


平成26年 2月 3日

学 長 殿

主 査 井上 昇 

学位論文審査の要旨及び結果並びに最終試験の  
結果について（報告）

25年 12月 17日付けで依頼されました下記の者の学位論文審査  
の要旨及び結果並びに最終試験の結果を別紙のとおり報告いたします。

記

専 攻 畜産衛生学専攻・博士後期課程

氏 名 Ngasaman Ruttayaporn

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	Ngasaman Ruttayaporn
審査委員署名	主査 井上 昇 副査 河津信一郎 副査 横山 直明 副査 西川 義文 副査 玄 学爾
題目	Expression and characterization of digestive enzymes from tsetse ( <i>Glossina morsitans morsitans</i> ) (ツェツェバエ由来消化酵素の発現と性状解析)
審査結果の要旨 (1,000字程度)	

ツェツェバエ中腸の消化酵素は感染動物の血液と共に中腸内に取り込まれたトリパノソーマがツェツェバエへの感染を成立させる際に主要な阻害因子として機能するが、それとは逆に消化酵素による刺激がトリパノソーマの中腸内での生存・増殖・分化を調節しているという報告もある。そこで本学位論文では中腸内でのトリパノソーマの感染・増殖に直接関与していることが予想される中腸内消化酵素について、その詳細な酵素活性解析とベクター・パラサイト相互作用における役割を明らかにすることを目的とした。

第一章ではカテプシン B (GmcathB) のプロエンザイム領域 (930 bp) をツェツェバエ中腸由来 cDNA からクローニングし、活性型組換え GmcathB をメタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) 発現系によって作製することに成功した。得られた組換え GmcathB は pH4、30°C で最も高いプロテアーゼ活性を示し ( $k_{cat}/K_M = 3.77 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )、ウシ血清アルブミン (BSA) よりもウシヘモグロビン (Hb) を効率よく消化した。加えて組換え GmcathB は血流型トリパノソーマ (BSF) に対して濃度依存的に強い殺滅作用を示すことも明らかとなり、ツェツェバエ中腸内でのトリパノソーマ感染・増殖に影響していることが示唆された。

第二章ではカテプシン L (GmcathL) プロエンザイム領域 (1,551 bp) をツェツェバエ中腸由来 cDNA からクローニングし、活性型組換え GmcathL をメタノール資化酵母発現系によって作製することに成功した。得られた組換え GmcathL は pH6、25~37°C の温度条件下で最も高いプロテアーゼ活性を示し ( $k_{cat}/K_M = 10.9 \text{ mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )、Hb よりも BSA に対する消化活性が高かった。トリパノソーマとの共培養実験では組換え GmcathB と同様に BSF に対して濃度依存的に殺滅作用を示した。以上の結果から GmcathL が中腸内での血液蛋白質の消化とトリパノソーマ感染・増殖阻害に関与していることが示唆された。

第三章ではトリプシン様セリンプロテアーゼ (Gmtrypsin) 前駆体領域 (681 bp) をツェツェバエ中腸由来 cDNA からクローニングし、活性型組換え Gmtrypsin を大腸菌 (*Escherichia coli*) 発現系によって作製することに成功した。得られた組換え Gmtrypsin は pH8、25~30°C の温度条件下で最も高いプロテアーゼ活性を示し ( $k_{cat}/K_M = 63.5 \text{ mM}^{-1}\text{sec}^{-1}$ )、BSA を消化したが Hb は消化しなかった。トリパノソーマとの共培養実験では上述の2つの消化酵素と同様に BSF に対して濃度依存的に強い殺滅作用を示した。以上の結果から Gmtrypsin も中腸内での血液蛋白質の消化とトリパノソーマ感染・増殖阻害に関与していることが示唆された。

本学位論文でこれまで詳細に解析されていなかったツェツェバエ中腸由来消化酵素の酵素活性特性が明らかになり、ベクター・パラサイト相互作用への関与と血液餌消化のメカニズム解析を行っていくための基礎となる知見を得ることができたと考えられる。よって審査委員全員一致で本学位論文が帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻博士後期課程の学位論文として申し分ないと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

題目 : Expression and characterization of cathepsin B from tsetse (*Glossina morsitans morsitans*)

著者名 : Ngasaman Ruttayaporn, Mo Zhou, Keisuke Suganuma, Shino Yamasaki, Shin-ichiro Kawazu and Noboru Inoue.

学術雑誌名 : The Japanese Journal of Veterinary Research (61・4・137-147)

発行年月 2013年 11月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	Ngasaman Ruttayaporn
審査委員署名	主査 井上 昇 副査 河津信一郎 副査 横山直明 副査 西川義文 副査 玄 学南
実施年月日	平成26年 1月31日
試験方法 (該当のものを○で 囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭・筆記
要 旨	
<p>主査及び副査の5名は、学位申請者に対し、原虫病研究センターPKホールにおいて、学位申請者本人に口頭発表による学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、学位申請者が帯広畜産大学大学院畜産衛生学専攻博士後期課程の修了者としてふさわしい学力および見識を有すると判断し、博士(畜産衛生学)の学位を授与するに値すると判断した。</p>	