

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Niken Pujirahayu
審査委員	主査 片山 健至 副査 鈴木 利貞 副査 大谷 慶人 副査 伊藤 和貴 副査 藤田 政之

論文名

Chemical Constituents, Botanical Origin and Biological Activity of Propolis of *Tetragonula sapiens*, a Stingless Bee, in Southeast Sulawesi, Indonesia
(インドネシア・南東スラウェシ州におけるハリナシミツバチ, *Tetragonula sapiens* のプロポリスの化学成分, 基原植物および生物活性)

審査結果の要旨

本研究では、インドネシア・南東スラウェシ州に生息するハリナシミツバチである *Tetragonula sapiens* Cockerell のプロポリスの化学成分、基原植物および生物活性を探究した。プロポリスはミツバチの生産物の一つであり、特に巣からの製品であり、主に植物組織またはその滲出液由来の樹脂とミツロウを含む。種々の生物活性・健康機能性が知られ、健康食品・飲料、薬品、化粧品などに利用され、その市場は広がっている。プロポリスの組成は、50%以上が植物樹脂からなるので、その生物活性・健康機能性はプロポリスに含まれる二次代謝産物の質と量に依存する。南東スラウェシ州は、マルク諸島とヌサトゥンガラと共にワラセア地域に位置するので、多くの固有の動植物種が生息する地域の1つである。ハリナシミツバチのプロポリス生産は、ハリのあるセイヨウミツバチよりも質量ともに優れている。ハリナシミツバチはハチミツや花粉を貯蔵する巣房もプロポリスで造るので、そのハチミツにもプロポリスが含まれている。

インドネシア産のプロポリスについては、外来種で世界的に利用されているセイヨウミツバチのプロポリスの化学成分、基原植物、生物活性は研究されているが、ハリナシミツバチのプロポリスのそれらは明らかでないので、ここで検討した。

本研究の内容は三段階から成る。第一段階では、南東スラウェシ州の二つの地域[南コナウェ地区(P1)とケンダリ地区(P2)]から得られた *T. sapiens* プロポリスの化学成分を明らかにすることを目的とした。プロポリス試料を99%エタノールで抽出して、得られたエタノール抽出物(EEP)を、ジエチルエーテルと水で分配した。この水層をさらに酢酸エチルで抽出した。得られたエーテル可溶部、酢酸エチル可溶部、水可溶部の3画分の中で、エーテル可溶性画分の収率(73~86%)が最も高かったので、このエーテル画分を、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分離精製し、単離された化合物の構造は、核磁気共鳴分光法およびガスクロマトグラフィー-質量分析法によって決定した。EEPから5つの化合物が得られ、それらはシクロ

アルタン型トリテルペンである mangiferolic acid (1), cycloartenol (2), ambonic acid (3), mangiferonic acid (4)および ambolic acid (5)と決定された。

プロポリスはミツバチが訪れて樹脂を採取する植物によって、成分や性質が異なる。第二段階では、*T. sapiens* が頻繁に訪れる数種の植物の樹脂の化学成分を抽出・分析することによって、プロポリスの基原植物を解明することとした。*Mandifera indica* 樹脂試料を粉碎して微粉末にして、次いでそれを P1 の EEP と同様に 99%エタノールで 3 回抽出し、*M. indica* 樹脂のエタノール抽出物 (EEM) を得た。次に EEM を HPLC 分析し、このクロマトグラムを P1 と P2 の EEP のそれらと比較した。EEP と EEM の HPLC クロマトグラムの特徴的なピークのパターンは同様であり、すなわちプロポリスの主成分は *M. indica* 樹脂中にも見出された。これらの結果は、南東スラウェシ州のプロポリスは上記 5 種のシクロアルタン型トリテルペン類に富み、そしてプロポリスの基原植物が *M. indica* (マンゴー)であることを示唆した。

第三段階においては、プロポリスから単離同定された 5 種の化合物について、生物活性を検討した。インドネシアにおいても生活習慣病である II 型糖尿病の患者は増加している。この糖尿病には活性酸素がかかわっていることが指摘されている。そこで、 α -グルコシダーゼ阻害活性と抗酸化活性を検討した。 α -グルコシダーゼ阻害活性は *Saccharomyces cerevisiae* およびラット小腸由来の α -グルコシダーゼを用いて測定した。前者を用いた測定の結果、 IC_{50} は 2.46 ~ 10.72 μ M の範囲であり、ポジティブコントロールの(-)-エピカテキン(1991.1 μ M)と比較して阻害活性は高かった。5 種の化合物の中で、mangiferonic acid (4) は IC_{50} 2.46 μ M で α -グルコシダーゼ阻害活性は最も強かった。この抗酸化活性 [2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性]は IC_{50} 値 37.74 \pm 6.55 μ M で中程度であった。 α -グルコシダーゼ阻害の機構は Lineweaver-Burk プロットで解析し、mangiferolic acid (1)と cycloartenol (2)は不競合阻害で、ambonic acid (3), mangiferonic acid (4)および ambolic acid (5)は混合阻害であった。一方、ラット小腸由来の α -グルコシダーゼを用いた測定の場合、活性は検出されなかった。

単離同定した 5 種のトリテルペンの α -グルコシダーゼ阻害活性の強さの順序は、化合物 4 > 3 > 5 > 1 > 2 であった。これらの構造活性相関については、C-3 のケトン基は -OH 基よりも、そして C-24 と C-25 の二重結合は C-24 と C-31 のそれよりも、さらに C-26 のカルボキシル基はメチル基よりも阻害活性を増大させると考察した。

本研究によって、インドネシアにおけるハリナシミツバチ *Tetragonula sapiens* のプロポリスの化学成分、基原植物および生物活性が初めて明らかになった。プロポリスから単離されたシクロアルタン型トリテルペンの α -グルコシダーゼ阻害活性の最初の報告である。また、 α -グルコシダーゼ阻害剤を本プロポリスのシクロアルタン型トリテルペンから開発する際に必要な構造要件を提供し、シクロアルタン型トリテルペンから α -グルコシダーゼ阻害剤を開発する可能性が示唆された。

本学位論文の公開審査会は、2019 年 8 月 3 日に高知大学農林海洋科学部において開催され、申請者の論文発表と、これに対する質疑応答が行われた。引き続き開催された学位論文審査委員会において、本論文の内容について慎重に審査を行った結果、審査委員全員が一致して本論文は博士(学術)の学位を授与するに値するものと判定した。