

(学位第10号様式)

No. 1

<b>学力確認結果の要旨</b>	
学位申請者 氏 名	緒方 由美
審査委員	主査 鹿児島大学水産学部教授                      木 村 郁 夫
	副査 鹿児島大学水産学部准教授                      加 藤 早 苗
	副査 鹿児島大学水産学部准教授                      塩 崎 一 弘
	副査 鹿児島大学農学部 教授                      安 部 淳 一
	副査 鹿児島大学農学部 教授                      侯        徳 興
審査協力者	□
実施年月日	平成 31 年 1 月 8 日
<p>試験方法（該当のものを○で囲むこと。）                      <input checked="" type="checkbox"/>筆答・<input checked="" type="checkbox"/>筆答</p>	
<p>主査及び副査は、平成 31 年 1 月 8 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、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のよう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できた。</p> <p>また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（水産学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	緒方 由美
[質問 1]	筋原線維 (Mf) からのアクトミオシン (AM) 抽出率について、Mfは不溶性であるがどのように抽出率を計算したのか説明してください。
[回答 1]	Mfは0.1M KCl溶液中では不溶であるが、0.5M KCl溶液状態にするとAMが溶解するので、AMの抽出量をMfタンパク量に対する値として抽出率として計算した。
[質問 2]	ATPの筋原線維冷凍変性抑制作用を測定するのに抽出率から検討しているが計算方法について説明してください。
[回答 2]	Mfを一定期間冷凍保存後、AMの抽出率を測定し、AMの抽出率の冷凍保存中の低下割合を相対値で表し、それを一次反応式で解析して変性速度恒数 $KD$ を算出した。
[質問 3]	マグロミオシンS-1 Mg-ATPase活性のpH依存性が中性域で低く酸性側とアルカリ側で活性が高くなることについては酵素学的にどのように考えられるか？ (一般的な酵素であれば山型あるいはpH依存で増減するが)
[回答 3]	本研究ではマグロミオシンS-1 Mg-ATPaseのpH依存性について3回繰り返し、このpH依存性のパターンが得られた。ミオシンMg-ATPase活性のpH依存性と同様であるが、酵素学的な説明までは本研究では検討していない。
[質問 4]	ATPが筋原線維タンパク質の各種変性を抑制するメカニズムについて、酵素と基質との結合反応とそれ以外のメカニズムが働くことを考察されているが、内容について説明してください。
[回答 4]	ATPによる変性抑制作用がATP結合部位による1:1の結合も影響していると考えますが、さらに高濃度のATP濃度で依存性を示すことが認められた。冷凍すり身のタンパク質変性抑制では冷凍変性抑制剤として糖類が使われているが、これに近い変性抑制作用であることを推察している。また、ミオシンに対するATPの作用を検討した論文ではミオシン表面の水和量や溶解性に関することも報告されている。一昨年ATPが疎水性タンパク質の溶解性維持に影響を及ぼすことが論文 (Science誌) として報告されておりそのようなメカニズムも働いているのではと推察している。
[質問 5]	サメとタイのミオシンで尿素とATPの作用が異なっていたが、ミオシンによってメカニズムが違うのか構造が違うのか説明してください。
[回答 5]	ミオシン構造に対するATPの作用については結合によりアクティブサイトの構造が変化する報告はあるが、ここではミオシンによってどのように違うかについて検討はしていない。
[質問 6]	魚ミオシンの一次配列に関する報告はあるので、保存性はかなり高いと思うが今後参考にしたらと思う。サメとタイの筋肉中のATP濃度は違いますか、また、サメとタイの尿素変性に対するATPの保護効果の違いについて説明してください。
[回答 6]	サメとタイでATP濃度はほとんど差が無いと考えられる。サメミオ

シンでは尿素耐性があり、タイでは筋肉中に尿素がほとんど含まれていないので尿素耐性に差が認められた。尿素変性に対してはサメもタイもATPによる変性抑制作用が認められる結果となっています。

- [質問7] このような食品加工の研究で得られる *in vitro* の結果が *in vivo* にどの程度反映されるのかということも大切。ATPの効果はほとんど差が無いということを理解した。
- [回答7] はい、その通りです。
- [質問8] 魚種たとえば赤身魚と白身魚で筋肉内のATP濃度に差はありますか。
- [回答8] 白身魚と赤身魚でのATP濃度の差を測定したことはないが、魚種によって若干の違いがあることを経験している。
- [質問9] ATPが筋肉内で消耗すると冷凍変性が速くなるが、ATPがあると変性抑制的に働く。ATPの再生や添加についてはどうでしょうか。
- [回答9] 生体内では細胞内でATPは再生されるが死後はATPの再生は止まる。
- [質問10] 水産の現場でATP作用を応用するためにはどのようにおこなうことになりますか。
- [回答10] ATPを添加するのではなく、元々魚の筋肉に含まれるATPを利用する。魚を水揚げするときに暴れるとATPは消耗するので、ATPが無くならないような水揚げ処理等を行うことが大切となる。
- [質問11] 論文へのコメントとして、ATPの変性抑制作用についてピロリン酸のタンパク質安定化作用についての論文もあるので、それを参考に議論も必要でしょう。また、ミオシンS-1のMg-ATPase活性のpH依存性について、ミオシンMg-ATPaseの活性化については、酸性pH下でのフィラメント形成とアクチンによる活性化の報告があるが、今回出された結果について、論文等を参考に議論をしてください。尿素変性に対するサメとマダイのミオシンについて、同じなのかどうかについて、議論が必要でしょう。また、試験では尿素濃度が生体内濃度よりも高いところで議論されているので、今後生体内濃度でのATPによる作用についても議論が必要でしょう。第1章の筋原線維の冷凍変性に対するATPの作用を測定する際にATP分解を抑制するためにEDTAを添加して試験を行っていますが、Caイオンキレートによるアクチンへの影響を考慮した考察が必要でしょう。
- [回答11] アドバイスありがとうございました。
- [質問12] ATPとミオシンの相互作用についてATPase活性部位とミオシンの構造にどのように反映しているのかについて説明してください。
- [回答12] ATPのミオシンに対する変性抑制作用についてはATPaseや塩溶解性などを指標にして測定している。ATPase活性は一つの指標である。ATPはATPaseのアクティブサイトのみではなく、ミオシン全体に影響するものと考察している。
- [質問13] 今後の研究の方向について説明してください。
- [回答13] ATPの変性抑制作用メカニズムに関する基礎研究とこの技術を利用して高品質冷凍品の生産への応用について検討していく予定である。