

(1022)

(学位第9号様式)

No. 1

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	室井 由起子
審査委員	主査 琉球大学 教授 和田 浩二
	副査 琉球大学 教授 高良 健作
	副査 佐賀大学 教授 濱 洋一郎
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 鹿児島大学 教授 大塚 彰
審査協力者	九州栄養福祉大学 教授 渡邊 啓一 九州栄養福祉大学 教授 杉元 康志
実施年月日	令和4年8月8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4年8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>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	室井 由起子
<p>[質問1] リゾチームのトリプトファン蛍光が発生に従って下がっていくことと表面への露出との関係についてどのように説明されますか？また、アクリルアミドによるトリプトファン蛍光について発生後期では低濃度で消光しているが、これはどう解釈されますか？</p> <p>[回答1] トリプトファンは分子表面に露出すると水の影響で蛍光は弱くなります。また、表面にあるトリプトファンは低濃度のアクリルアミドと衝突して蛍光が消光しますので、発生後期のトリプトファンの環境は発生前より分子表面にあると考えられます。ANSによる解析での表面疎水性の増加とも関連していると思います。</p> <p>[質問2] リゾチームの最終精製段階のHiTrap-CM-FFのクロマトグラフィーのパターンとNative電気泳動では、リゾチームは発生11日目以降 (+) 側に若干シフトしているが、どのようなことが考えられますか？</p> <p>[回答2] 発生が進むにつれて分子内部構造の変化により、塩基性アミノ酸の一部の表面への露出あるいは酸性アミノ酸のアミド化などが考えられます。</p> <p>[質問3] カラザペプチドはどれくらいの分子量ですか？また、アルツハイマー病は脳疾患であることから脳関門を通過することはできますか？</p> <p>[回答3] カラザペプチドを逆相-HPLCで分画しましたが、アミロイド線維形成を抑制するペプチドはまだ同定できていません。脳関門を通過するかどうかの検証はこれからですが、現時点で全身性アミロイドシースなどには有効と思われる。</p> <p>[質問4] アミロイド線維形成を促進する金属イオンの効果を抑制するカラザペプチドの効果をどのように考えていますか？</p> <p>[回答4] 詳しい解析はしていませんが、金属イオンの促進効果はアンフォールドしたタンパク質を架橋し、凝集を促進する効果と考えています。このような架橋効果をカラザペプチドは減少するか、金属と直接結合して金属の効果を弱めるのではないかと推察します。</p> <p>[質問5] アルミニウムは溶けにくい金属であるが、線維形成を促進する効果の要因をどのように考えますか？</p> <p>[回答5] アルツハイマー病などについてアルミニウムが線維形成を促進するという報告は多くありますが、不溶化したアルミニウムが線維形成を促進する報告は確認していません。</p> <p>[質問6] リゾチームのアミロイド線維の形成についてpH2と生体とは異なる条件で実験していますが、これは何故ですか？生体のpHに近い条件で行った方がよいのでは？</p> <p>[回答6] リゾチームの構造はジスルフィド結合が4カ所あり、大変リジッドな構造をしてい</p>	

るため、アミロイド線維を形成させるためにはアンフォールドの状態にする必要があります。そのためには酸性と高温あるいは有機溶媒などで構造を壊し、線維形成コア領域を引き出す必要があります。リゾチームをアミロイド線維形成モデルタンパク質として実験する場合はこの条件で行われています。なお、アミロイド $\beta$ ペプチドの線維形成の実験は中性のpHで行っています。

〔質問7〕カラザのタンパク質はどのようなタンパク質から構成されていますか？また、活性ペプチドが卵白にあれば、量的には卵白の方が多いのでは？

〔回答7〕SDS-PAGEで調べた限りでは卵白とよく似た構成になっています。一方で、カラザには特異的な分子も見ることができます。また、シアル酸含有量が高いことが特徴です。卵白に活性ペプチドが存在すれば、将来的に活性ペプチドを調製する場合は卵白の方が有効と考えます。

〔質問8〕リゾチームの熱安定性が低下するのは生物学的に意味のあることでしょうか？

〔回答8〕長い間38℃で保温されていることから、それほど大きくはないものの構造変化は起こっており、リジッドな構造がやや緩んで熱安定性が下がったと考えます。しかし、オボアルブミンは変性温度が逆に8℃上がっていることから、発生過程において個々のタンパク質によって構造変化は異なると思われます。リゾチームの変性温度は下がるものの生物学的機能は維持していることから、変性温度が下がることでその役割が保持できていると考えます。

〔質問9〕リゾチームの酵素活性と抗菌活性について説明してください。

〔回答9〕リゾチームの酵素活性はグラム陽性菌の細胞壁のペプチドグリカンのN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の $\beta$ 1-4グリコシド結合を加水分解する作用ですが、それが細胞壁を溶解することで抗菌活性を示すことと、それとは別にリゾチームの表面は塩基性アミノ酸が多いため(+)に帯電していると考えられ、(-)に帯電している細菌の細胞膜と相互作用することにより、細胞膜に穴を開け、細菌を死滅させると考えられています。発生後期のリゾチームはやや(+)の電荷にシフトしていると思われ、これにより抗菌活性は保たれていると考えます。

〔質問10〕基質との相互作用については、 $K_m$ 値が高くなり基質との親和性が低下することで活性が低下しているが、(+)チャージの影響はありますか？

〔回答10〕Trp62とTrp63は基質と水素結合し、活性中心のGlu35とAsp45の基質への作用に関係していると報告されています。したがって、これらの2つのTrpがやや表面に露出することで基質と活性中心との関係に変化が起こっていると考えられ、それが基質親和性や活性に影響していると思われ、(+)チャージの影響については不明です。