

博士学位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第51号

2023年3月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条の規定による公表を目的とし、令和5年3月19日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位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）であり、乙は同条第2項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1.	<small>キュウマ</small> 久間 <small>アンナ</small> 杏那	[博士 (物理学)]	1
2.	<small>ミタライ</small> 御手洗 <small>ショウ</small> 彰	[博士 (先端情報学)]	4
3.	<small>ヤマダ</small> 山田 <small>トモヒト</small> 等仁	[博士 (生命科学)]	9
4.	<small>タネムラ</small> 種村 <small>ヒロキ</small> 裕幸	[博士 (生命科学)]	12

氏名（本籍）	久間 杏那（愛知）
学位の種類	博士（物理学）
学位記番号	甲理 第17号
学位授与年月日	令和5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	金星熱潮汐波の大気安定度依存性とスーパーローテーションに対する力学的効果
論文審査委員	主 査 高木 征弘 教授
	副 査 佐川 英夫 教授
	〃 高谷 康太郎 教授

論文内容の要旨

本申請論文の主要部分は、国際的な査読付き学術雑誌 “Journal of Geophysical Research: Planets” 127 巻に掲載された “A sensitivity study of the thermal tides in the Venusian atmosphere: Structures and dynamical effects on the superrotation” である。

金星大気中には、太陽光吸収による大気加熱で励起される、熱潮汐波と呼ばれる惑星規模波動が存在している。金星大気中の熱潮汐波は主に強制重力波によって構成され、その鉛直伝播に伴って角運動量が上下に輸送されるため、大気スーパーローテーションと呼ばれる全球的な高速東西流の生成・維持に重要な役割を果たしていると考えられてきた。近年では大気大循環モデル (Atmospheric General Circulation Model; GCM) を用いて熱潮汐波の空間構造を明らかにする研究が試みられている。しかしながら、GCM によって得られた熱潮汐波の空間構造には、金星探査機あかつきなどの観測結果と整合しないという問題が指摘されており、大気スーパーローテーションへの力学的な影響を解明する上で大きな問題になっていた。最近では、あかつきの紫外光観測で推定された雲頂高度での水平風分布から、熱潮汐波による赤道向き角運動量輸送が大気スーパーローテーションの維持に寄与している可能性が指摘され、熱潮汐波の正確な再現が重要な課題となっている。本論文において、学位申請者は従来の金星 GCM を改良することにより、観測結

果と整合的な熱潮汐波の空間構造を再現することに成功した。さらに、その結果を用いて熱潮汐波による角運動量輸送と熱輸送を評価することにより、角運動量の南北・鉛直方向の輸送と熱輸送の空間分布を解明し、それらが雲層高度の大気スーパーローテーションの維持に寄与する効果を定量的に明らかにした。

序論および第1章では、これまでの先行研究を概観し、本論文の主要な結果の概要が述べられている。

第2章では、数値モデル（金星 GCM）の概要とともに、モデルの改良点が説明されている。本研究で用いた金星 GCM では赤外線によるエネルギー輸送がニュートン冷却によって簡略化されているが、モデル中で再現される大気安定度の分布および温度場の緩和先として仮定される参照温度場が観測結果と整合的ではないことを指摘し、最新の観測結果（Tellmann et al., 2009; Ando et al., 2020）に基づく改良案を提示している。本論文では、観測結果をもとに仮定した大気安定度の3通りの鉛直プロファイルを用いて数値積分を実行し、得られる大気安定度分布と熱潮汐波の構造の違いを検討するという方針が採られている。

第3章では、数値モデルを長期間積分することによって得られた大気大循環（東西風、子午面循環、温度および大気安定度の緯度・高度分布）を詳しく検討し、結果の妥当性を吟味している。さらに、基本場中に再現された熱潮汐波の3次元構造を抽出し、あかつき観測などと詳細に比較している。その結果、本研究で改良された参照温度場を用いると、観測と整合的な大気安定度分布と熱潮汐波の構造が再現されることを示し、その要因として半日潮の鉛直構造の重要性を明らかにしている。さらに、熱潮汐波による角運動量輸送、熱輸送、Eliassen-Palm (EP) flux を評価することにより、あかつき観測によって雲頂高度で得られた赤道向き角運動量輸送が、数値モデルによって定量的にも正しく再現できることを示し、スーパーローテーションが低緯度域の広い高度範囲で効果的に加速されることを明らかにしている。同時に、熱潮汐波による南北角運動量輸送が緯度・高度に強く依存し、必ずしも赤道向きではないことや、まだ観測されていない鉛直角運動量輸送や熱輸送の効果も重要であることを明らかにしている。これらの結果は、雲層全域にわたる広い高度範囲の観測が必要であることを示している。

第4章では、第3章で得られた結果がさらに詳しく考察され、子午面循環や極域の上層大気で観測されている周極低温域（コールドカラー）に対する影響などが議論されている。

第5章は全体のまとめである。

本論文の付録は、金星山岳波（地形によって励起される定常重力波）の鉛直伝播とスーパーローテーションに対する力学的効果に関する研究である。最近、金星探査機 Venus Express やあかつきの観測によって金星大気中に大規模な山岳波が発見され、雲頂付近のスーパーローテーションを減速する可能性が指摘された。学位申請者は地球大気用の非静力学モデル CReSS を金星用に修正し、山岳波の数値シミュレーションを行った。その結果、金星山岳波の鉛直伝播に対する地面付近の東西風および大気安定度・惑星境界層の厚さに対する依存性を明らかにし、従来考えられていた雲頂付近のスーパーローテーションの減速効果がほとんど存在しないことや、山岳波の

東西波数分布の高度依存性を明らかにしている。この付録部分については、現在、国際的な査読付き学術雑誌 “Icarus” に “Influence of the horizontal wind and static stability near the surface on the topographic waves in the Venusian atmosphere” として投稿中である。

論文審査結果の要旨

本論文は、金星大気中の熱潮汐波の空間構造および大気大循環に対する力学的効果に関する研究である。熱潮汐波の空間構造に関しては多くの先行研究 (Pechmann and Ingersoll 1984; Takagi et al. 2018 など) があるが、金星探査機あかつきの観測結果との大幅な不整合が指摘されており (Kouyama et al. 2019)、熱潮汐波自体の理解だけでなく、それが大気大循環 (特に金星大気スーパーローテーション) に与える力学的効果を明らかにする上でも大きな問題になっていた。本論文では、従来の金星大気大循環モデル (GCM) を改良することにより、観測と整合的な熱潮汐波の空間構造の再現に成功し、熱潮汐波に対する大気安定度分布の重要性を明らかにしている。さらに、熱潮汐波に伴う角運動量輸送や熱輸送、および Eliassen-Palm (EP) flux を評価することにより、熱潮汐波がスーパーローテーションに与える影響を明らかにすると同時に、従来考慮されていなかった熱輸送の重要性を指摘している。これらの結果は今後の金星探査計画を考える上でも重要な結果である。

本論文は、金星大気中の熱潮汐波とその力学的効果に関する注目すべき独創的な結果であり、国際的に評価の高い専門雑誌に掲載されている。また、学位申請者は、本論文の結果について国内外の学会や研究集会で発表を行っている。学位申請者は、本論文の結果を発展させ、金星熱潮汐波と山岳波に関する研究を進めており、さらなる発展が期待される。

令和5年2月9日(木)に開催した博士学位論文公聴会および審査会において、学位申請者は、研究の背景、目的、および結果について詳しく解説し、審査委員の質問に対して的確に回答した。これらの結果から総合的に判断して、本調査委員会は、本論文が博士学位論文に値するものと判定する。

氏名（本籍）	御手洗 彰（神奈川県）		
学位の種類	博士（先端情報学）		
学位記番号	甲先 第5号		
学位授与年月日	令和5年3月19日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
論文題目	人間の身体の内的変化に着目した社会的つながりを活性化させる環境知能システム		
論文審査委員	主 査	棟方 渚	准教授
	副 査	平井 重行	教授
	〃	水口 充	教授
	〃	松原 仁	教授

論文内容の要旨

本学位論文は、身体の内的変化からユーザ状態を理解し、それに即した介入を行うことで、ユーザ同士の社会的つながりを活性化させる環境知能システムの実現を目指している。本論文で着目している「身体の内的変化」というのは、表情や姿勢など外観に表出されるような体外の変化ではなく、覚醒度に応じて無意識的に変化する皮膚電気抵抗値や動作を伴わない筋収縮によって意識的に変化する筋電位による身体の変化を指す。上記提案システムの実現に向け3つのアプローチで研究を行なっている。まず、身体の内的変化（皮膚電気抵抗）による①複数人コミュニケーションにおけるユーザ状態の理解と、②提案する環境知能システムのユーザ支援がユーザ間の社会的つながりを活性し得るかについて調査を行なっている。次に、このような環境知能システムにユーザがアクセスする際の入力インターフェースについて、社会的つながりの活性を妨げることなく、身体の外観的变化（関節動作）を伴わずに入力可能な筋肉の等尺性収縮を利用した③入力インターフェースの開発を行なった。以下、3つのアプローチについて、方法と成果について具体的に説明する。まず、身体の内的変化に着目した①については、複数人でのコミュニケーション下における個々のユーザの無意識の内的変化から、社会的つながりを活性化させる要素の抽出

を行う観察実験を行なっている。実験では複数人コミュニケーション課題として、多人数参加型の対話心理ゲームと位置づけられる人狼ゲームを用い、人間同士のインタラクションの観察を通して、社会的つながりを活性化しうる振る舞いを調べた。対象とする被験者として、プロ（人狼劇出演の役者）と、アマチュア（大学生・大学院生）を用意し、50 試行以上のプレイを分析した。ここでは、複数人コミュニケーション時の社会的つながりを活性化させ得る要素のうち、他者の行動変容をもたらすような働きかけ（主に説得や誘導など）を中心に調べた。得られた知見として、「他者の状態（思考）や状況を理解し、働きかけるタイミングを決定すること」「他者の嗜好を理解し、適切な手法で働きかけること」、これらの要素が社会的つながりの活性に必要な「競争」に関わる意識を高めていたことが理解できた。次に、①で得られた社会的つながりの活性に寄与する要素を含めた②環境知能システムについて、システムによるユーザ支援が複数人ユーザの社会的つながりを活性し得るのかについて調査を行った。具体的には、被験者 2 名 1 組（12 組 24 名）で行うレクリエーションを対象とし、環境知能システムとの仲介役としてヒューマノイドロボットを用いて介入させ、社会的つながり活性化を促進し得るのかを調査した。2 名 1 組で行うレクリエーションとして、「だるまさんがころんだ」をベースとした VR ゲームを用意し、環境システムの介入の有無による、両被験者の振る舞いや印象の変化等を調査した。前述①の実験で得られた要素として、「適切なタイミング（主に会話の開始時）」と「適切な手法（必要としている情報を過不足なく提示する）」を採用した働きかけとして、被験者のうちどちらかが不利／有利な状況となったタイミングで、不利なプレイヤーに対してのみ有利な状況となるような情報の提供を行うといった場面を体験させ、ユーザの印象や振る舞いを調査した。この実験の結果として、ロボットを介した環境知能システムの介入が、両被験者のレクリエーションに対するモチベーションや勝敗への執着を有意に高めたことが示された。次に、ユーザが環境知能システムに直接アクセスする方法（情報入力手段）として、社会的つながりを阻害せず、身体の外観的变化（関節動作）を伴わない筋肉の等尺性収縮を利用した入力インターフェース開発し、その評価を行った。真の意味でユーザを支援する環境知能システムを構築するためには、どのような状況下においてもユーザの状況を適切に理解する必要があるが、従来手法では人間のコミュニケーションメディア（視覚、音声、身振り手振り）を利用した手法が多く用いられてきた、しかし従来の手法では、実世界の活動を阻害するといった課題がある（例として、他者との会話中に音声入力インターフェースを使用できない、両手が塞がった状態では手指を使った操作ができない等）。環境知能システムを様々な環境・状況下で行うことを想定すると、従来のインターフェースでは、実世界の活動を阻害してしまう可能性がある。そこで、人間のコミュニケーションメディアを介さずに入力できる様式として、様々な状況下においてもユーザの主活動を止めることなく入力可能な関節動作を伴わない筋肉の等尺性収縮に着目した入力インターフェースを開発した。具体的には、そのようなインターフェースを開発するためにインタラクションの阻害要因（ユーザの入力モダリティが占有されている）に対して、問題の原因を調査し、それを改善するための手法として、筋電位を用いた入力インターフェースを開発し評価した。評価実験の結果、93.13%の入力識別精度を示した。

従来手法で同様の分類タスクを行った際の精度は 59.17%であったため、33.96%の精度向上を実現できていた。

本学位論文は、上記のような①から③のアプローチにより、「社会的つながりの活性化」を支援する環境知能システム構築の実現可能性を十分に示しており、得られた結果は人間に関わるあらゆる分野（娯楽、教育、医療など）におけるユーザ支援を実現する上で重要な知見となると考えられる。今後は本論文で得られた知見を環境知能システムに実装し、システムの実現及び長期間を目指すとしている。本論文で得られた知見、学術的成果は博士の学位に十分値するものであると判断する。

論文審査結果の要旨

本学位論文は、身体の内的変化（意識／無意識）に着目しユーザ状態を理解することで、ユーザ同士の社会的つながりを活性化させる環境知能システムの実現を目指している。身体の内的変化というのは、表情や姿勢など外観に表出される変化ではなく、覚醒度に応じて無意識的に変化する皮膚電気抵抗や筋収縮に伴って意識的に変化する筋電位による身体の変化を指す。上記システムの実現に向け、身体の内的変化（皮膚電気抵抗）による①複数人コミュニケーションにおけるユーザ状態の理解と、②提案する環境知能システムのユーザ支援がユーザ間の社会的つながりを活性し得るかについて調査を行なっている。加えて、このような環境知能システムにユーザがアクセスする際の入力インタフェースについて、社会的つながりの活性を妨げることなく、身体の外観的变化（関節動作）を伴わずに入力可能な筋肉の等尺性収縮を利用した③入力インタフェースの開発を行なった。

身体の内的変化に着目した①については、複数人でのコミュニケーション下における個々のユーザの無意識の内的変化から、社会的つながりを活性化させる要素の抽出を行う観察実験を行なっている。具体的には、多人数参加型の対話心理ゲームと位置づけられる人狼ゲームを用い、人間同士のインタラクションの観察を通して、社会的つながりを活性化しうる振る舞いを抽出した。対象とする被験者として、プロ（人狼劇出演の役者）と、アマチュア（大学生・大学院生）を用意し、50試行以上のプレイを分析した。結果から、複数人コミュニケーションにおける社会的つながりを活性させ得る要素のうち、他者に対する説得、つまり他者の行動変容をもたらすような働きかけを中心に調べ、以下のような知見を得た。

- 他者の状態（思考）や状況を理解し、働きかけるタイミングを決定すること
- 他者の嗜好を理解し、適切な手法で働きかけること

また、上記の要素を含め、②環境知能システムのユーザ支援が複数人ユーザの社会的つながりを活性し得るのかについて調査を行った。具体的には、被験者2名で行うレクリエーションを対象とし、環境知能システムの仲介役としてヒューマノイドロボットを用いてレクリエーションを援

助させ、社会的つながり活性化の可能性を調査した。レクリエーションとして、「だるまさんがころんだ」をベースとしたVRゲームを用意し、両被験者の振る舞いや印象の変化を調査した。前述①の実験で得られた要素として、「適切なタイミング（主に会話の開始時）」と「適切な手法（必要としている情報を過不足なく提示する）」を採用した働きかけとして、被験者のうちどちらかが不利／有利な状況となったタイミングで、不利なプレイヤーに対してのみ有利な状況となるような情報の提供を行うといった場面を体験させ、ユーザの印象や振る舞いを調査した。この実験の結果として、ロボットを介した環境知能システムの介入が、両被験者のレクリエーションに対するモチベーションや勝敗への執着を有意に高めたことが示された。

次に、ユーザが環境知能システムに直接アクセスする方法（情報入力手段）として、社会的つながりを阻害せず、身体の外観的变化（関節動作）を伴わない筋肉の等尺性収縮を利用した入力インタフェースの開発を行いその評価を行った。ユーザを支援する環境知能システムを構築するためには、どのような状況下においてもユーザの状況を適切に理解する必要があるが、従来手法では人間のコミュニケーションメディア（視覚、音声、身振り手振り）を利用した手法が多く用いられてきた。しかし従来手法では、実世界の人間の活動を阻害するといった課題がある（例として、他者との会話中に音声入力インタフェースを使用できない、両手が塞がった状態では手指を使った操作ができない等）。環境知能システムを様々な環境・状況下で行うことを想定すると、従来のインタフェースでは、実世界の活動を阻害してしまう可能性がある。そこで、人間のコミュニケーションメディアを介さずに入力できる様式として、どんな状況下においてもユーザの主活動を阻害せずに入力可能な身体の内的変化を利用した（関節動作を伴わない筋肉の等尺性収縮に着目した）入力インタフェースを開発した。

具体的には、そのようなインタフェースを開発するためにインタラクションの阻害要因（ユーザの入力モダリティが占有されている）に対して、問題の原因を調査し、それを改善するための手法として、筋電位を用いた入力インタフェースを開発し評価した。評価実験の結果、93.13%の入力識別精度を示した。従来手法で同様の分類タスクを行った際の精度は59.17%であったため、33.96%の精度向上を実現できている。

本学位論文は、上記のような①から③のアプローチにより、「社会的つながりの活性化」を支援する環境知能システム構築の実現可能性を十分に示しており、得られた結果は人間に関わるあらゆる分野（娯楽、教育、医療など）におけるユーザ支援を実現する上で重要な知見となる。

本博士学位論文をふまえ、2023年2月13日14:00 14号館14102教室とオンラインで先端情報学研究科博士学位論文公聴会として実施し、副査の水口教授と平井教授、松原教授による本審査会を実施した。質疑応答を通して新規性や有用性を示し、今後の発展性についても明確となった。また、2編の査読付き学術論文のほか複数の発表があり、第三者の専門家による客観的評価がなされており、学術成果としての基準を満たしている。以上、博士学位論文公聴会による本審査と学術成果を踏まえ、博士学位論文として十分な内容を有すると判断し審査委員全員の一致で合格と判定した。

学術論文(査読有り)

[1] Designing Hand Gesture Sequence Recognition Technique for Input While Grasping an Object, Sho Mitarai, Nagisa Munekata, Daisuke Sakamoto, Tetsuo Ono, Transactions of the Virtual Reality Society of Japan, 26(4), pages 333-344, December 2021.

[2] 物を把持した状態における筋電センサを用いたハンドジェスチャ入力の問題抽出と新手法の提案、御手洗彰、棟方渚、小野哲雄、日本バーチャルリアリティ学会論文誌、22(1)、pages 41-50、March 2017.

研究発表(査読無し) 一部抜粋 他8件

[1] 皮膚電気活動を指標とした人狼プレイヤーのゲーム体験に基づくハイライト抽出の試み御手洗彰、棟方渚人工知能学会全国大会論文集第36回全国大会(2022)、 June 2021.

[2] ロボットを用いたレクリエーション援助がプレイヤーのモチベーションに与える影響の調査、御手洗彰、棟方渚、研究報告エンタテインメントコンピューティング(EC)、 June 2022.

[3] 筋肉の非活動部位を活用した外科手術用の筋電入力インタフェースの検討、御手洗彰、棟方渚、研究報告ヒューマンコンピュータインタラクション(HCI)、 January 2022.

[4] 筋肉の非活動部位を入力モダリティとして用いたハンドジェスチャ認識手法の提案、御手洗彰、棟方渚、研究報告ヒューマンコンピュータインタラクション(HCI)、 November 2021.

[5] プレイヤーのゲーム体験分析による5人人狼の特性抽出、御手洗彰、山本浩隆、棟方渚、研究報告ヒューマンコンピュータインタラクション(HCI)、 August 2021.

[6] 人狼プレイヤーの皮膚電気活動の解析: 情動変化を利用したソシオメータの実現へ向けて、御手洗彰、水丸和樹、本田健悟、棟方渚、坂本大介、小野哲雄、情報処理学会インタラクション2018、pages 885-888、 March 2018.

[7] 前腕の表面筋電を用いたジェスチャ認識の実験的検討、御手洗彰、棟方渚、吉田彩乃、櫻沢繁、小野哲雄、研究報告ヒューマンコンピュータインタラクション(HCI)、 2016. 13、 pages 1-6、 June 2016.

氏名（本籍）	山田 等仁（京都）
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	甲生 第5号
学位授与年月日	令和5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	二成分毒素の複合体構造および酵素成分の膜孔透過機構の解明
論文審査委員	主 査 津下 英明 教授
	副 査 遠藤 斗志也 客員教授
	〃 横山 謙 教授

論文内容の要旨

【背景と目的】

一度形成されたタンパク質の三次構造は、ほとんどの場合、ほどけることはない。しかしながら、ある種の細菌の二成分毒素は、一度形成されたタンパク質毒素（酵素成分）をほどいて宿主の細胞内に膜透過させる装置を持つ。本学位論文は、二成分毒素の複合体構造および酵素成分の膜透過機構について研究したものである。

腸内の常在細菌である *Clostridium perfringens* (ウェルシュ菌) や *Clostridioides difficile* (ディフィシル菌) は様々な毒素を持つことが知られている。特に、この2つの細菌は、共通の毒素として、二成分毒素を持つ。どちらの二成分毒素も、宿主細胞内でアクチンのADPリボシル化を行う酵素ユニット (Ia/CDTa) と酵素成分を細胞内に輸送するタンパク質膜透過装置 (Ib/CDTb 膜孔) からなる。酵素サブユニットの構造は、X線結晶構造解析により、その構造と機能はわかっていたが、タンパク質膜透過装置の構造と機能については不明であった。この論文は一連の研究により、二成分毒素複合体の高分解能の構造をクライオ電子顕微鏡で明らかにし、その酵素成分の膜透過機構の最初の様子を明らかにしたものである。

【結果と考察】

学位申請者は、最初にウェルシュ菌の二成分毒素であるイオタ毒素のタンパク質膜透過装置の精製に取り組んだ。しかし、通常のプロテアーゼによる活性化条件では、オリゴマー化の効率が悪く、ほとんどはモノマーのままであった。その後、エタノールを加えた条件で、オリゴマー化効率が上がることを見出し、界面活性剤 LMNG を用いて可溶化したサンプルを用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、二成分毒素で初めての複合体 (Ia が結合した Ib 膜孔) の高分解能構造を報告した (Nature Structural & Molecular Biology 2020 12(10):e0186392.)。このイオタ毒素の発表と同じ時期に、米国の 2 つのグループが、デフィシル菌の二成分毒素 CDT の CDTb 膜孔ダブルヘプタマーの構造を明らかにした。この構造は、膜に孔を開ける部分が隠されており、機能するように思えない。このことから、学位申請者は、イオタ毒素と同様の精製方法を用いて、すなわち界面活性剤 LMNG を用いて可溶化したサンプルを用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、CDTb 膜孔(ヘプタマー) に CDTa が結合した高分解能構造とその膜透過機構の最初の様子を明らかにした (Nature communications 2022 13(1):6119.)。

本研究は、(1) これまで分子レベルでの研究がほとんど進められていなかったウェルシュ菌とデフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過装置に注目して、その構造を明らかにした。(2) 酵素成分とタンパク質膜透過装置の複合体の構造を明らかにした。さらに(3) 2 つの二成分毒素でタンパク質の膜透過の共通の基盤があることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

本博士論文は 2 部の構成からなり (1) ウェルシュ菌が産生する二成分毒素のイオタ毒素の複合体構造の解明と (2) デフィシル菌 が産生する二成分毒素 CDT の複合体構造の解明からなる。

この 2 つの異なる複合体の構造解析から、わかってきたことは、(1) 7 つのプロトマーが集まり、約 100 Å の β バレルシステムを持つ膜孔を形成する。(2) 膜孔には酵素成分が 1 分子結合する。

(3) その結合には酵素成分の N 末端ドメインが関与する。(4) 酵素成分は、膜孔結合により、その N 末端がほどけ、その先の電子顕微鏡マップは膜孔の最狭窄部位 ϕ クランプに続いていた。

(5) 一方、酵素成分との結合には膜孔の NS(X)-loop が関わる。このループはアポ体では二状態のコンフォメーションをとるが、酵素成分が結合することにより、いくつかのプロトマーで二状態のコンフォメーションに偏りが生まれる。生化学解析により NS(X)-loop は酵素成分との結合に関与することを明らかにしたが、透過に関与するかどうかは今後の明らかにすべき課題である。最も重要な点は、二成分毒素それぞれ成分の結合によりタンパク質膜透過機構の最初の様子：酵素成分の N 末端がほどける様子が捉えられたことである。特に CDTa 結合 CDTb 膜孔(ヘプタマー) では、3D variability 解析により、複合体中で、インタクトの CDTa が結合した状態 (Folded) と N 末端がほどけた状態 (Unfolded) をそれぞれ分けて構造精密化することに成功している。

予備調査における主査及び 2 名の副査の協議において、本研究は、(1) これまで分子レベルでの

研究がほとんど進められていなかったウェルシュ菌とディフィシル菌の二成分毒素のタンパク質膜透過装置に注目して、その構造を明らかにした事(2)酵素成分とタンパク質膜透過装置の複合体構造を明らかにした事(3) 2つの二成分毒素でタンパク質の膜透過の共通の基盤が存在することを明らかにしたことは、学術的な意義があると結論した。また、研究課題の新規性、作業仮説の設定の仕方、実験方法の妥当性、結果の解釈や考察などについて大きな問題はないと判断された。

本研究により得られた知見は、二成分毒素のみならず、タンパク質膜透過機構の基礎の理解に資する。そして本論文に関する内容は、何れもハイインパクトな国際専門雑誌に掲載されている。主査、副査の博士論文調査委員による論文審査の結果、研究課題に新規性が認められること、作業仮説や実験方法に妥当性があること、そして、結果の解釈や考察が適切に導かれていることから、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであると認められた。また、令和5年2月14日に開催された公聴会では、発表内容は論理的かつ明瞭にまとめられており、質疑応答に対しても的確に回答されていた。よって、申請者は当該分野に関する学力において、博士の学位に相応しい資格を有していることが確認された。

以上より、本論文は、博士（生命科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

氏名（本籍）	種村 裕幸（愛知県）
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	乙生 第2号
学位授与年月日	令和5年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
論文題目	Hspa5 プロモーターを用いた新たな抗体安定発現系の構築
論文審査委員	主 査 潮田 亮 准教授
	副 査 板野 直樹 教授
	〃 川根 公樹 准教授

論文内容の要旨

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は抗体医薬の製造に広く使用されている。そのCHO細胞における抗体遺伝子の発現にはCMVやhEF1 α といった汎用プロモーターが使用されているが、これらのプロモーターは、14日間のフェドバッチ培養の後期（7~10日目以降）において、そのプロモーターからの目的抗体遺伝子の転写量が減少し、結果として抗体の生産効率が低下するという課題があった。本研究では、抗体生産性向上のため、高発現かつ培養後期まで抗体遺伝子の転写量を維持できるプロモーターの開発を目的として、トランスクリプトーム解析を基にした新規高発現プロモーターの探索を試みた。複数の抗体製造培養条件下でのトランスクリプトーム解析によって選抜した発現量が高い遺伝子の候補プロモーター領域をルシフェラーゼによるレポーターアッセイ及び実際の抗体発現量を評価することによってスクリーニングした。培養後期においても発現量が維持していた高発現プロモーターとしてHspa5プロモーター（Hspa5p）が単離された。さらに、in silico解析によるプロモーター領域の詳細な解析結果を基にプロモーター長を最適化し、抗体発現量をさらに向上させることに成功した。最適化したHspa5pの制御下で各種IgGサブクラス遺伝子を発現させた結果、いずれもフェドバッチ培養後期まで生産性が維持され、コントロールプロモーター（hEF1 α ）下流で発現させた場合と比較して生産性が向上しているこ

とが確認され、抗体医薬品製造用の細胞構築に活用できる汎用プロモーターとして使用できることが明らかとなった。Hspa5 は小胞体ストレスによって発現誘導される分子シャペロンである。そこで小胞体ストレス応答との関係を解析するため、Hspa5p 下流で抗体遺伝子を発現する独立した細胞株の小胞体ストレス関連遺伝子群の培養経時的な発現量を解析した。その結果、これらの遺伝子と抗体生産量及び重合体含量との間に相関があることが示唆された。すなわち、抗体の発現は小胞体ストレスを誘導し、小胞体ストレス関連因子の発現が上昇するのと同様に、小胞体ストレス応答プロモーターである Hspa5p の発現強度が上昇することによって抗体生産量を向上させることが示唆された。これらの結果から、外来タンパク質（抗体）をコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターとして Hspa5p を利用することで、CHO 細胞が有する、小胞体におけるタンパク質環境の恒常性（プロテオスタシス）の維持機能に同調した、より安定な抗体産生を実現できることが期待された。

論文審査結果の要旨

本学位論文は CHO 細胞における IgG 抗体産生について、抗体産生のための長期培養後半でおこる発現量の低下を克服するために、小胞体の主要な分子シャペロン Hspa5 のプロモーターを利用し、抗体発現量の低下を抑え、培養後期で抗体発現量を増加させることに成功した。

近年、抗体医薬品は、癌細胞特異的に抗がん剤を届けるなど抗がん剤などのドラッグデリバリーシステムにおいて非常に有用な治療法として需要がある。この現状をふまえ、CHO 細胞発現系において抗体の産生を向上させるため、目的遺伝子の発現を制御するプロモーターに着目して、高発現プロモーターのスクリーニングを実施した。トランスクリプトーム解析の結果、CHO 細胞の培養後期において、hspa5 遺伝子が高発現していることを明らかにし、この遺伝子上流領域を用いて、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を評価し、培養後期においても高いプロモーター活性を有していることを示した。また、抗体重鎖および軽鎖遺伝子をプロモーターに連結して抗体生産性を評価し、このプロモーターが抗体産生に適していることを確認した。さらに長さの異なる hspa5 遺伝子上流領域を用いて、抗体生産性を評価し、抗体産生に必要な最小プロモーター領域を特定した。本研究では、更に、hspa5 プロモーターによる高発現化機構について調査し、このプロモーターの高活性と小胞体ストレス応答との関連性について明らかにしている。そして、Hspa5p が抗体産生を向上させる活性が、小胞体ストレス応答を介す可能性を検証するために小胞体ストレス関連遺伝子の発現解析を行った結果、小胞体ストレス応答と抗体生産量に正の相関があることが示唆された。

本研究で申請者は、高い抗体生産性を実現する技術開発として、抗体産生細胞の培養期間を通じて抗体遺伝子の高発現を可能にする新規プロモーターの同定に成功している。そして、抗体医薬品の製造に向けた技術移転の諸課題についても検討を加え、一定の成果を得ている。得られた成果は、いずれも高く評価できるものであり、抗体医薬の生産性向上に資する技術基盤として、

極めて有用であると考えられる。

本研究に関する内容は、国際雑誌「Scientific Reports」に掲載され、主査および副査から構成される博士論文調査委員による論文審査の結果、研究課題に新規性が認められること、作業仮説や実験方法に妥当性があること、結果の解釈や考察が適切に導かれていることから、本論文は博士学位論文としてふさわしいものであると認められた。また、令和5年2月14日に開催された公聴会では、発表内容は論理的かつ明瞭にまとめられており、質疑応答に対しもの的確に回答されていた。よって、申請者は当該分野に関する学力において、博士の学位に相応しい資格を有していることが確認できた。

以上、本論文は博士（生命科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。