

博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び審査結果の要旨

(平成 28 年 3 月授与関係分)

第 21 号

神 戸 女 子 大 学

は し が き

本誌は、学位規則（平成25年3月11日文部科学省令第5号）第8条による公表を目的として、平成28年3月16日、本学において博士の学位を授与した者の論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

目 次

課程修了によるもの（課程博士）

(学位記番号)	(氏 名)	(論文題目)	(ページ)
家博甲第12号	今井 里佳	Transgenic mice overexpressing glia maturation factor- β , an oxidative stress inducible gene, show premature aging due to Zmpste24 down-regulation	1

論文提出によるもの（論文博士）

(学位記番号)	(氏 名)	(論文題目)	(ページ)
家博乙第9号	森元 直美	Breadmaking Properties of Frozen-and-Thawed Bread Dough	5

氏 名 (本 籍)	今井 里佳 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博 士 (食物栄養学)
学 位 記 番 号	家博甲第 12 号
学位授与の年月日	平成 28 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 家政学研究科 食物栄養学専攻
論 文 題 目	Transgenic mice overexpressing glia maturation factor- β , an oxidative stress inducible gene, show premature aging due to Zmpste24 down-regulation
論 文 審 査 委 員	主査 教授 置村 康彦 副査 教授 長澤 治子 副査 教授 狩野 百合子 副査 奈良女子大学大学院 教授 井上 裕康

論文内容の要旨

【背景・目的】

脳神経特異的因子 Glia maturation factor- β (GMF) は、神経系の分化・保持・再生などの生理学的役割をもつ。脳組織における GMF 過剰発現は、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生・分泌を誘導し、アルツハイマー病などの神経変性疾患の病態への関与が示唆されている。GMF は蛋白尿刺激により、腎近位尿細管において異所性に発現誘導される。*In vitro* における異所性の GMF 発現は、酸化ストレスに対し脆弱となりアポトーシスを誘導する。本研究では *in vivo* における異所性の GMF 発現が及ぼす影響を検討した。

【方法】

GMF は pCAGGS ベクターを用い C57BL/6J マウス(WT) に導入し、GMF を全身に強制発現させたトランスジェニックマウス(GMF-TG) を作製した。飼育期間中 GMF-TG の外観は、早期より老化を示唆する表現型が観察された。そこで、GMF-TG における老化促進と早老症との関連性に着目した解析を行った。

【結果】

1) GMF-TG の表現型

GMF-TG の外観は、早老症 laminopathies を伴う老化促進モデルマウスと類似した表現型が認められた。Kaplan-Meier 解析では、GMF-TG の寿命は WT に比し短いことを明らかとした。早老症マウスは、野生型マウスに比し hair regrowth が低下することが報告されている。Hair

regrowth assay では、GMF-TG は 10 週齢の時点で WT に比し有意に hair regrowth が低下することが示された。

2) GMF-TG における老化促進と早老症との関連性

1. 異常 lamin A 発現について

核の裏打ちタンパクである lamin A の異常は、早老症である laminopathies の原因となる。GMF-TG 腎臓において western blot 解析を行った結果、60 週齢 GMF-TG では異常 lamin A (prelaminA) の蓄積が認められた。Lamin A は前駆体 prelamin A が、プロテアーゼ Zmpste24 により切断されることによって生成される。60 週齢 GMF-TG の腎臓では、WT に比し Zmpste24 mRNA 量が有意に低下することが明らかとなった。

2. 老化促進の評価

60 週齢 GMF-TG の腎臓では、組織の線維化に関連する TGF- β 1 および connective tissue growing factor (CTGF) mRNA 量が WT に比し有意に増加することが示された。また、GMF-TG では WT に比し血清クレアチニン値の有意な増加が認められ、腎機能の低下が示唆された。p21/waf1 mRNA 量および protein 量は、10 週齢 GMF-TG の腎臓では WT に比し有意な増加が認められた。60 週齢では GMF-TG の p21/waf1 mRNA 量は WT に比し有意な低下が示されたが、protein 量には GMF-TG・WT 間に差異が認められなかった。

【結論】

In vivo における異所性の GMF 発現は、Zmpste24 mRNA 量の低下に伴う異常 lamin A 蓄積に起因して、老化を促進させる可能性が示された。

論文審査結果の要旨

本論文は、脳神経特異的因子 glia maturation factor-8 (GMF) を全身に強制発現させたトランスジェニックマウス (GMF-TG) を用い、*in vivo* における異所性 GMF 発現が及ぼす影響について検討した研究を 3 章にわたり述べたものである。

第 1 章では GMF に関する研究の学術的背景や、本研究の目的について説明している。GMF は通常脳に特異的に発現し、脳神経系の分化・保持・再生などに関与していることが知られている。しかし、脳神経特異的発現を示す GMF が腎近位尿細管において、蛋白尿刺激により異所性に発現誘導されることが見出され、*in vitro* における異所性の GMF 発現は、酸化ストレスに対し脆弱となり apoptosis を誘導することが明らかにされた。これは、異所性 GMF 発現により惹起される酸化ストレス障害が、慢性腎臓病における腎障害進行に寄与する可能性を示している。さらに、脳組織における GMF 過剰発現とアルツハイマー病のような神経変性疾患との関連が示されつつあり、GMF が生理学的役割だけでなく、病態生理学的役割をもつことが示唆されている。本研究は、*in vivo* における異所性 GMF 発現の影響に関して検討を行うこ

とを目的とし、いまだ未知の部分が多い GMF の役割を解明する一助となる可能性について述べている。

第 2 章では GMF-TG を作製し、本研究で検討した結果について述べている。飼育期間中 GMF-TG の外観は、野生型マウス (C57BL6/J: WT) より早期に白毛や脱毛・皮膚萎縮が生じ、ヒトの aging と類似した phenotypes が観察された。また、1). GMF-TG の寿命は WT に比し短いこと、2). 皮膚 (外観) における aging に関連した biomarker で知られる hair regrowth は、GMF-TG は 10 週齢の時点で WT に比し有意な低下を示すことを確認している。そこで、GMF-TG と aging との関連についてさらに検討するにあたり、GMF-TG と早老症 laminopathies を伴う老化促進モデルマウスの外観における phenotypes が類似していることに着目し解析をすすめている。

Laminopathies とは、核膜の内膜を裏打ちする核ラミナを構成する主要タンパク質である lamin A の異常によって引き起こされる疾患の総称として知られている。Lamin A は前駆体 prelam A の合成後に、プロテアーゼ Zmpste24 により成熟化される。60 週齢 GMF-TG の腎臓では、WT に比し Zmpste24 mRNA が有意な低下を示し、異常 lamin A (prelamin A) の蓄積が認められることが見出された。また、60 週齢 GMF-TG の腎臓では、腎臓における aging marker として知られる、組織の線維化に関連する TGF- β 1 および CTGF mRNA や血清クレアチニン値が WT に比し有意に増加することを確認している。これらの結果は、GMF-TG は異常 lamin A (prelamin A) 蓄積を伴う新規の老化促進モデルマウスである可能性をもつことを示している。Zmpste24 は酸化ストレスにตอบสนองし低下することが報告されていることから、GMF-TG では、異所性に発現誘導される GMF による酸化ストレスに対する脆弱性が引き金となり、Zmpste24 が鋭敏に反応し、老化促進につながるのではないかと推察している。

さらに、GMF-TG における aging phenotypes と p53 依存性老化シグナルの活性化との関連についても検討している。p53 の下流因子である p21/waf1 について、mRNA および protein 発現量について解析を行った結果、p21/waf1 mRNA および protein 量は、10 週齢 GMF-TG の腎臓では WT に比し有意な増加が認められた。一方、60 週齢では GMF-TG の p21/waf1 mRNA は WT に比し有意な低下が示されたが、protein 量には GMF-TG・WT 間に差異が認められなかったことを明らかにしている。この現象は、p53 に依存した p21 の転写を抑制する働きをもつような因子により生じているのではないかと推察している。

第 3 章では本研究の結論、およびその成果の可能性に関して述べられている。In vivo における異所性の GMF 発現は、lamin A のプロセッシング・エンザイム Zmpste24 の低下に伴い異常 lamin A (prelamin A) の蓄積を引き起こすことが示唆され、GMF の新たな作用について述べている。異常 lamin A の蓄積は、生理的な老化においても加齢に伴い認められることも示されている。また、酸化ストレスは老化促進に深く関わっていることが知られていることから、新規老化モデルマウスである GMF-TG は、aging メカニズムの解明に寄与するだけでなく、抗老化効果検証モデルとして利用できる可能性があるかと結んでいる。

GMF-TG と laminopathies マウスの phenotypes の類似点に着目し、GMF の作用を解明し

ようとした点は優れた着眼である。研究結果の解釈について十分には納得し得ないところもあるが、全体として新規性に富む研究であり、高く評価される。

試験の結果又は学力の確認の要旨

2015年11月26日午後4時20分より、審査委員会主査、副査2名（長澤、狩野）計3名により、論文内容および関連領域の知識に関して、口頭試問による学力確認を行った。質問に関して的確な回答がなされ、博士としての学力は十分であると判断された。

公開博士論文討論発表会の結果

今井里佳氏の公開博士論文討論発表会は、2015年12月10日午後4時20分から、本学須磨キャンパスC館318号教室で行われた。家政学研究科教員、院生などの出席のもと、パワーポイントを用いて論文内容を説明する発表が約40分間行われた。発表は3つに分かれていた。第一はGMFに関する研究の学術的背景および、本研究の目的についてであり、第二は彼女らの研究グループが作製したGMF-TGの表現型の解析についてであった。この発表において、今井氏は、GMF-TGは加齢現象が進行しており、早老症 laminopathies を伴う老化促進モデルマウスの外観における phenotypes が類似していることに着目し解析をすすめたことを述べ、GMF-TGでは、異所性に発現誘導されるGMFによる酸化ストレスに対する脆弱性が引き金となり、プロテアーゼ Zmpste24 の発現が減少し、その結果、異常 lamin A (prolamins) が蓄積した可能性を示唆した。第三として、これらの成績を総合し、本研究の結論、およびその成果の展開の可能性に関してまとめが述べられた。

その後、40分にわたって主査、副査を含む教員から、GMF-TGの表現型に関する質問、表現型の発現機構に関する質問、GMF自体に関する質問、さらに、食物栄養学における本研究の意義等、17の質問があった。質問に関しては口頭での回答に加え、12月22日に提出された口頭試問の回答書（別紙）で適切な回答が得られている。

これらの点から、当該領域の博士に必要な知識とプレゼンテーション能力があることが確認された。

総合結果

すでに、口頭試問の回答書は、外部審査委員である奈良女子大教授の井上氏に送付されており、井上氏から論文は博士（食物栄養学）の学位に相当するものであると返答を得ている。2016年1月7日午後1時から、内部の委員である主査、副査2名による論文審査委員会を開催した。学位論文の審査結果、試験の結果、および公開博士論文討論発表会の結果を総合して審議したところ、井上氏を含め全員一致で、提出された論文は博士（食物栄養学）の学位に相当するものと判断した。

氏名(本籍)	森元 直美(兵庫県)
学位の種類	博士(食物栄養学)
学位記番号	家博乙第9号
学位授与の年月日	平成28年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 家政学研究科 食物栄養学
論文題目	Breadmaking Properties of Frozen-and-Thawed Bread Dough
論文審査委員	主査 教授 後藤 昌弘 副査 教授 山根 千弘 副査 准教授 木村 万里子 副査 京都大学大学院農学研究科 教授 松村 康生

論文内容の要旨

【背景・目的】

冷凍ドウによる製パン技術は、1960年代にアメリカで発明された画期的な製パン技術であり、日本においても1980年代から用いられるようになってきた。しかしその利用は現在パン生産量全体の約7%である。その利用のおくれは冷凍による製パン性(パン高、比容積)低下である。本研究の目的は、この製パン性低下の原因を調べ、その改善策を見出すことである。

【方法】

(1)未冷凍ドウと冷凍・解凍ドウの製パン試験を行い、冷凍による製パン性の低下を調べた。さらに各ドウからの遊離液量を遠心分離によって求め、製パン性低下との相関性を求めた。(2)製パン工程の途中で冷凍・解凍工程を挟みこんだ3種類のドウA、B、Cを調製した。ドウAは小麦粉、砂糖、食塩を混合後、冷凍を挟みこんだもの、ドウBはこれら材料にイーストを添加後、冷凍を挟みこんだもの、ドウCはイーストを添加、一次発酵、成形(リミック)、二次発酵後に冷凍したものである。何れのドウが製パン性低下を起こしたかを調べた。さらにこの製パン性低下したドウに、新たに砂糖とイーストを添加し、一次発酵、成形、二次発酵後の製パン試験を行った。(3)小麦粉に13種類の多糖類(locust bean gum, guar gum, xanthan gum, tamarind seed gum, native gellan gum, dextrin, LM pectin, fermented cellulose CMC, konjac-gulcomannan, HM pectin, κ-carrageenan, ι-carrageenan, λ-carrageenan)を添加して、冷凍・解凍による製パン試験を行い、未冷凍小麦粉ドウによる製パン性と比較検討した。

【結果】

(1) 冷凍・解凍したドウの製パン性は、未冷凍時に比べ大きく低下した。ドウからの遊離液量は未冷凍時に比べ大きく増加した。この製パン性低下と遊離液量増加との間には、高い負の相関のあることがわかった。(2) ドウA、Bの製パン性は良好であったが、ドウCは大きく低下した。そして遊離液量も増加した。このドウCに砂糖、イーストを添加し、一次発酵、成形、二次発酵の工程を行うと、未冷凍時同様の良好な製パン性が得られた。(3) 各種多糖類添加による製パン試験から、未冷凍の小麦粉ドウと同様の製パン性が得られたものは、guar gum、xanthan gum、 tamarind seed gumであった。特にxanthan gumを添加した製パン性回復は著しかった。

【結論】

冷凍・解凍により、製パン性低下したドウに砂糖とイーストを加え、1次発酵、成形(リミックス)、2次発酵の工程を行うと、未冷凍ドウによるパン同様の良好な製パン性が得られたことから、製パン性低下の原因は、小麦粉中のデンプン、タンパク質等が冷凍・解凍によって損傷を受けて低下したのではなく、ドウ中の水分が冷凍中に移動したためとわかった。水を強く吸着する各種多糖類を用いた冷凍・解凍ドウの製パン試験から、xanthan gum を添加した場合、未冷凍小麦粉ドウによる製パンに匹敵するほどの製パン性が得られた。

論文審査結果の要旨

1. 本研究ではなるべく解析を容易にし、明確に結果を示すために、小麦粉、砂糖、食塩、イースト以外の乳成分、乳化剤等を除いて製パン試験を進めている点が優れている。7種類の小麦粉を用いて、冷凍・解凍による製パン性劣化の確認を行った。いずれの小麦粉を用いても製パン性は大きく低下し、一般的に見られる冷凍・解凍効果が本実験系でも再現されることを確認した。同時に冷凍・解凍ドウからの遊離液体量が未冷凍ドウより多い事を確認している。本研究では冷凍・解凍による製パン時のパン高、比容積の低下を、この遊離液体量増加の解析で調べようとした点もユニークな点と言える。冷凍時間と遊離液体量の関係を各小麦粉で調べている。何れの小麦粉も製パン性（パン高と比容積）と遊離液体量との間に高い負の相関性があることを確認し、製パン性劣化がドウ中の溶液の移行と大きく関係している事を示した。冷凍ドウによる製パン性の低下は広く知られているが、冷凍ドウと遊離液体量の関係についてはこれまで報告はなく、本研究で製パン性の低下と遊離液体量増加の関係を明らかにしたのは大きな発見である。冷凍・解凍によって製パン性の低下をパンドウの焼成前の状態で知る事ができたのは冷凍解凍のメカニズム解明の大きな手がかりであった。本研究の優れた点である。

2. 次に冷凍・解凍ドウがなぜ製パン性を低下させるのかを調べた。本研究では製パン工

程中に冷凍・解凍ステップを挟み込んでその原因を追求した。すなわち①イーストを加える前に冷凍・解凍ステップを入れるか、②攪拌・発酵を加える前に冷凍・解凍ステップを入れるか、③攪拌・発酵を加えた後に冷凍・解凍ステップを入れるかの何れかである。その結果、攪拌・発酵を加えた後に冷凍ステップを入れると製パン性の低下する事がわかった。このことは製パン性の低下は小麦粉成分の冷凍によるダメージによるものではない事を示している。これまで冷凍によってグルテンタンパク質、デンプン、多糖類等の劣化が推察され、多く研究がされてきたが、小麦粉成分の大きな変化が製パン性劣化の原因ではなく、別の理由で劣化する事を明らかにした。研究方法は極めて巧みであり、冷凍ステップをいろいろなところに挟み込んでどこの区分の冷凍によってパンが劣化するのかを調べるという興味深い方法で調べている。さらに冷凍によって劣化したパンドウにイースト、砂糖を添加し、再攪拌・発酵を行う事で製パン性を見事に回復した点、そして冷凍した小麦粉ドウを再攪拌後に、減圧下で膨化させたことでドウ生地は冷凍で傷んではいないことを明らかにしたこともユニークな点と思われる。こうして液体が冷凍でドウ中を移行し本来あるべき位置から消失したためにドウの膨化が不十分となり、製パン性の低下に至ったわけであり、この事は遊離液体量の増加と大きな相関のある事を示し、ドウ中の液体が不均一化する事で製パン性低下したことを示した点も大きな研究成果であった。

3. この成果に基づいてドウ中で液体の動かない状況を作るために吸水性多糖類をドウに添加し、液体の移行の抑制により製パン性低下を防止できるのか、研究を進めた。13種類の吸水性多糖類を用いた製パン試験をすすめ、その結果3種類の多糖類（Tamarind seed gum, guar gum, xanthan gum）にたどり着いた。すなわち解凍しても未添加・未冷凍ドウのパンに匹敵するか、あるいはそれ以上の製パン性をこれらの多糖類添加の冷凍解凍ドウから得る事ができた。最も効果の高かった xanthan gum は、微生物由来の芽胞形成の多糖類である。本論文では、オーブンスプリングの研究からこの多糖類の製パン性への効果をみた。この xanthan gum が 65-80℃に至ってもまだオーブン中でパン膨化をサポートする事を示した。その際、パンドウの温度は赤外線温度計を用いて正確に計っている。パンは空気のかたまりのようなもので、それを取り囲む固形部との温度のばらつきがあり非常に測定しにくいサンプルである。一般のデジタル温度計ではそのばらつきが大きく、測定の再現性が困難であった。しかし本研究では赤外線温度計を用いて温度を色の変化で測定している。製パン研究ではこの温度測定方法は画期的な測定方法と思われた。こうして冷凍ドウによる製パン性の低下の原因を液体の移行によっておこる現象であることを明らかにし、次にその液体の移行が起こらないようにするために吸水性の高い多糖類、xanthan gum を添加することで冷凍・解凍ドウの製パンを可能にしたことは大きな仕事であった。

4. ドウからの遊離液体に注目し、それが冷凍によって増える事の重要性を前項までに指摘した。ここではこの遊離液体についてさらに検討した。遊離液体はどのような条件でドウから出てくるのか。ドウ中の小麦粉、砂糖、食塩、イーストに注目し、完全な通常のパンドウから夫々ドウ成分の除去、及び組み合わせの違うドウを作り、遊離液体量の実験を行った。

その結果、食塩、イーストの入ったドウの場合、完全な通常のパンドウ（小麦粉、砂糖、食塩、イースト、水）に最も近い液量がえられた。すなわち小麦粉、砂糖、食塩、イースト、水のパンドウを 100%とした時、小麦粉、食塩、イースト、水の時 80-90% の遊離液体量であった。本研究ではさらにこれを押し進め、培養液ドウの研究に入った。培養液ドウでは小麦粉中の酵素の力を排斥するために砂糖、食塩、イースト、水で 35℃、140 分培養し、これをさらに 5 分間沸騰して完全にイーストの力を失活させ、ここに小麦粉を入れて培養液ドウを作り、遊離液体量を定量している。この条件では小麦粉の糖類は全く発酵に関与せず、このときの遊離液体量は通常のパンドウに比べ変化はなく、小麦粉の影響は全く考えなくてよかった。このとき、食塩、イースト、水の培養液ドウでは砂糖、食塩、イースト、水の培養液ドウのときの 30-40%と低くなり、通常のパンドウの場合の小麦粉、砂糖、食塩、イースト、水 100%に対し、小麦粉、食塩、イースト、水の場合 80-90%であったのに比べ、大きく低下している。これは培養液ドウではイーストの栄養源が全くないため培養しても発酵の進んでいない事を示している。それに対し通常のパンドウでは小麦粉中の糖質がエネルギー源となったため発酵が進んだと考えられる。すなわち発酵がおこらないと遊離液体量の生じにくいことが示された。この遊離液体は、発酵があつて食塩があると生じる液体である。しかもこの遊離液体は、本来の位置にないと製パン性が低下することを冷凍ドウによる製パン性の劣化実験から明らかにした。次に本研究では培養液ドウを使ってこの物質についてさらに検討している。砂糖、イースト、水の混合物を 35℃、280 分間培養後、培養液ドウを作り、遊離液体量を測定すると、そのままでは全く遊離液体がゼロであるが、そこに食塩を入れると遊離液体は生じた。したがって発酵物質は既にできているが食塩が無いと遊離して出てこないことがわかった。食塩添加量を検討してみると、3.63 g / ドウ 145g までは遊離液体量は増加し、それ以後は低下する事がわかった。この物質が、冷凍ドウ中から移行するとパンは膨化しなくなる事からこの発酵物質は製パンに重要な役割を果たしている可能性がある事を示した。

以上のように本論文は、テーマの設定が学位に対して妥当なものであり、論文作成にあつての背景と研究方法が明確に示されていること、研究に際して、具体的な実験と考察がなされており、学術論文として完成していること、先行研究や資料が適切に取り扱われており、当該研究分野における研究水準に十分到達しており、当該研究分野の論理的見地ならびに実証的見地からみて、新規性、創造性が認められ、博士（食物栄養学）の学位に相当する論文であると判断される。

試験の結果又は学力の確認の要旨

平成 27 年 12 月 16 日午後 4 時 20 分より、審査委員会主査、副査 2 名により、論文内容及び関連領域の知識に関する口頭試問による学力試験を行った。質問に関する的確な回答がなされ、博士としての学力は十分であると判断された。

公開博士論文討論発表会の結果

森元 直美氏の公開博士論文討論発表会は、平成 27 年 12 月 24 日に本学須磨キャンパス C 館 318 号室で午後 2 時 40 分から行われた。家政学研究科教員、院生などの出席のもと、パワーポイントを用いて論文内容を説明する発表が約 40 分間行われた。その後約 40 分にわたって主査、副査を含む教員から 19 点にわたって質疑があり、それに対し応答があった。その内容は多糖類の種類と添加量の問題、冷凍温度の問題、キサンタンガム構造の問題、発酵生成物の問題などの研究や実験の細部に関する質問などであった。質問に関しては口頭での回答に加え、平成 28 年 1 月 4 日に提出された口頭試問の回答書において補足され、適切な回答が得られている。これらの点から、当該領域の博士に必要な知識とプレゼンテーション能力がある事が確認された。

総合結果

平成 27 年 12 月 24 日発表会後に、主査、副査 3（外部審査委員として京都大学教授松村 康生氏含む）による論文審査委員会を開催した。また、平成 28 年 1 月 4 日の回答書提出後、さらに電子メールによる審議を行った。学位論文の審査結果、試験の結果及び公開博士論文討論発表会の結果を総合して審査したところ、全員一致で提出された論文は博士（食物栄養学）の学位に相当するものと判断した。