

【平成23年1月-3月授与分】博士学位論文内容の要旨 及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/20200>

出版情報：2011-10-07. 九州大学
バージョン：
権利関係：



氏名・(本籍・国籍)	フレドリク ヨハンソン Fredrik Johansson (スウェーデン)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第59号
学位授与の日付	平成23年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Investigation of scoring methods for sequence alignment (配列アラインメントのスコアリング手法の研究)
論文調査委員	(主査) 教授 神田 大 輔 (副査) 教授 久 原 哲 生命情報工学研究センター 副センター長 藤 博 幸

論 文 内 容 の 要 旨

保存度や変異度は、タンパク質の構造や機能に重要な残基を同定する際に、マルチプルアラインメント中のサイトの評価に用いられている。我々は、これまで報告されている25種類の保存度あるいは変異度を、アラインメントの参照セットBalibaseに適用することで、保存度や変異度間の相関係数を求め、それに基づいて保存度や変異度の間の距離を計算した。次に、その距離をしたがってクラスタ解析を実施した。すると、既存の保存度/変異度の大部分は二つのクラスタに分類された、一方のクラスタは、アミノ酸置換スコアに基づく手法で構成され、他方はアミノ酸頻度に基づく手法より成っていた。それらのクラスタの外部に、既知のアミノ酸の性質に基づく手法が位置づけられた。我々は、それらの手法による酵素の活性部位予測の性能の比較も試みた。その結果、アミノ酸頻度に基づく手法の予測精度が最も良好であった。

アミノ酸頻度に基づく手法の代表的なものとして、シャノンエントロピー法がある。その手法を、バックグラウンドのアミノ酸組成を考慮する形で拡張したものが相対シャノンエントロピー法である。また、アミノ酸間の物理化学的類似性を考慮する形でシャノンエントロピーを拡張したものにフォンノイマンエントロピー法がある。しかし、これまでその両者を組み合わせた拡張は行なわれていなかった。その理由の一つは、現在の配列比較のためのフォンノイマンエントロピー法の定義では、相対エントロピーへの拡張ができないということがあげられる。そこで、この拡張のためフォンノイマンエントロピーを再定義し、相対フォンノイマンエントロピーによるアラインメントサイトの評価法を開発した。この定義では、そのパラメータ空間の一点として、シャノンエントロピー、相対シャノンエントロピー、フォンノイマンエントロピーを表現できる。このパラメータ空間の網羅的探索により、シャノンエントロピー法、相対シャノンエントロピー法、フォンノイマンエントロピー法のいずれよりも、活性部位予測に高い精度を示すパラメータ値を決定した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

保存度や変異度は、タンパク質の構造や機能に重要な残基を同定する際に、マルチプルアライン

メント中のサイトの評価に用いられている。我々は、これまで報告されている25種類の保存度あるいは変異度を、アラインメントの参照セットBalibaseに適用することで、保存度や変異度間の相関係数を求め、それに基づいて保存度や変異度の間の距離を計算した。次に、その距離をしながらクラスタ解析を実施した。すると、既存の保存度/変異度の大部分は二つのクラスタに分類された、一方のクラスタは、アミノ酸置換スコアに基づく手法で構成され、他方はアミノ酸頻度に基づく手法より成っていた。それらのクラスタの外部に、既知のアミノ酸の性質に基づく手法が位置づけられた。我々は、それらの手法による酵素の活性部位予測の性能の比較も試みた。その結果、アミノ酸頻度に基づく手法の予測精度が最も良好であった。

アミノ酸頻度に基づく手法の代表的なものとして、シャノンエントロピー法がある。その手法を、バックグラウンドのアミノ酸組成を考慮する形で拡張したものが相対シャノンエントロピー法である。また、アミノ酸間の物理化学定類似性を考慮する形でシャノンエントロピーを拡張したものにフォンノイマンエントロピー法がある。しかし、これまでその両者を組み合わせた拡張は行なわれていなかった。その理由の一つは、現在の配列比較のためのフォンノイマンエントロピー法の定義では、相対エントロピーへの拡張ができないということがあげられる。そこで、この拡張のためフォンノイマンエントロピーを再定義し、相対フォンノイマンエントロピーによるアラインメントサイトの評価法を開発した。この定義では、そのパラメータ空間の一点として、シャノンエントロピー、相対シャノンエントロピー、フォンノイマンエントロピーを表現できる。このパラメータ空間の網羅的探索により、シャノンエントロピー法、相対シャノンエントロピー法、フォンノイマンエントロピー法のいずれよりも、活性部位予測に高い精度を示すパラメータ値を決定した。

以上の結果は、タンパク質のマルチプルアラインメントを最適化する方法として、理論的に優れかつ実用にも適した方法を与えるものであり、バイオインフォマティクスの分野で価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	さがたのりあき 佐方 功明 (福岡県)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第60号
学位授与の日付	平成23年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Comprehensive behavioural study of GluR4 knockout mouse: implication in cognitive function (GluR4 ノックアウトマウスの包括的行動解析：認知機能への関与)
論文調査委員	(主査) 教授 服巻 保幸 (副査) 教授 伊良皆 啓治 准教授 伊藤 功 准教授 柴田 弘紀

論文内容の要旨

AMPA 型グルタミン酸受容体は4つのサブユニット(GluR1, GluR2, GluR3, GluR4)のうち1~2種の組み合わせによる四量体で構成されており、哺乳類の中枢神経系において速い興奮性伝達を担っている。GluR4は主として小脳の顆粒細胞などに多く見られるが、海馬においては出生直後に限って高い発現を示すことから、海馬におけるシナプスの可塑性や機能的な神経ネットワークの発達に関与していると考えられている。また、統合失調症は、多様な症状を呈する精神疾患であり、人口の約1%という高い罹患率を示す多因子病である。当研究室では本疾患のグルタミン酸伝達異常仮説に基づき、グルタミン酸受容体遺伝子群について包括的な関連解析を行ってきた。この中で

AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluR4 の遺伝子 (*GRIA4*) と統合失調症との関連が示された。以上のことから、GluR4 の統合失調症への関与をはじめとし、高次脳機能における役割を明らかにすることを目的とし以下の解析を行った。

まず GluR4 の 4 個の細胞膜ドメインのうち 2 個をコードしているエクソン 12 を欠損させたノックアウトマウスを樹立した。GluR4 は海馬で生後間もない時期に GluR2 を含む AMPA 型グルタミン酸受容体をシナプス膜へとリクルートするとの報告がある。そこで免疫組織染色法により、GluR4 変異型 (GluR4⁻/GluR4⁻) マウスの海馬・小脳における GluR1 や GluR2 の発現分布を調べたが、変異型マウスと野生型マウスとの間に違いは観察されなかった。さらに、記憶や空間学習能力に関わることが知られている長期増強 (LTP) についてマウスの海馬スライスを用いて電気生理学的解析を行ったが、変異型マウスと野生型マウスとで少なくとも海馬 CA1 領域においては有意な変化が見られなかった。

次に、包括的行動テストバッテリーを施行したところ、T 字型迷路試験では変異型マウスの空間作業記憶がわずかながらも向上していることが観察された。また、バーンズの円形迷路試験では、変異型マウスの空間参照記憶の保持能力は維持されていたが、空間参照記憶の獲得能力が損なわれていることがわかった。以上の結果から、GluR4 サブユニットが作業記憶と参照記憶の両方に関与していることが示唆された。

さらに、感覚運動情報制御機能を反映することが知られているプレパルス抑制について検討した。このプレパルス抑制は、音刺激に対する驚愕反応が、その直前に驚愕反応を引き起こさない程度の弱い音刺激を与えることによって抑制される現象であり、統合失調症のエンドフェノタイプの 1 つと考えられている。解析の結果、変異型マウスではプレパルス抑制が、野生型マウスに比べ有意に低下していた。従って、GluR4 サブユニットがプレパルス抑制に寄与していることが示唆された。

以上の知見から、GluR4 が、プレパルス抑制の障害を示す精神疾患や、空間記憶を初めとした認知機能に関与しているものと結論した。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の中枢神経系において速い興奮性伝達を担っている AMPA 型グルタミン酸受容体は、4 つのサブユニット (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4) のうち 1~2 種の組み合わせによる四量体で構成されている。このなかで GluR4 は主として小脳の顆粒細胞などに多く見られるが、海馬においては出生直後に限って高い発現を示すことから、海馬におけるシナプスの可塑性や機能的な神経ネットワークの発達に関与していると考えられている。また、統合失調症のグルタミン酸伝達異常仮説に基づく関連解析において、GluR4 の遺伝子 (*GRIA4*) と統合失調症との関連が示されている。以上のことから、GluR4 の統合失調症への関与や高次脳機能における役割を明らかにすることを目的として本研究は行われた。

GluR4 の 4 個の細胞膜ドメインのうち 2 個をコードしているエクソン 12 を欠損させたノックアウトマウスを樹立した。GluR4 は海馬で生後間もない時期に GluR2 を含む AMPA 型グルタミン酸受容体をシナプス膜へとリクルートするとの報告がある。そこで免疫組織染色法により、GluR4 変異型 (GluR4⁻/GluR4⁻) マウスの海馬・小脳における GluR1 や GluR2 の発現分布を調べたが、変異型マウスと野生型マウスとの間に違いは観察されなかった。さらに、記憶や空間学習能力に関わることが知られている長期増強 (LTP) についてマウスの海馬スライスを用いて電気生理学的解析を行ったが、変異型マウスと野生型マウスとで少なくとも海馬 CA1 領域においては有意な変化が見られなかった。

次に、包括的行動テストバッテリーを施行したところ、T 字型迷路試験では変異型マウスの空間作業記憶がわずかながらも向上していることが観察された。また、バーンズの円形迷路試験では、変

異型マウスの空間参照記憶の保持能力は維持されていたが、空間参照記憶の獲得能力が損なわれていることがわかった。以上の結果から、GluR4 サブユニットが作業記憶と参照記憶の両方に関与していることが示唆された。

さらに、統合失調症のエンドフェノタイプの1つと考えられているプレパルス抑制の障害について検討した。このプレパルス抑制は、音刺激に対する驚愕反応が、その直前に驚愕反応を引き起こさない程度の弱い音刺激を与えることによって抑制される現象であり、感覚運動情報制御機能を反映することが知られている。変異型マウスではプレパルス抑制が、野生型マウスに比べ有意に低下していた。従って、GluR4 サブユニットがプレパルス抑制に寄与していることが示唆されるとともに、その機能消失で統合失調症のエンドフェノタイプが生じることが示された。

以上の結果は、GluR4 がプレパルス抑制の障害を示す精神疾患や、空間記憶を初めとした認知機能に関与していることを示すもので、この分野において価値ある業績として認められる。

本論文に関しては主論文を中心として論文公聴会を開き、論文調査委員会委員全員が出席して質疑応答を行った。特にLTP解析の意義、作業記憶解析の結果の解釈と問題点、統合失調症の病態への関わりなどが論点となった。その結果優秀であったので合格と判定した。

よって本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認められた。

氏名・(本籍・国籍)	いわもとかず なり 岩本一成 (大分県)
学位の種類	博士(システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第63号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	数理モデルを用いたp53動的挙動の細胞運命決定への影響に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 岡本正宏 (副査) 教授 巖佐庸 教授 久原哲

論文内容の要旨

がん抑制遺伝子 p53 の変異は、ヒトの種々のがん細胞の 50%以上で観察されており、正常細胞のがん化における重要な因子と理解されている。p53 は、細胞周期とプログラム細胞死（アポトーシス）に強く関与しており、これらに関連する遺伝子およびタンパク質も正常細胞のがん化を誘発する因子に含まれる。細胞周期は、細胞分裂の一連の過程であり、G1 (Gap1) 期、S (DNA Synthesis) 期、G2 (Gap2) 期、M (Mitosis) 期、G0 (Quiescence) 期から構成される。細胞周期進行を制御する細胞周期制御機構は、主に、サイクリン/サイクリン依存性リン酸化酵素複合体 (Cyclin/Cyclin-dependent kinase: Cyc/CDK) および CDK 阻害タンパク質 (CDK inhibitor: CKI) から構成される。一方、アポトーシスは、細胞の DNA が紫外線照射等で損傷を受け (DNA damage)、それが重篤な場合や細胞外からのデスシグナルにより誘導され、Caspase-3 の活性化により実行される。

DNA damage が発生すると、p53 が活性化し、CKI である p21 の合成を促進する。p21 は、複数の Cyc/CDK 複合体を阻害し、細胞周期進行を一時的に停止させる。そして、その間に、DNA damage は修復される。一方、重篤な DNA damage が発生した場合、p53 により内因性ミトコンドリア依存のアポトーシス誘導経路が惹起され、その細胞は除去される。すなわち、p53 は、細胞の生死を選択 (細胞運命を決定) する役割を持っており、この機能の不全が 50%以上のがん細胞において観ら

れている。p53 による細胞運命の決定機構の解明は、正常細胞ががん化する機構を解明する上で非常に重要であり、がんの治療法の構築において、不可欠な課題として考えられる。

近年、活性化した p53 の動的挙動が、細胞集団レベルで減衰振動を、単細胞レベルで定常振動をそれぞれ示すことが報告された。さらに、細胞ごとに発生する p53 パルス数は異なり、その発生数が DNA damage の大きさと相関することも示された (p53 パルスの多様性)。また、細胞集団に同等の放射線を照射した場合、アポトーシスが誘導されるか否かは細胞ごとに異なるとも報告されている (アポトーシス誘導のゆらぎ)。これらの報告は、p53 の振動現象が細胞運命の決定に影響することを示唆している。しかしながら、細胞周期制御機構、アポトーシス誘導経路、p53 が関与する反応系 (p53 経路) は、膨大な数の遺伝子およびタンパク質から構成されているため、p53 の動的挙動が細胞運命の決定機構へおよぼす影響は、未だに解明されていない。その上、正常細胞での生化学的実験等では、DNA damage を被った細胞が容易にアポトーシスを誘導するため、幅広い DNA damage での検証が困難である。本研究では、p53 の振動現象が細胞運命の決定におよぼす影響を明らかにするため、細胞周期制御機構、アポトーシス誘導経路、p53 経路が複雑に影響する 5 つの数理解モデルを構築し、それらの動特性解析を実践した。

まず、p53 の振動現象が細胞周期におよぼす影響について検証するため、3 つの数理解モデルを構築し、その解析を実践した。第 1 の数理解モデルとして、細胞周期 G1 期から S 期への移行 (G1/S 移行) の制御機構と p53 経路を統合した数理解モデルを構築し、p53 の振動現象が G1/S 移行へおよぼす影響を検証した。DNA damage を伴うシミュレーションでは細胞周期進行の遅延が再現され、特に、深刻な DNA damage を伴う場合、細胞周期進行の遅延を引き起こす p21 の合成量が低下し、遅延時間が短縮した。さらに、細胞周期 G1 後期 (late G1 期) に DNA damage が発生した場合、細胞周期進行の遅延が発生せず、late G1 期が、“細胞が DNA damage の発生を感知できない時期” であることが明らかにされた。第 2 の数理解モデルとして、G1 期から M 期にまでの細胞周期制御機構と p53 を統合した数理解モデルを構築し、p53 の振動現象が細胞周期全体におよぼす影響を検証した。DNA damage を伴うシミュレーションでは、細胞周期進行の遅延および p53 の振動現象が再現された。生物学的知見に基づくと、p53 の動的挙動が振動を呈する場合、細胞は、 400 J/m^2 以上の紫外線照射による DNA damage を被っていることが示された。このような状況において、正常細胞はアポトーシスを誘導することから、p53 の振動現象がアポトーシス誘導に関与することが示唆された。第 3 の数理解モデルとして、p53 経路を含み細胞周期進行が連続する数理解モデルを構築し、p53 の振動現象が細胞周期の継代におよぼす影響を調査した。DNA damage を伴うシミュレーションでは、p53 の振動現象および細胞周期進行の遅延が再現された。また、p53 パルスの数は、DNA damage が大きくなるにつれ増加した。2 個以上 (複数) の p53 パルスが発生した場合、細胞周期進行が M 期において停止し、細胞周期制御機構が崩壊した。そして、この細胞周期制御機構の崩壊は CycA の合成量に依存することが示された。

次に、p53 パルスの多様性およびアポトーシス誘導のゆらぎを検証するために、確率論的モデルを構築し、Gillespie 法を用いて確率論シミュレーションを実践した。一般質量作用則に基づく細胞周期制御機構の数理解モデルの確率論シミュレーションにおいて、Cyc/CDK 複合体が活性化する時期やその量は試行ごとに異なったが、それらが合成される順は変化せず、細胞周期の正常な進行が再現された。すなわち、細胞の個性が創出され、Gillespie 法の大規模モデルへの適用可能性が示された。次に、核内反応系に確率論を、核外反応系に決定論をそれぞれ適用した p53 経路とアポトーシス誘導経路の統合モデルを構築し、その数理解析を実施した。放射線量 (IR-dose) を、0、0.3、2.5、6 Gy に設定したシミュレーションを 1000 試行 (細胞) ずつ実行した。各 IR-dose における 0 個、1 個、複数の p53 パルス数ごとの細胞の割合およびアポトーシス誘導率は、生物学的知見と良好に一致し、p53 パルスの多様性およびアポトーシス誘導のゆらぎが再現された。そして、p53 パルスが発

生しない細胞および1個の p53 パルスが発生した細胞では、アポトーシスが全く誘導されず、対照的に、複数の p53 パルスが発生したほとんどの細胞で、アポトーシスが誘導された。したがって、複数の p53 パルス発生がアポトーシス誘導の必要条件であることが示された。

以上の解析結果をまとめると、複数の p53 パルス発生が、アポトーシス誘導および細胞周期進行において重要であることが示唆された。複数の p53 パルス発生により、多くの細胞はアポトーシスを誘導し自らを除去する。仮に、複数の p53 パルス発生によりアポトーシス誘導がされない場合、DNA 修復後に、細胞周期制御機構が崩壊し、細胞周期進行が停止した。すなわち、複数の p53 パルス発生におけるアポトーシス誘導の過誤を補償する機能が存在し、組織や器官の恒常性が維持されていることが推察された。今後は、本研究で得られた知見をもとに、細胞周期制御機構、p53 経路アポトーシス誘導経路をすべて統合した数理モデルを構築し、p53 の振動が細胞周期制御機構とアポトーシス誘導経路におよぼす影響を、同時に、観察および解析することが可能となる。そのことから、正常細胞ががん化する機序の解明やがんの放射線治療での治療効率の推定、がん細胞に強制的にアポトーシスを誘導させる治療法の開発等に有用な手がかりをもたらすと期待される。

論文審査の結果の要旨

がん抑制遺伝子 p53 の変異は、ヒトの種々のがん細胞の 50%以上で観察されており、正常細胞のがん化における重要な因子と理解されている。p53 は、細胞周期とプログラム細胞死（アポトーシス）に強く関与しており、これらに関連する遺伝子およびタンパク質も正常細胞のがん化を誘発する因子に含まれる。すなわち、p53 は、細胞の生死を選択（細胞運命を決定）する役割を持っており、この機能の不全が 50%以上のがん細胞において観られている。p53 による細胞運命の決定機構の解明は、正常細胞ががん化する機構を解明する上で非常に重要であり、がんの治療法の構築において、不可欠な課題として考えられる。本論文は、細胞周期制御機構、アポトーシス誘導経路、p53 経路が複雑に影響する微分方程式に基づく 5つの数理モデルを構築し、それらの動特性解析結果より、p53 の振動現象の細胞運命の決定に及ぼす影響を取りまとめたものである。

細胞周期は、細胞分裂の一連の過程であり、G1 (Gap1) 期、S (DNA Synthesis) 期、G2 (Gap2) 期、M (Mitosis) 期、G0 (Quiescence) 期から構成される。細胞周期進行を制御する細胞周期制御機構は、主に、サイクリン/サイクリン依存性リン酸化酵素複合体 (Cyclin/Cyclin-dependent kinase: Cyc/CDK) および CDK 阻害タンパク質 (CDK inhibitor: CKI) から構成される。一方、アポトーシスは、細胞の DNA が紫外線照射等で損傷を受け (DNA damage)、それが重篤な場合や細胞外からのデスシグナルにより誘導され、Caspase-3 の活性化により実行される。

DNA damage が発生すると、p53 が活性化し、CKI である p21 の合成を促進する。p21 は、複数の Cyc/CDK 複合体を阻害し、細胞周期進行を一時的に停止させる。そして、その間に、DNA damage は修復される。一方、重篤な DNA damage が発生した場合、p53 により内因性ミトコンドリア依存のアポトーシス誘導経路が惹起され、その細胞は除去される。

近年、活性化した p53 の動的挙動が、細胞集団レベルで減衰振動を、単細胞レベルで定常振動をそれぞれ示すことが報告された。さらに、細胞ごとに発生する p53 パルス数は異なり、その発生数が DNA damage の大きさと相関することも示された (p53 パルスの多様性)。また、細胞集団に同等の放射線を照射した場合、アポトーシスが誘導されるか否かは細胞ごとに異なるとも報告されている (アポトーシス誘導のゆらぎ)。これらの報告は、p53 の振動現象が細胞運命の決定に影響することを示唆している。しかしながら、細胞周期制御機構、アポトーシス誘導経路、p53 が関与する反応系 (p53 経路) は、膨大な数の遺伝子およびタンパク質から構成されているため、p53 の動的挙動が細胞運命の決定機構へ及ぼす影響は、未だに解明されていない。その上、正常細胞での生化学的実験等では、DNA damage を被った細胞が容易にアポトーシスを誘導するため、幅広い DNA damage

での検証が困難である。

本論文では、まず、p53 の振動現象が細胞周期に及ぼす影響について検証するため、3 つの数理モデルを構築し、その解析を実践した。第 1 の数理モデルとして、細胞周期 G1 期から S 期への移行 (G1/S 移行) の制御機構と p53 経路を統合した数理モデルを構築し、p53 の振動現象が G1/S 移行へおよぼす影響を検証した。DNA damage を伴うシミュレーションでは細胞周期進行の遅延が再現され、特に、深刻な DNA damage を伴う場合、細胞周期進行の遅延を引き起こす p21 の合成量が低下し、遅延時間が短縮した。さらに、細胞周期 G1 後期 (late G1 期) に DNA damage が発生した場合、細胞周期進行の遅延が発生せず、late G1 期が、“細胞が DNA damage の発生を感知できない時期” であることが明らかにされた。第 2 の数理モデルとして、G1 期から M 期にまでの細胞周期制御機構と p53 を統合した数理モデルを構築し、p53 の振動現象が細胞周期全体におよぼす影響を検証した。DNA damage を伴うシミュレーションでは、細胞周期進行の遅延および p53 の振動現象が再現された。生物学的知見に基づくと、p53 の動的挙動が振動を呈する場合、細胞は、 400 J/m^2 以上の紫外線照射による DNA damage を被っていることが示された。このような状況において、正常細胞はアポトーシスを誘導することから、p53 の振動現象がアポトーシス誘導に関与することが示唆された。第 3 の数理モデルとして、p53 経路を含み細胞周期進行が連続する数理モデルを構築し、p53 の振動現象が細胞周期の継代におよぼす影響を調査した。DNA damage を伴うシミュレーションでは、p53 の振動現象および細胞周期進行の遅延が再現された。また、p53 パルスの数は、DNA damage が大きくなるにつれ増加した。2 個以上 (複数) の p53 パルスが発生した場合、細胞周期進行が M 期において停止し、細胞周期制御機構が崩壊した。そして、この細胞周期制御機構の崩壊は CycA の合成量に依存することが示された。

次に、p53 パルスの多様性およびアポトーシス誘導のゆらぎを検証するために、確率論的モデルを構築し、Gillespie 法を用いて確率論シミュレーションを実践した。一般質量作用則に基づく細胞周期制御機構の数理モデルの確率論シミュレーションにおいて、Cyc/CDK 複合体が活性化する時期やその量は試行ごとに異なったが、それらが合成される順は変化せず、細胞周期の正常な進行が再現された。すなわち、細胞の個性が創出され、Gillespie 法の大規模モデルへの適用可能性が示された。次に、核内反応系に確率論を、核外反応系に決定論をそれぞれ適用した p53 経路とアポトーシス誘導経路の統合モデルを構築し、その数理解析を実施した。放射線量 (IR-dose) を、0、0.3、2.5、6 Gy に設定したシミュレーションを 1000 試行 (細胞) ずつ実行した。各 IR-dose における 0 個、1 個、複数の p53 パルス数ごとの細胞の割合およびアポトーシス誘導率は、生物学的知見と良好に一致し、p53 パルスの多様性およびアポトーシス誘導のゆらぎが再現された。そして、p53 パルスが発生しない細胞および 1 個の p53 パルスが発生した細胞では、アポトーシスが全く誘導されず、対照的に、複数の p53 パルスが発生したほとんどの細胞で、アポトーシスが誘導された。したがって、複数の p53 パルス発生がアポトーシス誘導の必要条件であることが示された。

以上の解析結果をまとめると、複数の p53 パルス発生が、アポトーシス誘導および細胞周期進行において重要であることが示唆された。複数の p53 パルス発生により、多くの細胞はアポトーシスを誘導し自らを除去する。仮に、複数の p53 パルス発生によりアポトーシス誘導がされない場合、DNA 修復後に、細胞周期制御機構が崩壊し、細胞周期進行が停止した。すなわち、複数の p53 パルス発生におけるアポトーシス誘導の過誤を補償する機能が存在し、組織や器官の恒常性が維持されていることが推察された。今後、細胞周期制御機構、p53 経路、アポトーシス誘導経路をすべて統合した数理モデルを構築し、p53 の振動が細胞周期制御機構とアポトーシス誘導経路におよぼす影響を、同時に、観察および解析することが必須となる。

以上の結果は、がん抑制遺伝子 p53 の動的挙動がどのようにして細胞周期制御、アポトーシス誘導といった細胞運命決定に影響を及ぼすのかを数理科学的に明らかにしたもので、生命情報科学、

システム生物学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	い わ さ き あ き ゆ き 岩 崎 哲 行 (福岡県)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第64号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	細胞内フィードバック制御機構を導入した通信および交通システムに関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 岡本正宏 (副査) 教授 久原 哲 教授 内田 誠一

論 文 内 容 の 要 旨

生体内部では様々な制御システムが存在し、細胞内では代謝システムによって生産される代謝物質の濃度調節が常に行われている。この調節機構は生命の進化の過程で必要に応じて創り出され、システムへ組み込まれてきた。その制御システムは、系全体を一元的に管理するものではなく、分散化された個々の制御機構が互いに影響を及ぼしあうことで全体の制御を行っている。また、その制御は自律的に行われ、外界から想定しない事象が発生した場合でも個々の制御の相互作用によって系全体の恒常性を保っている。生体内機構に備わるこれらの制御機構と工学的なシステムを比較した場合、生体内の制御には多くの優位性が確認でき、最も優れている性質は負荷分散性と耐障害性である。この優位性は生体内のシステムが進化的に形成された過程から得られたものであり、構築方法が異なる工学的システムには存在しない。そこで、工学的なシステムに対して生体内の制御を導入することで、生体内制御機構がもつ負荷分散性と耐障害性を実現できるのではないかと考えた。これまでも生体内の制御機構を工学の分野へ導入し、その機能を活用する取り組みはすでに行われており、大きな成果をあげている。本研究でもこれらの考え方にに基づき、生体内制御機構がもつ負荷分散性と耐障害性を工学的なシステムに導入する方法について検討した。

インターネットや道路交通ネットワークでは年々増加する需要によってネットワークの様々な場所で輻輳が発生し、システム全体に悪影響を及ぼしている。現在のネットワーク制御システムはすでに限界を迎えており、これらの対策は急務である。生体内機構、インターネット、そして道路交通ネットワークについて考察すると、そのネットワークを構成する要素は全く異なるが、システムの目的という観点から、全てのネットワーク系は一つのキーワードで結ぶことができる。それは系の処理がネットワーク全体の恒常性を保つことを目的として制御されていることである。これらのシステムは物質の過剰生産や、トラフィックの増大といったシステムを破壊しかねない要因から系を保護しているという点で一致している。また、物質に対する経路制御という点もシステム的に見て同等と考えられる。これらの共通点から、生体内の制御システムをインターネット、そして道路交通ネットワークへと導入する考えは、非常に理にかなった方法である。

本論文では、生体内の制御機構の一つである細胞内代謝経路の酵素フィードバック制御機構をインターネットと道路交通ネットワークへ導入し、生体内制御機構の優れた性質を備えた制御システムを構築する事を目的としている。生物が持つ耐障害性や自律的に系全体を最適化する機能を移植することで、インターネットと道路交通ネットワークにおける制御に対し、新たな手法を提案する。

具体的には、代謝ネットワーク制御の一つである拮抗阻害反応型フィードバック制御機構を工学

的システムへと導入し、制御アルゴリズムの設計を行った。設計したアルゴリズムは拮抗阻害反応の反応式が組み込まれた混雑指標と距離指標を持つ評価関数によって構成される。設計したアルゴリズムの評価を行うためにシミュレーション実験を行い、それぞれのアルゴリズムの性能評価を行った。

インターネットにおけるアルゴリズムの導入において、設計したアルゴリズムをシミュレーション実験により評価した。比較対象の制御システムとして、主要な制御アルゴリズムである SPF (Shortest Path First) と ECMP (Equal Cost Multi Path) を採用した。また、アルゴリズムの評価指標としてパケットの到達遅延時間 (Latency) を用いた。初めに、提案アルゴリズムの負荷分散機能の性能を評価した。その結果、提案したアルゴリズムはパケットの Latency において、比較対象のアルゴリズムと比べ非常に大きな優位性を持つ事が示された。また、アルゴリズムの耐障害性能について検証を行った。特定の時間に意図的にネットワーク内で障害を発生させ、アルゴリズムの障害への対応方法を観察した。実験結果では提案したアルゴリズムはシミュレーションを通して Latency の増大が発生せず、SPF、ECMP のどちらと比較しても非常に強い耐障害性を示した。これらの結果より、提案したアルゴリズムは負荷分散性と耐障害性という性質を併せ持つアルゴリズムであるといえる。また、提案したアルゴリズムを実問題へ適用するための検討も行った。インターネットのように莫大な数の制御点をもつネットワークでは全ての地点で制御方式を変更することは困難である。そこで、少ない制御点でも設計したアルゴリズムと同じ効果が得られる方法を提案し、シミュレーション実験によってその効果を確認した。その結果、提案アルゴリズムの効果をj得るために、ネットワーク内の全てのノードを置換する必要は無く、トラフィックの集中する場所を制御点として選択することで全体の約 10% のノード置換を行うだけで、提案アルゴリズムと同等の効果が得られることが示された。また、提案したアルゴリズムの評価関数のパラメータを調整することにより、新たなサービスの可能性を示した。アルゴリズムの評価関数には距離指標と混雑指標を結ぶ重み係数が存在する。この係数はどちらの指標をより考慮するかを決定するパラメータであり、この値を変更することによってデータの優先度を変更する方法を提案した。シミュレーション実験により、制御対象とするパケットを優先的に目的地に配送できることを示した。

道路交通ネットワークでは、インターネットで提案したアルゴリズムと同様の方法で評価関数を設計し、交通ネットワークにおける制御アルゴリズムを提案した。提案したアルゴリズムは道路ネットワーク内を通行する車両に指示を与え、車両の経路を指示する働きをするものである。設計したアルゴリズムの性能評価のため、交通シミュレータを用いてアルゴリズムの検証を行った。比較対象のアルゴリズムとして最短経路優先アルゴリズムを用いた。評価の指標として DelayTime を採用した。DelayTime とは理想的な状態での到達時間と実際の到達時間の距離あたりの差を表す。実験の結果、提案したアルゴリズムは混雑が発生している道路区間に車両が流入する事を防ぎ、ネットワーク全体の負荷を分散化させる経路指示を行った。最短経路優先アルゴリズムと比較しても、DelayTime の改善が確認された。また、突発的な事故に対する提案アルゴリズムの耐障害性についても検証を行った。障害は特定の時間に道路ネットワーク内の道路を封鎖することにより表現した。実験の結果、提案したアルゴリズムが障害の発生時には自律的に車両の経路を変更させ、ネットワーク全体の負荷を分散化させる様子が確認できた。また、最短経路優先アルゴリズムのシミュレーションでは事故後のネットワーク状況はすぐに改善せず、不安定な状態が続く。対して、提案アルゴリズムではシミュレーションを通して常に安定した状態を保ち、障害の発生に対して高い耐障害性を示した。提案したアルゴリズムを実際に適用する方法として、カーナビゲーションシステムの経路処理に組み込むことで、アルゴリズムで示した効率的な交通制御が行えると考えられる。

以上の結果から、本研究では酵素フィードバック機構をインターネットと道路交通システムの制御に組み込むことで、生物が持つ負荷分散性と耐障害性を実現することが可能となった。

論文審査の結果の要旨

生体内部では様々な制御システムが存在し、細胞内では代謝システムによって生産される代謝物質の濃度調節が常に行われている。この調節機構は生命の進化の過程で必要に応じて創り出され、システムへ組み込まれてきた。その制御システムは、系全体を一元的に管理するものではなく、分散化された個々の制御機構が互いに影響を及ぼしあうことで全体の制御を行っている。また、その制御は自律的に行われ、外界から想定しない事象が発生した場合でも個々の制御の相互作用によって系全体の恒常性を保っている。生体内機構に備わるこれらの制御機構と工学的なシステムを比較した場合、生体内の制御には多くの優位性が確認でき、最も優れている性質は負荷分散性と耐障害性である。本論文は、生体内の制御機構の一つである細胞内代謝経路の酵素フィードバック制御機構をインターネットと道路交通ネットワークへ導入し、生体内制御機構の優れた性質を備えた制御システムを構築することを目的としている。そして、生物が持つ耐障害性や自律的に系全体を最適化する機能を移植することで、インターネットと道路交通ネットワークにおける制御に対し、新たな手法を提案している。

インターネットや道路交通ネットワークでは年々増加する需要によってネットワークの様々な場所で輻輳が発生し、システム全体に悪影響を及ぼしている。現在のネットワーク制御システムはすでに限界を迎えており、これらの対策は急務である。生体内機構、インターネット、そして道路交通ネットワークについて考察すると、そのネットワークを構成する要素は全く異なるが、システムの目的という観点から、全てのネットワーク系は一つのキーワードで結ぶことができる。それは系の処理がネットワーク全体の恒常性を保つことを目的として制御されていることである。これらのシステムは物質の過剰生産や、トラフィックの増大といったシステムを破壊しかねない要因から系を保護しているという点で一致している。また、物質に対する経路制御という点もシステム的に見て同等と考えられる。これらの共通点から、生体内の制御システムをインターネット、そして道路交通ネットワークへと導入する考えは、非常に理にかなった方法である。

本論文では、具体的に、代謝ネットワーク制御の一つである拮抗阻害反応型フィードバック制御機構をインターネットおよび道路交通システムへと導入し、制御アルゴリズムの設計を行った。設計したアルゴリズムは拮抗阻害反応の反応式が組み込まれた混雑指標と距離指標を持つ評価関数によって構成される。設計したアルゴリズムの評価を行うためにシミュレーション実験を行い、それぞれのアルゴリズムの性能評価を行った。

インターネットにおけるアルゴリズムの導入において、設計したアルゴリズムをシミュレーション実験により評価した。比較対象の制御システムとして、主要な制御アルゴリズムである SPF (Shortest Path First) と ECMP (Equal Cost Multi Path) を採用した。また、アルゴリズムの評価指標としてパケットの到達遅延時間 (Latency) を用いた。初めに、提案アルゴリズムの負荷分散機能の性能を評価した。その結果、提案したアルゴリズムはパケットの Latency において、比較対象のアルゴリズムと比べ非常に大きな優位性を持つ事が示された。また、アルゴリズムの耐障害性能について検証を行った。特定の時間に意図的にネットワーク内で障害を発生させ、アルゴリズムの障害への対応方法を観察した。実験結果では提案したアルゴリズムはシミュレーションを通して Latency の増大が発生せず、SPF、ECMP のどちらと比較しても非常に強い耐障害性を示した。これらの結果より、提案したアルゴリズムは負荷分散性と耐障害性という性質を併せ持つアルゴリズムであるといえる。また、提案したアルゴリズムを実問題へ適用するための検討も行った。インターネットのように莫大な数の制御点をもつネットワークでは全ての地点で制御方式を変更することは困難である。そこで、少ない制御点でも設計したアルゴリズムと同じ効果が得られる方法を提案し、シミュレーション実験によってその効果を確認した。その結果、提案アルゴリズムの効果をj得るために、ネットワーク内の全てのノードを置換する必要は無く、トラフィックの集中する場所を制御点として選

択することで全体の約10%のノード置換を行うだけで、提案アルゴリズムと同等の効果が得られることが示された。また、提案したアルゴリズムの評価関数のパラメータを調整することにより、新たなサービスの可能性を示した。アルゴリズムの評価関数には距離指標と混雑指標を結ぶ重み係数が存在する。この係数はどちらの指標をより考慮するかを決定するパラメータであり、この値を変更することによってデータの優先度を変更する方法を提案した。シミュレーション実験により、制御対象とするパケットを優先的に目的地に配送できることを示した。

道路交通ネットワークでは、インターネットで提案したアルゴリズムと同様の方法で評価関数を設計し、交通ネットワークにおける制御アルゴリズムを提案した。提案したアルゴリズムは道路ネットワーク内を通行する車両に指示を与え、車両の経路を指示する働きをするものである。設計したアルゴリズムの性能評価のため、交通シミュレータを用いてアルゴリズムの検証を行った。比較対象のアルゴリズムとして最短経路優先アルゴリズムを用いた。評価の指標としてDelayTimeを採用した。DelayTimeとは理想的な状態での到達時間と実際の到達時間の距離あたりの差を表す。実験の結果、提案したアルゴリズムは混雑が発生している道路区間に車両が流入する事を防ぎ、ネットワーク全体の負荷を分散化させる経路指示を行った。最短経路優先アルゴリズムと比較しても、DelayTimeの改善が確認された。また、突発的な事故に対する提案アルゴリズムの耐障害性についても検証を行った。障害は特定の時間に道路ネットワーク内の道路を封鎖することにより表現した。実験の結果、提案したアルゴリズムが障害の発生時には自律的に車両の経路を変更させ、ネットワーク全体の負荷を分散化させる様子が確認できた。また、最短経路優先アルゴリズムのシミュレーションでは事故後のネットワーク状況はすぐに改善せず、不安定な状態が続く。対して、提案アルゴリズムではシミュレーションを通して常に安定した状態を保ち、障害の発生に対して高い耐障害性を示した。提案したアルゴリズムを実際に適用する方法として、カーナビゲーションシステムの経路処理に組み込むことで、アルゴリズムで示した効率的な交通制御が行えると考えられた。

以上の結果は、細胞内の酵素フィードバック機構をインターネットと道路交通システムの制御に組み込むことで、生物が持つ負荷分散性と耐障害性を実現できる可能性を示したもので、生命情報科学、情報通信及び交通工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	ひらしまつよし 平島剛志 (宮崎県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第61号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	MATHEMATICAL MODELING OF BRANCHING MORPHOGENESIS IN ORGAN DEVELOPMENT (器官発生における分岐形態形成の数理モデル)
論文調査委員	(主査) 教授 巖佐 庸 (副査) 教授 舘田 英典 准教授 小早川 義尚

論文内容の要旨

分岐構造は生物の組織・臓器形成において普遍的に観察されている。特にほ哺乳類の腎臓と肺においては、共通の発生過程に依拠した分岐形態形成の様式が示唆されており、それは以下の三つの過程に大別できる。第一に、分岐形態形成に必須である分岐誘導因子が、上皮細胞の管先端からの拡散

性シグナルによる制御を受け、間充織細胞にて局在分布する。第二に、拡散性タンパク質である分岐誘導因子が、上皮細胞内の ERK 経路を活性化し、上皮細胞の細胞増殖や細胞走性を促す。第三に、細胞増殖や細胞走性の積み重ねの結果、管の先端が分岐誘導因子の局在位置に向かって伸長することにより分岐構造が形成される。つまり、分岐誘導因子の局在位置が決まり、その局在に向かって上皮の管が正確に伸長することが腎臓や肺の分岐形態形成の重要な発生過程といえる。本論文では、腎臓や肺で観察される上記の三つの発生過程それぞれに注目し、シグナルレベルでの動態から組織の形態変化まで幅広い現象の数理モデリングを示す。以下に各題目とその要旨を記す。

第一章：初期肺発生における Fgf10 発現の分岐局在機構について

脊椎動物の初期肺発生では、上皮の管である肺芽が器官の境界となる胸膜細胞に覆われた間充織に侵入し、伸長・先端二分岐・側枝分岐といった典型的な組織形態変化の積み重ねにより分岐パターンを作ることが知られている。肺芽の管が伸長しているときは Fgf10 発現のピークが管先端近くの間充織に一つ局在する一方で、先端二分岐や側枝分岐が起こるときには Fgf10 の局在が二つに分かれることが観察されている。本章では、Fgf10 の空間発現パターンを説明するために、器官のかたちを特徴づけ、幾何的な要素を考慮した Fgf10 発現制御の数理モデルを示す。このモデルでは Fgf10 発現の異なる局在パターンを幾何学的な条件の違いによって説明することができ、これらの結果は実験観察と一致する。すなわち、管先端と器官の境界との距離が大きいときには Fgf10 発現のピークが一つ形成されるのに対し、その距離が小さいときは Fgf10 発現のピークが二つに分かれる。さらに、二つに分かれた Fgf10 発現ピークの位置が境界の曲がり具合に依存することも示す。

第二章：初期腎臓発生における腎管芽の分岐形態形成モデリング

脊椎動物の初期腎臓発生では、腎管芽と呼ばれる上皮性細胞の管が伸長と先端二分岐を繰り返しながら複雑な分岐パターンを作っている。この腎管芽の分岐パターンは細胞増殖や化学走性による細胞移動などの時空間的な細胞レベルでの振る舞いの結果として形成されるものである。

本章では、管分岐形成を記述するためのコンピューショナルモデルを構築し、最終的な分岐形態が細胞増殖や細胞走性の時空間的な分布にどのように依存するのかを調べる。主要な結果として、細胞増殖の速さと化学走性による細胞移動速度の適切なバランスが正常な分岐形態形成に必要であることを示す。細胞増殖速度が細胞移動速度よりも速いときにはねじれパターンが形成され、逆の場合には膨張パターンが形成される。この結果は同様の条件下での変異体における管の異常形態と整合する。さらに、細胞増殖と細胞移動のバランスを特徴づける量を定義することにより、細胞レベルの振る舞いから最終的な分岐形態を予測することができることを示す。

第三章：細胞内 ERK 経路におけるシグナル遡及効果の数理的研究

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (ERK) シグナル経路はリン酸化・脱リン酸化を含む経路で、細胞増殖や細胞走性といった細胞応答に繋がっているため、分岐形態形成を含む様々な発生過程で重要な役割を果たす。近年、大腸菌とショウジョウバエによる実験で、ERK のリン酸化と ERK 活性の空間的な局在が、ERK 下流の基質によって調整されることが明らかにされた。しかし、ERK 下流の基質が ERK シグナルの性質を制御する機構についてはわかっていない。本章では、反応速度論に基づいた ERK シグナル経路の数理モデルを提案し、ERK 下流の基質が ERK と結合・解離することによって ERK のリン酸化活性度を変化させる機構について調べる。系に存在する基質量の増加に伴う ERK リン酸化活性度を増減が、基質と ERK との解離定数や ERK 経路が持つ化学反応の性質に依存することを示す。さらに、核特異的に局在する基質が、ERK のアンカーとなることで ERK の核局在を誘導することを明らかにし、実験結果と照らし合わせる。ERK 経路の下流の因

子がシグナル経路の入出力関係を変化させる遡及効果が発生過程において重要な点について議論する。

論文審査の結果の要旨

生物の組織・臓器形成において分岐構造の形成は幅広くみられる。特に哺乳類の腎臓と肺においては、間充織と上皮組織との出会う場所で分岐形態が形成され、それらの間には共通の発生過程に依拠した形成の様式がある。それはつぎの3ステップで遂行される。まず、拡散性タンパク質である分岐誘導因子が、上皮細胞の管先端からの拡散性シグナルによる制御を受け、間充織細胞にて局在分布するようになる。次に、分岐誘導因子が、上皮細胞内の ERK 経路を活性化し、上皮細胞の細胞増殖や細胞走性を促す。最後に、細胞増殖や細胞走性の積み重ねの結果、管の先端が分岐誘導因子の局在位置に向かって伸長することにより分岐構造が形成される。

本論文では、腎臓や肺で観察される上記の発生過程それぞれに注目し、シグナルレベルでの動態から組織の形態変化まで幅広い現象の数理モデリングを行った。

第一章：初期肺発生における Fgf10 発現の分岐局在機構について

脊椎動物の初期肺発生では、上皮の管である肺芽が器官の境界となる胸膜細胞に覆われた間充織に侵入し、伸長・先端二分岐・側枝分岐といった典型的な組織形態変化の積み重ねにより分岐パターンを作る。肺芽の管が伸長しているときは Fgf10 発現のピークが管先端近くの間充織に一つ局在する一方で、先端二分岐や側枝分岐が起こるときには Fgf10 の局在が二つに分かれる。本章では、Fgf10 の空間発現パターンを説明するために、器官のかたちを特徴づけ、幾何的な要素を考慮した Fgf10 発現制御の数理モデルを解析した。このモデルでは Fgf10 発現の異なる局在パターンを幾何学的な条件の違いによって説明することができ、これらの結果は実験観察と一致する。すなわち、管先端と器官の境界との距離が大きいときには Fgf10 発現のピークが一つ形成されるのに対し、その距離が小さいときは Fgf10 発現のピークが二つに分かれる。さらに、二つに分かれた Fgf10 発現ピークの位置が境界の曲がり具合に依存することも示す。

第二章：初期腎臓発生における腎管芽の分岐形態形成モデリング

脊椎動物の初期腎臓発生では、腎管芽と呼ばれる上皮性細胞の管が伸長と先端二分岐を繰り返しながら複雑な分岐パターンを作っている。この腎管芽の分岐パターンは細胞増殖や化学走性による細胞移動などの時空間的な細胞レベルでの振る舞いの結果として形成されるものである。

本章では、管分岐形成を記述するための計算機モデルを構築し、最終的な分岐形態が細胞増殖や細胞走性の時空間的な分布にどのように依存するのかを調べた。その結果、細胞増殖の速さと化学走性による細胞移動速度の適切なバランスが正常な分岐形態形成に必要であることが分かった。細胞増殖速度が細胞移動速度よりも速いときにはねじれパターンが形成され、逆の場合には膨張パターンが形成される。この結果は同様の条件下での変異体における管の異常形態を説明できる。さらに、細胞増殖と細胞移動のバランスを特徴づける量を定義することにより、細胞レベルの振る舞いから最終的な分岐形態を予測することができることを示した。

第三章：細胞内 ERK 経路におけるシグナル遡及効果の数理的研究

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (ERK) シグナル経路はリン酸化・脱リン酸化を含む経路で、細胞増殖や細胞走性といった細胞応答に繋がり、分岐形態形成を含む様々な発生過程で重要な役割を果たす。近年、大腸菌とショウジョウバエによる実験で、ERK のリン酸化活性化と ERK 活性の空間的な局在が、ERK 下流の基質によって調整されることが明らかにされた。しかし、ERK

下流の基質が ERK シグナルの性質を制御する機構についてはわかっていない。本章では、反応速度論に基づいた ERK シグナル経路の数理モデルを提案し、ERK 下流の基質が ERK と結合・解離することによって ERK のリン酸活性度を変化させる機構について調べた。系に存在する基質量の増加に伴う ERK リン酸活性度を増減が、基質と ERK との解離定数や ERK 経路が持つ化学反応の性質に依存することを示した。さらに、核特異的に局在する基質が、ERK のアンカーとなることで ERK の核局在を誘導することを明らかにし、実験結果を説明した。ERK 経路の下流の因子がシグナル経路の入出力関係を変化させる遡及効果の発生過程での役割を議論した。

以上の研究は、数理生物学および発生生物学として、重要な貢献である。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	しばた とし お 柴田 俊生 (福岡県)		
学位の種類	博士 (理学)		
学位記番号	シ生博甲第62号		
学位授与の日付	平成23年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻		
学位論文題目	Functional Studies on Transglutaminase that Controls Cuticle Morphogenesis in <i>Drosophila</i> (外皮形成におけるショウジョウバエトランスグルタミナーゼの機能研究)		
論文調査委員	(主査) 教授	川畑 俊一郎	
	(副査) 教授	石原 健	教授 下東 康幸
		准教授	小柴 琢己

論文内容の要旨

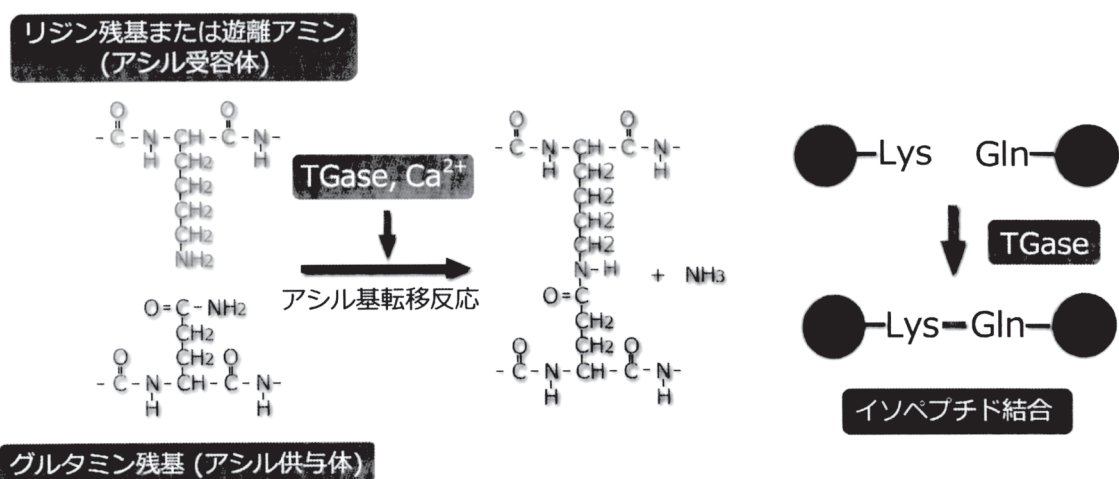
トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質のリジン残基またはアミンのアミノ基をアシル受容体、グルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とするアシル転移酵素である (参考図 1)。この反応によって、タンパク質間にイソペプチド結合が形成されることにより、哺乳類においては皮膚形成や血液凝固、また、アポトーシスなどの生理機能を果たしている。一方、無脊椎動物における TGase の機能はほとんど不明であった。これまでにカブトガニにおいては、外骨格タンパク質の多くが TGase の基質であり、その多くがキチン結合性を有していること、ザリガニにおいては、TGase が体液凝固に関与していることなどが分かっている。本研究では、TGase の生体内での詳細な機能を解明するために、モデル生物であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて実験を行った。ヒトでは 8 種類の TGase アイソザイムが報告されているが、ショウジョウバエでは TGase の遺伝子はゲノム上に 1 つしか存在せず、TGase の機能解析に優れた生物だと言える。

Drosophila の TGase は、ウエスタンブロットや活性測定により、発生段階特異的に発現していることが分かった。特に 3 齢幼虫と、成虫において顕著に発現していた。また、成虫では創傷によって TGase の発現量が、創傷後 2 時間で約 3 倍に増加した。哺乳類では、血液中の TGase が創傷治癒に関与していることが判明しているため、*Drosophila* においても同じく創傷治癒を行っているかと推定される。次に、TGase の生理機能を調べるために GAL4-UAS システムを用いた RNAi を行った。全身で RNAi を行うと、蛹の段階で大部分が致死となり、羽化率は約 20% で

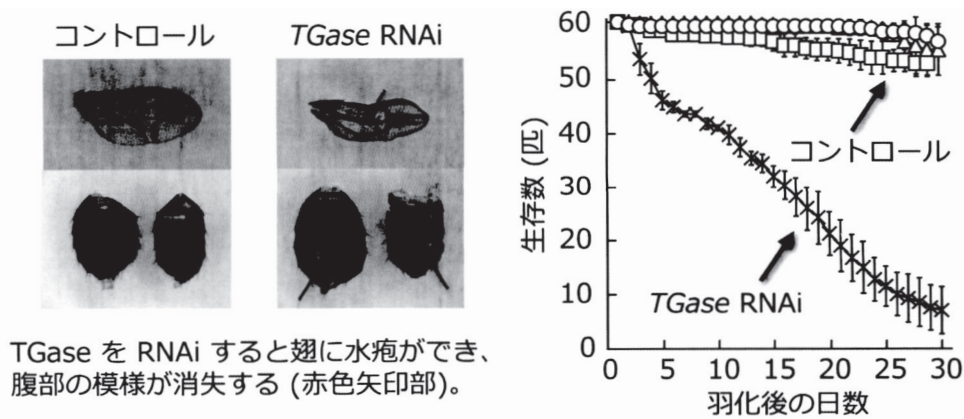
あった。また、成虫になっても高い致死性を示し、羽化後 30 日で約 90% が致死となった。さらに、外皮においては、翅の水疱形成や腹部のメラニン化消失といった表現型が見られた (参考図 2)。さらに、各発生段階での TGase の重要性を調べるために、温度感受性の変異体を用いた解析を行った。すると、TGase は羽化する前の形態形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に外皮形成に影響をおよぼす TGase の基質を同定する目的で、翅からタンパク質の抽出を行った。野生型では羽化後 30 分で抽出されたタンパク質は、羽化後 24 時間経過すると抽出されなくなった。これらのタンパク質は、TGase 依存的、または非依存的に架橋されて、翅の構成成分になったと推定される。一方、TGase を RNAi した個体では羽化後 24 時間経過しても複数のタンパク質が抽出された。これらのタンパク質は形態形成における、TGase 依存的な架橋反応の基質タンパク質と推定されたので、全 12 種類について質量分析による解析を行った。その結果、数種類の機能不明タンパク質やキチン結合タンパク質が同定された。それぞれのタンパク質の外皮形成における機能を調べるために、全身、または翅特異的な RNAi を行った。まず、全身で RNAi したところ、7 種類が致死となった。また、血漿中のタンパク質である *LSP2* とキチン結合モチーフを有する *Cpr76Bd* については、TGase を RNAi したときと同様に、腹部のメラニン化の消失が起こった。さらに、致死となった 7 種類について翅特異的に RNAi を行ったところ、キチン結合モチーフを有する *Cpr97Eb* については翅が上方に曲がり、また、C 型レクチンドメインを有する *Clect27* は翅脈の一部分 (前横脈) が消失した。RNAi で外皮に異常が見られたタンパク質のうち、*Cpr97Eb* と *Clect26* について、大腸菌を用いた組換え体の作製を行った。それぞれの組換え体を、TGase 存在下で TGase の合成基質であるビオチン化ペンチルアミンと反応させたところ、どちらのタンパク質についても TGase 依存的な合成基質の取り込みが確認された。また、両タンパク質は昆虫外皮の主成分であるキチンと特異的に結合することも分かった。

以上より、*Drosophila* の TGase は、発生や外皮の形成、また生存に重要な役割を果たしていることが判明した。



参考図 1 : TGase によるタンパク質の架橋形成



参考図 2 : TGase を RNAi によりノックダウンした個体の表現型と生存数

論文審査の結果の要旨

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、哺乳類では、タンパク質の Gln と Lys の側鎖間にイソペプチド結合を形成して皮膚形成や血液凝固、アポトーシスなどに関与する。これまで、無脊椎動物においては、カブトガニの外骨格タンパク質の多くが TGase の基質であり、その多くがキチン結合性を有していること、ザリガニの TGase が体液凝固に関与していることが判明している。本研究では、無脊椎動物での TGase の機能を *in vivo* で解明するために、黄色ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いて実験を行った。ヒトでは 8 種類の TGase アイソザイムが報告されているが、*Drosophila* の TGase 遺伝子はゲノム上に 1 個しか存在せず、TGase の機能解析に優れているモデル生物と考えられる。

Drosophila の TGase は、ウエスタンブロットや活性測定により、発生段階特異的に発現しており、特に 3 齢幼虫と成虫において顕著であった。一方、成虫では創傷によって TGase の発現量が、創傷後 2 時間で約 3 倍に増加した。哺乳類では、血液中の TGase が創傷治癒に関与しているが、*Drosophila* においても創傷治癒に関与していることが推定された。全身で RNAi を行くと、蛹の段階で大部分が致死となり、羽化率は約 20% であった。また、成虫になっても高い致死性を示し、羽化後 30 日で約 90% が致死となった。さらに、翅の水疱形成や腹部のメラニン化消失といった表現型が見られた。温度感受性の変異体を用いて各発生段階で解析したところ、羽化前の外皮形成において重要な役割を果たしていることが判明した。

次に TGase 基質を同定する目的で、翅からタンパク質の抽出を行った。野生型では羽化後 30 分で抽出されたタンパク質は、羽化後 24 時間経過すると抽出されなくなった。これらのタンパク質は、TGase 依存的、または非依存的に架橋されたと推定される。一方、TGase を RNAi した個体では羽化後 24 時間経過しても複数のタンパク質が抽出された。これらのタンパク質は外皮形成における、TGase 基質タンパク質と推定されたので、全 12 種類について質量分析による解析を行った。その結果、数種類の機能不明タンパク質やキチン結合タンパク質が同定された。それぞれの基質タンパク質に対して、全身、または翅特異的な RNAi を行った。まず、全身で RNAi したところ、7 種類が致死となった。また、血漿中のタンパク質である *LSP2* とキチン結合モチーフを有する *Cpr76Bd* については、TGase を RNAi したときと同様に、腹部のメラニン化の消失が起こった。さらに、致死となった 7 種類について翅特異的に RNAi を行ったところ、キチン結合モチーフを有する *Cpr97Eb* については翅が上方に曲がり、また、C 型レクチンドメインを有する *Clect27* は翅脈の一部 (前横脈) が消失した。RNAi で外皮に異常が見られたタンパク質のうち、*Cpr97Eb* と *Clect26* について、大腸菌を用いた組換え体の作製を行った。

それぞれの組換え体を、TGase 存在下で TGase の合成基質であるビオチン化ペンチルアミンと反応させたところ、どちらのタンパク質についても TGase 依存的な合成基質の取り込みが確認された。また、両タンパク質は昆虫外皮の主成分であるキチンと特異的に結合することも分かった。

以上の以上の結果は、TGase とその基質群が外皮形成に必須であることを *Drosophila* を用いて初めて示した研究であり、較免疫学や生化学の分野において価値ある業績であると認められる。

よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	なしろ ち か 名城千香 (沖縄県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第68号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Studies on recruiting mechanisms of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, to Pex26p on peroxisome membrane (ペルオキシソーム膜上のPex26pに対するAAAペルオキシシン、Pex1pとPex6pの局在化機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 藤木幸夫 (副査) 教授 近藤久雄 准教授 田村茂彦 准教授 岡敏彦

論文内容の要旨

ペルオキシソームは酵母からヒトに至る真核生物全般に広く存在する、球状ないし楕円形の一重単位膜で囲まれた細胞内小器官である。ペルオキシソームの機能としては極長鎖脂肪酸の β -酸化、プラズマローゲンやコレステロールの生合成など様々な代謝経路に関与していることが知られている。ペルオキシソームの重要性は、ヒトにおいてペルオキシソームの形成不全が重篤な先天性代謝異常を引き起こすことから示されている。現在までにヒトペルオキシソーム欠損症は14の異なる相補性群に分類されており、ペルオキシソーム形成過程には多数のペルオキシソーム構成因子(*PEX*遺伝子、その遺伝子産物をペルオキシシンと呼称)が関与することが示唆される。分子レベルでのペルオキシソーム形成過程の解明を目的として、これまでにこれらペルオキシシンの解析が精力的に行われてきた。特に新規に合成されたペルオキシソームマトリックスタンパク質のペルオキシソームへの輸送メカニズムは、詳細な研究が行われてきた。しかしながら、未解明な点も多数残されている。これまでに同定されたペルオキシシンのうち、ATPをエネルギーとして変換し利用するATPaseはPex1pとPex6pのみである。本研究において私は、Pex1pとPex6pのペルオキシソームへの局在化および機能に関するATPの必要性について、詳細な解析を試みた。

1) Pex1p, Pex6p のペルオキシソーム膜上レセプターPex26p との結合領域の同定

Pex1pとPex6pはペルオキシソームとサイトゾル両局在性であり、ペルオキシソーム局在型はペルオキシソーム膜上のPex26pをレセプターとしてアンカーされている。Pex26pはN末端側をサイトゾルへ、C末端側をペルオキシソーム内腔へと配向した一回膜貫通型膜タンパク質である。よって、Pex26pのN末端側でPex1pやPex6pと結合すると推察された。そこでまず、Pex26pの

る。これまでに同定されたペルオキシソムのうち、ATPをエネルギーとして変換し利用するATPaseはPex1pとPex6pのみである。本研究において私は、Pex1pとPex6pのペルオキシソムへの局在化および機能に関するATPの必要性について、詳細な解析を試みた。

1) Pex1p, Pex6pのペルオキシソム膜上レセプターPex26pとの結合領域の同定

Pex1pとPex6pはペルオキシソムとサイトゾル両局在性であり、ペルオキシソム局在型はペルオキシソム膜上のPex26pをレセプターとしてアンカーされている。Pex26pはN末端側をサイトゾルへ、C末端側をペルオキシソム内腔へと配向した一回膜貫通型膜タンパク質である。よって、Pex26pのN末端側でPex1pやPex6pと結合すると推察された。そこでまず、Pex26pのN末端側欠損変異体を数種作製し、PEX26欠損性CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞ZP167に導入した。Pex1pやPex6pの細胞内局在を形態学的に観察したところ、Pex26pの33-40アミノ酸領域を欠損するとPex1pとPex6pのペルオキシソムへの局在が著減した。また、Pex26pのN末端側欠損変異体を発現させたZP167細胞において、ペルオキシソムマトリックスタンパク質であるカタラーゼ、PTS1-, PTS2-タンパク質の細胞内局在を形態学的に観察した結果、Pex26pの33-40アミノ酸領域を欠損させると、これらのペルオキシソムマトリックスタンパク質輸送が観察されなくなった。このことから、Pex26pの33-40アミノ酸領域がPex1pとPex6pのペルオキシソム局在に必須であると同時に、ペルオキシソムマトリックスタンパク質輸送にも必須であることを解明した。Pex1pとPex6pの正常なペルオキシソムへの局在がペルオキシソムマトリックスタンパク質輸送に重要であると推察された。

2) Pex1pとPex6pの局在化機構の解析

セミインタクト細胞系を用いて、サイトゾル中のPex1pとPex6pがPex26p依存的にペルオキシソムへ局在化するアッセイ系を構築した。これまでに我々の研究グループ並びに他の研究グループが、Pex26p-Pex6pとPex6p-Pex1pの相互作用によりPex26pがPex1pとPex6pをペルオキシソムへリクルートすることを報告していたが、セミインタクト細胞系においてもPex6pを介してPex26pとPex1pは相互作用し、ペルオキシソム膜上で三者複合体を形成することを示した。この系において、ATPaseドメインに変異を導入したPex1pやPex6pを用いた実験、及びATPase阻害剤を用いた実験を行った結果、Pex1pはATP加水分解依存的にペルオキシソムへと局在化し、Pex6pはATP結合依存的にペルオキシソムへと局在化することが明らかとなった。また、反応温度を4°Cから26°CへとシフトするとPex26pに対するPex1pとPex6pの結合量が増したことから、温度依存性があることが示唆された。

3) Pex1pとPex6pの構造変化解析

リコンビナントのPex1pとPex6pを精製し、トリプシンによってタンパク質限定加水分解を行った結果、ATP非存在下よりもATP存在下では、Pex1pとPex6pのトリプシン耐性が増し、分解を受けにくくなることが明らかとなった。Pex1pとPex6pはATPの結合・加水分解を通して、よりコンパクトで固い構造に変化し、トリプシンのアタックを受け難くなることが示唆された。

Pex1pとPex6pは、共にAAA ATPaseファミリーに属し高い相同性をもっているにもかかわらず、異なる形式でATPを利用することによってその局在が制御されていることを示した。また、Pex1pとPex6pの局在変化がペルオキシソムマトリックスタンパク質輸送の制御に影響を与える可能性を示唆した。

以上の結果は、生命科学、分子細胞生物学の分野において価値ある業績と認められる。よって、本申請者は、博士(理学)学位を受ける資格があるものと認める。

N 末端側欠損変異体を数種類作製し、*PEX26* 欠損性 CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞 ZP167 に導入した。Pex1p や Pex6p の細胞内局在を形態学的に観察したところ、Pex26p の 33-40 アミノ酸領域を欠損すると Pex1p と Pex6p のペルオキシソームへの局在が著減した。また、Pex26p の N 末端側欠損変異体を発現させた ZP167 細胞において、ペルオキシソームマトリックスタンパク質であるカタラーゼ、PTS1、PTS2-タンパク質の細胞内局在を形態学的に観察した結果、Pex26p の 33-40 アミノ酸領域を欠損させると、これらのペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送が観察されなくなった。このことから、Pex26p の 33-40 アミノ酸領域が Pex1p と Pex6p のペルオキシソーム局在に必須であると同時に、ペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送にも必須であることを明らかにした。Pex1p と Pex6p の正常なペルオキシソームへの局在がペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送に重要であると推察された。

2)Pex1p と Pex6p の局在化機構の解析

セミインタクト細胞系を用いて、サイトゾル中の Pex1p と Pex6p が Pex26p 依存的にペルオキシソームへ局在化するアッセイ系を構築した。これまでに我々の研究グループ並びに他の研究グループが、Pex26p-Pex6p と Pex6p-Pex1p の相互作用により Pex26p が Pex1p と Pex6p をペルオキシソームへリクルートすることを報告していたが、セミインタクト細胞系においても Pex6p を介して Pex26p と Pex1p は相互作用し、ペルオキシソーム膜上で三者複合体を形成することを示した。この系において、ATPase ドメインに変異を導入した Pex1p や Pex6p を用いた実験、及び ATPase 阻害剤を用いた実験を行った結果、Pex1p は ATP 加水分解依存的にペルオキシソームへと局在化し、Pex6p は ATP 結合依存的にペルオキシソームへと局在化することが明らかとなった。また、反応温度を 4°C から 26°C へとシフトすると Pex26p に対する Pex1p と Pex6p の結合量が増したことから、温度依存性があることが示唆された。

3)Pex1p と Pex6p の構造変化解析

リコンビナントの Pex1p と Pex6p を精製し、トリプシンによってタンパク質限定加水分解を行った結果、ATP 非存在下よりも ATP 存在下では、Pex1p と Pex6p のトリプシン耐性が増し、分解を受けにくくなることが明らかとなった。Pex1p と Pex6p は ATP の結合・加水分解を通して、よりコンパクトで固い構造に変化し、トリプシンのアタックを受け難くなることが示唆された。

Pex1p と Pex6p は、共に AAA ATPase ファミリーに属し高い相同性をもっているにもかかわらず、異なる形式で ATP を利用することによってその局在が制御されていることを示した。また、Pex1p と Pex6p の局在変化がペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送の制御に影響を与える可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

ペルオキシソームは酵母からヒトに至る真核生物全般に広く存在する、球状ないし楕円形の一重単位膜で囲まれた細胞内小器官である。ペルオキシソームの機能としては極長鎖脂肪酸の β -酸化、プラズマローゲンやコレステロールの生合成など様々な代謝経路に関与していることが知られている。ペルオキシソームの重要性は、ヒトにおいてペルオキシソームの形成不全が重篤な先天性代謝異常を引き起こすことから示されている。現在までにヒトペルオキシソーム欠損症は14の異なる相補性群に分類されており、ペルオキシソーム形成過程には多数のペルオキシソーム構成因子 (*PEX* 遺伝子、その遺伝子産物をペルオキシシンと呼称) が関与することが示唆される。分子レベルでのペルオキシソーム形成過程の解明を目的として、これまでにこれらペルオキシシンの解析が精力的に行われてきた。特に新規に合成されたペルオキシソームマトリックスタンパク質のペルオキシソームへの輸送メカニズムは、詳細な研究が行われてきた。しかしながら、未解明な点も多数残されている

る。これまでに同定されたペルオキシソームのうち、ATPをエネルギーとして変換し利用するATPaseはPex1pとPex6pのみである。本研究において私は、Pex1pとPex6pのペルオキシソームへの局在化および機能に関するATPの必要性について、詳細な解析を試みた。

1) Pex1p, Pex6pのペルオキシソーム膜上レセプターPex26pとの結合領域の同定

Pex1pとPex6pはペルオキシソームとサイトゾル両局在性であり、ペルオキシソーム局在型はペルオキシソーム膜上のPex26pをレセプターとしてアンカーされている。Pex26pはN末端側をサイトゾルへ、C末端側をペルオキシソーム内腔へと配向した一回膜貫通型膜タンパク質である。よって、Pex26pのN末端側でPex1pやPex6pと結合すると推察された。そこでまず、Pex26pのN末端側欠損変異体を数種作製し、PEX26欠損性CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)細胞ZP167に導入した。Pex1pやPex6pの細胞内局在を形態学的に観察したところ、Pex26pの33-40アミノ酸領域を欠損するとPex1pとPex6pのペルオキシソームへの局在が著減した。また、Pex26pのN末端側欠損変異体を発現させたZP167細胞において、ペルオキシソームマトリックスタンパク質であるカタラーゼ、PTS1-, PTS2-タンパク質の細胞内局在を形態学的に観察した結果、Pex26pの33-40アミノ酸領域を欠損させると、これらのペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送が観察されなくなった。このことから、Pex26pの33-40アミノ酸領域がPex1pとPex6pのペルオキシソーム局在に必須であると同時に、ペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送にも必須であることを解明した。Pex1pとPex6pの正常なペルオキシソームへの局在がペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送に重要であると推察された。

2) Pex1pとPex6pの局在化機構の解析

セミインタクト細胞系を用いて、サイトゾル中のPex1pとPex6pがPex26p依存的にペルオキシソームへ局在化するアッセイ系を構築した。これまでに我々の研究グループ並びに他の研究グループが、Pex26p-Pex6pとPex6p-Pex1pの相互作用によりPex26pがPex1pとPex6pをペルオキシソームへリクルートすることを報告していたが、セミインタクト細胞系においてもPex6pを介してPex26pとPex1pは相互作用し、ペルオキシソーム膜上で三者複合体を形成することを示した。この系において、ATPaseドメインに変異を導入したPex1pやPex6pを用いた実験、及びATPase阻害剤を用いた実験を行った結果、Pex1pはATP加水分解依存的にペルオキシソームへと局在化し、Pex6pはATP結合依存的にペルオキシソームへと局在化することが明らかとなった。また、反応温度を4°Cから26°CへとシフトするとPex26pに対するPex1pとPex6pの結合量が増したことから、温度依存性があることが示唆された。

3) Pex1pとPex6pの構造変化解析

リコンビナントのPex1pとPex6pを精製し、トリプシンによってタンパク質限定加水分解を行った結果、ATP非存在下よりもATP存在下では、Pex1pとPex6pのトリプシン耐性が増し、分解を受けにくくなることが明らかとなった。Pex1pとPex6pはATPの結合・加水分解を通して、よりコンパクトで固い構造に変化し、トリプシンのアタックを受け難くなることが示唆された。

Pex1pとPex6pは、共にAAA ATPaseファミリーに属し高い相同性をもっているにもかかわらず、異なる形式でATPを利用することによってその局在が制御されていることを示した。また、Pex1pとPex6pの局在変化がペルオキシソームマトリックスタンパク質輸送の制御に影響を与える可能性を示唆した。

以上の結果は、生命科学、分子細胞生物学の分野において価値ある業績と認められる。よって、本申請者は、博士(理学)学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	た なか よう すけ 田 中 陽 介 (京都府)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第69号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Defecation behavior in the grasshopper <i>Atractomorpha lata</i> (Orthoptera: Pyrgomorphidae) : quantitative studies on frass-kicking behavior and adaptive significance of the behavior (オンブバッタ <i>Atractomorpha lata</i> (バッタ目: オンブバッタ科) の排泄行動: フンけり行動の定量的研究と適応的意義)
論文調査委員	(主査) 准教授 粕谷英一 (副査) 教授 矢原徹一 教授 高木正見

論文内容の要旨

動物は食物を摂取し排泄物を体外に出す。採餌行動は、生態学の重要な研究課題である捕食者-被食者間相互作用や食物網、最適採餌戦略等と関連し、古くから様々な研究が行われてきた。一方で排泄行動はこれまでほとんど注目されてこなかった。しかし排泄物自体には様々な生態学的な機能があり、排泄物が捕食者-被食者の関係や同種他個体に対する作用を持つことや、病原体への感染源となることが知られている。このため、排泄行動は動物の適応度に影響していることが予想される。実際に昆虫では、捕食者に対する化学的・物理的防御の機能を持つフンで自身の体を覆う種や、フンを遠くに飛ばすことで、フンに誘引される捕食者を回避する種が知られている。これらの例から、排泄物を自身からどれくらいの距離に置か(排泄者と排泄物の間の距離)は、排泄行動の適応的意義や排泄物の機能を明らかにする上で重要であると考えられる。

バッタ目の複数の科から、フンを排泄中に後脚でそのフンをけり飛ばす行動(以下「フンけり行動」と呼ぶ)が存在すること自体は報告されているが、それ以上の研究は全く行われていない。オンブバッタ *Atractomorpha lata* も野外や実験室内で頻繁にフンけり行動を行う。またフンをけらずに排泄口から落とすこともある。本研究では、まずオンブバッタのフンけり行動を定量的に調べ、けり飛ばされたフンの飛距離を調べた。またフンけり行動の適応的意義の解明に役立つと考えられる、飛距離に影響する要因や、フンをける割合について明らかにした。次に、フンけり行動の適応的意義として考えられる3つの仮説が正しいか調べた。

成虫を用いて、けったフンの飛距離を測定した結果、平均飛距離はオスで252mm、メスで487mmで、体長の10倍以上の距離フンを飛ばしていた(体長:オス約25mm、メス約40mm)。性が飛距離に有意に影響しており、メスのほうが飛距離が長かった。腿節長やフンの体積はメスの方が大きく、フンの長さをフンの直径で割った値はオスのほうが大きかった。これら3つの要因の飛距離への効果を解析したところ、いずれもオスメスを一緒にして解析すると飛距離に影響していたが、オスメス別にみると影響していなかった。この結果は、飛距離の性差は腿節長やフンの体積、フンの形(フンの長さを直径で割った値)の性差によるのではないことを示唆している。

2齡幼虫から成虫にかけてのフンをける割合を調べた。排泄行動を、A,フンを1回のけりで飛ばす、B,1回のけりで飛ばせない(けりミス)、C,けらないで排泄、の3つの型に分けて記録し、フンをける割合($(A+B)/(A+B+C)$)と、けりミス割合($B/(A+B)$)を計算した。フンをける割合は雌雄共にどの成長段階でもほぼ65%から80%で、性による違いはなく、成長段階との相関もなかった。けりミス割合は多くて約20%で、雌雄共に成長するに従って増加した。このため成長するに従ってフンをけり飛ばすことが難しくなる可能性が考えられる。雌雄両方が体長の10倍以上フンをけり飛ばしていたことや、フンをける割合が雌雄ともに高かったことから、フンを自

身から遠ざけることは雌雄両方に利益をもたらしていると考えられる。フンけり行動によって得られる利益は雌雄両方で共通している可能性が高いが、フンの飛距離に雌雄間で差があったことから、フンをけて得られる利益に、雌雄間で一部または量的な違いがある可能性もある。また、幼虫期と成虫期両方でフンをけていたことから、フンけり行動は卵の時期を除くすべての成長段階で利益をもたらしていると考えられる。

フンけり行動の適応的意義に関して、以下の3つの仮説が正しいか調べた。仮説は、上記の結果や、昆虫の排泄物や排泄行動に関するこれまでの研究を参考にした：①捕食者がオンブバッタのフンを手がかりにして探索する（捕食者がバッタのフンに誘引される）、②フンが同種他個体に対するシグナルとして働いている（同種他個体がフンに誘引されたりフンを忌避したりする）、③フンが病原体への感染源となる（フンが近くにあることで生存率や成長に負の影響が出る）。

まず、捕食者がバッタのフンに反応するかを明らかにするため、バッタの捕食者であるチョウセンカマキリ *Tenodera angustipennis* とオオズアリ *Pheidole noda* を用いて、オンブバッタのフンに対する反応を調べた。カマキリとアリどちらも、バッタのフンのある場所での滞在時間が長くなるなどの反応は示さなかった。次に、オンブバッタの成虫と1齢幼虫を用いて、同種他個体のフンに対する反応を調べた。オンブバッタは同種他個体のフンに誘引される、またはフンを忌避するような反応を示さなかった。最後に、オンブバッタの孵化幼虫を成虫まで飼育し、飼育容器内のフンを除去する頻度の違いが、オンブバッタの生存率や成虫までの日数、成虫までの齢数、腿節長、跳躍距離に与える影響を調べた。フンを除去する頻度の違いは、生存率等のいずれに対しても影響を与えていなかった。以上のように、本研究では3つの仮説はどれも支持されなかった。バッタのフンけり行動には他の適応的意義がある可能性や、実験条件の問題により効果が検出されなかった可能性が考えられる。

本研究は、オンブバッタのフンけり行動を定量的に調べ、オンブバッタがフンを遠くにそして頻繁にけり飛ばしていることを明らかにした。またメスの方が遠くに飛ばしており、この飛距離の性差が、腿節長やフンの体積、フンの形の性差によるのではないことを明らかにした。さらにその適応的意義について、3つの仮説（捕食者がオンブバッタのフンを手がかりにして探索する、フンが同種他個体に対するシグナルとして働いている、フンが病原体への感染源となる）が支持されないことを示した。本研究は、ほとんど注目されていない排泄行動自体を生態学的視点から定量的に調査したものであり、今後の排泄行動研究の標準となりうるものである。

論文審査の結果の要旨

本研究は、オンブバッタの排泄行動とその適応的な意義を生態学ならびに動物行動学的な解析により検討したものである。まず、オンブバッタは後脚の片方により糞を体長の約10倍程度の距離を蹴りとばすという特徴的な排泄行動を行うことを示し、この行動が幼虫・成虫いずれにおいても一貫して見られることを示した。蹴る際に糞が飛ばないことが10%以下の頻度で見られ、この蹴りとばし失敗の頻度は齢とともに高くなることを示した。糞の飛距離は、メスにおいてオスよりも長かったが、体サイズや糞自体の特徴のいずれとも関係していなかった。糞の存在が捕食者を誘引する効果がある、同種の他個体の行動に影響を与える、糞をした個体自身の生存や成長に負の影響を与えるという3つの可能性を検討したが、いずれについても効果はみられなかった。

以上の研究は排泄行動について重要な知見を得たものとして生態学において価値ある業績であると認める。

よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	よしだ たかのり 吉田 貴徳 (福岡県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第70号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Molecular population genetics of a common pioneer tree, <i>Zanthoxylum ailanthoides</i> Siebold & Zucc. (Rutaceae). (典型的パイオニア種カラスザンショウの分子集団遺伝学的研究)
論文調査委員	(主査) 教授 館田 英典 (副査) 教授 矢原 徹一 准教授 Alfred Edward Szmidt 講師 楠見 淳子

論文内容の要旨

研究の背景

生物集団の遺伝的な変異を解析する分子集団遺伝学的研究は近年盛んに行われており、集団遺伝学や生態学、進化学などの多くの分野において新たな知見をもたらしている。これらの研究ではアロザイム変異、AFLP (amplified length polymorphism)、SSR (single sequence repeat)、SNP (single nucleotide polymorphism)、DNA 塩基配列等を解析することで集団内や集団間の遺伝的多様性のパターンを観察する。観察された遺伝的多様性のパターンが、自然淘汰や遺伝的浮動等の進化的な力や生物の生態的特徴にどのような影響を受け形成されているのかを解明することを目的としている。人間やキイロシヨウジョウバエといったモデル生物や経済的に重要な穀物等が主な研究材料として用いられてきたが、生態的、進化的に興味深い非モデル生物の研究も、新しい解析手法の開発等により可能となってきた。

樹木は陸上の生態系における優占種であり様々な特徴を持つ種が存在するため、その適応的進化の分子的基盤や、遺伝的多様性のパターンの形成に関与する要因の解明は興味深い研究課題である。本研究に用いた樹木カラスザンショウ(*Zanthoxylum ailanthoides*)は、日本に生育する典型的なパイオニア樹種である。カラスザンショウは、ミカン科サンショウ属の落葉高木で、中国、朝鮮半島、日本列島などに分布している。日本の照葉樹林では典型的なパイオニア種であり、生育条件や生活史が極相種とは異なっている。私は、カラスザンショウの遺伝的構造や塩基多型のパターンとその形成に関与している要因の解明を目的とした、分子集団遺伝学的研究を行った。以下に、主な研究結果と本論文中での記載箇所を示す。

本論文の第3章では、カラスザンショウの遺伝的構造と適応進化による selective sweep が起こったと考えられる遺伝子座についての研究結果を示している。本種の遺伝的構造を解明するために、10の自然集団から256個体を採集し、9つのSSRマーカーを用いて解析を行なった。その結果、集団間の遺伝的分化は樹木としては非常に大きく($R_{ST} = 0.318$ 、 R_{ST} は遺伝的分化の指標であり、0~1の値を示す)、集団間の遺伝的分化と地理的距離との間には有意な正の相関があることが分かった。また、先行研究ではデンプン合成経路に関与する遺伝子ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (*agpL*)で、有利な突然変異が選択されることにより周囲の多型が減少する selective sweep が起こっていることが示唆されていた。本研究において *agpL* の塩基多型を解析したところ、日本の分布域全体にわたって変異がほとんどないことが示された。集団の遺伝的構造の解析結果を基にシミュレーションを行なったところ、*agpL* の変異の減少は、中立進化を仮定すると極めて起こり

にくいことが示された。これらの結果は *agpL* での selective sweep の可能性を強く示唆している。

本論分の第 4 章では、複数の核遺伝子座を用いた集団の歴史の推定についての研究結果を示している。集団の歴史(demographic history)についての知見は、自然淘汰の検出や集団の進化的歴史の解明に必要である。SSR マーカーを用いた研究では、最終氷期(70000~15000 年前)には九州南部に避難所(レフュージア)となる集団が存在したことが示唆されたが、集団の動態の時間スケールや、他の地域にレフュージアが存在していた可能性については、明確な結論は得られなかった。そこで、本研究では、自然集団における 26 の核遺伝子座の塩基配列を Isolation with Migration (IM) モデルを用いて解析した。解析には、九州南部集団、九州南部集団から最も遺伝的分化の大きかった伊豆半島集団、その他 4 つの自然集団を用いた。その結果、九州南部集団と伊豆半島集団の間の分岐年代は、異なる突然変異率を仮定すると、約 4000 年から 23000 年と推定された。他の集団間の分岐年代はこれと同程度か、より最近に分岐したことが示された。また、九州南部集団と屋久島集団の集団サイズの推定値は、他の集団よりも大きかった。これらの結果から、本種は最終氷期の寒冷期が終わった後に、九州南部から分布域を拡大したことが示唆された。一方、祖先集団の集団サイズは、現在の集団よりも大きかったと推定された。また、伊豆半島集団から九州南部集団に向けた遺伝子流動が起きていた可能性が示唆された。これらは予期しなかった結果であり、最終氷期以降に集団の縮小や隣接する集団からの移住などのより複雑な集団の歴史が存在する可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

生物集団の遺伝的な変異を解析する分子集団遺伝学的研究は、集団遺伝学や生態学、進化学などにおいて新たな知見をもたらしている。これらの研究では集団内や集団間の遺伝的多様性のパターンが、自然淘汰や遺伝的浮動等の進化的な力や生物の生態的特徴にどのような影響を受け形成されているのかを解明することを目的としている。これまで主にモデル生物が研究材料として用いられてきたが、生態的、進化的に興味深い非モデル生物の研究も、新しい解析手法の開発等により可能となってきた。

樹木は陸上生態系における優占種であり様々な特徴を持つ種が存在するため、その適応的進化の分子的基盤や、遺伝的多様性のパターン形成に関与する要因の解明は興味深い研究課題である。本研究に用いた樹木カラスザンショウ (*Zanthoxylum ailanthoides*) は、ミカン科ザンショウ属の落葉高木で、中国、朝鮮半島、日本列島などに分布している。日本の照葉樹林では典型的なパイオニア種であり、生育条件や生活史が大きく極相種とは異なっている。本研究では、カラスザンショウの遺伝的構造や塩基多型のパターンとその形成に関与している要因の解明を目的とした、分子集団遺伝学的研究を行われた。以下に、主な研究成果を示す。

本論文の第 3 章では、カラスザンショウの遺伝的構造と適応進化による selective sweep が起こったと考えられる遺伝子座についての研究結果を示している。本種の遺伝的構造を解明するために、10 の自然集団から 256 個体を採集し、9 つの SSR マーカーを用いて解析を行なった。その結果、集団間の遺伝的分化は樹木としては非常に高く(遺伝的分化の指標 $R_{ST} = 0.318$)、集団間の遺伝的分化と地理的距離との間には有意な正の相関があることが分かった。また、先行研究で示唆されたデンプン合成経路に関与する遺伝子 ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit (*agpL*) での局地的な selective sweep が(適応進化による連鎖した領域での多型減少)、日本の分布域全体で起こっていることが示された。シミュレーションから中立進化を仮定するとこのような *agpL* 変異の減少は極めて起こりにくいことが示され、*agpL* での適応淘汰の可能性が強く示唆された。

本論分の第 4 章では、複数の核遺伝子座を用いた集団の歴史の推定についての研究結果を示して

いる。このような集団の歴史(demographic history)についての知見は、今後の自然淘汰検出や集団の進化的歴史の解明に必要である。第3章の研究で最終氷期(70000~15000年前)には九州南部に避難所(レフュージア)が存在したことが示唆されたが、集団の動態の時間スケールや、他地域にレフュージアが存在した可能性については、明確な結論は得られなかった。そこで、本研究では、自然集団における26の核遺伝子座の塩基多型を調査し Isolation with Migration (IM) モデルを用いて解析した。解析には、九州南部集団とこの集団と最も遺伝的に分化していた伊豆半島集団、その他の四自然集団を用いた。その結果、九州南部集団と伊豆半島集団の間の分岐年代は、約4000年~23000年と推定された。他の集団間に分岐年代はこれと同じかより最近に分岐したことが示された。また、九州南部集団と屋久島集団の集団サイズの推定値は、他の集団よりも大きかった。これらの結果から、本種は最終氷期後に九州南部から分布域を拡大したが、祖先集団の集団サイズは現在の集団よりも大きかったと考えられる。また、伊豆半島集団から九州南部集団への遺伝子流動が起きていた可能性も示唆された。これらは予期しなかった結果であり、最終氷期以降に集団の縮小や隣接する集団からの移住などのより複雑な集団の歴史が存在する可能性を示唆している。

以上の研究は、生態的特徴を持つ樹木種での集団構造を初めて明らかにしたものであり、集団遺伝学および樹木進化学の分野において重要な貢献である。よって、本研究者は博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	といた 戸井田	りき 力 (愛媛県)
学位の種類	博士(工学)	
学位記番号	シ生博甲第65号	
学位授与の日付	平成23年3月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻	
学位論文題目	プロテインキナーゼ応答型分子システムの創製に関する研究	
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 教授 上平正道 教授 後藤雅宏	

論文内容の要旨

細胞内におよそ500種あるタンパク質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ: PK)は種々の細胞の機能(増殖、細胞死など)を制御している分子であり、正常な細胞では種々のPK活性が厳密に制御されている。一方、PK活性の異常亢進は種々の疾患(ガンなど)で確認されている。これらのことから、細胞内のPK活性を分析・測定できる、あるいは利用した化学システムは、疾患におけるPKの生物学、医学的な研究ツール、PKを標的とした薬剤探索や疾患の診断技術への展開、あるいは新規の化学システム概念の提唱が期待できるであろう。

本論文では、種々のガン細胞で異常亢進しているプロテインキナーゼC α (PKC α)を標的PKとし、これに応答して機能発現する化学システムの創製を目指した。PKによるリン酸化反応後、二価のアニオン電荷が基質に導入されることから、図1のアイデアが提案できる。すなわち、(1)ポリカチオンとしてリン酸化される化合物を使用すれば、(2)ポリカチオンとポリアニオンの静電相互作用で作製される複合体は、(3)PKC α にリン酸化を受けることでポリカチオンの正電荷が中和されるので、(4)複合体が解離する、であろうと考えられる。この原理を基礎とし、(A) PKC α 活性を測定できる蛍光プローブ(第2章)および(B)正常細胞とガン細胞のPKC α 活性の差を利用したガン細胞特異的な遺伝子発現システム(第3、4章)を開発した。

第2章では、PKC α 活性を蛍光強度で測定することを目的に、分子の設計、合成および評価を行った。本システムではポリカチオンとして蛍光色素(Cy5.5)およびPKC α の基質ペプチドを修飾した高分子P(S)、ポリアニオンとして消光基(BHQ-3)を修飾した高分子を利用し、以下のスキームでPKC α に反応した蛍光強度の増幅が期待できる(図2)。すなわち、複合体形成により蛍光を消光させておき、PKC α によるリン酸化反応に伴い複合体が解離し、蛍光強度を増幅するというアイデアである。最も高い消光効率(93%)を示した複合体にPKC α を添加すると、経時的な蛍光強度の増幅(2時間後に初期値の約5倍)が認められたが、過剰量のPKC α に対する阻害剤を添加した場合は全く蛍光の増幅が確認できなかった。さらに、ガン細胞の抽出液をこの複合体に添加すると、2.3倍の蛍光増幅が認められ、従来法では困難であった細胞抽出液中の微弱なPKC α 活性も測定できることが示された。

第3章では、ガン細胞特異的に遺伝子発現を達成できるシステムの開発を行った。このシステムでは、ポリカチオンとしてカチオン性のPKC α 特異的な基質ペプチドを担持した高分子(PPC)、ポリアニオンとして治療遺伝子を利用した。両者が複合体形成時は遺伝子発現が効率的に抑制されるが、ガンで特異的に異常亢進しているPKC α に反応すると複合体が解離し、遺伝子発現が活性化されるため、ガン細胞特異的な遺伝子発現が期待できる(図3)。たしかにPPCとpDNAの複合体を培養細胞に投与するとPKC α に反応した遺伝子発現の活性化が認められた。また、本複合体をマウスの正常皮膚に導入した場合は遺伝子発現が観察できなかったが、種々のガン組織に導入した場合は発現が観察された。さらに、治療遺伝子をガン組織に導入したところ、制ガン効果が認められた。本システムにより、PKC α が高活性化しているガン細胞でのみ遺伝子発現が活性化されることから、副作用を劇的に抑えることのできる新たな薬物送達概念といえる。

第4章では、前章のシステムの改善、すなわち、(1) 遺伝子発現レベルの向上、および(2) リン酸化によらない遺伝子発現の抑制、を目的に高分子の設計・合成・評価を行った。新たに設計したポリエチレンジアミン-ペプチドコンジュゲートは、ガン細胞での評価で、従来型PPCの遺伝子発現量の約10倍に増大し、また、リン酸化によらない遺伝子発現が大幅に抑制できたことにより、PKC α 応答性が2.3倍に向上した。さらに、この結果はマウスでも再現された。以上の結果より、新規コンジュゲートは(1) 高い遺伝子発現効率、(2) ガン特異的な遺伝子発現の双方を達成できる遺伝子キャリアーと結論付けることができる。

第5章では、以上の結論および展望を述べ、本論文のまとめとした。

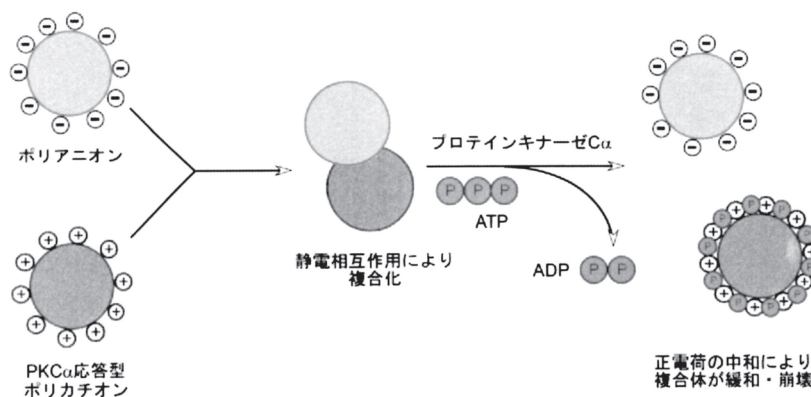


図1. PK応答型システムの基礎原理

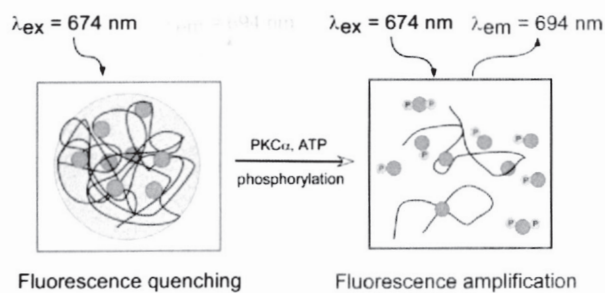


図2. PKCα活性の計測のための蛍光プローブ

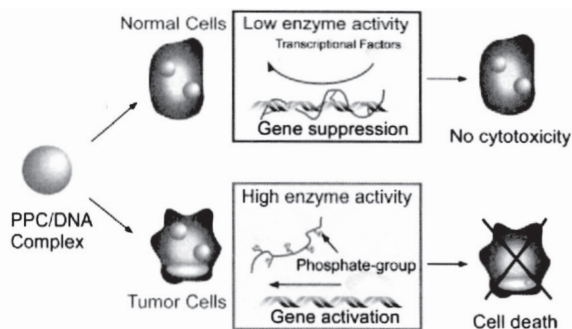


図3. PKCαにตอบสนองするガン細胞特異的な遺伝子発現制御システム

論文審査の結果の要旨

細胞は、生命を維持するために細胞内シグナル伝達系と呼ばれる反応カスケードを保有しており、外部からの情報を様々な細胞内応答へと変換している。この細胞内シグナル伝達系は細胞の生命活動そのものであるために、この異常は様々な疾病と密接に関連している。細胞内シグナル伝達系を構成する分子群の中で、最も重要な酵素の一つがタンパク質のリン酸化を触媒するタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）である。プロテインキナーゼは細胞内で重要な役割を担っているため、その異常は様々な疾病において確認されている。本論文では、このプロテインキナーゼにตอบสนองする分子システムを開発して、細胞特異的遺伝子発現制御、及びプロテインキナーゼ活性評価法に適用し、医療・創薬の場に貢献することができる新しい分子ツールを創製している。得られた成果は以下のとおりである。

まず、標的プロテインキナーゼ活性にตอบสนองして、蛍光を増大できる分子システムの開発に成功している。標的プロテインキナーゼに対するカチオン性の特異的基質ペプチドを dendrimer 分子に導入した分子と消光基を標識したポリアニオンとから静電相互作用により生じるナノ粒子が蛍光消光すること、標的キナーゼにより基質ペプチド部分がリン酸化されることによりナノ粒子構造が崩壊して蛍光を回復することを見出している。特に、ポリアニオンとしてコンドロイチン硫酸を用いた場合では、標的キナーゼの活性を蛍光の増大により評価可能であり、また、本現象を利用してキナーゼに対する阻害剤の能力を評価可能であることを明らかにしている。

また、がんで特異的に亢進しているプロテインキナーゼ Cα に対する基質ペプチドをグラフトした高分子型遺伝子制御剤を設計、開発して、その高分子が遺伝子と静電的複合体を形成して遺伝子の転写を高効率に抑制すること、さらに、標的プロテインキナーゼによって、側鎖ペプチドがリン酸化されることによる静電相互作用の減弱によって、遺伝子転写が開始でき、高度にがん細胞特異的に遺伝子を発現できることを、培養細胞、及び担がんマウスを用いて実証している。

ついで、上記遺伝子制御システムの性能向上のため、遺伝子制御剤の主鎖を中性のポリアクリルアミド誘導体から、カチオン性のポリエチレンイミンに変更した新規制御剤を設計し、その合成法を確立している。この制御剤を用いて物性、遺伝子制御能を検討し、この制御剤分子が前項の制御剤に比べ 100～数 100 倍の遺伝子制御能を有していることを見出している。また、その理由を細胞へのトランスフェクションメカニズムに基づいて検討して、主として用いたポリエチレン主鎖に基づくプロトンスポンジ効果によるエンドゾーム離脱能の向上にあることを明らかにしている。この制御剤を、従来の制御剤では適用不可能であった HepG2 に適用したところ、ルシフェラーゼ遺伝子を用いた検討により、がん細胞でのみ遺伝子発現を引き起こせることも実証している。

以上の結果は、現行の遺伝子送達における細胞特異性の問題を解決するまったく新しい概念と、薬物探索、薬効評価、疾患診断における新規な手法を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（工学）の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	くらもとまさのり 倉本政則（長崎県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	シ生博甲第66号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	医用材料を指向したプロテアーゼ応答性高分子の創製に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 准教授 水本博 教授 今任稔彦

論文内容の要旨

プロテアーゼがタンパク質やペプチドを分解する酵素であることは周知の事実であるが、生体内におけるプロテアーゼは単に消化酵素として働くだけでなく、広範囲の生体機能において重要な役割を担っている。タンパク質は生命現象で最も基本的な機能を果たすが、プロテアーゼはそのタンパク質の機能を変換、制御する。近年では分子生物学的手法の導入により次々と新しいプロテアーゼが発見され、その生理機能の解明とともに様々な病態との関連性が明らかとなっている。プロテアーゼ活性の異常はタンパク質の分解の亢進や蓄積に繋がり、それを原因として発症する疾患の中には治療が困難なものも少なくない。これらの事実を踏まえると、疾患関連プロテアーゼを標的とした医用材料の開発は医療の現場に大きく貢献する可能性がある。

そこで、本研究では2種類の医用材料を指向したプロテアーゼ応答性高分子を考案し、その創成を目指した。一つ目は、ウイルス感染細胞内で特異的に活性化しているウイルスプロテアーゼを指標として患部選択的に遺伝子を発現させる機能性高分子であり、遺伝子治療を安全かつ効率的に行うための遺伝子キャリアとしての利用を目指した。二つ目は、前立腺癌組織特異的に異常亢進している前立腺特異抗原（PSA）を指標として、患部を選択的に可視化する機能性高分子であり、手術ナビゲーションを指向した近赤外蛍光イメージングプローブとしての応用を目的とした。本論文はその研究成果をまとめたものであり、全4章から構成されている。

第1章は序論であり、プロテアーゼの生体機能と病態との関係について概説した。

第2章ではまず、HIV-1感染細胞内特異的に活性化しているHIV-1プロテアーゼに応答して導入遺伝子の発現を活性化できる機能性高分子の設計と評価を行った。そのような高分子としてポリアクリルアミドを主鎖として側鎖にHIV-1プロテアーゼの基質ペプチドと細胞膜透過ペプチド（Tatペプチド）を直結した高分子型遺伝子キャリア（CPCHIVtat）を設計、合成した。まず、基礎評価

として EtBr exclusion assay とゲル電気泳動を行った結果、CPCHIVtat が DNA と複合体を形成し、HIV-1 プロテアーゼ応答的に DNA を放出することを確認した。そこで、無細胞系および HIV-1 感染細胞系で CPCHIVtat を用いた遺伝子発現制御実験を行った結果、HIV-1 プロテアーゼ応答的に遺伝子の発現を活性化することに成功した。また、難治性疾患である拡張型心筋症を引き起こすコクサッキーウイルス (CV) B 2A プロテアーゼを標的とした遺伝子キャリア (CPCCVtat) を設計し、無細胞系で遺伝子の発現制御が可能であったことから、ウイルスプロテアーゼ応答性高分子の高い汎用性が証明された。

第3章では PSA に応答して FRET を解消し、前立腺癌を選択的に可視化する機能性高分子の設計、合成、基礎評価を行った。まず、生体適合性の高い PHPMA を主鎖とし、側鎖にカチオン性ドメインを含む PSA の基質ペプチドと近赤外蛍光色素である Cy5.5 をグラフトした高分子 (PSA sensitive imaging probe (PSAsip))、および、その消光剤として消光基 (BHQ-3) をグラフトしたコンドロイチン硫酸 (CS_{BHQ}) を設計した。基礎評価として消光効率、粒子径、表面電位、PSA 応答性について検討を行った所、粒子径が 33.8 nm~100.3 nm で表面電位が -14~-17 mV の非常に分散安定性に富んだ PSAsip/ CS_{BHQ} 複合体の形成に成功した。これは、この複合体が高い血中滞留性と EPR 効果を発揮する資質を十分に備えていることを示している。最後に、この複合体と PSA を反応させた結果、PSA 応答的に消光時の約 4 倍 (消光前の蛍光強度の約 80% に相当) の蛍光回復を示した。これは、PSAsip が PSA の活性を指標として前立腺癌組織を可視化する可能性を強く支持している。

第4章は結論であり、本研究の総括を述べた。

論文審査の結果の要旨

プロテアーゼはタンパク質やペプチドの特定のアミノ酸配列を認識し加水分解して切断する酵素であり、広範囲の生体機能に重要な役割を担っている。特に近年、種々のプロテアーゼの亢進が特定の病態と密接に関係していることが明らかになりつつあり、それら疾患関連プロテアーゼを標的とした医用材料の開発は、医療技術に大きく貢献する可能性がある。本論文では、医用材料を指向した2種類のプロテアーゼ応答型高分子材料を考案し、その合成と評価を行っている。得られた成果は以下のとおりである。

まず、ウイルス感染細胞で特異的に発現、活性化しているウイルスプロテアーゼに応答して、細胞に導入した遺伝子の発現を活性化できる高分子型遺伝子キャリアーを考案している。具体的には、まず HIV 感染時に活性化する HIV-1 プロテアーゼを標的とし、細胞膜透過型カチオン性ペプチド (Tat ペプチド) を HIV-1 プロテアーゼに対する切断基質配列でポリアクリルアミド主鎖にグラフトした高分子型遺伝子キャリアー分子を設計、合成し、この高分子が遺伝子(プラスミド)と強固な静電相互作用に基づく複合体ナノ粒子を形成し、HIV-1 プロテアーゼがその複合体を崩壊して遺伝子を放出できることを見出している。また、この際、複合体では遺伝子の発現を高効率に抑制でき、HIV-1 プロテアーゼによるペプチド側鎖の切断を通して遺伝子の抑制を解除できることを明らかに

している。さらに、この分子システムを実際の細胞に適用し、T細胞由来の Jurkat 細胞に遺伝子を導入した場合には、遺伝子発現を完全に抑制できること、細胞に HIV 感染患者の血清を用いてウイルス感染した場合にのみ、発現を引き起こすことに成功している。ついで、本概念を別種のウイルスプロテアーゼであるコクサッキーウイルス B2A プロテアーゼにも適用し、同様に標的ウイルスプロテアーゼの活性存在下でのみ遺伝子発現を引き起こせることを実証して、本概念に一般性があることを証明している。

さらに、病態に関与するプロテアーゼの活性のイメージングを可能にする分子プローブシステムとして、前立腺がんで特異的に活性化しているプロテアーゼである前立腺特異抗原 (PSA) に対するイメージングプローブの開発にも成功している。すなわち、生体適合性の高いポリヒドロキシプロピルメタクリロイルアミド (PHPMA) を主鎖とし、側鎖にカチオン性アミノ酸配列であるオリゴアルギニンを PSA に対する基質配列で連結し、さらに近赤外蛍光色素である Cy5.5 を標識した高分子を設計・合成し、別途合成した消光基である BHQ-3 を標識したコンドロイチン硫酸と混合して静電複合体を形成すると、粒径が 30~100 nm の分散安定性に富むナノ粒子を形成して蛍光を消光できることを見出している。また、このナノ粒子に PSA を作用させるとペプチド側鎖が切断されることに基づく粒子の崩壊により蛍光が回復し、生体内の PSA の活性イメージングに適用できる条件を備えた初めての分子プローブシステムの開発に成功している。

以上の結果は、ウイルス疾患治療に対する現行の遺伝子送達における細胞特異性の問題を解決するまったく新しい概念と、前立腺がん診断における新規な手法を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (工学) の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	の がみ ひろ ふみ 野上大史 (福岡県)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	シ生博甲第67号
学位授与の日付	平成23年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	MEMS血流量センサを用いた上肢挙上試験による脱水状態の評価
論文調査委員	(主査) 教授 澤田 廉 士 (副査) 教授 村上 輝 夫 准教授 角 田 直 人 教授 古 江 増 隆

論 文 内 容 の 要 旨

近年、生体情報をウェアラブルに測定することの要望が高くなってきている。健康管理や予防医学、独居老人の健康モニタリング、ベッドサイドモニタリング、運転中やスポーツ中の危険防止など、その用途は多岐に渡る。

栄養や老廃物を運ぶ血液は生きていく上で非常に重要な役目を担っており、血液の循環は健康のバロメータである。心臓の収縮により全身に送られる血液は、血管内で自身がもつ流動特性が血流に対して抵抗を示す。この流動特性の一因として、血液の粘度が深く関わっており、特に毛細血管や細動脈などの末梢循環において血液の粘度は影響が大きい。現在、血液の粘度の上昇は循環器系の病気を促進するという考えはかなり確立した概念となっているものの、高血圧などの危険因子と比較すると注目度は低い。その理由として、1) 血流量に関する定量的データが少ない、2) 携帯

可能な小型、低コストの血流量測定計が世の中になくことが挙げられる。既存の血流量計は装置全体が非常に大型であり、装着部が小型である光ファイバタイプのレーザ血流量計は、ファイバの振動や変形の影響によるノイズがあるためウェアラブルな測定に向かず、しかも高価である。このためレーザ血流量計は末梢組織血流量を非侵襲に測定できるため臨床医用の分野で血流量は新しい指標として注目されてはいるものの、定量的なデータは少なかった。

我々が開発したレーザ血流量センサは、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術と新規アイデアを適用することで作製された。このレーザ血流量センサは、装着も簡単にでき、長時間の測定と、人が動きながらでも安定した測定が可能である。我々は循環不全動態の一つである脱水に注目し、脱水によって生じる血液粘度の変化と血流量の変化との密接な関係を追究した。開発したレーザ血流量センサを用いた脱水状態の評価は、脱水の予防や早期発見、脳梗塞や心発作などの循環動態不全疾患の予防や早期発見につながっていく。本論文は、開発したレーザ血流量センサとそれを用いた脱水状態の評価方法についてまとめたものである。

第1章では、研究の背景を脱水の項目と血流量センサの項目の2点に分けて述べる。脱水の項目では、脱水の症状や危険性に触れながら、脱水の早期発見や予防の重要性について述べる。次に現在行われている脱水の検査方法と日常の中で脱水検査を行う場合に考えられる課題についてまとめる。血流量センサの項目では、既存のレーザ血流量計の特徴と測定原理に触れた後に、ウェアラブル測定を可能とするための課題についてまとめた。

第2章では、ウェアラブル測定を可能とするために開発したレーザ血流量センサについて述べる。開発したレーザ血流量センサは、集積型血流量センサチップ、チップをとりつけたセンサプローブ、本体部から構成される。集積型血流量センサチップが最も重要な部分であり、超小型化、低消費電力化、高生産性化のための新規アイデアとそのアイデアを実現可能とするMEMS技術適用することで作製された。この章では、最初に集積型血流量センサチップについて詳述し、次に従来のレーザ血流量計と比較しながら開発したレーザ血流量センサの特徴についてまとめた。

第3章では、脱水状態の評価方法に、開発したレーザ血流量センサを用いた上肢挙動試験を提案した理由について述べる。まず、血管を剛体管と仮定して、脱水が血流量に及ぼす影響を考察する。また血液の粘度と血流の関係から、血管を収縮させる方法が脱水状態の評価に有効であるという仮説をたてた。血管を収縮させるには、交感神経性皮膚血流反応を利用するか壁内外圧差の変化を利用するか2つである。開発したレーザ血流量センサを用いた上肢挙動試験では、挙動負荷による交感神経性皮膚血流反応と挙手中の内圧低下による壁内外圧差の変化の両方を満たす試験である。開発したレーザ血流量センサは、動きながらでも安定した測定を可能とするためこの試験を実現できる。測定された血流量変化から基礎血流波、拍動波、反射波を観察でき、多くの指標を算出可能である。この中から脱水状態の評価に有効な指標を見つけ出せる可能性があり、携帯性、非侵襲性、簡便性といった脱水検査方法の課題を満たすため、この試験法を選んだ。

第4章では、複数名の実験参加者に実際に軽度の脱水状態になってもらい、脱水前と脱水状態に開発した血流量センサを用いた上肢挙動試験を行い、測定された血流量変化および血流量変化から算出した4つの指標を比較した。指標の一つである挙手前の平均血流量は、脱水前と脱水状態では有意な差は見られなかった。一方で、挙手中の平均血流量は、脱水の前よりも脱水状態では有意に低下した。この結果から、脱水状態の評価方法として、血管を収縮させる方法が有効であることが示唆された。他2つの指標も脱水の前よりも脱水状態に有意な低下を示しており、上肢挙動試験の有効性が示された。ここでは、脱水前と脱水状態の指標の変化についても考察を行った。

第5章では、本研究の総括を行い、今後の展望について言及した。

論文審査の結果の要旨

生活習慣病などの予防、高齢化社会における独居老人の在宅医療、危険察知・診断のための病院内でのベッドサイドモニタリング、眠気や緊張など心身の評価による運転中事故の防止、スポーツにおけるパフォーマンス向上、ならびにより質の高い生活を送る上で、運動量、脈、血圧、血流量、心電、体温、血中飽和酸素濃度などの生体情報を日常において測定することの要望が大きくなっている。

生体情報の一つである血流量の測定方法については、血液が栄養や老廃物を運ぶ上で非常に重要な役目を担っており、健康のバロメータでもあることから臨床医療分野で昔から研究されている。心臓の収縮により全身に送られる血液の流動性が血管内において流れの抵抗になる。この流動特性の一因として血液粘度が深く関わっており、特に毛細血管や細動脈などの末梢循環において血液粘度は血流に大きな影響を及ぼす。血液粘度の上昇が循環器系の病気を促進するという考えはかなり確立した概念となっているものの、高血圧などの危険因子と比べ注目度は低く過小評価されている。その理由として、1) 血流量に関する定量的データが少ない、2) 携帯可能な小型、低コストの血流量測定計が世の中になくことが挙げられる。既存の血流量計は装置全体が非常に大型であり、装着部が小型である光ファイバタイプのレーザ血流計は、ファイバの振動や変形の影響によるノイズがあるためウェアラブルな測定に向かず、しかも高価である。このため臨床医療の分野で血流量は新しい指標として注目されてはいるものの、定量的なデータが少ない。

本研究では、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術と新規アイデアにより開発した超小型の血流量センサは生体への装着も簡単にでき、動きながらでも安定した測定を可能とした。特に、循環不全動態の一つである脱水に注目し、脱水によって生じる血液粘度の変化と血流量信号の変化との密接な関係を追究した。このことは血流量、血液の粘度を危険因子とする脳梗塞や心発作などの循環動態不全疾患の予防や早期発見にも有益である。本研究では、新規に開発した、動きながらの血流量測定が可能な MEMS 血流量センサを指に装着後、上肢挙上試験により得られた血流量信号変化と、脱水によりもたらされた血液粘度の上昇との関係を明確にした。

まず、血液粘度と血流における流体力学的見地から、血管を収縮させる方法が脱水状態の評価に有効であるという仮説をたてた。血管を収縮させるには、交感神経性皮膚血流反応を利用する方法と壁内外圧差の変化を利用する方法とがある。さらに壁内外圧差を変化させる方法には、血管内圧を低下させるか、血管外圧を増加させるかの2つがある。MEMS 血流量センサを装着した指を挙上させると、交感神経性皮膚血流反応と内圧低下の2要因に基づき壁内外圧差を変化（血管の収縮）が引き起こされ、基礎血流波、拍動波、反射波の血流量信号の検出が期待できることから、本研究では上肢挙上試験を行った。

軽度の脱水状態になった 14 名の実験参加者に対し、開発した血流量センサを指に装着し上肢挙上試験を行った結果、指標の一つである上肢挙上前の平均血流量は、脱水前と脱水状態では有意な差は見られなかったものの、上肢挙上中の平均血流量、反射波の傾きおよび拍動波振幅が、脱水前の状態よりも脱水状態では有意に低下した。脱水状態の評価方法として上肢挙上試験が有効であることを明確にした。

本研究における上肢挙上試験による軽度の脱水症評価は血液粘度を危険因子とする脳梗塞や心発作など循環動態不全疾患の予防や早期発見、およびスポーツ医学に資するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（工学）の学位を受ける資格があるものと認める。