

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	鶴留 奈津子
審査委員	主査 鹿児島 大学 准教授 加治屋 勝子
	副査 鹿児島 大学 教授 北原 兼文
	副査 鹿児島 大学 准教授 塩崎 一弘
	副査 琉球 大学 教授 和田 浩二
	副査 鹿児島 大学 准教授 南 雄二
審査協力者	
実施年月日	令和5年1月30日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和5年1月30日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	鶴留 奈津子
[質問1]	Fynの活性化はエンドサイトーシス/エキソサイトーシスのどこにシグナルが入っているか。
[回答1]	細胞膜近傍に移行したFynがFlotillin1を活性化することが報告されているが、本研究でもFlotillin1の発現量が増加していることから、SPCによる異常収縮の発生やエンドサイトーシスの発生にFynによるFlotillin1の活性化機構が関係していると考えている。
[質問2]	FynやROCK、ミオシンとの関連性において、既存のデータと合わせてどういう仮説が考えられるか。
[回答2]	FynやROCKの活性化は異常収縮以外に他の細胞機能にも関与しているため、ROCKの活性化のみで異常収縮の発生を評価するのが難しいと考え、今回はFynやROCKの活性化については評価を行っていない。またミオシンのリン酸化は、正常収縮においてもリン酸化や脱リン酸化が起きることが既に報告されており、正常収縮と異常収縮のシグナルが同時に発生するので、仮説を立て難い。
[質問3]	SPCはもともと存在していて異常収縮により増えるのか、それとも細胞から分泌されるのか。
[回答3]	SPCは、細胞膜を構成しているスフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴミエリンの代謝異常により産生されることが知られており、別の研究グループによると溶血などにより赤血球が破壊されると赤血球膜のスフィンゴミエリンから生成されることが報告されている。しかし、詳細は不明である。
[質問4]	フレッシュリーフはどのように調製したのか。桑茶は酵素活性を失活させるためにスチームするが活性を持ったままなのか。
[回答4]	フレッシュリーフは葉を採取してすぐに乾燥させただけの試料である。また桑茶はスチームした後焙煎(有/無)した試料を用いている。
[質問5]	抽出物は70%エタノールで抽出、乾固後、超純水に再溶解しているとのことだったが、この時は水に完全に溶解していたか。また、実際に桑茶という形になると、水や熱水抽出の場合ほどのくらい移行するかわかれば教えて欲しい。
[回答5]	超音波処理を行い、完全に溶解したことを確認して実験には使用した。またFisetinはどちらかというと疎水性が強い化合物なので、桑茶に含まれるFisetin量を定量したところ検出はできた。しかし抽出温度によってもFisetin含量が変わることを確認しているため、異常収縮予防食材として桑茶を用いる場合は、抽出温度や飲み方まで明らかにした上で消費者に届ける必要がある。
[質問6]	活性部位はC環3位の水酸基で、B環のOH基は関与しないということなので、例えばメトキシフラボンなどC環3位を潰してしまえば良いと思うが、これについてはどうか。
[回答6]	C環3位をOH基以外で置換した化合物により確認することは有効な手立てと考える。本

発表では割愛したが、脂質二重層に対してC環3位の水酸基が相互作用しやすいことが報告されているので、脂質二重層との関わりが予防機序に関与しているのではないかと考える。

[質問7] 配糖体がほとんどないのがやや不思議に思うが、複数の糖が結合している可能性もあるので、 β -グルコシダーゼではなく、酸加水分解して確認したらどうか。

[回答7] ポジティブコントロール化合物を使用して酸加水分解ができる測定系を構築して、実際に桑試料で酸加水分解を行ってみたところ、なぜかFisetinを示すピークが酸加水分解によって消失してしまうという現象が確認され、上手くいかなかったため今回の酵素分解を試みた。ただ酵素分解をする場合も、 β -グルコシダーゼ以外の酵素についても確認する必要があると考える。

[質問8] 桑には血糖上昇抑制など様々な生体調節機能が報告されているが、これらの作用に対するFisetinの効果は報告されているか。

[回答8] Fisetinによる血糖値抑制効果は報告されているが、Fisetinは老化細胞除去薬として医薬品としての承認申請も進んできていることから、細胞老化に関する生理的機能が注目を集めている。

[質問9] Fisetinは HPLCにおいて標品のリテンションタイムで同定したのか。他のリテンションタイムに配糖体を示すピークがないのか。標品に酸を入れても目的ピークが消えるか。

[回答9] 標品でリテンションタイムを確認し、標品と桑試料を混合したものでリテンションタイムにずれがないかも確認している。また、酸加水分解後のピークを分取して質量分析計で確認しており、酸加水分解をすると前方のピークが増えるが、例えばこれはクロロゲン酸を示しており、配糖体があるかどうかを見極めることが難しかった。Fisetinは標品だとピークは消えないが桑試料を用いると消える。

[質問10] 取り込まれたものが細胞外に出ることについて、例えばユビキチン・プロテアソーム系など、本研究に関与する報告や考えがあれば教えて欲しい。

[回答10] 本研究で示した「SPCがエンドソームで細胞に取り込まれること」「異常収縮細胞がエクソソームを排出すること」はこれまでに報告が無い。一因として、エクソソームの回収が難しいことがあげられる。また、本研究ではエクソソームの確認にCD9やCD63をマーカータンパク質として発現量解析を行ったが、エクソソームに発現しているか特定のタンパク質を解析することができれば、例えば異常収縮を起こしやすい人の健康診断などでバイオマーカーとして活用することもできると考える。

[質問11] マイクロドメインが破壊されていることは確認しているか。

[回答11] 先行研究で細胞や組織におけるメチル β サイクロデキストリン処理における最適条件が検討されているため、この条件を基にマイクロドメイン除去をおこなっており、本研究ではコレステロールを染色するフィリピン染色はおこなっていない。その他、コレステロール量やマーカータンパク質の発現量は確認しているが、マイクロドメインがどのくらい破壊されているかは確認できていない。