

博士学位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第 55 号

2025 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 6 年 3 月 16 日 17 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. 岡 卓也	〔博士（生命科学）〕	1
2. 中野 敦樹	〔博士（生命科学）〕	4

氏 名（本 籍）	岡 卓也（奈良県）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	甲生 第12号
学位授与年月日	令和7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論 文 題 目	尿中匂い分子による高齢者のサルコペニア判別方法に関する研究
論文審査委員	主 査 加 藤 啓 子 教授
	副 査 野 村 哲 郎 教授
	〃 棚 橋 靖 行 准教授

論文内容の要旨

本研究では、高齢者検診への利用を想定したサルコペニアの尿検査方法を検討した。

【背景】世界的に継続している高齢化現象は今後30年以上続くと推定されており、日本においても高齢社会対策大綱のもと高齢者の健康づくり施策が推進されている。加齢により心身が老い衰えた状態をフレイルとよび、フレイルが悪化することによって高齢者は要介護状態に至る。このため、フレイルの早期発見および運動や食事による治療介入が高齢者の健康維持において重要である。サルコペニアは高齢者の3割程度が罹患し、加齢とともに筋肉が減少することで徐々に運動機能が障害される疾患である。サルコペニアを罹患した高齢者は、運動機能の低下によって社会活動への参加が減少する。また、精神機能の低下すなわち不安うつ症状を併発し、要介護状態に陥る可能性が高くなる。サルコペニアは高齢者フレイルのきっかけになることから、サルコペニアの早期発見と回復はフレイルおよび要介護状態の予防に有効である。しかしながら、サルコペニアの診断は二重エックス線吸収法（DXA）あるいは生体電気インピーダンス法（BIA）など大型装置を用いた筋肉量分析と歩行速度などの運動機能を評価するための設備を必要とし、簡易的に検査することが難しい。以上の現状を踏まえ、要介護状態を効果的に防止するためにはサルコペニアを簡易的に検査でき、適切な治療介入を行うための指針となりうる診断技術の開発が必要であると考えられる。

【目的】サルコペニアの診断は高齢者の健康管理にとって極めて重要であるが、非侵襲的な生物学的サロゲートマーカーは同定されていない。本研究では、尿中の揮発性有機化合物（Volatile

organic compound: VOC) からサルコペニアのマーカーを探索・同定し、サルコペニアの非侵襲性診断の可能性を示すことを目的とした。

【方法】健康人 71 名と Asian Working Group on Sarcopenia 2019 基準で診断されたサルコペニア患者 68 名を対象に、尿中 VOC のヘッドスペース固相マイクロ抽出およびガスクロマトグラフ質量分析法を実施した。217 種類の VOC から Total イオンクロマトグラムで有意差が認められた 23 種類の VOC について、T 検定により VOC のベースピークフラグメントの m/z (質量電荷比) を比較した。サルコペニアの有無をアウトカム変数、10 種類の VOC (揮発性有機化合物) を説明変数としてロジスティック回帰分析を行った。診断精度を評価するため、ROC (Receiver Operating Characteristic) 分析を行い。サルコペニアの予測確率と握力、通常歩行速度、骨格筋量との相関性を評価した。

【結果】尿中バイオマーカー候補として 10 種類の VOC (p-キシレン、1-ブタノール、d-リモネン、ノナナール、ピロール、 γ -ブチロラクトンテキサノール、ノナン酸オクタン酸、フタル酸ジイソブチル) を同定した。10 種類の VOC を組み合わせた ROC 分析では、サルコペニアの高い診断精度 (AUC=0.866、95%CI : 0.829-0.942)、感度 80.9%、特異度 81.7%を示した。また、サルコペニアの予測確率は通常歩行速度や骨格筋よりも握力と有意に相関していた。

【結論】本研究は、尿から揮発する複数の VOC を検出することで、非侵襲的なサルコペニアの判別が出来る可能性を示している。また、尿中の VOC の検出は、サルコペニアの発症メカニズムや治療標的の開発に示唆を与えるものと期待される。

論文審査結果の要旨

予備調査の結果を受けて、本博士論文を以下の観点から本審査に付した。

1. 学位論文の評価

本論文は、サルコペニアのバイオマーカーを尿中の揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds: VOCs) から探索した研究報告である。その結果、10 種類の尿中最終代謝産物 VOCs を同定し、これらがサルコペニアの発症と高い相関性を示すことを明らかにした研究の報告である。さらに、サルコペニアの発症初期段階で、この 10 種類の VOCs が尿中排出量に変化を示す可能性も示唆した。この発見は、サルコペニアの非侵襲性診断といった社会実装への発展を提案した。

サルコペニアは高齢者の 3 割程度が罹患し、加齢とともに筋肉が減少することで徐々に運動機能が障害される疾患である。サルコペニアを罹患した高齢者は、運動機能の低下によって社会活動への参加が減少する。サルコペニアは高齢者フレイルのきっかけになることから、サルコペニアの早期発見と回復はフレイルおよび要介護状態の予防に有効である。また、サルコペニアの介入には、運動と栄養状態の改善が有効であることが知られている。そこで、加齢に伴う代謝変化を早期に捉えることが、サルコペニアの早期発見につながると考え、尿中の最終代謝産物である揮発性有機化合物の分析に着目した研究である。健康人 71 名と Asian

Working Group on Sarcopenia 2019 基準で診断されたサルコペニア患者 68 名を対象に、尿中 VOC のヘッドスペース固相マイクロ抽出およびガスクロマトグラフ質量分析法を実施している。さらに、ロジスティック回帰分析により、サルコペニアの予測確率を算出しており、この予測確率はサルコペニアの検出に高い正確性を示すものであった。以上より、本論文は優れた学位論文であり、学位論文として十分な水準に達しているものと判断できる。

2. 研究業績

申請者は、英文専門誌に筆頭著者として 1 報の論文を公表している。これは、専攻科の学位論文博士申請基準の内規を満たすものである。さらにこの論文に先立ち、PCT 出願 (W0/2024/210185)を行なっている。また、日本語総説(バイオインダストリー, 2024)を筆頭著者として公表すると共に、学会においても 3 回の研究発表 [ポスター発表 3 回 (うち国際学会 2 回)] をおこなっている。以上より、学位申請に十分な研究業績を備えている。

3. 学位申請論文公聴会

令和 7 年 2 月 6 日に公聴会を開催し、研究成果を公表すると共に、質疑応答による試験をおこなった。発表では、同定された 10 種の VOCs とサルコペニア発症に関わる代謝変化との関連性が十分に解明されていない点が指摘された。しかしながら、全体として研究成果は簡潔かつ明瞭にまとめられ、わかりやすく発表していた。また、質疑応答も的確であった。

氏 名（本 籍）	中野 敦樹（京都府）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	甲生 第13号
学位授与年月日	令和7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論 文 題 目	脂質二重膜中で機能中の ATP 合成酵素および呼吸鎖複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析
論文審査委員	主 査 横 山 謙 教授
	副 査 遠 藤 斗 志 也 教授
	〃 津 下 英 明 教授

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、近年目覚ましい発展を遂げているクライオ電子顕微鏡による構造解析により、生膜上で機能する ATP 合成酵素や呼吸鎖複合体の機能解明を目的として研究を進めた。

前半は、V 型の ATP 合成酵素である V/A-ATPase の ATP 合成中の中間体構造の決定を目的とした構造解析研究である。ATP 合成酵素は生体膜を横断するプロトン（水素イオン）を移動させようとするプロトン駆動力 (pmf) により ADP をリン酸化して ATP を合成する。申請者は、ATP 合成酵素が ATP を合成している時の構造を得るには、 pmf が負荷された状態での構造解析が必要であると考え、リポソームに V/A-ATPase と光駆動性のプロトンポンプであるバクテリオロドプシンを共再構成し、光照射およびさらにカリウムイオンの拡散電位を与えることで pmf 存在下での V/A-ATPase の構造解析を行った。ADP とリン酸を加え、 pmf 存在下で得られた V/A-ATPase の構造では、V₁ 部分に存在する 2 つの触媒部位に合成された ATP が確認された。 pmf が存在しない場合は、触媒部位に ADP が結合していた。このことは、得られた構造が ATP 合成中もしくは合成が完了した構造であることを示す。膜内在性部分である V₀ 部分では、 pmf が存在しない場合、固定子である a-subunit と回転子である c-subunit の間に塩橋が形成され、安定な構造をとっていた。 pmf 存在下で得られた V₀ 部分の構造では、この塩橋が切断され、 pmf が存在しない場合には見られない新しい構造変化が確認された。このことは、V₀ 部分において ATP 加水分解過程とは異なる構造変化で回転力が発生し、V₁ 部分で ATP が合成されることを明らかにした。 pmf を負荷した状態での膜タンパク質の構造解析例はなく、方法論的にも新規性が高い結果である。

後半部分は、ミトコンドリア内膜小胞上（SMP）にある ATP 合成酵素および呼吸鎖複合体の構造解析からなる。従来の膜タンパク質の構造解析では、可溶化精製したものを対象としていたが、可溶化することでゆるく結合しているサブユニットが脱落したり、複合体同士の会合が壊され、生体膜上で存在する本来の姿と異なるものを見ている可能性があった。申請者は、SMP をクライオ電子顕微鏡で観察撮影し、SMP 上にある ATP 合成酵素 F_0F_1 の単粒子画像を抽出してその構造を決定した。 F_0F_1 が SMP 上で調節因子である IF_1 で連結された二量体として存在し、さらにその二量体が近接することで四量体もしくはさらに大きな多量体として存在することを明らかにした。また、SMP 上に存在する呼吸鎖複合体の単粒子解析の結果、新しい組み合わせの超分子複合体が存在することが明らかになった。得られた呼吸鎖複合体構造の分解能は、原子モデル構築に十分であり、今回の手法により生体膜上の膜タンパク質を高分解能で構造決定できることが示された。生体膜上の膜タンパク質の構造解析法として、急速に研究が進んでいるクライオ電子線トモグラフィ（クライオ ET）があるが、分解能を上げるのが簡単ではないという問題があるため、今回の生体膜上にある膜タンパク質の単粒子解析法は、可溶化状態の膜タンパク質の構造解析と、クライオ ET によるトモグラフィとをつなぐ有力な方法となることが示された。

論文審査結果の要旨

ATP 合成酵素に代表される膜タンパク質複合体の構造解析は難易度が高く、特に生体膜上で機能している状態での構造解析例はほとんどない。そのため、ATP 合成酵素の機能中の構造変化を知ることは困難であり、どのような構造変化で機能するかは解決すべき課題として残されていた。

申請者である中野敦樹氏は、近年技術革新が著しいクライオ電子顕微鏡を用いた膜タンパク質複合体の構造解析について、より生体内に近い環境で構造情報を取得する方法を開発し、これを V 型 ATP 合成酵素とミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体および ATP 合成酵素に適用し、新たな知見を得ることに成功した。

本論文は大きく二つのパートからなり、前半では、V 型 ATP 合成酵素をリポソームに再構成し、*pmf* を負荷した状態での構造解析を行った。この結果、ATP 合成中と思われるいくつかの構造が得られ、プロトン駆動力になる回転力発生に関する重要な知見を得ることができた。特に、基質である ADP に対する高い選択性、プロトン駆動力による回転機構解明につながる中間体構造の同定、分子内のねじれによるエネルギー共役機構に関する特筆すべき知見が得られた点は大いに評価できる。

続く後半のパートでは、ミトコンドリア内膜からなる SMP 上の ATP 合成酵素と呼吸鎖複合体をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析で構造決定し、いままで見つかっていなかった複合体の組み合わせからなる超分子複合体の存在を明らかにした。

本審査では、公聴会における質疑討論を通してこれまで明らかでなかった生体膜上での膜タンパク質の構造を決定し、さらに分子機構の理解を進めた点で学術的な意義があることが認められた。さらに、*pmf* を負荷した状態で構造解析するなど、他の膜タンパク質の機能構造解析への波及効果が期待される点も評価された。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。予備調査段階で指摘のあった不正確な記載、単純な記載ミスなどは概ね改善されていた。第一著者としての3報の副論文が査読付き国際学術雑誌で刊行されており、申請者の研究成果が国際的にも高い評価を得ていることが確認された。

公聴会における発表では、研究成果の新規性や実験方法の妥当性、結果の解釈や考察の妥当性が議論された。質疑応答においては、概ね的確な回答がなされていた。

以上の議論を踏まえ、調査委員会は、申請者は博士（生命科学）の学位を授与されるのに相応しいと判断する。よって、論文審査及び最終試験を合格とする。