




論文審査の結果の要旨

報告番号	博(水・環)甲第 80 号	氏名	Yang Min
学位審査委員	主査	平坂 勝也	
	副査	石橋 郁人	
	副査	長富 潔	

論文審査の結果の要旨

Yang Min氏は2019年4月長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科博士後期課程に入学し、現在に至っている。同氏は水産・環境科学総合研究科に入学以降、水産科学を専攻して所定の単位を修得するとともに、海洋性イミダゾールジペプチドバレニンの生理活性と機能性に関する研究に従事し、その成果を2021年12月に主論文「Study on bioactivity and function of marine imidazole dipeptide, balenine (海洋性イミダゾールジペプチドバレニンの生理活性と機能性に関する研究)」として完成させ、参考論文として、学位論文の印刷公表論文2編（うち審査付き論文2編）、学位の基礎となる論文2編（うち審査付き論文2編）を付して、博士（学術）の学位を申請した。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授会は、2021年12月15日の定例教授会において論文内容を検討し、本論文を受理しても差し支えないものと認め、上記の審査員会を選定した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審議し、2022年1月24日に公開論文発表会を実施すると共に、最終試験を行い、論文審査及び最終審査の結果を2022年2月16日の水産・環境科学総合研究科教授会に報告した。

本研究は、これまでに解析されていない海洋性イミダゾールジペプチドバレニンの生理活性と機能性を明らかにしたものである。

第1章では、背景として、機能性を有するイミダゾールジペプチドの種類や特徴等、これまでの意見を細述し、研究目的と構成を紹介している。

第2章では、マウス由来C2C12筋管細胞を用いて、バレニンの抗酸化作用について調べた。筋管細胞にバレニンを添加しスーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)の産生を検討したところ、10, 100, 1000 μM のバレニンを添加した細胞では無添加と比較して、内在性の $O_2^{\cdot-}$ 産生が有意に抑制された。一方、過酸化水素(H_2O_2)の産生については、バレニンの添加濃度依存的に増加する傾向を示した。 $O_2^{\cdot-}$ から H_2O_2 へと変換する酵素としてsuperoxide dismutase (SOD)が知られている。SOD活性はバレニン添加で濃度依存的に増大した。従って、バレニンはSODの活性化に大きく寄与していることがわかった。そこで、バレニンがどのようにSODの活性化に寄与しているのかを確かめるために、SODのmRNA発現について解析を行った。SOD1(細胞質に存在)、SOD2(ミトコンドリアに存在)およびSOD3(細胞外マトリックスに存在)は、バレニンを添加してもmRNAレベルでの発現量に変化はなかった。この結果よりバレニンは間接的に遺伝子の発現レベルを増大させることでSODの活性化を増大させていることではないことがわかった。そこで、バレニンが直接SODを活性化することが出来るかどうかを解析したところ、バレニンを添加した群ではSODタンパク質単独より有意にSOD

活性の上昇が認められた。また、バレニン同様イミダゾールジペプチドであるカルノシンもまた、SODタンパク質単独より有意な活性上昇を認めたが、バレニンと比較すると低値であった。これに対して、イミダゾールジペプチドの構成要素である単独のアミノ酸(L-アラニン、 β -アラニン、L-ヒスチジン、3-メチル-ヒスチジン)の効果は、SODタンパク質単独と同等のレベルであった。これらの結果より、SODの直接的な活性化にはジペプチド様構造が必須であることが考えられた。

第3章では、実験動物C57BL/6jマウスを用いて、筋機能に対するバレニンの作用について調べた。まず初めに、0, 0.25, 0.5, 1%アカマンボウ由来バレニンを含む食事をC57BL/6Jマウスに5週間与え、安全性試験を行った。摂食量と体重変動は各群で変化がなかった。同様に、5週間後の後肢筋(長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋)、脾臓、肝臓、白色脂肪重量、血中パラメーターも各群で有意な差は認められなかった。これらの結果より、1%バレニン食でも安全性は確保されることが示唆された。次に、1%バレニン食を与えたマウスを用いて筋機能解析を行った。バレニン食群における筋線維の断面積は、普通食群と比較して同等であった。一方、バレニン食は骨格筋内のミトコンドリア生合成および脂質代謝に関連するperoxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC)-1 α およびpyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4の発現を有意に誘導した。加えて、バレニン食群における骨格筋内のSOD活性は、普通食群と比較して有意に高値を示したが、SOD mRNAの発現レベルには影響しなかった。これらの結果により、食餌性バレニンが、骨格筋内においてミトコンドリア生合成と代謝およびSOD活性の調節に寄与することが示された。

第4章では、筋再生に対するバレニンの作用について調べた。骨格筋へカルディオトキシン(CTX)を投与することで、3日後、免疫細胞による筋組織の貪食が見られ、7日後には、再生筋の出現が観察された。CTX投与14日後には、全体で筋再生している様子が観察された。バレニン食群ではCTX投与7日目において、普通食群よりも筋線維の再生が促進される様子を示した。加えて、バレニン食群は筋衛星細胞の増殖に関与するpaired box gene 7 (Pax7)や筋細胞の分化マーカであるmyoblast determination protein 1 (MyoD1)の発現が普通食群よりも高値であった。筋再生には免疫細胞の活性化が重要な働きをしていることから、サイトカイン、ケモカインおよび免疫細胞活性化に関与する転写因子の発現量を解析した。筋損傷初期に活性化する炎症性サイトカインtumor necrosis factor- α およびmonocyte chemotactic protein (MCP)-1 mRNAの発現はバレニン食群で普通食群よりも有意に高い値を示した。さらに、修復に関与するマクロファージが産生する抗炎症性サイトカインIL-10とtransforming growth factor (TGF)- β 1 mRNAの発現もまた、バレニン食群で有意に高かった。これらの結果より、バレニンが筋再生に関与する免疫細胞の活性化を調節し、筋再生を促進する可能性が示唆された。

第5章では、本研究の結果について総合考察を行った。本研究において、バレニンはSODの活性化を介した抗酸化作用、骨格筋内代謝調節機能や筋再生を促す作用を有することを見出した。従って、食事性バレニン摂取は超高齢社会において問題となっている筋機能障害の改善策をなりうることを期待された。

以上のように、本研究ではバレニンは抗酸化作用や筋機能向上に関与する有用な機能性生理活性物質であることを明らかにした。学位審査委員会は、これらの知見が水産栄養学および水産食品学の分野において、極めて有益な成果であるとともに、水産科学の分野の進歩発展に貢献するところが大きいと評価し、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判断した。