



Title	Landscape around Catalase I from <i>Bacillus stearothermophilus</i> and Its Application for Protein Engineering by Artificial Evolution
Author(s)	Savitr, Trakulnaleamsai
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39112
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	サヴィット トラクイラムサイ Savitr Trakulnaleamsai
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 月 3 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科 醗酵工学専攻
学 位 論 文 名	Landscape around Catalase I from <u>Bacillus</u> <u>stearothermophilus</u> and Its Application for Protein Engineering by Artificial Evolution (<u>Bacillus stearothermophilus</u> 由来カタラーゼ I から見た配列空間 の地形と人工進化によるタンパク質工学への応用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 ト 部 格 教 授 今 中 忠 行 教 授 山 田 靖 宙 教 授 大 嶋 泰 治 教 授 新 名 惇 彦 教 授 吉 田 敏 臣 教 授 二 井 將 光

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、酵素が進化の過程で作りに上げられたものであるとの認識の上に立ち、配列空間の地形という新しい観点から酵素を理解し、タンパク質工学の新しい方法論を構築することを目指した一連の研究成果をまとめたもので、以下の4章から構成されている。

緒論では、本研究の背景を述べるとともに、本論文の目的とその概要について述べている。

第1章では、Bacillus stearothermophilus 由来のカタラーゼ I を精製し、その酵素的性質を明らかにするとともに、酵素遺伝子の塩基配列を決定している。そして、これらの知見より、本酵素は Escherichia coli や Salmonella typhimurium のカタラーゼ HPI と近縁であり、カタラーゼ活性とともに微弱なペルオキシダーゼ活性を持つ細菌カタラーゼのグループに属することが確認されている。さらに、既知のカタラーゼ、ペルオキシダーゼのアミノ酸配列の比較より系統樹を作成し、本酵素が進化の過程でペルオキシダーゼ活性の大部分を失い、新たにカタラーゼ活性を獲得してきたとの示唆を得ている。

第2章では、カタラーゼ遺伝子にランダムな変異を導入し、得られた変異型酵素の性質を解析することにより、本酵素から見た配列空間の地形を推定し、次のような結果を得ている。本酵素は、耐熱性の点では高いレベルにあるものの、カタラーゼ活性とペルオキシダーゼ活性に関しては中程度の平凡なレベルにある。また、両活性の地形はそれぞれの高い領域と低い領域とがほぼ一致しているが、耐熱性の地形と活性の地形の間には相関性は見られない。そして、これらの知見の重要性を、酵素進化とタンパク質工学の点から考察している。

第3章では、前章で得られた知見をもとに、本酵素の反応特異性をカタラーゼからペルオキシダーゼに変化させることを試みている。前章で得られた変異酵素集団の中から、カタラーゼ活性が減少し、ペルオキシダーゼ活性が上昇した変異酵素を出発点として選び、その遺伝子に2度目のランダム突然変異を導入することにより、野生型酵素のペルオキシダーゼ活性が2%であったものを71%にまで上昇した変異酵素を取得している。

第4章では、以上の結果を要約し、本研究で得られた主たる結論を総括している。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の一次配列と性質とを関連付けた配列空間の地形の特徴を知ることは、酵素の新しい理解の方法であり、さらには、酵素進化の理解、人工進化による既存の酵素機能の改良および新酵素の創成に対して重要な知見となる。本論文は、*Bacillus stearothermophilus* 由来カタラーゼ I を材料として選び、本酵素の現在の性質を明らかにした後、本酵素のまわりの局所的地形の特徴を明らかにし、その知見をもとに、本酵素の反応特異性の改変を行ったものである。その主な成果を要約すると以下の通りである。

- (1) 本酵素を精製し、その酵素的性質を明らかにするとともに、酵素遺伝子の塩基配列を決定し、これらの知見より、本酵素がカタラーゼ活性とともに微弱なペルオキシダーゼ活性を持つ細菌カタラーゼのグループに属していることを示している。さらに、既知のカタラーゼ、ペルオキシダーゼのアミノ酸配列の比較より系統樹を作成し、本酵素が進化の過程でペルオキシダーゼからカタラーゼに変化してきたとの示唆を得ている。
- (2) 本酵素から見た配列空間の局所的地形を調べる方法を開発し、次のような地形の特徴を明らかにしている。本酵素は、耐熱性の点では高いレベルにあるものの、カタラーゼ活性とペルオキシダーゼ活性に関しては中程度の平凡なレベルにある。また、両活性の地形はそれぞれの高い領域と低い領域とがほぼ一致しているが、耐熱性の地形と活性の地形の間には相関性は見られない。そして、これらの知見の重要性を、酵素進化とタンパク質工学の点から考察している。
- (3) 本酵素のまわりの配列空間の地形に関する知見のタンパク質工学への応用例として、反応特異性をカタラーゼからペルオキシダーゼに変換することを試み、2度のランダム突然変異により本酵素のペルオキシダーゼ活性を2%から71%にまで上昇することに成功している。

以上のように、本論文は、酵素のまわりの配列空間の地形を調べる方法を新しく開発し、カタラーゼ I の局所的地形の特徴を明らかにするとともに、その知見がタンパク質工学に応用しうることを示したもので、酵素学および酵素進化工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。