

## 生物資源開発科学専攻

氏名	潘 涛
学位記番号	生博 甲第 149 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 3 月 25 日
学位論文題目	中赤外分光法によるイオン解離性代謝物質の定量法の開発
論文審査委員	主査 教授・亀岡 孝治 教授・伊藤 信孝 教授・堀部 和雄 教授・大宮 邦雄 助教授・橋本 篤

### 要 旨

細胞・生体内における動的な代謝メカニズムを理解するためには、代謝反応に関わる物質を同時かつ高精度にリアルタイム計測する必要がある。代謝関連物質のなかには、イオン解離性を持った物質が数多く存在している。それらは、代謝情報に関して極めて重要な役割を果たしている。イオン解離性物質のイオン解離状態や分子構造は代謝反応場の pH に大きく依存するとともに、pH は生体内において空間的および時間的に変化している。そして、pH の影響を考慮したイオン解離性物質の分子構造・解離状態の時系列的変化に基づく代謝物質の同時定量法の構築が重要となる。そこで、測定には、複数成分を同時に非破壊かつリアルタイムで連続計測できるセンシング手法である中赤外分光法が挙げられる。本論文では、中赤外分光法 (FT-IR/ATR 法) を援用し、エネルギー代謝全般に関わるアデノシンリン酸、および解糖系の初期の反応に関わるグルコース-6-リン酸 (G6P)、フルクトース-6-リン酸 (F6P) などのイオン解離性代謝物質を対象とし、pH 依存性を考慮した赤外分光特性を把握したうえで、酵素反応におけるイオン解離性代謝物質に関する定量法の開発を目的とする。その際、解糖系の入り口にあたる G6P から F6P へのグルコース-6-リン酸イソメラーゼ (PGI) 異性化反応系に着目した。

#### 1. イオン解離性代謝物質の赤外分光特性と各解離成分スペクトルの抽出

水溶液中におけるアデノシンリン酸 (ATP, ADP, AMP), 糖リン酸 (G6P, F6P) などの中赤外分光スペクトルに及ぼす pH の影響について研究を行った。解離によって生じた各イオン解離成分の吸光度スペクトルは pH によらず一定であること、各イオン解離成分のスペ

クトルの加成性が成り立つことを仮定し、吸光度と各イオン解離成分の濃度との関係に対して線形重回帰を行うことにより各イオン解離成分のモル吸光度スペクトルを抽出し、pH 依存性を考慮したイオン解離性代謝関連物質の赤外分光特性を明らかにした。

ところで、上記のスペクトル抽出方法 (抽出方法 2) は、イオン解離性物質の個別水溶液スペクトルに基づいている。そこで、混合溶液中の各成分物質の可能な相互作用を中赤外分光スペクトルに与える影響を考慮するために、イオン解離性物質の混合溶液のスペクトルに基づく抽出方法を提示した (抽出方法 1)。また、未知成分が含まれている反応系において既知のイオン解離性代謝物質のみに着目し、そのイオン解離成分スペクトルの抽出を試みた (抽出方法 3)。その際、異性化反応を想定した G6P-F6P-Tris 混合溶液を対象系とした。

各スペクトル抽出方法によって得られたイオン解離成分の 2 次微分スペクトルを比較したところ、各イオン解離成分を特徴づけるピークにおいては、ピーク位置、ピーク強度ともに顕著な差異は認められなかった。また、すべての抽出方法に関して、実測したスペクトルと計算により合成して得られたスペクトルとの有意な差違は認められなかった。その結果、各抽出方法によって解離成分スペクトルの加成性が確認できた。

#### 2. イオン解離性代謝物質の定量

常温 (25°C) における G6P-F6P-Tris 混合溶液の定量を試みた。ここでは、各スペクトル抽出方法により得られた各解離成分の吸光度スペクトルとその 2 次微分スペクトルを比較・検討し、各解離成分に起因する吸収波数を決定した。さらに、各解離成分のスペクトルの加成性に基づき、各解離成分の吸収波数における 2 次微分値を用いて、

G6P-F6P-Tris 溶液中の各解離成分濃度の線形重回帰分析を試みた。そして、pH の緩衝成分である Tris の解離成分比から解離平衡を仮定して pH を推定し、さらにその pH に基づいて G6P, F6P, Tris 濃度を求めた。その結果、すべての抽出方法に関して調製値と推定値は極めて良好に一致し、pH と各成分濃度に関する調製値と推定値の相関係数はすべて 0.995 以上であった。

つぎに、酵素反応の設定温度 (40°C) で測定した G6P-F6P-Tris 混合溶液の定量を試みた。ここでは、抽出方法 2 により得られた各解離成分スペクトルに基づき、解離定数  $pK$  値の温度依存性を考慮することで、選択された吸収波数ごとに混合溶液の吸光度二次微分と各イオン解離成分の吸光度二次微分との関係に対して線形重回帰を行

い、40°C における G6P-F6P-Tris 混合溶液の pH と各成分濃度を求めた。その推定精度は、常温の時とほぼ同じ程度であった。

最後に、酵素反応連続モニタリング用の ATR アクセサリーを自作し、PGI 異性化反応のモニタリングを試みた。そこで、酵素反応の連続測定法における諸条件を設定し、酵素反応における中赤外分光スペクトルの経時変化に基づいて、反応溶液中の pH と各成分濃度を求めることができた。

以上、本論文では、中赤外分光法による、pH が変化した代謝反応におけるイオン解離性代謝物質の pH と各成分濃度を同時にかつ高精度で定量する方法を開発した。

### 生物資源開発科学専攻

氏名	佐土 哲也
学位記番号	生博 甲第 150 号
学位記授与の日付け	平成 16 年 3 月 25 日
学位論文題目	コイ科ダニオ亜科仔稚魚の形態形成と類縁関係
論文審査委員	主査 教授・柏木 正章 教授・前川 行幸 教授・神原 淳 助教授・木村 清志

### 要 旨

ダニオ亜科はヒゲとその神経支配の状態、顎や篩骨? 口蓋骨の形態に基づいて定義されたコイ科魚類である。ダニオ亜科内の類縁関係は骨学のおよび外部形態学的特徴に基づきラスボラグループとバリリウスグループに大別されるが両者の関係は不明瞭である。また、本亜科内の幼期の形態についてはほとんど記載されておらず、卵、仔稚魚の研究がなされている *Danio rerio* でも細胞学的研究が主で幼期形態の詳細な記載はない。また、日本産の種も、カワムツとヌマムツについては両種が分けられる以前の記載しかなく、これらの仔稚魚の詳細な記載が必要である。これらのことから、ダニオ亜科魚類卵、仔稚魚を詳細に記載し、その識別的特徴を明らかにし、さらに亜科内の類縁関係を幼期の形態形成から考察することを目的として研究を行った。

本研究ではダニオ亜科内のラスボラグループから *Danio albolineatus*, *D. choprae*, *D. dangila*, *D. kerri*, *D. nigrofasciatus*, *D. rerio*, *Devario devario*, *D. malabaricus*, *D.*

*pathirana*, *D. maetaengensis*, *Chela dadiburjori*, *Tanichthys albonubes* の 12 種を、バリリウスグループからは *Barilius canarensis*, ハス, コウライハス, *Opsariichthys pachycephalus*, オイカワ, カワムツ, ヌマムツ, *Candidia barbatus* の 7 種 2 亜種の合計 19 種 2 亜種により研究を行った。

*Danio* 属は体側の縦帯形成や側中線上黒色素胞配列に共通性が見られ、属内の各種は後屈曲期以降の背鰭分枝軟条数、体側面黒色素胞配列で区別できた。*Devario* 属は頭部附着器、側中線上黒色素胞配列、鰓蓋直後の黒斑形成に共通性が見られ、属内の各種は前屈曲期から屈曲仔魚期までの鰓蓋腹縁黒色素胞分布、後屈曲期以降の鰓蓋直後の斑形状、背鰭および臀鰭分枝軟条数によって区別できた。*Chela dadiburjori* は頭部附着器、体側面黒色素胞で特徴付けられた。*Tanichthys albonubes* は体側面黒色素胞、尾鰭基底の黒斑形成に特徴を有した。ラスボラグループは卵径や孵化仔魚が小さいこと、孵化時に黒色素胞をもつことで特徴付けられた。個々の属間では *Chela*