



平成 30年 1月 30日

工学研究科長 水田 洋司 殿

審査委員会

主査 迎 勝也



博士學位論文等審査報告書(甲)

論文提出者： 工学研究科産業技術デザイン専攻 山元 裕太 (15DTI02)

論文題目： 養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性に関する研究

審査委員会	主査	九州産業大学 教授	迎 勝也
	副査	九州産業大学 教授	小林 繁夫
	副査	九州産業大学 教授	磯部 信一郎



(論文審査結果の要旨)

本論文は、緑藻類養殖ヒトエグサに含まれる硫酸化多糖であるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について研究した成果をまとめたものである。

第一章では、海藻に含まれる硫酸化多糖に関する従来の研究を詳細に調査し、本論文における目的を述べている。海藻に含まれる硫酸化多糖は、褐藻類のフコイダンを始めとして、これまで様々な研究が行われ、硫酸化多糖についても多くの生理活性が報告されている。例えば、抗酸化活性、ヒアルロニダーゼ阻害活性(抗炎症活性)、抗アレルギー活性、抗腫瘍活性、抗肥満活性、抗糖尿病活性、抗血液凝固活性及び抗ウイルス活性等が知られている。しかしながら、硫酸化多糖の産業的利用は、増粘剤としてカラギーナン、抗血液凝固剤としてヘパリンが知られているのみで、それ以外の硫酸化多糖の産業上の利用へ向けた研究は少ない。硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害活性については、これまで褐藻類のメカブやコンブに含まれるフコイダンや、紅藻類チノリモ由来の硫酸化多糖で報告がなされているが、緑藻類の硫酸化多糖についてのヒアルロニダーゼ阻害活性の報告はほとんどなく、阻害機構についても詳細な研究はなされていない。本論文では、緑藻類の養殖ヒトエグサに存在するラムナン硫酸の抽出方法とラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について詳細に検討している。

第二章では、養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の最適な抽出法について検討している。養殖ヒトエグサからのラムナン硫酸の水抽出、酸処理抽出、酵素処理抽出及びオートクレーブ処理抽出の4方法を実施し、得られた各抽出物の収率、化学組成、分子量及びIRやNMRによる構造解析の結果から、酵素処理抽出法が、ラムナン硫酸の硫酸基含有率及び分子量が最も大きく、灰分含有率の少ない有効な抽出方法であることを明らかにしている。

第三章では、酵素処理抽出法により得られた硫酸基含有率20%(w/w)、700kDaのラムナン硫酸(以後、RS(20,700kDa)とする)を用い、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について検討している。その結果、ラムナン硫酸RS(20,700kDa)はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することを明らかにしている。次にラムナン硫酸の硫酸基含有率がヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす影響を調べるた

め、ラムナン硫酸 RS(20, 700kDa)を過硫酸化または脱硫酸処理により、硫酸基含有率 41%(w/w)、7%(w/w)及び 0.5%(w/w)のラムナン硫酸を調製し、RS(20, 700kDa)と共に、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行い、ラムナン硫酸の硫酸基含有率の増加に従い、ヒアルロニダーゼ阻害率は高くなる事を明らかにしている。更にラムナン硫酸の分子量がヒアルロニダーゼ阻害に及ぼす影響を調べるために、RS(20, 700kDa)の低分子化处理を行い、その硫酸基含有率をほとんど低下させず、分子量 200kDa 及び 50kDa のラムナン硫酸を調製し、RS(20, 700kDa)と共に、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行い、分子量の異なるこれらいずれのラムナン硫酸においてもヒアルロニダーゼ阻害率にほとんど差がみられないという事を明らかにしている。

これらの結果は、ラムナン硫酸がヒアルロニダーゼ阻害活性を発現する為には、ラムナン硫酸中の硫酸基含有率が重要であり、分子量の影響は少ないことを明らかにしている。

第四章では、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構について、詳細な検討を行っている。ヒアルロニダーゼ阻害機構を解明する為には、ラインウィーバー=バーク式によりラムナン硫酸のヒアルロニダーゼに対する酵素阻害様式を検討している。その結果、ラムナン硫酸がヒアルロニダーゼの活性部位に直接作用する拮抗阻害であることを明らかにしている。また、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは溶液中で白濁物質を生成することを確認したため、この白濁物質の IR 分析により、白濁物質がラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体であることを明らかにし、この複合体の ¹H-NMR 分析により、ヒアルロニダーゼのリジン残基が、ラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成に関与していることを明らかにしている。次にラムナン硫酸-ヒアルロニダーゼ複合体の生成が、試験溶液のヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす影響を調べるために、その複合体を除去したろ液にヒアルロン酸を加え、そのヒアルロン酸分解率を求め、ラムナン硫酸の硫酸基含有率と複合体生成率の関係及び硫酸基含有率とヒアルロン酸分解率の関係を検討している。その結果、ラムナン硫酸はその硫酸基含有率に応じて、ヒアルロニダーゼと複合体を生成し、複合体の生成率が増加するほど、ろ液のヒアルロン酸分解率が低下している事を明らかにしている。即ち、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは複合体を生成することで、ヒアルロニダーゼは不活性化される事を明らかにしている。

これらの結果から、ヒアルロニダーゼの活性部位を構成するアミノ酸残基の一つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位であるリジン残基の正電荷がイオン相互作用を通して複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化し、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害が発現した事を明らかにしている。

以上、本論文は、緑藻類である養殖ヒトエグサに含まれている硫酸化多糖であるラムナン硫酸の有効な抽出方法を見出し、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性について、ラムナン硫酸の硫酸基とその分子量が阻害活性に与える影響と、更にラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの間でどのような分子間相互作用が生じ、ヒアルロニダーゼ阻害活性を発現させるかについて明らかにしており、その学問的な意義は大きい。よって本論文は博士（工学）の学位論文に値するものと認める。

（最終試験結果の要旨）

本論文に関し審査委員から、産業的応用はどのように考えるのか、リジン残基とヒアルロニダーゼの相互作用の ¹H-NMR 分析について質問があったが、著者の明確な説明が行われた。また公聴会も多数の出席者があり、活発な質問がなされ、著者の適切な回答がなされた。本論文に関し、査読付き学術論文 2 報、学内紀要 1 報を掲載している事から、著者は最終試験に合格したものと認める。