

### 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	Fina Amreta Laksmi		
審査委員	主査	鹿児島大学 教授	石橋 松二郎
	副査	鹿児島大学 准教授	花城 勲
	副査	佐賀大学 教授	渡邊 啓一
	副査	琉球大学 教授	屋 宏典
	副査	鹿児島大学 教授	安部 淳一
審査協力者			
実施年月日	令和 2年 1月 24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>主査及び副査は、令和2年1月24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>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	Fina Amreta Laksmi
氏名	

〔質問1〕 H18Tは70℃で野生型やH18Sより高い活性を示したが、70℃での熱安定性はどうか？

〔回答1〕 CDを用いたサーマルメルティング解析によると、H18TはpH7.5条件下では72℃から遷移が始まっている。この事は、H18Tは70℃でまだ安定であることを示唆している。変異後の安定性を考慮して、変異の部位を基質との結合に関与もしくはあまり関与しない残基を選択した。

〔質問2〕 H18Tが安定性と柔軟性の両方を示したのは面白い。安定性は酵素構造の別の場所が起因しているのかもしれない。例えば変異後、ある場所でリジットな構造が増加し、また、別の場所で柔軟性が改善したのかもしれない。その安定性を維持する変異体の原因を調べるためには、恐らく60℃と70℃でのキネティックパラメータを測定し比較する必要がある。これにより、GSAI変異体の温度依存性のパターン、 $K_m$ 依存性なのか $K_{cat}$ 依存性なのかを知ることが出来る。 $K_m$ もしくは $K_{cat}$ のどちらかがGSAI変異体の温度依存性に影響を与えている可能性がある。

〔回答2〕 有難うございます。今後検討します。

〔質問3〕 今回 $K_m$ はD-ガラクトースの基質特異性の増加に重要であることを示した。これに関して、アラニンスキヤニングの結果、H129残基は $K_m$ を改善するかもしれないことを示した。なぜ、この残基について調べなかったのか？

〔回答3〕 この残基についても調べたが、得られた変異体は野生型より良い活性を示さなかった。

〔質問4〕 H18TY234C変異体のバインディングポケットの容積が増加し、その増加がpH6.5-8.0での活性を促進したと推察したが、そのバインディングポケットの容積を計算したか？

〔回答4〕 C234残基付近のキャピティー容積を計算し、変異前のY234残基の時より226Å<sup>3</sup>増加した。

〔質問5〕 N123変異体やM350変異体では良い結果が得られなかったと報告した。もっとたくさんの変異体を取得した方が良い。また、論文にどのくらいのコロニーを調べたか書くべきだ。

〔回答5〕 我々は約100コロニーをスクリーニングしたが、D-ガラクトースに対する基質特異性が上昇した変異体を得ることが出来なかった。

[質問6] H18TY234C変異体の固定化は検討したか？

[回答6] 固定化酵素は遊離酵素より高い安定性を示す。今後検討したいと思う。

[質問7] 基質特異性のimprovementという単語を使っているが、違う言葉に言い換えた方がよい。また、H18TY234C変異体を使ったD-タガトースの生産効率はどうですか？

[回答7] わかりました。実際のD-タガトース生産効率については、まだ検討していない。今後検討していきたい。

[質問8] pH6.0での活性の増加はアロステリック効果だと推察しているが、コファクターの結合サイトがないのでアロステリック機構に従わない。別の言葉に変えた方がよい。アロステリック効果に従うことを推察するためには、2つのモデル、T状態とR状態を比べる必要がある。なぜアロステリック機構に従うと思うのか説明しなさい。

[回答8] pH6.0で261番目の残基のpKaが増加した。それは261残基と周りの残基間の相互作用を変化させ、その変化はさらにサブユニットの構造に影響を与え、最終的に立体構造を変化させたことでpH6.0での活性が上昇したと考察した。この効果はアロステリック効果に類似していると考えた。

[質問9] 普通アロステリック効果はリガンドが結合し、立体構造に影響を与えた時に使用される。活性部位から離れた場所にリガンドが結合し、それが活性部位に影響を与える場合、allosteric-like effectという言葉が使える。アミノ酸残基の変異とリガンド結合は恐らく類似した機構だと思う。変異による酵素構造のある部分の変化が立体構造に影響を与えている。

[回答9]

有難うございます。

[質問10]

GSAI変異体にD-タガトースが結合したモデルを作成する必要がある。このモデルを使うとGSAI変異体の変異による効果を明らかに出来るかもしれない。

[回答10] 有難うございます。今後検討します。