

博士學位論文

内容の要旨

および

審査の結果の要旨

第17号

平成30（2018）年3月授与分

県立広島大学

はしがき

本編は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成29年3月に県立広島大学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨および審査結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した「甲」は、学位規則第4条第1項によるもの（いわゆる課程博士）を、「乙」は学位規則第4条第2項によるもの（いわゆる論文博士）を示している。

目 次

県立広島大学

博士（生命システム科学）

- 1 博甲 第40号 岩岡 裕二
アスコルビン酸標的タンパク質の探索を目指した新規アフィニティーゲルの創製に
関する研究 1
- 2 博甲 第41号 岡本 麻子
哺乳動物における卵胞発育および排卵制御機構の内分泌学的解析 4
- 3 博甲 第42号 片山 裕美
金属カルシウム触媒法による脱ハロゲン化反応とその触媒活性の評価 7
- 4 博甲 第43号 佐藤 勇太
関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響に関する研究 10
- 5 博甲 第44号 藤原 守
細胞内情報伝達変換器分子のゲノムストレス応答性制御を担う RhoGDI β の研究
..... 13
- 6 博甲 第45号 三浦 香織
親油性安定型アスコルビン酸誘導体の抗アレルギー作用および抗がん作用に
関する研究 16

氏名・本籍	岩岡 裕二 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第40号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	アスコルビン酸標的タンパク質の探索を目指した 新規アフィニティーゲルの創製に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 田井 章博 副査 教授 野下 俊朗 教授 齋藤 靖和 准教授 青柳 充

学位論文の要旨

ビタミンCとして知られるアスコルビン酸(AA)は抗壊血病作用、抗酸化作用など多様な生理作用を有する。また、AAを合成できないヒトを含む一部の霊長類は生存する上でAAの日常的な摂取が必要不可欠とされている。一方で、多くのAAの生理作用は実験動物を用いた*in vivo*評価系で明らかになっているにも関わらず、分子レベルでの生理作用メカニズムに関する知見はこれまでにあまりない。これはAAが化学的に非常に不安定であることから、メカニズム解明に有用とされる細胞などの*in vitro*評価系において既知のAAの生理作用を再現することが困難であるためと考えられる。また、AAは生体内において強力な還元剤であるため、AAの生理作用メカニズムにはその還元作用が大きく寄与しているとされてきた。しかし、還元作用が関与すると考えられるAAの生理作用の中にはAAと同等の還元力を有し、AAの立体異性体であるエリスルビン酸や化学構造がAAと異なる還元剤ではAAより低作用もしくはほとんど作用を示さないものもある。更に生体内においてAAによって特異的に還元される酵素やAA特異的な輸送体などのタンパク質の存在が報告されており、AAの生理作用メカニズムは単純な還元作用のみでは説明が困難である。従って、AAを安定化した上で*in vitro*系において生体内でAAを標的とするタンパク質の探索を行うことは分子レベルでのAAの生理作用の解明の一助となりうる事が期待される。

本論文はAAの生理作用メカニズムの解明の手がかりを得るため、化学的に不安定なAAをリガンドとして安定的に支持担体に固定化したアフィニティーゲルを新たに創製し、このゲルを用いて動物組織中よりAAを標的とするタンパク質の探索を行った研究結果をまとめたものである。

第1章の緒言ではAAの有する生理作用とその生理作用メカニズムに関する現状及び本研究の目的を述べた。第2章ではアフィニティーゲルの作製に際して不安定なAAをその化学構造の特徴を残し、かつ安定化して支持担体に固定化するためのAA誘導体の合成、またそれら誘導体を用いたアフィニティーゲルの作製に関して述べた。本研究で作製するアフィニティーゲルにはAAを安定化しつつ支持担体へ固定化し、更にAAの生体内における特徴的な化学構造である解離した3位水酸基、5位水酸基の立体及びエンジオールラクトン構造をタンパク質に認識させるような設計が求められる。そこで、まずタンパク質側からAAの解離した3位水酸基及び5位水酸基の立体を認識させるべく2位水酸基からの固定化を考えた。本研究で使用する支持担体はリガンドの1級アミンに対して選択的に反応し、リガンドを固定化する特徴を有する。そこで、AAの2位を選択的にアミノ化し、支持担体に固定化した(2-AAゲル)。次に、タンパク質側からAAの解離した3位水酸基及びエンジオールラクトン構造を認識させるため、AAの6位水酸基からの固定化を考え、AAの6位を選択的にアミノ化した。2位からの固定化の際、固定化によりリガンドは安定化するが、6位からの固定化の際はAAの安定性に関わる2位水酸基がフリーとなってしまう。そこで、2位水酸基をより立体障害性の低い官能基であるメチル基で修飾し、安定化した上で6位から支持担体へ固定化した(6-AAゲル)。また、作製した2-AAゲル及び6-AAゲルのリガンドの固定化及び固定化リガンドの安定性の確認も行った。第3章では作製した2種のAAゲルを用いて、生体内においてAAが高濃度存在する組織として知られる脳のタンパク質抽出液からAAゲルに特異的に吸着するタンパク質を同定した。雄のICRマウスの脳由来タンパク質抽出液を2種のAAゲルに供し、各ゲルへの吸着タンパク質をnanoLC-MS/MSにより分析した。その結果、2種のAAゲルへ特異的に吸着するタンパク質としてcytochrome c (cyt c)を同定した。第4章ではcyt cに対するAAの特異性を検討した。cyt cは活性中心の鉄イオンの還元状態により、酸化型cyt c (oxd-cyt c)と還元型cyt c (red-cyt c)の2種が存在する。AAゲルに対するこれら2種のcyt cの親和性を検討したところ、oxd-cyt cがより高い親和性を示した。そこでAAと他の還元剤を用いてoxd-cyt cに対する還元速度及び遊離の鉄イオンに対する還元力をそれぞれ比較した。その結果、oxd-cyt cに対する還元速度はAAが最も大きかったが、一方で遊離の鉄イオンに対する還元力はある還元剤を除いて、AAと他の還元剤の間で差はほとんど見られなかった。これらの結果はAAが他の還元剤よりも特異的にoxd-cyt cの構造を認識し、活性中心の鉄イオンを速やかに還元していることを示している。第5章では本研究の総括を行い、今後の展望を述べた。

以上から本研究において作製した2種のAAゲルを用いることで、AAに親和性を示すタンパク質としてcyt cを同定し、特にoxd-cyt cがAAに対して特異的な親和性を示すことを見出した。cyt cはミトコンドリアの電子伝達系においてエネルギー産生に関与するタンパク質である。また最近、ミトコンドリア膜の表面上にAA特異的な輸送体の存在が報告されていることから、本研究の結果はミトコンドリア内に輸送されたAAが電子伝達系においてcyt cの還元に関与している可能性を示す。将来、作製した2種のAAゲルは更なるAAの生理作用メカニズムの解明のための強力なツールになることが期待される。

審査の結果の要旨

本研究は、アスコルビン酸 (AA) の未知の作用点や生理作用メカニズムの解明への手がかりを得るため、AA 標的タンパク質を探索するツールとして化学的に不安定な AA を安定的にリガンドとして支持担体に固定化した新規アフィニティーゲルを創製することを目的とした。

本論文は5章から構成される。第1章は緒言で、AAの有する生理作用とその生理作用メカニズムに関する現状及び研究の目的を述べた。第2章では、不安定なAAをその化学構造の特徴を残し、かつ安定化して支持担体に固定化するためのAA誘導体を合成し、それら誘導体を用いてAAの固定化位置が異なる2種類のアフィニティーゲルの作製に関して述べた。さらに、AAと特異的に反応する既知のタンパク質を用いてAA固定化ゲルの親和性と再利用性に関する性能について検証した。第3章では、作製した2種類のAA固定化ゲルを用いて、生体内においてAAが高濃度存在する組織として知られる脳のタンパク質抽出液から特異的に吸着するタンパク質として cytochrome c (cyt c) を見出した。第4章では、酸化型 cyt c と還元型 cyt c の2種 cyt c に対するAAの特異性を検討した。2種のAA固定化ゲルに対して酸化型 cyt c がより高い親和性を示した。また、酸化型 cyt c に対するAAとその他還元剤の還元効率を比較した結果、AAは特異的認識によって酸化型 cyt c を効率的に還元することが示唆された。ミトコンドリアの電子伝達系において cyt c は、エネルギー産生に関与するタンパク質である。最近、ミトコンドリア膜の表面上にAA特異的な輸送体の存在が報告されていることから、以上の結果はミトコンドリア内に輸送されたAAが電子伝達系において cyt c の還元に関与している可能性を示す。第5章は総括である。

本研究は、作製した2種のAA固定化ゲルを用いることで、脳のタンパク質抽出液からAAに親和性を示すタンパク質として cyt c を同定し、AAが特異的認識によって酸化型 cyt c を効率的に還元することを明らかにしている。これらの成果は、作製した2種のAA固定化ゲルがAAの未知の作用点や生理作用メカニズムを解明するための強力なツールとして期待できる点で高く評価される。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。

氏名・本籍	岡本 麻子 (岡山県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第41号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	哺乳動物における卵胞発育および排卵制御機構の内分泌学的解析
学位論文審査委員	主査 准教授 山下 泰尚 副査 教授 堀内 俊孝 教授 小西 博昭 准教授 阿部 靖之

学位論文の要旨

哺乳動物では FSH 刺激により同時に複数個の卵胞発育が誘導されるが、一部の優勢卵胞のみが選抜・発育し、発育した優勢卵胞からその後の LH 刺激により成熟卵が排卵される。これまで卵胞発育は FSH 依存的に顆粒膜細胞から分泌されるエストロゲン (E2) がプロゲステロン (P4) へと移行すること、排卵は LH 依存的に顆粒膜細胞で発現する増殖因子 (EGF-like factors ; AREG, EREG, BTC および NRG1) が切断酵素 (ADAM17) により切り出され、卵丘細胞の受容体 (ErbBs) -ERK1/2 の活性化を介して誘導されることが示された。しかし、卵胞発育期の E2 から P4 への分泌変換時期とそれが優勢卵胞選抜に果たす役割や排卵期での EGF-like factors や ErbBs の発現制御機構など未だ不明な点が多い。本研究では FSH 依存的に生じる卵胞選抜機構と LH 依存的に生じる排卵機構の詳細を内分泌学的に解析した。

第一章では、緒論として卵胞発育の開始から、胞状卵胞の発育を経て、成熟卵が排卵へと至るメカニズムの概要を説明し、研究の目的を記載した。

第二章では、卵胞発育期において FSH 依存的に卵胞内で生じる、E2 優勢環境から P4 優勢環境への移行がいつ、どのような機構により制御されるのか、またこのような E2 から P4 への卵胞内ステロイドホルモン環境の移行が卵成熟に与える影響を検討した。その結果、P4 産生遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*) の高発現により卵胞発育期に恒常的に産生される P4 は卵胞発育初期に P4 代謝酵素である *Akr1c1* により 20 α -OHP へ代謝または *Cyp19a1* により E2 合成の基質として使用されることで低濃度に保たれ、卵胞発育後期に P4 代謝が抑制されると P4 濃度が上昇する、ブタ卵胞発育期のステロイドホルモン移行メカニズムを解明した。さらに、優勢卵胞環境は退行卵胞由来の卵丘細胞の機能性向上を介して卵成熟を促進することを初めて示した。

第三章では、排卵期のマウス卵巣のトランスクリプトームデータより見出した Neurotensin (NTS)

に着目し、NTS の発現および役割と EGF-like factors と ErbBs の発現制御機構を検討した。その結果、NTS とその受容体である NTSR1 は排卵刺激後の顆粒膜細胞と卵丘細胞において発現・局在し、排卵期における卵丘細胞の継続的な ERK1/2 リン酸化を伴い、卵丘細胞の膨潤、卵成熟、排卵、産仔形成、顆粒膜細胞の黄体化に機能することを見出した。また、NTS による卵丘細胞の ERK1/2 のリン酸化維持機構を検討した結果、NTS は顆粒膜細胞の EREG、NRG1 と卵丘細胞の ErbB2、ErbB3 の発現を亢進することで、排卵直前期までリン酸化 ERK1/2 を持続することを認めた。

第四章では、本研究の総合考察、および第五章では本研究の総括を述べた。

本研究により、卵胞発育後期における E2 優勢から P4 優勢環境への移行メカニズムが優勢卵胞選抜と卵成熟に重要であることを明らかにした。さらに排卵期において、NTS は顆粒膜細胞の EREG と NRG1 および卵丘細胞の ErbB2 と ErbB3 の発現を促進し、ErbBs-ERK1/2 の持続的リン酸化を誘導する結果、卵成熟、排卵、黄体化を促進することを初めて明らかにした。また、卵成熟の段階に応じたステロイドホルモンや NTS の添加は卵成熟を向上させたことから、本研究の成果は畜産資源の効率的利用に加え、ヒトの高度生殖補助医療分野においての利用が期待できると考えられた。

審査の結果の要旨

卵巣に含まれる卵が受精後の発生能を獲得するには卵巣内で生じる卵を含む卵胞の発育（卵胞発育）と排卵時の詳細な内分泌メカニズムを知ることが重要であると考えられている。卵胞発育期には卵胞発育を誘導し下垂体から放出される FSH が卵胞を刺激しエストロゲン（E2）優勢環境からプロゲステロン（P4）優勢環境に移行することが重要であることが知られている。また、排卵時には排卵を誘導し下垂体から放出される LH に続いて卵胞内で分泌される EGF-like factor が重要であることが明らかになっている。しかし、これら卵胞発育を制御する E2 と P4 の移行メカニズムと EGF-like factor の発現制御メカニズムは不明な点が多い。本研究では、卵胞発育期および排卵期の内分泌環境を解析した。

本論文は第一章から第五章で構成され、第一章においては、これまで明らかになっている卵胞発育と排卵のメカニズムと研究目的について述べた。第二章においては、卵胞発育期におけるステロイドホルモン動態とその役割について検討を行った。その結果、卵胞発育期中期から後期にかけて P4 合成酵素の発現は高く保たれているが、卵胞発育中期に E2 合成酵素と共に P4 代謝酵素の遺伝子発現が増加し、E2>P4 環境となること、後期には P4 代謝酵素と E2 合成酵素の発現が低下し E2<P4 環境となることを明らかにした。さらにこのような中期の E2>P4 環境と後期の E2<P4 環境を体外で再現すると、卵の発生能獲得を補助する卵丘細胞の機能が向上することを示した。このことから、卵胞発育中期から後期にかけて変化する正常な E2 と P4 のバランス誘導は、卵胞発育と卵の成熟能向上に重要であることを明らかとなった。

第三章においては、排卵期における EGF-like factor の発現制御メカニズムについて検討を行った。その結果、排卵刺激前後のマウス卵巣のトランスクリプトームデータから排卵時の卵成熟候補因子として Neurotensin (NTS) を候補化し、排卵時の卵巣に NTS とその受容体 (NTSR1) が著しく高く発現することを見出した。さらにその役割には、分泌される EGF-like factor の一種 (EREG, NRG1) とそれらの受容体 (ErbB2, ErbB3) の排卵期後期の発現を上方制御することで、NTS はその後続く胚発生と胚の着床と妊娠維持に働く黄体形成を制御するマスターキーであることを明らかにした。また第四章において、第二章と第三章の総合考察を述べ、第五章では、総括を述べた。

これらの結果は、その基礎的な研究内容に加え、新規体外成熟培養法を提案することが可能となることから、獣医畜産学・医学に大きく貢献しうる研究であることから高く評価できるものである。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。

氏名・本籍	片山 裕美 (静岡県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第42号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	金属カルシウム触媒法による脱ハロゲン化反応とその触媒活性の 評価
学位論文審査委員	主査 教授 三苦 好治 副査 教授 原田 浩幸 教授 呉 漢生 准教授 青柳 充

学位論文の要旨

残留性有機汚染物質 (POPs) は、難分解性、高蓄積性、及び長距離移動性を有し、地球規模での環境汚染が懸念される物質であるため、ストックホルム条約において早急に無害化すべき化学物質に指定された。これまでは、高い無害化効率を達成することに主眼が置かれ、そのため過剰なエネルギー投入下で無害化処理が検討されていた。しかしながら、近年、グリーンケミストリー的な考えから、処理効率を維持しつつ、可能な限り投入エネルギー量を最小化することが望まれている。そのコンセプトを満足する分解方法の一つとして、触媒を用いた接触水素化法に注目が集まっているものの、系外から過剰の水素ガスの供給が必要であることや水素ガスを触媒に解離吸着させるためには比較的高温・高圧条件を必要とするなどの解決されるべき課題がある。このようななか、申請者らは、金属カルシウム (Ca)、貴金属触媒、及びアルコールを組み合わせた「金属 Ca 触媒法」を開発した。通常の接触水素化法では固相 (焼却飛灰や土壌など) 中の POPs 分解は困難であったが、本手法では、常温微加圧下、POPs (例えば、塩素化ダイオキシン類やポリ塩素化ビフェニル類など) を 99% 以上の高効率で分解することに成功した。さらに、塩素化アニソール類の脱塩素化反応において、既存の接触水素化法よりも 1/50 から 1/5 程度の極低圧力 (0.02 MPa) の水素存在下で脱塩素化反応が 96% 以上で進行することが明らかとなった。以上のように、通常の接触水素化法に比較して極めて温和な条件下で脱塩素化が可能である金属 Ca 触媒法には、特有の反応機構があると考え、以下に挙げた各章の研究内容に取り組んだところ、Ca 上から触媒上への原子状水素の特異な移動過程が、温和な条件下で反応を進行させる理由であることが示唆された。

第一章は、緒言とした。本研究の背景となる POPs の基本的性質及び社会的背景をまとめた。さらに、既存の脱塩素化技術の原理とその課題を総論的にまとめ、当該技術との比較を行った。

また、これまでに明らかとなった当該技術の分解メカニズムの一部についてまとめた。

第二章は、触媒の物性評価について述べた。粒度分布測定、走査型電子顕微鏡 (SEM-EDS)、X 線回折 (XRD)、及び X 線光電子分光 (XPS) を用いて、4 種の貴金属触媒 (Pd/C, Rh/C, Pt/C, Ru/C) の粒度と表面状態に関する初期物性をまとめた。XRD および XPS については、カルシウム共存貴金属触媒についても分析を行い、カルシウム添加前後の貴金属の化学状態について比較を行った。

第三章は、金属カルシウム触媒法による脱ハロゲン化反応について述べた。基質は、ヘキサブromベンゼンまたはヘキサクロロベンゼンを用いた。まず、ヘキサブromベンゼンの脱臭素化反応に関して、生成されたベンゼン誘導体を出発原料として、それぞれの脱臭素化反応経路や変化率について考察した。次いで、ヘキサブromベンゼン (HBB) の脱臭素化経路を求め、ヘキサクロロベンゼンの脱塩素化反応との反応性の比較結果について述べた。HBB の炭素-臭素結合の切断は、臭素多置換体から臭素低置換体に至るまで、電子的要因が支配しているのに対し、HCB の炭素-塩素結合の切断は、塩素多置換体で強く電子的要因に支配され、塩素低置換体へと脱塩素化反応が進むにつれて、立体的要因に支配される傾向がみられた。

第四章は、ゼータ電位測定による触媒上原子状水素の評価と脱塩素化反応との関連について述べた。原子状水素が触媒上貴金属の空軌道に配位すると、原子状水素がもつ電子が軌道上に広がるため、原子状水素が吸着した触媒表面は正電位を帯びると推測した。まず、その仮説に基づき、有機溶媒中でのゼータ電位測定法を確立した。次いで、各種反応剤の単独あるいはすべての組み合わせでゼータ電位を測定し、その Ca 濃度依存性について検討した。その結果、Pd/C の場合、Ca 非共存下では 0 mV であったが、Ca 濃度が増加するに従い、明らかに正電位側へのシフト (10.96 mV) が確認された。さらに、Rh/C、Pt/C、Ru/C についても同様の検討を行ったところ、それぞれ 21.00 mV、14.72 mV、0.64 mV にシフトした。このように開放系かつ極めて少量の水素分子の利用の下で貴金属種によって電位シフトの傾向が異なることから、原子状水素と貴金属種の親和性の差異がゼータ電位に影響を与えたことが示唆された。最後に、クロロベンゼンの分解効率と触媒のゼータ電位及び触媒表面評価の関係について述べた。脱塩素化反応の効率とゼータ電位の比較を行い、さらに表面物性の点からも比較した。Pd/C の場合、電位が正電位側へシフトすると脱塩素化反応効率が向上し、0.5 mmol 以上の Ca 共存下で約 40% となった。加えて、反応時間が 2 時間以上になると、カップリング体の生成が多くなる傾向がみられた。これは、水素化によって原子状水素が消費されたことにより、触媒上の原子状水素濃度が低下したため、カップリング体反応が優先的に進行したと考えられる。

第五章は、総括である。本研究で得られた結果について考察を行うとともに、今後の展望について述べた。

本研究は、金属 Ca、貴金属触媒、及びアルコールを組み合わせで電子移動還元法と接触水素化法の長所を兼ね備えた金属 Ca 触媒法の反応機構の解明について検討を行った。有機溶液中では初となる、ゼータ電位測定を用いた触媒上原子状水素の評価が可能であることを明らかにし、脱塩素化能と原子状水素吸着量を関連付けることに成功した。この成果は、水素社会に向けた新規水素活用技術への展開や有機化学合成分野における生成物の新規選択的合成方法の開発への応用が期待できる。

審査の結果の要旨

本研究の目的は、難分解性、高蓄積性、及び長距離移動性を有し、地球規模での環境汚染が懸念される残留性有機汚染物質（POPs）の無害化処理について、溶液中の原子状水素量のリアルタイムな評価法を確立し、金属カルシウム（Ca）と貴金属触媒を組み合わせた金属 Ca 触媒法による高効率な脱ハロゲン化特性の機構解明に役立てることにある。

本論文は 5 章からなる。第 1 章は、POPs による環境汚染の経緯、処理技術の原理、及びそれらの課題等をまとめた。第 2 章は、貴金属触媒（Pd/C, Rh/C, Pt/C, Ru/C）の物性値をまとめた。走査型電子顕微鏡（SEM-EDS）による担体上の貴金属分散状態の観察、さらに、Ca 共存あるいは非共存下での触媒の X 線回折（XRD）及び X 線光電子分光（XPS）分析から、共存下の貴金属表面が還元状態であることを明らかにした。第 3 章は、POPs のモデル化合物としてハロゲン化ベンゼン類を選定し、脱ハロゲン化効率を求めた。加えて、中間体の同定によって反応経路を特定し、ハロゲン多置換体では電子的要因に支配された脱ハロゲン化反応が進行し、低置換体への誘導が進むにつれて接触水素化反応が優先する事実を明らかにした。第 4 章では、有機溶媒中の分散粒子のゼータ（ ζ ）電位が固相表面の荷電状態をリアルタイムで反映することに注目し、原子状水素が貴金属触媒表面に吸着する前後の ζ 電位差を脱ハロゲン化能に関係づけ、Ca 濃度が増すにつれて各貴金属触媒の ζ 電位が正電位シフトすることを見出した（Pd/C : -0.5 mV から +11.0 mV, Rh/C : -5.9 mV から +21.0 mV 等）。このとき、担体である活性炭のみでは帯電しないことから、原子状水素が貴金属の空軌道に配位したことにより ζ 電位がプラス性を帯びたと考えた。さらに、クロロベンゼンの脱塩素化効率と ζ 電位変化との間に高い整合性も確認でき、金属 Ca 上で生じた原子状水素が触媒上に移動し、本反応に利用された機構が強く示唆された。第 5 章は総括である。

以上の通り本研究は、有機溶媒中での ζ 電位と貴金属触媒上の原子状水素の吸着量を関連づけ、さらに、その電位と脱ハロゲン化効率に強い関係性があることを世界で初めて明らかにした。これらの知見は、開発触媒の反応性の予想等に多大な貢献が期待できる。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値すると認められる。

氏名・本籍	佐藤 勇太 (東京都)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第43号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 小野 武也 副査 教授 沖 貞明 教授 堀内 俊孝 教授 齋藤 靖和

学位論文の要旨

臨床において、患者は不活動により廃用症候群を合併することがある。廃用症候群は、ほぼすべての臓器に生じ、筋骨格系では関節拘縮などが発生する。関節拘縮は、日常生活に支障をきたすため、重要な機能障害の一つとして扱われている。関節拘縮の原因は、関節運動が減少することであり、臨床では関節固定やベッド上での安静臥床などが挙げられる。関節拘縮の発生には、関節運動の減少だけでなく、非荷重の影響を受けている可能性がある。しかし、関節拘縮発生に非荷重が与える影響については不明な点が多い。効果的な関節拘縮の予防を考える上で、関節拘縮の病態を理解することは、重要である。そこで本研究では、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を明らかにし、効果的な予防方法を検討した。

第1章の緒言では、関節拘縮や非荷重についての概要と本研究の目的を述べる。動物実験において、関節拘縮は、1週間の関節固定によって生じ、進行していく。一度発生した関節拘縮の治療は、困難となる。このため、関節拘縮の予防は重要である。本研究の目的は、特に1週間の関節固定で生じる関節拘縮における各原因組織の変化に着目して、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を明らかにし、効果的な予防方法を検討することである。また、本研究では、先行研究を参考に関節拘縮の再現モデルである関節固定と非荷重の再現モデルである後肢懸垂を組み合わせたラットを対象として実験を実施した。

第2章では、関節拘縮発生やヒラメ筋の変化に非荷重が与える影響について関節固定を実施する群と関節固定と後肢懸垂を組み合わせた群を実際に比較することで検討した。その結果、非荷重は、足関節最大底屈位での関節固定によって生じる足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下、およびコラーゲン量の増加をさらに増悪した。このことから我々は、非荷重が関節拘縮の発生に悪影響を与えること、その原因がコラーゲンの増加に起因する骨格筋の伸張性低下に由来するものであることを明らか

にした。このヒラメ筋の伸張性低下の要因は、後肢懸垂による骨格筋の筋収縮減少であると推測される。

第3章では、非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性がどのように変化するかを検討した。その結果、非荷重は、関節固定により生じる足関節背屈角度の低下をさらに増悪した。一方、皮膚や靭帯の伸張性は、関節固定や後肢懸垂によって変化を生じなかった。以上のことから、我々は、1週間の非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮において、皮膚や靭帯の伸張性が変化しないことを明らかにした。

第4章では、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮発生やヒラメ筋変化に電気刺激が与える影響を検討した。その結果、我々は、電気刺激が非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮における足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下、ヒラメ筋のコラーゲン量の増加を抑制することを明らかにした。また、非荷重が関節拘縮発生を重篤化させる原因は、非荷重によって筋収縮が減少することでコラーゲンが増加し、ヒラメ筋の伸張性を低下させるためであることが示唆された。

第5章では、本研究における総括と今後の展望について述べる。臨床において、ギプス固定の目的は、関節固定や下肢骨への免荷などである。これまで関節拘縮に関する先行研究は、ギプス固定などの関節固定の影響について検討されており、免荷の影響について考慮されていなかった。整形外科術後の患者は、関節固定の他に免荷が治療の一環として実施されることがある。このような状況は、整形外科術後の患者のみならず、非荷重状態で関節運動が減少している寝たきり高齢者にも当てはまるものである。このため、関節拘縮に関する検討は、関節固定と非荷重の影響を合わせて考慮すべきである。そこで、我々は、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を調査した。本研究は、非荷重が関節固定によって生じる関節拘縮に悪影響を与えること、また非荷重に伴う筋収縮減少に起因した骨格筋の伸張性低下が関節拘縮を重篤化する原因であることを初めて証明した研究である。

本研究成果により、従来の関節拘縮に対する介入によって得られた予防や治療効果は、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に対しても有効であるか懸念される。我々は、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮に対する有効な予防方法として電気刺激が適していることを初めて証明し、関節拘縮の予防研究を一步先に推し進めることに成功した。電気刺激は、関節拘縮を重篤化させる因子である筋収縮の減少に直接介入できる方法であるため、非荷重を伴う関節固定によって生じた関節拘縮の予防方法として最適であると考えられる。

審査の結果の要旨

身体の活動が低下すると身体各臓器の機能低下がおこり廃用症候群を発生する。廃用症候群の代表的症状の一つが関節の動く範囲が減少し日常生活に支障をきたす関節拘縮である。関節拘縮の発生には、関節運動の不動だけでなく、下肢に体重をかけない非荷重の影響を受けている可能性があるが明らかにされていない。本研究の目的は、関節固定で生じる関節拘縮における各原因組織の変化に着目して、関節拘縮発生におよぼす非荷重の影響を明らかにし、効果的な予防方法を検討することである。

第1章は緒言である。第2章と第3章では、これまで実験を通して証明されていない、関節固定に非荷重を加える影響について検討した結果、非荷重は足関節背屈角度やヒラメ筋の伸張性低下およびコラーゲン量の増加を促進すること、また皮膚や靭帯の伸張性には影響をおよぼさないこと明らかにした。第4章では、関節固定に非荷重を加えると重篤化する関節拘縮の原因は、筋収縮を人工的に電気刺激により加えると足関節背屈角度低下やヒラメ筋の伸張性低下およびヒラメ筋コラーゲン量増加が抑制されることから、非荷重による筋収縮減少であることを新たに明らかにした。第5章は、総括である。一般的にギプス固定の目的には、関節固定と非荷重が含まれるが、先行研究は主として関節固定による関節拘縮について検討している。関節拘縮は寝たきり高齢者の多くに発生する。寝たきり状態の下肢は非荷重である。従って、関節拘縮の発生や治療を考える場合、関節固定に非荷重の要因を加えて検討することが有用である。本研究は、非荷重が関節固定によって生じる関節拘縮の進行を促進することをはじめて証明した。また非荷重を伴う関節固定によって生じる関節拘縮に電気刺激が有効であることから、非荷重による筋収縮減少が関節拘縮重篤化の原因であることを見出し、関節拘縮の発生要因や治療方法に新たな視点を提唱した。

これらの新知見は、関節拘縮により日常生活の低下を招いている障害者の生活の質の向上に貢献するのみならず、保健福祉学分野の応用研究に寄与するところが大きいと判断した。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。

氏名・本籍	藤原 守 (愛媛県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第44号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	細胞内情報伝達変換器分子のゲノムストレス応答性制御を担う RhoGDI β の研究
学位論文審査委員	主査 教授 達家 雅明 副査 教授 齋藤 靖和 教授 小西 博昭 准教授 菅 裕

学位論文の要旨

第1章では、緒言として背景と目的を述べる。

本研究では、放射線被曝によるゲノムストレスで起こる不都合な生体応答現象を回避させるような分子創薬を最終目的とし、それに関係した細胞内シグナル伝達経路の研究を行った。特に、細胞増殖や細胞運動、細胞骨格の制御に中心的な役割を担っている細胞内情報伝達の変換器分子 (分子スイッチ) である RhoGTPase ファミリーに注目し、その制御因子のひとつである RhoGDI β によるゲノムストレス応答時での制御様式を解明することを目指した。

RhoGDI β は、分子スイッチである RhoGTPase、特に Rac1 の制御因子として知られる。また、この分子は、ヒトのがん進展における転移関連分子として知られる。更に、その分子内に、放射線などで誘発されるアポトーシスで活性化する 3 型カスパーゼによって切断されるサイトを持つ。

第2章では、RhoGDI β のゲノムストレス応答性動態解析結果を述べる。

RhoGDI β はその分子内に活性化 3 型カスパーゼによる切断サイトが存在する。そこで、本研究では、RhoGDI β の活性化 3 型カスパーゼによる切断産物 (N 末欠失型 RhoGDI β 、 Δ N-RhoGDI β) が、ゲノムストレスに曝された後に、アポトーシスに陥った細胞で発現しているのかどうかについて、ヒト子宮がん由来 HeLa 細胞で確かめた。その結果、驚くべきことに、 Δ N-RhoGDI β は、放射線照射されて生き残っている細胞内で長期間 (144 時間以上) 発現が持続していた。

第3章では、 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖や生存に関係する形質の変更について述べる。

Δ N-RhoGDI β の強制発現実験を行った。その結果、細胞の増殖能に大きな変更は無かった。また、アポトーシス感受性は増大傾向にあったものの、顕著では無かった。すなわち、RhoGDI β は、3 型カスパーゼの活性化によって起こる細胞死とは直接関係せず、他の細胞機能のシグナル・メディエータ

一であろうと考えられた。

第4章では、 ΔN -RhoGDI β の強制発現による細胞運動に関係する形質の変更について述べる。

ΔN -RhoGDI β が高発現した細胞では、細胞の形態、特にアクチン束の形成がコントロールと比較して低下していたが、ランダムな細胞運動能に大きな変更は観察されなかった。そこで、方向性のある細胞運動能について、試験管内での epithelial wound-healing assay を行った。その結果、 ΔN -RhoGDI β が高発現した細胞では、著しい方向性のある細胞運動能の阻害が起こっていた。

第5章では、 ΔN -RhoGDI β が分子スイッチである RhoGTPase とどのように関係しているのかについて述べる。

細胞分画と免疫沈降法により、RhoGDI β が細胞膜画分で Rac1 と結合しているのに対して、 ΔN -RhoGDI β は、細胞膜画分以外に、細胞質や細胞核に分布し、Cdc42 と結合していることを見出した。また、Cdc42 活性を阻害した。すなわち、RhoGDI β は、細胞膜で Rac1 を阻害する因子として働いているが、ゲノムストレスにより切断された後、細胞内で大きく分布を変更させて、Cdc42 を阻害する因子として働くことがわかった。

第6章では、 ΔN -RhoGDI β の Cdc42 阻害効果がもたらす生理作用について述べる。

Cdc42 は、細胞の極性を制御する分子スイッチとして認識されている。この活性の阻害は、方向性のある分裂や運動が阻害される。また、ハエの研究から、Cdc42 阻害によって、方向性を失った細胞がアポトーシスで失われた細胞を埋める増殖（代償性増殖）を誘導するシグナル経路を活性化することが知られている。そこで、本研究では、 ΔN -RhoGDI β の高発現によって、放射線によるアポトーシスで誘導される代償性増殖が活性化するかどうかを確かめた。その結果、 ΔN -RhoGDI β の高発現では、Cdc42 が阻害されて代償性増殖が促進することがわかった。

第7章では、本研究の総括を述べる。

分子スイッチ RhoGTPase の制御因子である RhoGDI β は、Rac の阻害因子として働いているが、ゲノムストレスでアポトーシスに至らず生存した細胞内で ΔN -RhoGDI β が蓄積し、Cdc42 阻害因子として働く。その結果、ゲノムストレスを受けた生存細胞は、細胞極性を喪失し、代償性増殖の誘導が起こることが示された。このシグナル経路は、特に、RhoGDI β 発現の高い癌腫で機能していると考えられる。放射線治療を受けた場合、生存細胞では ΔN -RhoGDI β の発現によって無秩序な細胞運動が起こり、代償性増殖の誘導により再増殖（再発）へのシグナル伝達経路として機能する可能性が示唆される。RhoGDI β の発現を下げるような作用のある物質の探索は、放射線治療の効果を高めることに繋がるかも知れない。

審査の結果の要旨

本研究では、放射線被曝によるゲノムストレスで起こる不都合な生体応答現象を回避させるような分子創薬を最終目的とし、それに関係した細胞内シグナル伝達経路の研究を行った。特に、細胞増殖などの制御に中心的な役割を担っている細胞内情報伝達の変換器分子（分子スイッチ）であるRhoGTPaseファミリーに注目し、その制御因子のひとつであるRhoGDI β によるゲノムストレス応答時での制御様式を解明することを目指した。

第1章では、緒言として背景と目的を述べる。第2章では、RhoGDI β のゲノムストレス応答性動態解析結果を述べる。RhoGDI β の活性化3型カスパーゼによる切断産物である Δ N-RhoGDI β は、放射線照射されて生き残っている細胞内で長期間（144時間以上）発現が持続していた。第3章では、 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖や生存に関係する形質の変更について述べる。 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞の増殖能の変更はなく、また Δ N-RhoGDI β は細胞死とは直接関係しないことがわかった。そのため他の細胞機能のシグナル・メディエーターであろうと考えられた。第4章では、 Δ N-RhoGDI β の強制発現による細胞運動に関係する形質の変更について述べる。 Δ N-RhoGDI β が高発現した細胞では、ランダムな細胞運動能に大きな変更は観察されなかったが、epithelial wound-healing assayでの結果から、著しい方向性のある細胞運動能の阻害が起こっていた。第5章では、 Δ N-RhoGDI β が分子スイッチであるRhoGTPaseとどのように関係しているのかについて述べる。細胞分画と免疫沈降法により、RhoGDI β が細胞膜画分でRac1と結合しているのに対して、 Δ N-RhoGDI β は、細胞膜画分以外に、細胞質や細胞核に分布し、Cdc42と結合していることを見出した。また、Cdc42活性を阻害した。すなわち、RhoGDI β は、細胞膜でRac1を阻害する因子として働いているが、ゲノムストレスにより切断された後、細胞内で大きく分布を変更させて、Cdc42を阻害する因子として働くことがわかった。第6章では、 Δ N-RhoGDI β のCdc42阻害効果がもたらす生理作用について述べる。 Δ N-RhoGDI β の高発現によって、放射線によるアポトーシスで誘導される代償性増殖が活性化するかどうかを確かめた。その結果、 Δ N-RhoGDI β の高発現では、Cdc42が阻害されて代償性増殖が促進することがわかった。第7章では、本研究の総括を述べる。

放射線治療を受けた場合、生存細胞では Δ N-RhoGDI β の発現によって無秩序な細胞運動が起こり、代償性増殖の誘導により再増殖（再発）へのシグナル伝達経路として機能する可能性が示唆される。RhoGDI β の発現を下げるような作用のある物質の探索は、放射線治療の効果を高めることに繋がると期待される。よって審査員一同が協議の結果、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。

氏名・本籍	三浦 香織 (広島県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第45号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	親油性安定型アスコルビン酸誘導体の抗アレルギー作用および 抗がん作用に関する研究
学位論文審査委員	主査 教授 田井 章博 副査 教授 野下 俊朗 教授 齋藤 靖和 准教授 青柳 充

学位論文の要旨

ビタミンCとして知られるアスコルビン酸(AA)は、多様な作用を示す重要な栄養素である。しかし、AAは不安定な物質であり、容易に酸化されて活性を失うため、多くの安定型AA誘導体の開発が行われている。その1つであるアスコルビン酸2-グルコシド(AA-2G)は、AAの2位水酸基に α -グルコースを導入することにより非常に高い安定性を示し、酵素的に加水分解されて生体にAAを供給する。しかし、AA-2Gは水溶性が極めて高く使用用途が限定される欠点を持つ。この問題点を解決するため、当研究室ではAA-2GのAA側6位水酸基に各種アシル基を導入した一連の6-O-acyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (6-Acyl-AA-2G)を合成している。親油性が増すことでAA-2Gよりも高い腸管吸収性や皮膚透過性を示す6-Acyl-AA-2Gは、 α -グルコシダーゼとエステラーゼによりAAに加水分解され、AA作用を効率的に発揮する優れたプロビタミンC剤である。これまで6-Acyl-AA-2GはプロビタミンC剤としての作用に注目され、それ自身が発揮する作用についてはあまり研究されていなかった。6-Acyl-AA-2Gがそれ自身、またはAA以外の代謝物が何らかの薬理作用を発揮すれば、新しい利用が可能になるのではないかと考えた。本論文は、6-Acyl-AA-2Gの新規利用法を追究するため、抗アレルギー作用および抗がん作用を評価し、その研究成果をまとめたものである。

第1章の緒言では6-Acyl-AA-2Gの開発背景と研究の状況、本論文の目的を述べた。第2章では6-Acyl-AA-2Gの抗アレルギー作用を評価した成果を述べた。炎症時に活性化することが知られるヒアルロニダーゼの阻害作用を検討したところ、6-Acyl-AA-2Gは低濃度で強い阻害活性を示した。また、その活性は分子内のアシル基の構造によって影響され、直鎖アシル基を持つ6-sAcyl-AA-2Gにおいてアシル基の炭素数が伸長するほど活性が強くなる傾向が認められた。

6-sAcyl-AA-2Gはさらに、ラット好塩基球性白血病細胞株であるRBL-2H3細胞に対する脱顆粒抑制作用を有意に示し、ヒアルロニダーゼ阻害作用と同様にアシル基の炭素数が伸長するほどより低濃度で活性が強くなる傾向が認められた。代謝物であるAAやAA-2Gには有意な活性が認められないことから、6-sAcyl-AA-2Gのヒアルロニダーゼ阻害作用および脱顆粒抑制作用は誘導体自体による作用であると考えられる。両試験で最も強い作用を發揮した、炭素数16の直鎖アシル基を有する6-sPalm-AA-2Gについて、分子内のどの構造が活性に寄与するのか検討するため2種類の異性体を合成し、活性の比較を行った。その結果、ヒアルロニダーゼ阻害作用においてはAAの5位水酸基の立体の保持が重要であること、またグルコースの結合様式は関与しないことが明らかになった。脱顆粒抑制試験においては、立体や結合様式の違いによる活性の変化は認められず、分子内にアシル基とグルコシル基を持つことで強い脱顆粒抑制作用を發揮することが明らかになった。次に、6-sPalm-AA-2Gのマウス受動皮膚アナフィラキシー(PCA)反応に対する抑制作用を検討した。6-sPalm-AA-2G溶液をIgE抗体で感作させたマウス耳介に塗布し、抗原を静脈投与してPCA反応を誘発したところ、6-sPalm-AA-2G投与群のPCA反応は有意に抑制された。以上より、6-sPalm-AA-2Gは抗アレルギー薬としての開発が期待できる。第3章では6-Acyl-AA-2Gの抗がん作用についての研究成果を述べた。高濃度AA点滴療法は副作用の少ない新しいがん治療法として注目されている。しかし、治療には非常に大量のAAを投与する必要があり腎機能障害を持つ患者は治療を受けられない問題点がある。担がんモデルマウスに隔日で6-Acyl-AA-2Gを静脈投与し、その間の腫瘍体積増殖の推移を計測した結果、炭素数8個の分岐したアシル基を持つ6-bOcta-AA-2GがAAの10分の1用量で強い腫瘍増殖抑制作用を示した。6-bOcta-AA-2Gの抗がん作用本体を同定するため、化合物投与後の組織中化合物含有量を測定した。投与から15分後の時点で6-bOcta-AA-2Gは酵素による加水分解を受けており、血中からは α -グルコシダーゼの作用を受けた代謝物の6-bOcta-AAが検出された。細胞における評価で即時的にがん細胞に傷害を与えるAAに対し、6-bOcta-AAは添加から24時間後において作用は示さないが、長時間培養(~72時間)すると有意に細胞の増殖を抑制することが明らかになり、AAとは異なるメカニズムで抗がん作用を示すことが示唆された。これより、6-bOcta-AA-2Gは作用本体として6-bOcta-AAを供給することでAAよりも強い抗がん作用を發揮したと考えられ、高濃度AA点滴療法における問題点を解決した薬剤としての開発が期待できる。第4章では本研究の総括を行い、今後の展望を述べた。

以上の結果から本研究において親油性安定型AA誘導体である6-Acyl-AA-2Gの新規利用法が示された。6-Acyl-AA-2Gは、プロビタミンC剤としてAAを供給する働きだけでなく、本誘導体自身の構造の特徴を生かした疾患治療や予防などが期待される。

審査の結果の要旨

本研究は、親油性安定型アスコルビン酸誘導体 6-*O*-acyl-2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (6-Acyl-AA-2G) のアスコルビン酸(AA) 作用を効率的に発揮するプロビタミン C 剤としての利用法だけではなく新規利用法の開発を目的とした。

本論文は4章から構成される。第1章は緒言で、AAの生理作用や物性、プロビタミンC剤の開発に関する現状及び研究の目的を述べた。また、6-Acyl-AA-2GはC₄からC₁₈の直鎖アシル基を導入した6-sAcyl-AA-2Gと、C₆からC₁₆の分岐鎖アシル基を導入した6-bAcyl-AA-2Gの2系統のAA誘導体群であることも述べた。第2章では、6-Acyl-AA-2Gの抗アレルギー作用を評価した成果を述べた。6-Acyl-AA-2Gの中でC₁₆の直鎖アシル基を有する6-sPalm-AA-2Gが、ヒアルロニダーゼ阻害試験及びラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒抑制試験において最も高い活性を示した。その活性は、6-sPalm-AA-2Gの代謝物ではなく、6-sPalm-AA-2G自身によるものであった。また、6-sPalm-AA-2Gはマウス受動皮膚アナフィラキシー反応に対する抑制作用を示すことも明らかにした。第3章では、6-Acyl-AA-2Gの抗がん作用についての研究成果を述べた。担がんモデルマウスに6-Acyl-AA-2Gを複数回静脈投与し、腫瘍体積増殖の推移を計測した結果、C₈の分岐鎖アシル基を持つ6-bOcta-AA-2Gが強い腫瘍増殖抑制作用を示した。*In vitro*において6-bOcta-AAは細胞傷害性を示したが、6-bOcta-AA-2Gは示さなかったことや*in vivo*における6-bOcta-AA-2Gの代謝実験により、抗がん活性は、6-bOcta-AA-2Gではなく、6-bOcta-AA-2Gが α -グルコシダーゼにより加水分解された6-bOcta-AAによることが明らかとなった。第4章は総括である。

本研究は、プロビタミンC剤である6-Acyl-AA-2Gの抗アレルギー薬や抗がん薬としての新規利用法の可能性を科学的に提示するものである。これらの成果は、6-Acyl-AA-2GがプロビタミンC剤としてAAを供給する働きだけでなく、本誘導体自身の構造的特徴を生かした疾患治療や予防などへの応用が期待される点で高く評価される。よって、本論文は博士(生命システム科学)の学位に値するものと認められる。