

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第 38 号

2015 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、平成 27 年 3 月 21 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 . 周 艷	〔博士（経済学）〕	1
2 . 佐 藤 雅 俊	〔博士（法律学）〕	5
3 . 新 中 善 晴	〔博士（物理学）〕	11
4 . 新 崎 貴 之	〔博士（物理学）〕	15
5 . <small>シーモントリー</small> SRIMONTRI <small>パイトゥーン</small> PAITOON	〔博士（生物工学）〕	19

論文博士

1 . 佐 倉 正 明	〔博士（生物工学）〕	25
2 . 鶴 村 俊 治	〔博士（生物工学）〕	29

氏名（本籍）	シームントリー バイトゥーン (タイ) SRIMONTRI PAITOON (タイ)
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工 18 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
論文題目	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4 regulates hormonal levels that are associated with emotional and reproductive behaviors
論文審査委員	主 査 加藤 啓子 教授
	副 査 齋藤 敏之 教授
	" 浜 千尋 教授

論文内容の要旨

Sialic acids are nine-carbon acidic monosaccharides that are located at the ends of sugar chains attached to glycoproteins and glycolipids by 20 species of sialyltransferases in the Golgi apparatus, and are involved in the cell-cell communication, adhesion and migration of cells. Of the 20 species of sialyltransferases identified to date, a focus was placed on the physiological functions of the sialyltransferase, ST3Gal IV. ST3Gal IV exhibits stimulation-responsive expression in epilepsy and inflammation. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in a genome-wide association of human populations have indicated that ST3Gal IV is associated with lipid metabolism, coronary artery disease, and attention deficit disorder with hyperactivity (ADHD); however, the regulatory mechanisms involved currently remain unknown. The involvement of ST3Gal IV in the expression and responses of hormones that affect neuropsychiatric symptoms and reproductive functions was also examined herein.

ST3Gal IV and growth hormone (GH) are both epileptic seizure-responsive genes that play roles in the development of epileptic seizures. In *Chapter I*, a decrease was detected in GH mRNA levels in the brains of ST3Gal IV-deficient mice using quantitative RT-PCR. This result suggested that ST3Gal IV regulates the expression of GH. Loss of the ST3Gal IV gene has been shown to induce anxiety, depression, and sleep disturbance. Presently, to examine behavioral similarity between ST3Gal IV and GH, the effects of infusions of GH and its receptor (GHR) antagonist into the hippocampus on emotional behaviors in mice

were examined using elevated plus maze and dark-light transitional tests. GH was found to cause hyperactivity in mice. Following these tests, mouse brains were subjected to immunofluorescence to determine the localization of epilepsy-responsive immediate early genes, including *Arc*, *Nr4a1*, *Npas4*, and *Fos*. The results obtained revealed that infusions of GH increased the number of GHR- and Arc-positive cells around the injection sites in the CA3-subfield of the hippocampus, whereas the infusion of the receptor antagonist decreased the number of Npas4-positive cells. These results suggest that the GH-GHR signaling system in the brain is involved in the expression of immediate early genes and hyperactivity. The possibility that ST3Gal IV modulates the GH-GHR signaling system associated with hyperactivity was proposed in *Chapter I*.

In *Chapter II*, the reproductive system of ST3Gal IV-deficient mice was investigated, including the development of puberty, the estrous cycle, mating, pregnancy, parturition, post-partum estrous, and nursing. The following reproductive phenomena were observed: (1) a ST3Gal IV deficiency delayed the onset of puberty and prolonged the estrous cycle in mice; (2) when ST3Gal IV-deficient mice entered proestrus once, they succeeded in mating and became pregnant; (3) all ST3Gal IV-KO fetuses were alive on gestation day 19 prior to parturition; (4) ST3Gal IV-deficient mothers often failed to deliver and nurse offspring. Therefore, ST3Gal IV-deficient female mice exhibited an irregular estrous cycle and perinatal disorders. The hormonal responses involved in these phenomena were then examined. The results obtained revealed that ST3Gal IV-deficient mice did not show the plasma progesterone withdrawal and did not increase plasma level of follicle-stimulating hormone (FSH) on gestation day 19 that normal mother showed. Progesterone generally exerts negative feedback suppressive effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) production at the hypothalamus and also on the production of LH and FSH at the pituitary in order to prevent parturition and estrus, while progesterone withdrawal induces parturition. The results obtained showed that the loss of ST3Gal IV prevented progesterone withdrawal, which led to the failure of parturition and post-partum estrus. Progesterone and its metabolites are known to be critically involved in catamenial epilepsy, depression, anxiety, mood symptoms, and neuroprotective effects. The irregular expression of progesterone demonstrated herein may be associated with neuropsychiatric symptoms in ST3Gal V-KO female mice.

The results of this thesis indicate that ST3Gal IV modulated the expression of GH and progesterone, and this altered expression is associated with emotional behaviors and perinatal disorders. GH affected hyperactivity levels, and an irregularity in progesterone-FSH levels of mother causes perinatal disorder. These suggest that the ST3Gal IV-KO mouse is a viable model for investigating involvement of hormonal responses in novel mechanisms underlying brain functions and will open a path for therapeutic interventions to halt the progression of epilepsy, anxiety, and perinatal abnormalities.

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、てんかん発症に関与するシアル酸転移酵素・ST3Gal IV が、特定のホルモンの発現を調節し、また、情動行動や生殖機能に関わることを示した研究の報告であり、これまで全く知られていない、新規のホルモン応答性機構を提案したものである。

シアル酸は糖タンパク質や糖脂質の末端に付加される酸性糖であり、細胞間の相互作用、細胞接着、遊走に作用することが知られている。シアル酸修飾には、20種類のシアル酸転移酵素がゴルジ装置内でシアル酸修飾を担当することが知られているが、本学位論文では、そのうちの1種類に相当する、シアル酸転移酵素 ST3Gal IV の機能に着目している。ST3Gal IV の発現は刺激に反応して亢進する。また、ST3Gal IV は、ヒト一塩基多型解析より代謝疾患、心疾患、注意欠陥多動性 (attention-deficit hyperactivity) 障害への関与が示唆されているが、その発症機構はいまだ明らかにされていない。本学位論文では、ST3Gal IV の欠失が原因で発症する症状の中でも特に、神経精神症状と生殖能力に着目している。ST3Gal IV が、成長ホルモンやプロゲステロンの発現量に影響し、情動行動や周産期分娩を調節していることを見いだしている。

本論文は2章から構成されており、行動学的、分子生物学的、血液生化学的、免疫組織学的手法を用いて研究をおこない、以下に示す重要な知見を得ている。

第1章：ST3Gal IV と成長ホルモンは、てんかん発作に連動した発現の亢進を示すが、本学位論文では、ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスの脳内で成長ホルモンの発現量が著しく低下したことを見いだしている。これはST3Gal IV が成長ホルモンの発現量を調節することを示している。すでにST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスが、不安障害やうつ、睡眠障害を示すことは知られていた。そこで、ST3Gal IV が作用する情動行動のうちのどれかに、成長ホルモンが直接影響するかどうかについて調べることにした。具体的には、海馬内微小薬物投与方法を用いて、成長ホルモンやその受容体拮抗薬を投与し、高架式十字迷路と明暗試験をおこなっている。その結果は、海馬内における成長ホルモン量の亢進が、マウスの多動性 (hyperactivity) を引き起こすものであった。さらに、行動実験終了後に免疫組織化学法を用いて、てんかん応答性最初期遺伝子の組織分布と発現量を検討している。結果は、海馬内の成長ホルモン量の亢進が、成長ホルモン受容体や、Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) の発現量を亢進する一方で、受容体拮抗薬の投与は、Npas4 (neuronal PAS domain protein 4) の発現量を低下するものであった。以上の知見は、脳内には最初期遺伝子の発現を制御する成長ホルモンシグナル系が存在し、少なくとも脳内の成長ホルモンは、多動性の調節に関わっていることを示している。また、この一連の成長ホルモンの作用がST3Gal IV により制御される可能性を示唆している。

第2章：雌マウスの生殖能力及び生殖行動を詳細に観察すると同時に、非妊娠時と周産期のホルモン量をELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) により測定し、ホルモン量と生殖能

力との相関性を調べている。正常なマウスは、分娩直前に血中プロゲステロンを消失することが引き金となり、分娩を成功させることが知られている。その一方で、ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、血中のプロゲステロンのレベルが高く維持され、その結果、周産期分娩不全を示すものであった。また、正常なマウスの妊娠期には、血中プロゲステロンが視床下部に作用し、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌を抑え（負のフィードバック）その結果、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌が抑えられ、発情を阻止することが知られている。ST3Gal IV 遺伝子を欠損したマウスは、周産期に達した後もこの血中プロゲステロンによる負のフィードバックが維持されることから、FSH の分泌が抑えられ、“分娩後発情”を示さないことがわかった。以上の知見は、ST3Gal IV が性ホルモンの発現量を調節し、その結果、周産期分娩時にみられる一連の反応を引き起こしたことを示唆している。

申請者が得た知見は、シアル酸修飾に関わる酵素が、成長ホルモンやプロゲステロンといったホルモンの発現を調節し、情動行動や生殖機能に重要な役割を果たすことを初めて示したものである。一連の研究成果は、シアル酸転移酵素による新規のホルモン調節機構を提案したものであり、今後期待される、ホルモン調節機構の解明の糸口を発見したものととして、大変興味深い。論文の構成については、1章と2章の間で、対象とする器官が異なることから、連続性に欠く部分が見受けられたものの、各章は論理的に記述されている。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2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。また、学会においても4回の研究発表 [ポスター発表3回 (うち国際学会1回) 口頭発表1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

平成27年2月20日に公聴会をおこない、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。第1章と第2章の内容で連続性を欠く部分についての指摘を受けたものの、全体的には研究成果を要領よくまとめ、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。

4. 総合判断

上記各項目の評価より明らかな様に、本学位論文は高い水準の研究成果をまとめたものである。申請者は、6年半に及ぶ獣医学講師の教育歴を持つ一方、研究歴は、本学入学後の博士後期課程の3年間と短い期間であったが、研鑽努力の結果、学位を取得するに十分な専門知識と技術を持ち合わせるに至った。しかしながら、研究歴の短いことから生じる経験の未熟さが気がかりであることから、学位取得後も、学位論文第2章の研究内容を充実させ、英文専門誌への公表を期待するものである。

以上の調査を総合的に判断して調査委員は全員一致で、本学位論文が博士課程の学位の授与に値するものであると判断した。

