

2016. 7

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人  
高知大学学報

高知大学学位授与記録第八十二号

総務課広報係発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第47号	滝本 幸治	Comparison of timing and force control of foot tapping between elderly and young subjects  (足タッピングのタイミングと力の制御における高齢者と若年者の比較)	<b>1</b>
甲総医博第48号	西田 愛恵	Intrinsic characteristics of Min proteins on the cell division of <i>Helicobacter pylori</i>  (ヘリコバクター・ピロリMin蛋白の細胞分裂における固有特性)	<b>6</b>

氏名(本籍)	滝本 幸治 (和歌山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第47号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年5月17日
学位論文題目	Comparison of timing and force control of foot tapping between elderly and young subjects (足タッピングのタイミングと力の制御における高齢者と若年者の比較)
発表誌名	Journal of Physical Therapy Science 28(6) 2016年6月(in press)

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	北岡	裕章
	副査	教授	池内	昌彦

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 滝本幸治

論文題目 Comparison of timing and force control of foot tapping  
between elderly and young subjects

(足タッピングのタイミングと力の制御における高齢者と若年者の比較)

(論文要旨)




【目的】随意運動におけるタイミングと力の制御は動作協応の主要なパラメータであり、両パラメータを同時に評価するためにこれまでは手指タッピングなどの周期運動が用いられてきた。例えば、手指タッピング課題を用いた検討では、タイミングと力の制御能力はいずれも加齢とともに低下することが知られている。一方、日常生活における典型的な周期運動のひとつに歩行が挙げられるが、成熟した歩行パターンは半ば自動的に制御されており、意図的に制御する機会の多い手指などによる知見が下肢にも該当するのか精査する必要があると思われる。そこで本研究は、足タッピング課題によるタイミングと力制御の検討を通して、加齢の影響とともに手指タッピング課題との相違点と類似点について明確にすることを目的とした。

【対象と方法】健常若年者 10 名 (平均  $22.1 \pm 4.3$  歳)、健常高齢者 10 名 (平均  $74.8 \pm 6.7$  歳) を対象とした。対象者は、課題に応じて足関節底屈の等尺性最大随意収縮力(MVC)の 20% MVC を目標力発揮値とした周期的な一側 (利き足) の等尺性足底屈力発揮 (足タッピング) を遂行した。対象者は椅子坐位で利き足の前足部直下に設置された筋力測定装置 (フロンティアメディック社製) 上に前足部を置き、練習課題と再生課題を行った。両課題の共通事項は、異なる 3 種の音刺激周期 ISI(500-ms, 1000-ms, 2000-ms) 下で、20%MVC を目標力発揮値とした足タッピングを行うことである。練習課題は、テンポ音 (電子メトロノーム使用) を聴取しながら PC モニター上に示される 20%MVC ラインと自身の筋出力値を視覚的に確認しながら足タッピングを実施した。再生課題は、テンポ音と PC モニターを消去し、練習課題で練習したテンポ間隔で目標筋出力の再現を要求した。なお、練習課題は足タッピング 60 回×3 セット実施し 3 セット目を、再生課題は 60 回 1 セットのみ実施し解析対象とした。データ解析は、力量解析ソフト (エミールソフト開発社製) を用いて、目標力発揮値に対する力発揮誤差 (MVC で正規化した恒常・絶対誤差) と力発揮値の変動係数 (CV)、そして目標 ISI に対する足タッピング間隔の誤差(恒常・絶対誤差)と足タッピング間隔の CV を算出した。統計解析は、各検討指標について 2 (高齢群・若年群) × 2 (練習・再生課題) の二元配置分散分析および多重比較検定 (Bonferroni 法) を実施した。有意水準はいずれも 5%未満とした。

【結果】各検討指標における結果について、加齢の影響を認めた指標は力発揮とタッピング間隔の CV および 500-ms ISI における力発揮誤差（絶対誤差）であり、いずれも若年群より高齢群が有意に高値であった。課題による影響を認めた指標は、500-ms および 1000-ms ISI におけるタッピング間隔の CV であり、高齢群では再生課題より練習課題で有意に CV が高値であった。

【考察】高齢群で力発揮および足タッピング間隔の CV が大きくなる結果は、手指タッピング課題の先行知見と類似の結果である。この背景には神経学的な加齢の影響が考えられ、例えば基底核は加齢に伴う黒質線条体の組織化学的退化が起こり、その結果として基底核-皮質ループの機能障害が生じるためと考えられる。一方で、足タッピング間隔の CV が練習課題（テンポ音と同期）で大きくなる結果は、練習課題より再生課題（テンポ音消去）で CV が大きくなると報告した手指タッピングの知見と相反する結果であった。練習課題遂行時は、外的刺激に同期した随意運動が求められるが、この際には小脳が重要な機能的役割を担っている。したがって、加齢に伴う小脳の機能障害が練習課題での変動の増大に反映しているかも知れない。

論文審査の結果の要旨

		氏名	滝本 幸治
審査委員	主査氏名	佐藤 隆幸	
	副査氏名	北岡 裕章	
	副査氏名	池内 昌彦	

題目 Comparison of timing and force control of foot tapping between elderly and young subjects

(足タッピングのタイミングと力の制御における高齢者と若年者の比較)

著者 Koji Takimoto, Hideaki Takebayashi, Kenzo Miyamoto, Yutaka Takuma, Yoshikazu Inoue, Shoko Miyamoto, Takao Okabe, Takahiro Okuda, Hideto Kaba

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Journal of Physical Therapy Science 28(6)  
2016年6月(in press)

要旨

随意運動におけるタイミングと力の制御能力が協応動作の基本能力となる。この基本能力を評価するために、手指タッピングなどの周期運動が用いられている。加齢は、手指タッピングにおけるタイミングと力の制御がともに低下する、と報告されている。しかし、手指タッピング動作は、日常生活における典型的動作ではない。日常動作における周期運動としては歩行が挙げられるが、足タッピングを課題とした協応動作の基本能力の評価に関する報告はない。申請者は、成熟した歩行パターンが半ば自動制御されていることから、意図的に制御することの多い手指などとは異なる協応動作能力の低下が加齢で見られるのではないかと、この仮説を立て検証した。

健常若年者 10 名 (平均 22.1±4.3 歳) および健常高齢者 10 名 (平均 74.8±6.7

歳)を対象とした。足タッピング運動は、周期的な利き足の等尺性足底屈の筋力曲線として時系列的に測定した。被験者には、テンポ音としてメトロノーム音を聞かせ、かつ、モニタ上に表示された筋力曲線を見ながらタッピングを行う練習課題を行わせ、次いで、被験者にテンポ音、筋力曲線とともに与えないで、練習課題と同様の運動を自身で再現する再生課題を行わせた。

その結果、高齢者では、タッピングの周期性の乱れ、タッピング力の変動が有意に大きく、手指タッピング動作に関する知見と同様の結果であった。しかし、手指タッピング動作に関する知見と異なり、高齢者では、練習課題実施中に、周期性の乱れと力の変動が大きくなることがあきらかになった。

以上の結果から、申請者は、足タッピング能力は、手指タッピング能力と同様、加齢により低下するが、特に、練習課題でその低下が顕著であり、聴覚、視覚などの外的刺激に同期した協調運動を行う際に中枢として働く小脳機能の低下がその背景にあるのではないかと結論付けた。

審査員一同は、協応動作の基本能力に対する加齢の影響が手指と足で類似している点と相違している点について初めて報告した貴重な研究論文であることから、本論文を、本学博士(医学)の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	西田 愛恵 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第48号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成28年5月17日
学位論文題目	Intrinsic characteristics of Min proteins on the cell division of <i>Helicobacter pylori</i> (ヘリコバクター・ピロリMin蛋白の細胞分裂における固有特性)
発表誌名	FEMS Microbiology Letters 2016年(in press)

審査委員	主査	教授	大畑	雅典
	副査	教授	藤枝	幹也
	副査	教授	山本	哲也

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨



# 学位論文要旨

氏名

西田 愛恵

論文題目

Intrinsic characteristics of Min proteins  
on the cell division of *Helicobacter pylori*  
(ヘリコバクター・ピロリ Min 蛋白の細胞分裂における固有特性)

(論文要旨)

*Helicobacter pylori*(ピロリ菌)はグラム陰性のらせん状の細菌で、全世界の半数の人が慢性持続感染しているといわれており、胃潰瘍、胃癌や MALT リンパ腫を引き起こす。

細菌において染色体複製・分配、適正な分子挙動や分裂面の決定は、細胞分裂関連蛋白により厳密に制御されている。この分裂機構において鍵となる蛋白はチューブリン様細胞骨格蛋白 FtsZ である。FtsZ は 20 以上の細胞分裂関連蛋白 (FtsA, ZipA, ZapA など) と共に細胞中央で重合し Z リングといわれるリング状の形態をとり、これが収縮することで細胞が分裂する。ピロリ菌の分裂を制御する蛋白も FtsZ のみとは考えられないが、その研究報告は乏しく分裂機構には不明な点が多い。

一方、大腸菌の分裂機構の研究は盛んに行われており、核様体上での FtsZ の集積を防ぎ分裂を妨げる nucleoid occlusion (NO) システムと、Z リング形成とその細胞内の配置を仲介する Min システムの大きな 2 つの制御を受けていると考えられている。Min システムにおいて、MinD は MinC を活性化し、MinC は MinC/D 複合体を介して Z リング形成を阻害することで一定の場所で分裂が起きる。また、MinE が細胞中央で MinC と MinD の複合体形成を阻害することで、細胞極ではなく細胞中央で Z リングが形成され分裂が起こる。この Min システムの構成は細菌により異なるが、ピロリ菌の Min 蛋白の役割は良く分かっていない。また大腸菌は *minCDE* が連続して存在するが、ピロリ菌の *minC* と *minDE* は 770kb 離れている上に相同性は 50%以下である。これらのことから、ピロリ菌は独自の分裂機構をもつ可能性が高いと考えられる。そこでピロリ菌における Min 蛋白の機能の検討を行った。

まず、ピロリ菌野生株 HPK5 の 5 つの遺伝子破壊株 ( $\Delta$ MinC,  $\Delta$ MinD,  $\Delta$ MinE,  $\Delta$ MinCD および  $\Delta$ MinDE) を作成したところ、すべての遺伝子破壊株の菌体で伸長化を認めた。しかし、増殖および生存能について野生株と単一遺伝子破壊株 ( $\Delta$ MinC,  $\Delta$ MinD および  $\Delta$ MinE) には差は認められなかった。*minE* 破壊株において他の遺伝子破壊株と比較し、顕著なコッコイド(菌体の球状化)出現の低下を認めた。ピロリ菌においてコッコイドの形態は、生存しているが培養出来ない状態であると推測されている。コッコイドへの変態に関わる分子や生物学的な

重要性については十分な見解が得られていないが、ピロリ菌の MinE は定常期においてコクコイドへの変態に関わる因子として機能することが示唆された。走査型電子顕微鏡を用いた観察においてもグラム染色と同様に伸長化を認めたが、*minC*破壊株と *minD*破壊株において分裂部位と考えられる菌体のくびれ位置が中心にはなかった。MinC と MinD は、ピロリ菌において分裂部位決定に必要であると考えられた。




また、ピロリ菌特異的な FtsZ 抗体を用いた免疫蛍光染色において MinD を破壊した株 ( $\Delta$ MinD,  $\Delta$ MinCD,  $\Delta$ MinDE) を観察したところ、核様体の位置に関係なく細胞全体に広がって FtsZ が存在していた。MinD の欠損により FtsZ と核様体の調和が乱されていると考えられた。ピロリ菌の MinD は大腸菌において NO システムに中心的役割を果たす SlmA に似た機能を持つ可能性が考えられた。

野生株 2 株 (HPK5 および 26695) について特異抗体を用いて行った免疫沈降後のウエスタンブロット法により、ピロリ菌の FtsZ 蛋白と各 Min 蛋白は、相互作用を認めたため協同して働いていると考えられた。

さらに、FtsZ の崩壊分析 (チェイス実験) において、*minC*破壊株で FtsZ 分解の著しい遅延を認めた。*minD*破壊株ではわずかに FtsZ 分解が促進されていたが、増殖と生存能については破壊株間で大きな差はなかった。FtsZ 分解率はピロリ菌の分裂サイクルとは関係していないとの報告もあり、この点についてはさらなる検討が必要であると考えられる。さらにピロリ菌は遺伝的な多様性が高く、分裂機構に関連したその他の蛋白が関わる可能性も考えられた。

ピロリ菌 Min 蛋白は分裂部位決定や FtsZ 分布を含む分裂機構や細胞の形態に関係していた。特に、MinC は FtsZ の破壊に、MinD は NO システム様の働きに、MinE はコクコイドへの変態に関わっていると考えられた。この研究によりピロリ菌 Min 蛋白について特徴的な働きを示唆し、細胞分裂における新たな知見を付加することができた。

論文審査の結果の要旨

		氏名	西田 愛恵
審査委員	主査氏名	大畑 雅典	
	副査氏名	藤枝 幹也	
	副査氏名	山本 哲也	

題目 Intrinsic characteristics of Min proteins on the cell division of *Helicobacter pylori*

(ヘリコバクター・ピロリMin蛋白の細胞分裂における固有特性)

著者

Yoshie Nishida, Hiroaki Takeuchi, Norihito Morimoto, Akiko Umeda, Yoshu Kadota, Mizuki Kira, Ami Okazaki, Yoshihisa Matsumura, Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

FEMS Microbiology Letters  
2016年(in press)

要旨

【背景・目的】

*Helicobacter pylori* (以下、ピロリ菌と略す) は胃粘膜に慢性持続感染を起こし、胃炎・胃潰瘍さらには胃癌への病態進行に関与し、さらにはMALTリンパ腫を惹き起こす病原細菌である。

細菌において染色体複製・分配、適正な分子挙動や分裂面の決定は、細胞分裂関連蛋白により厳密に制御されている。この分裂機構において重要な役割を果たすのがFtsZというチューブリン様の細胞骨格蛋白である。FtsZは通常モノマーの状態が存在するが、細胞が分裂する時期には、FtsZは細胞の中央でポリマーの状態で重合しZリングといわれるリング状の構造物を作る。これは収縮環と呼ばれるが、細胞中央でくびれを作ることで細胞が分裂する。FtsZには20以上の分裂関連蛋白が関わっているが、その重要な一つがMinシステムであり、MinC、MinD、MinEからなる。これまでMinシステムは大腸菌や枯草菌でよく研

究されてきたが、ピロリ菌に関してはほとんど研究がなされていない。

大腸菌における Min システムでは、MinC は FtsZ の重合を阻害する。MinC が細胞中央から離れると、FtsZ が細胞中央で重合を開始する。MinD は MinC を活性化し、MinC は細胞膜下に存在する MinD と複合体を形成している。MinC は MinD と結合した時のみ活性を持つ。この MinC-MinD 複合体を細胞膜から引き離す役割を持っているのが、MinE である。MinE は細胞中央で重合してリング状になり、これが契機で MinC-MinD 複合体が分解され、活性が失われ、それゆえ FtsZ は阻害物質のない中央付近でのみ重合が可能となる。Min システムについては、菌によって構成や機能に多様性がある。例えば、遺伝子座をみると、大腸菌では *minCDE* が連続して存在するが、ピロリ菌の *minC* と *minDE* は 770 kb 離れている上に、相同性は 50% 以下である。これらのことから、ピロリ菌は独自の分裂機構をもつ可能性が高いと考えられる。そこでピロリ菌における Min 蛋白の機能解析を行った。

#### 【方法】

本研究で使用した菌株は、臨床分離株である日本人由来の HPK5 であり、Min 遺伝子破壊株として、5 つの遺伝子破壊株 ( $\Delta$ MinC、 $\Delta$ MinD、 $\Delta$ MinE、 $\Delta$ MinCD および  $\Delta$ MinDE) を作成した。これは抗菌薬耐性遺伝子を挿入することで各 Min 遺伝子を破壊し、相同組み換えによって作成した。

培養は主に液体培養で行い、必要に応じて寒天培地を使用した。各 Min 遺伝子破壊株の増殖率を調べるために、菌液の光学濃度 (optical density: OD) を測定した。生菌数を調べるために、寒天培地でコロニーのカウントを行った。その後、各破壊株での菌の形態を確認し、FtsZ の局在を調べるために免疫染色を行った。蛋白-蛋白間の関連を調べるために、免疫沈降を行い、ウエスタンブロット法で確認した。FtsZ の崩壊分析にはチェイスアッセイを行った。

#### 【結果と考察】

まず、各 *min* 遺伝子破壊株における増殖および生存能について調べた。その結果、*minDE* 遺伝子株の増殖が若干遅い傾向がみられたが、その他の *min* 遺伝子破壊株では野生株と比較して優位な差はみられなかった。生菌数に関しては、48 時間以降、*minE* 遺伝子破壊株がやや高い傾向が認められた。一方、*minCD* および *minDE* 遺伝子破壊株では生菌数の著しい低下がみられた。

次に、各 *min* 遺伝子破壊株における菌の形態変化を観察した。全ての遺伝子破壊株の菌体で伸長化 (フィラメント化) を認めた。最も顕著に伸長化がみられたのは *minD* 遺伝子破壊株で野生株と比べて 4~5 倍になっていた。伸長化が最も少なかったのは *minE* 遺伝子破壊株であった。また、各 *min* 遺伝子破壊株でコッコイドと呼ばれる菌体の球状化が見られた。しかし、*minE* 遺伝子破壊株ではコッコイドへの変化は、他の遺伝子破壊株と比較して明らかに少ないことが判明した。ピロリ菌においてコッコイドの形態は、生存しているが培養出来ない状態であると推測されている。コッコイドへの変態に関わる分子や生物学的な重要性については十分な見解が得られていないが、便中で見られるピロリ菌はほとんどがコッコ

イドを示すことなどから、ピロリ菌の生態と関連した形態であることが考えられている。今回の結果により、ピロリ菌の MinE は定常期においてコッコイドへの変態に関わる因子として機能することが示唆された。

走査型電子顕微鏡を用いた観察においてもグラム染色と同様に伸長化を認めたが、*minC* 破壊株と *minD* 破壊株において分裂部位と考えられる菌体のくびれ位置が中心にはなかった。これらの結果により、MinC と MinD はピロリ菌において分裂部位決定に必要であると考えられた。

また、ピロリ菌特異的な FtsZ 抗体を用いた免疫蛍光染色において MinD を破壊した株 ( $\Delta$ MinD、 $\Delta$ MinCD、 $\Delta$ MinDE) を観察したところ、細菌全体に広がって FtsZ が存在していた。MinD の欠損により FtsZ と核様体の調和が乱されていると考えられた。したがって、ピロリ菌の MinD は FtsZ の分布と核様体の局在決定に関係することが示唆された。

野生株 2 株 (HPK5 および 26695) について、特異抗体を用いて行った免疫沈降後のウェスタンブロット法の結果では、ピロリ菌の FtsZ 蛋白と各 Min 蛋白間で相互作用が認められたため、これらは協同して働いていると考えられた。

さらに、FtsZ の崩壊分析 (チェイス実験) において、*minC* 破壊株で FtsZ 分解が著しく抑制された。この結果は、MinC は FtsZ の分解に関連していることを示唆した。

#### 【結論】

ピロリ菌の Min 蛋白は細胞形態の維持、分裂部位の決定や FtsZ 分布を含む細菌分裂機構に関係していた。具体的には、以下の事項が示された。

MinE はピロリ菌のコッコイドへの変態誘導に関与する。

MinC と MinD はピロリ菌が菌体中央で分裂するために必要である。

MinD は FtsZ と核様体の位置関係決定 (核様体閉鎖) に関与する。

MinC は FtsZ の分解に関わる。

ピロリ菌は大腸菌の 3 分の 1 程度のゲノムしか持たないことから、一つの Min 蛋白がいくつかの役割を果たしているということは意外ではない。

以上のように本論文は、病原微生物として重要な位置にあるピロリ菌の分裂に関して、新たな知見を付加したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は、本論文が高知大学博士 (医学) の学位を授与するに値するものと判断した。