OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Evolutionary Molecular Engineering Based on the Structure of Fitness Landscape
Author(s)	松浦, 友亮
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155355
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	松浦友亮（まつうらともあき）
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 14601 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Evolutionary Molecular Engineering Based on the Structure of Fitness Landscape. （適応度地形に基づく進化分子工学的手法）
論文審査委員	（主査） 教授 卜部 格 （副査） 教授 原島 俊　教授 山田 靖宙　教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣　教授 関 達治　教授 金谷 茂則

論文内容の要旨

本論文は，タンパク質配列空間内の地形を実験的に解析し，その結果から進化分子工学的に有用な手法を開発したことを示している。

緒言では，変異と選択を繰り返し行う進化分子工学的手法の背景，さらに本研究の目的，およびその意義について記述している。

第一章では進化分子工学的手法を用いて，より効率的に酵素の機能を改良するための変異率及びサンプルサイズを推定する方法の開発に関して記述している。本章では理論的研究により3つの地形の特徴を表すパラメーター1）アミノ酸置換による機能の変化の平均，2）分散，3）変異の非加法性の度合い，がこの推定に必要であることを明らかにしている。さらに *Bacillus stearothermophilus* 由来のカタラーゼI（735アミノ酸）を材料としてランダムな変異と選択を繰り返し行い，その過程で作成された変異型酵素の活性及び熱安定性を測定し，上記3つのパラメーターを統計的解析により求めている。これらの値を用いると作成されるライブラリーの変異型酵素の性質の分布を予測できている。さらには任意の活性，熱安定性などの機能をもつ酵素を得るために最低必要なライブラリーサイズ，ライブラリー作成の際の変異率を知ることができることが示されている。よって，これら3つのパラメーターにより作成されるライブラリーの変異型酵素の性質の分布を推定でき，結果として効率的にタンパク質の改変が行えることが示されている。

第二章ではランダム点変異と異なる新しい変異の導入法を開発したことを記述している。カタラーゼIの熱安定性は以前の報告から点変異を導入することにより向上させることは難しいことが示唆されている。そこで点変異と異なる方法，ランダム伸長変異（16アミノ酸のうち10アミノ酸がランダムであるような配列を酵素のC末端に付加する方法）をカタラーゼIに導入している。その結果，野生型及び変異型カタラーゼI（I108T／D130N／I222T）の熱安定性や活性の上昇が確認されている。伸長変異は配列空間の新しい次元に地形を開くことに対応している。従って，これらの結果はそれにより酵素の機能を改良する可能性が与えられることを示している。

最後に，以上で得られた知見を総括し，さらに進化分子工学に関する研究の将来展望について記述している。

論文審査の結果の要旨

過酷な工業過程に利用できるように，酵素の性質を改良する方法を科学者は熱心に探し求めている。細菌のカタラーゼは過酸化水素を分解する工業的に重要な酵素で，非常に高い温度にも耐性な *Bacillus stearothermophilus* から野生型が単離されているので，これをさらに改良するのは難しい。本論文は進化分子工学的手法によりこのカタラーゼＩの活性や熱安定性を高くする方法の開発に関して論じたものである。得られた結果を要約すると以下のようである。

1）ランダム点変異と選択を繰り返し行う進化分子工学的手法がタンパク質の機能を改良する有効な手法であることがカタラーゼＩを用いた実験結果から示されている。

2）進化分子工学的手法を用いて，より効率的に酵素の機能を改良するための変異率及びサンプルサイズを推定するためには３つのパラメーター，①アミノ酸置換による機能の変化の平均，②分散，③変異の非加法性の度合い，が必要であることを理論的研究により明らかにしている。

3）これらのパラメーターを実験結果から求め，実際に進化分子工学に応用できることを実験で示している。

4）カタラーゼＩの熱安定性は以前の報告から点変異を導入することにより向上させることは難しいことが示唆されている。そこで点変異と異なる方法であるランダム伸長変異（16アミノ酸のうち10アミノ酸がランダムであるような配列を酵素のＣ末端に付加する方法）をカタラーゼＩに導入している。

5）野生型の酵素にランダム伸長変異を導入したライブラリーでは58個のクローンの中から，野生型よりも高い熱安定性をもつクローンが15個得られている。

6）高い熱安定性を持つクローンが得られる比率は野生型の酵素にランダム点変異を導入したライブラリーと比較すると約10倍近く高いものが得られることが述べられている。

7）また，変異型カタラーゼＩ（I108T／D130N／I222T）にランダム伸長変異を導入した場合も熱安定性，活性の高いものが多く取得できている。

8）ランダム伸長変異は配列空間内で次元の拡張に対応しており，概念的に点変異とは異なる方法であり，よってランダム点変異とは異なる結果が期待されると結論づけられている。

以上のように，本論文は進化分子工学手法において効率的に酵素の機能を改良する手法の開発について論じている。これらの結果は適応度地形を考慮することの有用性を示すものであり，生物工学，生化学の分野で貢献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。