (*N. verrucosum*)、Cushuro (*N. sphaericum*)、髪菜 (*N. flagelliforme*) などがある。食用 *Nostoc* 属はスピルリナ (*Spilurina platensis*) のような大量培養ができていないため、天然品を採取して食用にされており、その採取量にも限りがあることから希少な食材である。中国産の *N. commune* #31株、日本産の *N. commune* YK-04株、中国産の *N. flagelliforme* NXU株、日本産の *N. verrucosum* KU005株およびペルー産の *N. sphaericum* MAC09PER株の4種5株の *Nostoc* 属の80%エタノール処理した熱水抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。その結果、*N. flagelliforme*、*N. verrucosum*、および *N. sphaericum* の抽出物のヒアルロニダーゼに対する活性を示した。*N. sphaericum* の抽出物の収率とヒアルロニダーゼ阻害活性はいずれも5株の中で最も高かった。*N. sphaericum* の抽出物の構成糖の測定の結果、グルクロン酸の割合は他の4株より多い値であった。

これらの成果は、新規性、学術性ともに十分な成果として認めることができる内容であり以下の審査員付学術論文に公表された。

### 最終試験結果の要旨

これらの内容は、学位論文審査委員会が開催した平成28年2月9日の最終試験・公聴会にて慎重に審査を行った結果、学位を授与することに値することを確認した。

以上、上記申請者の学位論文審査結果をここに報告します。

---

発表論文 (論文名、著者、掲載誌名、巻号、ページ)

- 1 Isolation and analysis of polysaccharide showing high hyaluronidase inhibitory activity in *Noctochopsis lobatus* MAC0804NAN (Yuji Yamaguchi and Mamoru Koketsu) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121** (3), 345-348 (2016).
- 2 Comparison of anti-hyaluronidase activities and sugar compositions of extracts from four edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) (Yuji Yamaguchi, Toshio Sakamoto and Mamoru Koketsu) *Algal Resources*, accepted on 28, December, 2015.