

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Nina Artanti
審査委員	主査 大谷 慶人 副査 片山 健至 副査 伊藤 和貴 副査 市浦 英明

論文名

Studies on α -Glucosidase Inhibitors from *Colletotrichum* sp. TSC13, Endophytic Fungus isolated from *Taxus sumatrana* (Miq.) de Laub.

(スマトライチイ(*Taxus sumatrana* (Miq.) de Laub.) から単離された *Colletotrichum* sp. TSC13 菌の α -グルコシダーゼ阻害物質に関する研究)

審査結果の要旨

糖尿病の患者数は多く、この病気の治療のため、植物や微生物などの生理活性成分から糖尿病治療薬を開発する研究も行われている。本研究では、インドネシアに生育するスマトライチイから糖尿病（2型）に関係する α -グルコシダーゼの働きを阻害する物質（阻害物質）を生産する内生菌を単離し、その阻害物質を明らかにするとともに、この菌の培地組成および培養条件を検討することにより、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量を高めることを試みた。

まず始めに、スマトライチイから14種の内生菌を単離した。そして、それらの菌の培養により、高い α -グルコシダーゼ阻害活性を示す1種の内生菌を見出した。その菌の形態学および遺伝子的手法により *Collectotrichum* 属菌であることを明らかにし、*Collectotrichum* sp. TSC13 と名付けた。さらに、この菌が産出する α -グルコシダーゼ阻害物質を明らかにするため、この菌を培養後、培養液と菌体に分け、各々を酢酸エチルおよびメタノールで抽出して各々の抽出物を得た。菌体メタノール抽出物が高い α -グルコシダーゼ阻害活性を示したので、この抽出物をさらに溶媒（*n*-ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル）分画し、各可溶部を得た。活性試験の結果、*n*-ヘキサン可溶部が高い α -グルコシダーゼ阻害活性を示したので、その可溶部をシリカゲルカラムにより8フラクション（F1-F8）に分けた。F3が高い α -グルコシダーゼ阻害活性（71.4%、対菌体メタノール抽出物）を示した。F3は脂肪酸の混合物であることを見出したので、メチルエステル化後 GC-MS で分析した。その結果、F3は5種の脂肪酸（2種の飽和脂肪酸：パルミチン酸、ステアリン酸、3種の不飽和脂肪酸：オレイン酸、リノール酸、リノレン酸）の混合物であった。それらのメチルエステルの標品との保持時間の一致並びにマススペクトルとの一致により、それらの脂肪酸と同定した。また、それぞれの脂肪酸含量も測定した。しかし、菌体のメタノール抽出時に脂肪酸の一部がメチルエステル化されることが判明したので、抽出溶媒をメタノールから酢酸エチルに変更し、得られた菌体酢酸エチル抽出物から α -グルコシダーゼ阻害活性を示す物質を再度調べた。メタノール抽出物の場合と同様にして、高い α -グルコシダーゼ阻害活性（90.3%、対菌体酢酸エチル抽出物）を示す遊離の脂肪酸フラクションを単離した。このフラクションのメチルエステル化後 GC-MS で分析した結果、メタノール抽出物の場合と同様に5種

の脂肪酸の混合物であることを見出した。そして、それらを同定するとともに、それらの脂肪酸含量の測定、それぞれの脂肪酸の α -グルコシダーゼ阻害活性を調べた。その結果、3種の不飽和脂肪酸は高い α -グルコシダーゼ阻害活性 [オレイン酸 (IC_{50} : 2.2 μ g/mL)、リノール酸 (IC_{50} : 2.9 μ g/mL)、リノレン酸 (IC_{50} : 4.4 μ g/mL)] を示した。しかし、2種の飽和脂肪酸の α -グルコシダーゼ阻害活性は低く、不飽和脂肪酸のそれらの約 1/40~1/50 であった。これらの結果から、*Collectotrichum* sp. TSC13 が生産する α -グルコシダーゼ阻害物質は3種の不飽和脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、リノレン酸) であることを明らかにした。なお、3種の不飽和脂肪酸メチルエステルも α -グルコシダーゼ阻害活性を示すことも見出した (不飽和脂肪酸のそれらの約 5/7~6/7)。

次に、*Collectotrichum* sp.TSC13 の培養による α -グルコシダーゼ阻害物質の生産性を高めるため、培地組成 [炭素源 (単糖、多糖)、窒素源 (イースト抽出物、ビーフ抽出物、ソイトン)、金属イオン等] が阻害物質の生産性向上におよぼす影響について検討した。 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産におよぼす培地中の糖の影響については、コントロールとしてポテトデキストロースブロス (PDB) 培地 (α -グルコシダーゼ阻害物質生産量: 20.7 μ g/mg 菌体乾重) を用い、デキストロースの代わりに数種の糖を加えて検討した。その結果、キシロースが菌の育成には最も効果的であったが、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産はフルクトースが最良 (64.3 μ g/mg 菌体乾重) で、その生産量は 3.1 倍増加した。可溶性デンプンは菌の育成には適していたが、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産はごく僅かであった。窒素源の影響については、イースト抽出物が最も多くの α -グルコシダーゼ阻害物質 (32.43 μ g/mg 菌体乾重) を生産することを見出した。しかし、ビーフ抽出物やソイトンによる α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量はイースト抽出物のそれよりも低かった。金属イオンは殆ど α -グルコシダーゼ阻害物質の生産には影響をおよぼさなかった。

さらに、培養条件 (培養温度、培地量、静置培養、振とう培養、pH) が菌の成長、グルコース消費量、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量におよぼす影響について検討した。その結果、培地の量が少ない場合 (50mL 培地/500mL 三角フラスコ) には、20 $^{\circ}$ Cよりも 25 $^{\circ}$ Cの方が菌の成長は速くグルコース消費量は高かった。しかし、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量については、培地の量が多い場合 (150mL 培地/500mL 三角フラスコ) には、20 $^{\circ}$ Cの方が 25 $^{\circ}$ Cよりも多くの α -グルコシダーゼ阻害物質 (56.9 μ g/mg 菌体乾重) が生産されることを見出した。菌の成長は振とう培養の方が静置培養よりも速かった。 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量は、培養 7 日目で振とう培養および静置培養いずれの場合も最高になったが、培養期間が長くなるに従って両培養ともに α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量は減少した。培養液の pH が 7.0 の場合、pH が 4.5 の場合に比べ、菌の成長は速くグルコース消費量は高かった。しかし、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量は培養液の pH が 4.5 の場合の方が多かった (pH7.0 に比べ 1.5 倍生産)。

以上から、インドネシアに生育するスマトライチイから単離した内生菌、*Collectotrichum* sp.TSC13 が生産する α -グルコシダーゼ阻害物質を明らかにするとともに、この内生菌の培養時の培地組成および培養条件を検討することにより、 α -グルコシダーゼ阻害物質の生産量を高め得ることを見出した。

本論文の公開審査会は 2015 年 2 月 7 日に愛媛大学で開催され、論文審査と質疑応答が行われた。それに引き続いて、学位論文審査委員会を開催して審査し、全員一致して本論文が博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判断した。