

2010. 6

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第四十号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *
 *

高知大学学報

本学は、次の者に博士（理学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲理博第 31 号	大塚 雅勇	天草地域の上部白亜系および始新統の層序と二枚貝化石群集	1
甲理博第 32 号	齋藤 伸介	群体ホヤ <i>Aplidium yamazii</i> に共生するカイアシ類 <i>Idomene purpurocincta</i> の分類および生態に関する研究	3
甲理博第 33 号	高橋 健一	Paleoecology of the Early Miocene brackish and shallow marine molluscs in Honshu, Japan (本州における前期中新世の汽水性および浅海性貝類古生態)	6
甲理博第 34 号	多田 博	2 ドメイン型アルギニンキナーゼの酵素特性に関する研究	8

ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	おおつか まさお 大塚 雅勇(熊本) 博士(理学) 甲理博第31号 学位規則第4条第1項該当 平成22年3月23日 天草地域の上部白亜系および始新統の層序と二枚貝化石群集 (1) Trans. Proc. Palaeont. Soc. Japan, N. S., No. 112, pp. 417-423, 1978
	審査委員 主査 教授 近藤 康生 副査 教授 東 正治 副査 准教授 池原 実

論文の内容の要旨

白亜紀後期から古第三紀にかけては、二枚貝類をはじめとする海洋生物が多様化し、現代型の生態系が成立した時期と考えられている。天草地域の上部白亜系から始新統にかけては、暁新統を欠き地層記録が連続的ではないものの、堆積物とその累重様式がよく似ており、白亜紀後期と始新世での海生動物群を比較するのに適している。すなわち、潮汐作用が卓越する沿岸ないし陸棚域の堆積物とタービダイトを主体とする深海堆積物が繰り返し、これに対応した化石群集が繰り返し現れる。

このような視点に立ち、本論文では、これまでに発表された同地域のおびただしい研究成果を基礎として新たな調査結果も加えながら、同地域の上部白亜系と始新統に、二枚貝類の進化史的イベントがどのように記録されているかを検討した。また、そのため、同地域の詳細な野外調査を行い、層序を再検討するとともに、地域的、あるいはより広域的な環境変化を推定した。

その成果は、以下のようにまとめられる。

- ・ 詳細な野外調査の結果、姫浦層群、および弥勒層群で新知見を得た。
- ・ 天草地域の白亜紀後期(サントニアン階からマストリヒシアン階)と始新世の化石群集を比較すると最大の特徴は古異歯類から異歯類への移り変わりとイノセラムス類の消滅である。
- ・ 現代的な初期の異歯類 *Amakusatapes ovatus* Tashiro and Otsuka の産出層は、上姫浦層群宮野河内層と下津深江層の干潟堆積物であり、同二枚貝が干潟の生息であったことが推定できる。また、この化石群集には原鰓類の *Portlandia* 属がみられるが、現生の本属が深海に分布することから、沿岸域から深海への生息地の移り変わりが推定される。
- ・ 現在、深海に生息する *Periploma* 属二枚貝は、姫浦層群上部の深海堆積物からも確認できた。一方、これより下位の上部白亜系御船層群の汽水生貝類群集の一員として産出していることから、白亜紀後期のチューロニアン階からカンパニアン階の間に、同属の一部が深海に生息地を移したことが推定される。
- ・ 白亜紀後期から始新世にかけての二枚貝類の進化的変化は、古異歯類の海域からの消滅、イノセラムス類の消滅、現代型異歯類の沿岸域での出現、現在類の沿岸域から深海への生息地の移動、などが天草の上部白亜系および始新統に記録されていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、天草地域の上部白亜系姫浦層群および始新統弥勒層群・本渡層群・坂瀬川層群の層序を、離島を含めた海岸部から内陸にわたる詳細な野外調査によって再検討するとともに、そこに含まれる二枚貝化石群集を総括的に研究したものである。従来、姫浦層群は分布域の違いと堆積環境の違いから下部亜層群と上部亜層群に区別されてきたが、天草大江地域および牛深大島での調査により、下部亜層群最上部の阿村層と上部亜層群最下部のU-Iが対比できることが明らかとなった。そこで本論では、姫浦層群全体を下位から順に、樋の島層、阿村層、天草大江層、宮野河内層、下津深江層の5層に層序区分した。始新統についても、層序区分に混乱があった分布域南西部における離島での調査により新知見を得て層序区分を確立した。このように、Nagao(1922)以来の長い研究史を有する天草地域の上部白亜系および始新統の層序は、本研究により確立されたとと言える。

本研究では、これらの層序学的成果を基礎として、本層群に多産する二枚貝類化石を群集として評価し、姫浦層群で20群集、弥勒層群・本渡層群・坂瀬川層群で10群集を認定した。これらの地層群において、二枚貝化石群集を全分布域にわたって総括的に記載したのは本論が初めてである。

また、白亜紀後期から新生代初期にかけての二枚貝類の進化的時間スケールでの変遷については、イノセラムス類が絶滅したことや、トリゴニアなどの古異歯類がオーストラリア沿岸を除き海から消滅したことはよく知られていたが、現在繁栄している長い水管を持つ異歯類の初期の多様化パターンについてはこれまで不明の点が多かった。本研究では、堆積相を含めて検討した結果、現生のアサリによく似たリュウキュウアサリ亜科二枚貝 *Amakusatapes ovatus* の生息場所が海水域の干潟であったことをはじめて明らかにした。本種を含む *Amakusatapes* 群集には、*A. ovatus* の他、*Glycymeris japonica*, *Nanonavis* 類の他、現在深海に多く見られる原鰓類 *Portlandia* 属の *P. cneistriata* が含まれている。このことは、原鰓類が白亜紀後期以後、沿岸域から深海へ生息地を移動させたことを示唆している。このような、沿岸域から深海への進化的時間スケールでの移動現象は、Jablonski *et al.* (1983) などにより、他の無脊椎動物にも広く認められている現象であるが、本研究のように生息地を正確に特定できた事例は少ない。

なお、本研究は、その中心的な内容が日本古生物学会 2007 年年会において口頭発表されており、学会誌 (Otsuka, 1978: Trans. Proc. Palaeont. Soc. Japan, N. S., n. 112, p. 417-423) に報告された内容を含めてまとめられている。

本研究は、九州西部天草地域の姫浦層群および弥勒層群・本渡層群・坂瀬川層群層序について、その層序、堆積相、二枚貝化石群集を研究したものであり、これらの地層群で二枚貝化石群集を初めて網羅的に記載するとともに、現代型の生態的特徴を持つ二枚貝類の白亜紀における多様化パターンについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者大塚雅勇は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。

ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	さいとう しんすけ 齋藤 伸介(神奈川県) 博士(理学) 甲理博第32号 学位規則第4条第1項該当 平成22年3月23日 群体ホヤ <i>Aplidium yamazii</i> に共生するカイアシ類 <i>Idomene purpurocineta</i> の 分類および生態に関する研究 (1) Plankton and Benthos Research Vol.4, No.4:160-166, 2009
	審査委員 主査 教授 町田 吉彦 副査 教授 藤原 滋樹 副査 教授 上田 拓史 副査 准教授 岩崎 望

論文の内容の要旨

カイアシ類は、現在までに約1万種が知られており、その内の約35%が共生性である。宿主は、ほとんど全ての動物門に及び、海産無脊椎動物の中でホヤ類は主要な宿主の一つである。

高知県野見湾の潮間帯には群体ホヤ *Aplidium yamazii* が生息しており、冬から夏にかけて群体を形成する。2004年に、群体内の共同排出腔にハルパクチクス目のカイアシ類が生息することを発見した。本研究は、群体ホヤに共生するハルパクチクス目カイアシ類の初めての知見である。

本研究で用いたカイアシ類は *Idomene purpurocineta* に同定された。本種は、英国で採集された標本に基づき、1905年に Norman と T. Scott により原記載された。その後、本種は1940年に Nicobar 諸島の Nancowry (インド洋)、1964年に Caloline 諸島の Ifaluk (西太平洋)、1965年にカリフォルニア沖で採集され、それぞれ再記載された。原記載に用いられた標本が何から採集されたのか明らかではないが、Nancowry、Ifaluk およびカリフォルニア産の標本は海藻から採集された。本研究で用いた標本が群体ホヤから採集されたこと、また、本種は日本初記録種であることから、日本産の *I. purpurocineta* として詳細な再記載を行った。

2004年12月から2006年8月まで *I. purpurocineta* の生態調査を行った。潮間帯に *A. yamazii* の群体が出現すると、カイアシ類の成体が共生を開始した。共生開始直後から抱卵雌の割合とノープリウス幼生の個体数が増加し、群体内のカイアシ類の密度は急激に上昇した。カイアシ類の共生は群体の出現期間を通して確認され、ほとんど全ての期間でノープリウス幼生とコペポディド幼生が個体数の約70%を占めた。共同排出腔内のカイアシ類の平均密度は 1.3×10^3 indiv. cm^{-3} であり、この密度は、最も高いと報告されている浮遊性カイアシ類の密度 (10^2 indiv. cm^{-3}) よりも高い。

群体サイズが大きくなるに従って、カイアシ類の密度と成体の割合は、それぞれ一定の値に近づいた。観察から、ノープリウス幼生とコペポディド幼生は共同排出腔から出ることはいないが、遊泳能力を持つ成体は群体間を頻りに移動することが明らかとなった。これらのことから、サイズの大きい群体では、共同排出腔の容積が十分であるため、ノープリウス幼生の加入や成体の群体間の移動など密度を決定する要因の間で均衡が保たれ、カイアシ類の個体群が安定すると考えられる。

群体の消失時期が近づくにつれて、抱卵雌の割合と卵嚢内の卵数は減少した。このカイアシ類はサイズの大きい少数の卵(1-11個)を持つ。また、発生段階におけるステージ毎の減耗率は、ノープリウス幼生期で小さく、発生段階が進むにつれて徐々に増加した。これらのことから、このカイアシ類は少数の子孫を確実に残すタイプの繁殖戦略をもち、群体の共同排出腔は幼生の保護の役割を果たす微小生息地であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

従来、群体ならびに単体ホヤ類は共生性カイアシ類の主要な宿主として知られていたが、底生性の動物群であるハルパクチクス目のカイアシ類がホヤ類に共生しているという報告は皆無である。本研究は、ハルパクチクス目の種が群体ホヤに共生し、ホヤの共同排出腔を個体の成長の場として利用していることを明らかにした。

論文は、共生性カイアシ類の分類と記載、カイアシ類の寄主特異性ならびに行動観察、カイアシ類の密度の決定要因と密度調節機構、カイアシ類の生活史と繁殖戦略から構成されている。シモフリボヤ (*Aplidium yamazii*) は岩礁域の潮間帯に群体を形成する。本研究の対象となったカイアシ類はこの群体の共同排出腔から発見され、暫定的に *Idomene purpurocincta* と同定された。本種の原記載は 1905 年で、タイプ産地は英国海峡である。ホロタイプはドレッジにより得られたため、寄生性なのかあるいは自由生活をするのかは不明である。その後、インド洋のニコバル諸島、西太平洋のカロリン諸島、カリフォルニア沖から本種と同定された種が報告されているのみに、黒潮流域ならびに日本沿岸では本属の記録すらない。申請者は日本産の標本に詳細な記載を与え、日本産の種がいくつかの重要な形質において *I. purpurocincta* のホロタイプと異なり、ほぼ確実に未記載であることを明らかにした。国際動物命名規約に従った新種記載論文の完成が待たれる。同時に、原記載以降に *I. purpurocincta* として公表された種が *I. purpurocincta* ではない可能性が高いことが指摘された。このように、分類学的側面においても本論文は優れた内容を含んでいる。本研究のシモフリボヤが群体を形成している環境では、他の 16 種の群体ホヤも同所的に出現する。これらのうち 2 科 7 種で *I. purpurocincta* が確認され、ホヤの単位乾燥重量に基づく比較では確かにシモフリボヤに依存しているとみなせる。ただし、野外ではいずれの種の群体も低密度であり、また、季節的消長もわずかに異なる。寄主特異性に関しては今後、さらに観察を続けると同時に、化学的視点からの解明も期待されるが、これらには膨大な時間が必要なることもまた明白である。

カイアシ類が共同排出腔内で交尾を行い、孵化後に脱皮をくり返して繁殖可能なステージになることが明らかにされた。申請者は観察された膨大な個体数のカイアシ類を发育段階ごとに同定して個体数を算出し、さらにコペポデイド 5 期と成体については雌雄を判別した。このような個体群構造の解析結果はカイアシ類に関してはきわめて希である。ここで重要なことは、共同排出腔内にカイアシ類の捕食者が存在しないことと、破碎されたホヤの糞をカイアシ類が餌とすることが観察されたことである。同時に、成体は宿主間を頻繁に移動するが、未熟なステージの個体ではこのような現象が観察されなかった。これらのことは、本論文の個体群生態学的側面における論理の展開で重要な位置を占めている。捕食者が不在であることは、個体群の減耗が自然死亡に一方向的に依存していることを示唆する。また、破碎された糞でなければ餌として利用できないことは、共同排出腔内がカイアシ類にとって相対的に貧栄養状態であることを想定させ、成体が宿主から離れることで密度効果が緩和されると申請者は考察した。カイアシ類の密度と成体比はより小さい宿主で大きくばらつく傾向を示したが、より大きな宿主においてはカイアシ類の密度が上昇するにしたがい成体比が減少し、一定の値に収束する傾向を示した。すなわち、サイズの大きな宿主では、ノープリウスの加入、成体の移出と移入などの要因が平衡状態に達し、カイアシ類の個体群が安定する可能性が示唆された。他の分類群では、コペポデイド 2 期が宿主への侵入ステージであることが報告されているが、本種の場合は成体である点で特異なのかも知れない。本種はさらに、雌が相対的に大きな卵を小数抱え、その最大数は 11 個であった。これほど少ない卵数は他の共生性カイアシ類では例がない。この卵数は、共同排出腔内がカイアシ類にとって相対的に貧栄養状態であることと、共同排出腔が保護の役割を担っていることに関連すると申請者は推察した。個体群減耗の過程の解析、共同排出腔内におけるエネルギーの流れの解明など、未解明の部分は確かに認められるが、これには室内飼育を含む膨大な時間が必要となる。また、宿主の群体が崩壊した後の寄主の存在様式は、本種に限らず解明がほぼ困難と考えられる。以上の研究成果の一部は 2008 年 7 月 14-19 日にタイ国パタヤ市で開催された第 10 回 International Conference on Copepoda において Life history and host specificity of harpacticoid copepod

論文審査の結果の要旨

Idomene sp. (Thalestridae) associated with a compound ascidian *Aplidium yamajii* のタイトルで発表され、学生口頭発表最優秀賞を受賞し、さらに Density and adult ratio of the symbiotic harpacticoid copepod *Idomene purpurocincta* in the compound ascidian host *Aplidium yamajii* として 2009 年の Plankton & Benthos Research 誌の第 4 巻第 4 号 160-166 ページに掲載された。

新たな試料の追加と遺伝子解析などが必要ではなかったかとの指摘があった。申請者は遺伝子の解析も行なったが、本論文では主題から離れるため割愛したことと、安定同位体を用いた共同排出腔内におけるエネルギーの流れの解析も試みたが、実験条件の設定が極めて困難であることが指導教員である主査から説明された。論理の展開において、飼育実験に基づく知見が若干不足気味なのは否めない。しかし、寄主の個体群構造の詳細な解析結果と、群体ホヤをめぐる共進化に新たな展望を示した点は高く評価され、申請者齋藤伸介は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	たかはし けんいち 高橋 健一(愛知) 博士(理学) 甲理博第33号 学位規則第4条第1項該当 平成22年3月23日 Paleoecology of the Early Miocene brackish and shallow marine molluscs in Honshu, Japan (本州における前期中新世の汽水性および浅海性貝類古生態) (1) 地質学雑誌, 114巻, p. 472-492, 2008年9月
	審査委員 主査 教授 近藤 康生 副査 教授 サントツシユ 副査 准教授 三宅 尚

論文の内容の要旨

西南日本弧の東部に位置する岐阜県南部には前期中新世の浅海堆積物で貝化石を豊富に含む瑞浪層群明世層と岩村層群遠山層が分布している。また、最近の研究により、黒潮は17-15 Ma ごろにインドネシア海路が閉鎖されることによって形成されたことが明らかとなってきた。本研究では明世、遠山両層がタフによって詳細に対比できること、および黒潮形成以前の堆積物であることに注目し、両層での堆積相解析、産出貝化石の定量分析と群集認定および貝類の水温特性の推定に基づいて、西南日本弧東部太平洋側における黒潮形成以前の貝類の水平分布、および沿岸海洋環境を明らかにした。

明世、遠山両層では *Meretrix arugai*, *Trapezium modiolaeforme*, *Vicaryella ishiihana* などの暖水種から構成される *Dosinia-Meretrix* 群集、および *Trapezium-Vicaryella* 群集は閉鎖的な浅い内湾堆積物から産し、冷水種である *Felaniella usta*, *Patinopecten egregius*, *Liocyma minuta* や、広温種である *Saccella miensis* などで構成される *Felaniella* 群集、および *Saccella-Liocyma* 群集は下部外浜と内側陸棚の漸移部や、内側陸棚堆積物から産出する。また、下部外浜と内側陸棚の漸移部には冷水種の *Felaniella usta* と暖水種である *Dosinia nomurai* が混合して産出する。これらのことより、浅い閉鎖的な内湾や沿岸表層は高温水が、一方、開放的な海域の平穏時波浪作用限界以深では低温水が占め、高温水と低温水は平穏時波浪作用限界付近で混合していたことが推定される。この推定を日本周辺および中国沿岸の夏の水温構造および貝類分布と比較すると、当時の西南日本弧東部太平洋側は現在の黄海と類似する。

黒潮が存在しないということは赤道域から日本近海への、強い熱輸送システムが働いていなかったことを意味している。すなわち陸棚に高温の水が供給されなかったため静穏時波浪限界以深には広温種および冷水種が生息したと推定される。一方、明世、遠山両層堆積時の陸上植生は現在の西南日本あるいは長江流域に類似していることが明らかとなっている。これは現在の黄海周辺よりも温暖であったことを示している。現在の黄海では日射によって表層に高温水層が形成され、暖水性貝類が生息している。前期中新世の西南日本の大気温度が現在の黄海周辺よりも高かったと考えられるので、当時の沿岸表層水は日射や大気温度によって、黄海と同程度あるいはより高温になっていたと推定される。このようにして形成された高水温塊に暖水種が生息したと推定される。

論文審査の結果の要旨

現在、西南日本太平洋岸の気候や生物相に多大な影響を与えている黒潮は、1700-1500 万年前にインドネシア海路が閉鎖されたことによって形成されたことが明らかとなっている。すなわち、海路の閉鎖以前は太平洋からインド洋へ流れていた赤道域の暖流が、海路の閉鎖により北へ向きを変え黒潮となって日本列島沿岸に到達するようになった、と理解されている。この考えに従えば、黒潮形成前の西南日本太平洋沿岸の海洋生物群は、現在とは相当に異なっていたに違いない。このことを具体的に解明するため、西南日本弧の東部に位置する岐阜県南部前期中新世の瑞浪層群明世層と岩村層群遠山層の堆積相と貝化石群集を解析したのが本研究の趣旨である。

詳細な野外調査の結果、明世・遠山両層では *Meretrix arugai*、*Trapezium modiolaeforme*、*Vicaryella ishiana* などの暖水種から構成される *Dosinia-Meretrix* 群集や *Trapezium-Vicaryella* 群集が閉鎖的な浅い内湾堆積物から見つかった。一方、冷水種である *Felaniella usta*、*Patinopecten egregius*、*Turritella sagai* や、広温種である *Saccella miensis* などによって構成される *Felaniella* 群集、および *Saccella-Liocyma* 群集が下部外浜と内側陸棚の漸移部や、内側陸棚堆積物から産出することがわかった。これらのことより、浅い閉鎖的な内湾や沿岸表層には高温水が分布したのに対し、開放的な海域の平穏時波浪作用限界以深では低温水が占め、高温水と低温水は平穏時波浪作用限界付近である程度混合していたことが推定された。また、文献調査の結果、滋賀県に分布する前期中新世鮎河層群においてもこれら暖水種、冷水種、広温種が火山灰層に挟まれた同時代の堆積物から産出していることがわかった。これらの事実に基づき、前期中新世において、先の暖水種および冷水種が同じ海域に同時に存在していたことが結論された。推定される貝類分布や水温構造を現在の日本の太平洋側および中国沿岸と比較することにより、当時の西南日本東部太平洋側沿岸海域の水温構造は現在の黄海と類似することも示された。

なお、本研究の中心的な内容は、第6回国際堆積学会議、日本地質学会第16年学術大会、および日本古生物学会第159回例会において発表されており、関連する内容が学会誌（高橋ほか、2008：地質学雑誌、114：472-492）に掲載されている。

本研究は、我が国の新第三紀貝類化石群の産地としてよく知られた前期中新世瑞浪層群明世層および岩村層群遠山層の層序、堆積相および貝化石群集をかつてない精度で研究したものであり、化石群集の組成、分布、またこれらの地層群を堆積させた沿岸海域の水温構造について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者高橋健一は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

<small>ふりがな</small> 氏名 (本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名	<small>ただ ひろし</small> 多田 博 (徳島) 博士 (理学) 甲理博第 34 号 学位規則第 4 条第 1 項該当 平成 22 年 3 月 23 日 2 ドメイン型アルギニンキナーゼの酵素特性に関する研究 (1) International Journal of Biological Macromolecules, 42,46-51, 2008
	審査委員 主査 教授 鈴木 知彦 副査 教授 川村 和夫 副査 教授 松岡 達臣 副査 教授 藤原 滋樹

論文の内容の要旨

筋肉、神経などの細胞において急激なエネルギー需要に対応するため、グアニジノ基をもつ高エネルギーリン酸化合物のフォスファージェンと ADP から可逆的に ATP が産生される。この反応を触媒している酵素がフォスファージェンキナーゼ (PK) である。PK のなかでもアルギニンキナーゼ (AK) は、無脊椎動物に広く分布している。AK は通常単量体の 40 kDa であり、稀に 2 量体や 2 ドメイン型が存在する。ヨロイソギンチャク 2 ドメイン型 AK の酵素特性について以下のとおり研究した。

1. ヨロイソギンチャク 2 ドメイン型 AK の協同性 (ドメイン間の相互作用) の存在

ヨロイソギンチャク *Anthopleura japonicus* AK は稀な 2 ドメイン型であり、それは進化の過程で遺伝子の重複と融合によって生じたものといわれている。既に pMAL ベクターにクローニングされている *Anthopleura* AK 2 ドメイン型、それを切り離れたドメイン 1 (D1) およびドメイン 2 (D2) のそれぞれの cDNA の 5' 側に制限酵素 *Nde* I と His×6 を、また 3' 側に *Bam* HI を付加し、pMAL から pET30b に移し替え、発現条件を探索、決定し、それにより精製・活性測定を行った。それらの活性度合いを触媒効率 $k_{cat}/K_m^{ATP} \cdot K_d^{arg}$ でみると、2 ドメインを 100 とすれば D1 は 9、D2 は 24 となり、D1、D2 は大きく低下している。2 ドメインの構成は D1 と D2 であり、常識的にはそれぞれの指数を合計すれば 100 となると考えられる。2 ドメインの触媒効率は D1 と D2 を合わせたものよりはるかに高く、その原因は D1 と D2 のドメイン間の相互作用による協同性 cooperativity があるためと考えた。

2. 協同性の検証

この協同性を検証するため、部位特異的変異導入誘発 site-directed mutagenesis により、*Anthopleura* AK 2 ドメインの主要な個所のアミノ酸を改変・挿入し、そのリコンビナント酵素を発現、精製し、活性測定を行い、2 ドメイン型における協同性の存在を確認した。

3. ヨロイソギンチャク 2 ドメイン型 AK の相乗作用 (ドメイン内の相互作用) の特徴

現在 AK の立体構造は単量体のアメリカカブトガニ *Limulus polyphemus* AK において closed 構造と open 構造が解析されている。それらを基にした研究で基質結合に伴う立体構造の安定化に寄与するアミノ酸残基として Asp62 と Arg193 が同定されている。これら 2 つの残基は単量体の AK ではほとんどが保存されており、*Anthopleura* AK も単量体 AK と同様に両残基が保存されている。AK が触媒する正反応ではアルギニンと ATP が基質となり、最初の基質の結合 (K_d) は、二番目の基質の結合 (k_m) を促進させ、 $K_d/K_m > 1$ ならば相乗作用 synergism があることとなる。この相乗作用はドメイン内の相互作用といえる。オオムガイ *Nautilus pompilius* AK の相乗作用は 3.37 であるが、62 位、193 位を Gly に変異させた場合、その K_m は野性型の 2~3 倍となり、活性は大きく低下した。*Anthopleura* AK 2 ドメイン野性型の相乗作用は 1.07 とその作用はほとんど見られない。62 位、193 位を Gly に変異させ、その活性測定結果から基質結合時の 2 ド

論文の内容の要旨

メインの立体構造について考察した結果, D1 側が 2 ドメインの活性の主となり, D2 側が D1 を支えるような構造を考えるに至った。

4. ヨロイソギンチャク AK の熱力学的特性

Anthopleura AK 2 ドメイン, D1 および D2 の熱力学的パラメーターを算出した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヨロイイソギンチャクの特異な2ドメイン型アルギニンキナーゼ（以下、2D-AK と記す）のドメイン間に相互作用が存在し、それにより協同性が現れることを示す実験を中心に組み立てられている。第一部、第一章においては、先ず、His-tag 付きの酵素として発現された2D-AK と、そこから単離された2つのドメイン (D1, D2) の触媒定数 (k_{cat}) や触媒効率 ($k_{\text{cat}}/K_m^{\text{ATP}} K_d^{\text{Arg}}$) を比較し、D1 と D2 の和が2D-AK よりも有意に小さい (k_{cat} で50% に相当) ことを見いだした。このことから、2D-AK には機能上の協同性が存在するのではないかと推定した。これを証明するために、2D-AK のドメイン間のリンカー部分に6残基の Lys を挿入し、その変異体の触媒定数が30% 弱に低下することを実験的に確かめた。このことから両ドメイン間に相互作用があることを証明した。次に、協同性のトリガーに関する情報を得るために、2D-AK の2つのドメインのいずれか一方にグアニジノ基質の結合を妨げるような変異を導入した。それらの変異体は、期待される触媒定数の25-35% しか示さず、2D-AK の協同性発現のトリガーが、両ドメインいずれかへの基質結合そのものであることが示された。第一部、第二章においては、2ドメインアルギニンキナーゼが触媒する反応の遷移状態における熱力学特性を明らかにして、通常のシングルドメイン型 AK 酵素のものと比較して2D-AK の特性を論じている。第二部においては、ドメイン内における基質結合の相乗作用に関して、通常の AK 酵素で重要とされている二つのアミノ酸残基、Asp62 と Arg193, の変異体作製を通して議論している。通常の AK とは異なり、2D-AK 及び単離された D1 及び D2 には正の相乗作用がほとんど存在しない (K_i/K_m 値が1以下)。しかし、2D-AK の D1 側の Asp62 変異体では強い相乗作用が現れており、この変異体の相乗作用発現にもドメイン間の相互作用が関与していることが示された。

以上の結果の一部は、2008年に、査読付き学術雑誌に発表しており (Tada, H., Nishimura, Y., and Suzuki, T. (2008) Cooperativity in the Two-domain Arginine Kinase from the Sea Anemone *Anthopleura japonicus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42: 46-51.), 現在、第2報を投稿準備中である。また、研究成果は、国内の全国大会レベルの学会で3回の口頭発表として、地方大会レベルの学会でも数回の口頭又はポスター発表として公表している。総じて、論文内容は質的、量的にも博士論文として優れており、本学理学研究科応用理学専攻の博士(理学)の学位にふさわしいと判断される。