

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	ELVY LIKE GINTING
審査委員	主査 佐賀大学 教授 渡邊 啓一
	副査 佐賀大学 教授 濱 洋一郎
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 琉球大学 准教授 平良 東紀
審査協力者	
実施年月日	平成25年12月27日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成25年12月27日の公開審査会において、学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について諮問を行った。具体的には、別紙の様な質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	ELVY LIKE GINTING
[質問1]	低温適応酵素とはどのような酵素と定義していますか？例えば、至適温度が低い酵素ですか？
[回答1]	低温適応酵素は、中温性細菌由来の同族酵素（常温酵素）と比較して、一般に至適温度は低く、低温で高い活性を有し、低い熱安定性を示します。どの低温適応酵素にも必ずみられる特徴は、温度の低下に伴う活性の低下の度合いが小さいことです。これらの酵素は低温環境に生息する変温生物や微生物によって生成されます。好冷細菌（ <i>Shewanella</i> sp. AS-11）由来無機ピロホスファターゼ（Sh-PPase）は低温適応酵素の一つです。 <i>Shewanella</i> sp. AS-11は、南極の氷に覆われた海中に生息する貝類（ <i>Neobuccinum eatoni</i> ）から分離された細菌で、0℃付近でも活発に増殖します。無機ピロホスファターゼは、活性のために金属イオンを必要とします。本研究で私はMn ²⁺ 活性型Sh-PPaseの至適温度は5℃と低く、またCo ²⁺ 活性型は他の金属イオンと比較して低温で最も高い活性を示すことを明らかにしました。したがって、Sh-PPaseが低温適応特性を得るためには、Mn ²⁺ またはCo ²⁺ が必要であることが明らかになりました。
[質問2]	Mn ²⁺ 活性型Sh-PPaseは低温（5℃）で高い活性を有していますが、あなたは低温で高い活性を有する別のPPaseの情報を持っていますか？
[回答2]	本研究は、PPaseとして初めて、Sh-PPaseが低温に適応した酵素であることを明らかにしたものであり、これまでのところ低温で高い活性を有する他のPPaseの情報はありません。低温適応酵素ではありませんが、別のPPasesの情報としては、 <i>B. subtilis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. agalactiae</i> などの中温細菌からの酵素の研究が報告されています。さらに、 <i>B. stearothermophilus</i> や <i>Thermus aquaticus</i> などの好熱性細菌由来PPasesも研究されています。しかし、好冷細菌由来PPaseはまだ研究されていませんでした。したがって、この研究は低温に適応したPPaseの最初の研究です。
[質問3]	Zn ²⁺ 活性型のSh-PPaseは、温度に対して安定化されていますが、どのようなメカニズムでPPaseを安定化しているのでしょうか？
[回答2]	Zn ²⁺ 活性型のSh-PPaseの安定化のメカニズムはまだ解明できていませんが、Co ²⁺ やMn ²⁺ と比較してZn ²⁺ は非常に低い濃度で酵素を活性化し安定化しました。このことから、Zn ²⁺ は他の金属より活性部位に対する親和性が高く、配位結合が強いと思われます。それが安定化に関わっている可能性が考えられます。安定化のメカニズムをより明確にするためには、Zn ²⁺ 活性型および非活性型Sh-PPaseの三次元構造解析が必要であると考えています。私たちはZn ²⁺ 活性型の安定性を含め金属イオンによる活性化機構を解明する目的で、種々の活性型酵素の結晶化を行い、これらの酵素の三次元構造を解析することを試みました。未活性型とMn ²⁺ 活性型酵素の結晶は成長しましたが、これらの結晶の回折データは、酵素の3次元構造を解析するのに十分な質のデータではありませんでした。
[質問4]	好冷細菌（ <i>Shewanella</i> sp. AS-11）は南極海からどのように単離しましたか？この細菌の生育温度と細胞内温度はどうなっているのでしょうか？
[回答4]	好冷細菌（ <i>Shewanella</i> sp. AS-11）は0℃以下の南極海底から採取した貝類（ <i>Neobuccinum eatoni</i> ）から単離されたものです。この貝は運動能力の低い底生生物であるため、体温は海水温度と同じと考えられ、それから分離された細菌の細胞内温度も環境温度と変わらないと考えられます。実験室では4℃で振とう培養すると良好に増殖します。これまでに好冷細菌の細胞内温度が環境温度より高いという報告はありません。
[質問5]	酵素に結合する金属イオンの親和性は分かりますか？また、どの金属イオンが、最も高い親和性を持っていますか？

[回答5] 私は、酵素に結合する金属イオンの親和性を直接測定していません。ただ CoCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 が Sh-PPase を活性化する至適濃度がそれぞれ 25 mM, 15 mM および 0.5 mM であり、活性化に必要な濃度は ZnCl_2 が最も低かったことから、おそらく、 Zn^{2+} は、 Co^{2+} と Mn^{2+} よりも親和性が高く、酵素の活性部位により強く配位結合すると考えられます。しかし、低温活性が高いのは Zn^{2+} 活性型ではなく Co^{2+} と Mn^{2+} 活性型であることから、金属イオンの親和性の強さと活性は相関しないと思われま

[質問6] 金属イオンで活性化された Sh-PPase の Trp109 と Trp286 はどちらが埋もれていますか？

[回答6] 非活性型と活性型 Sh-PPase のアクリルアミド消光実験ではどちらも直線的な Stern-Volmer plots を示しました。この Stern-Volmer plots の直線性は、Trp109 と Trp286 の両方が等しくアクリルアミドにより消光されていることを示しています。従って、金属イオンによる活性化の際に2つの Trp 残基の両方が同様に分子内に埋もれ、アクリルアミドの接触が起こりにくくなったと考えられます。一方、Trp 残基の蛍光スペクトルは、金属イオンの結合により長波長側にシフトしました。これは、Trp 残基を取り巻くミクロ環境において疎水性が減少したことを意味します。これらの結果に基づき、Trp 残基は二価の陽イオンの結合の際に酵素内に埋没し、隣接の極性基と相互作用することになることが示唆されました。活性型酵素のホモロジーモデリング構造では、Trp 残基から近いところにいくつかの極性残基があります。

[質問7] この好冷細菌が海水中で生育しているときに、この酵素はどんな金属イオンと結合しているのでしょうか？

[回答7] 本研究では、私は大腸菌で発現した組換え酵素を使用しており、好冷細菌由来の酵素の金属イオン含有量を測定していませんのでご質問に対する回答はできません。この研究で Sh-PPase を活性化した Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} は海水に含まれる金属イオンであることから、好冷細菌の細胞内でも同じような金属イオンが結合していると考えています。

[質問8] 応用として低温適応酵素である Sh-PPase をどのように産業利用できると思いますか？

[回答8] 一般に低温適応酵素は、反応エネルギーの節約や反応制御の容易さを通して、産業界へ利益を提供してくれると考えています。たとえば、コストのかかる加熱工程の削減と食品加工における比較的低い温度での酵素失活による反応制御などです。しかし、Sh-PPase の場合は直接産業用に使用するのではなく、低温適応のメカニズム解明を進めていくことで、酵素の構造と活性や安定性の関係の理解を深めていくことに貢献できると考えています。これらの理解の蓄積によって、食品加工、洗剤、環境保全、バイオエネルギー生産等で有用な酵素のタンパク質工学的な改良も可能になると考えています。Sh-PPase は N-および C-末端ドメインの2つのドメインからなるサブユニットのホモ二量体です。その2つのドメインは、フレキシブルなリンカーによって連結されており、活性部位はこれらのドメインのインターフェイスに位置しています。N末端ドメインは触媒作用に重要である2つの金属イオンを結合します。C末端ドメインは基質に結合します。酵素反応時に起こる N末端ドメイン上の C末端ドメインの動きが、触媒的に有能な構造を形成します。このような触媒反応に必要な酵素の動きを研究するために Sh-PPase は大変有用な酵素と思っています。

[質問9] あなたの研究でのゲル濾過はどのような役割ですか？それは精製のために使用しているのですか？

[回答9] 私の研究ではゲルろ過は酵素の精製に使用していません。ゲル濾過は、金属イオン非結合型と結合型 Sh-PPase の分子量を決定するために使用しました。