

氏名	吉田 和典
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第 6406 号
学位授与の日付	2021年 3月 25日
学位授与の要件	自然科学研究科 化学生命工学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Alteration of Industrial Lipases by Protein Engineering (タンパク質工学による産業用リパーゼの改変)
論文審査委員	教授 依馬 正 教授 菅 誠治 教授 今村 維克 教授 稲垣 賢二
<b>学位論文内容の要旨</b>	
<p>本論文では、タンパク質工学を利用して、既に産業分野で利用されているリパーゼ PS (LPS, Amano Enzyme Inc.) 及びリパーゼ AK (LAK, Amano Enzyme Inc.) の基質適用範囲と安定性の改良を試みた。</p> <p>第1章では、論文の研究背景についてまとめた。リパーゼは、学術分野や産業分野などで幅広く使用される有用な酵素である。しかしながら、基質特異性やエナンチオ選択性、耐熱性や pH 安定性などに限界があるために、利用範囲が制限される場合がある。自然界から取得されたリパーゼは必ずしも利便性が高くないため、固定化やタンパク質工学などによって酵素特性を強化して使用されている。中でも、タンパク質工学は最も強力な方法の1つである。</p> <p>第2章では、LPS と LAK の基質適用範囲を拡張するため、合理的設計によって二重変異体 (LPS_L287F/I290A, LAK_V287F/I290A) を設計し、基質特異性とエナンチオ選択性を改良した。また、二重変異体のエナンチオ選択性の起源を熱力学的パラメータより解明した。併せて、産業利用における酵素の適切な溶媒条件を確認するため、溶媒効果を検討した。</p> <p>第3章では、LPS の安定性を改良するため、新たな変異手法としてループウォーキング法を開発し、耐熱化変異体の創出を検討した。本手法によって、耐熱化のホットスポットを発見し、耐熱化変異体の創出に成功した。創出した耐熱化変異体の pH 安定性、有機溶媒耐性、第2級アルコールに対する基質特異性やエナンチオ選択性への影響を確認した。また、本手法の有効性を一重変異体と三重変異体の比較より確認した。</p> <p>第4章では、第3章で発見した耐熱化のホットスポットから最良の耐熱化変異体を創出するため、多変量解析による耐熱化変異体の予測を検討した。第3章で取得した実験データから耐熱化に寄与するアミノ酸置換の法則性を抽出し、耐熱化が期待される変異体を予測することで、更に耐熱性が向上した耐熱化変異株の創出に成功した。また、多変量解析によって予測された各アミノ酸の加重パラメータの考察より、耐熱化のメカニズムを検討した。</p> <p>これらの研究を通じて、基質適用範囲、エナンチオ選択性、および安定性が改善された幾つかの LPS 変異体を創出した。これらの LPS 変異体は、産業分野における活用が大いに期待される。</p>	

## 論文審査結果の要旨

リパーゼは産業分野で幅広く使用される有用な酵素であるが、基質特異性やエナンチオ選択性、耐熱性や pH 安定性などに限界があるために利用範囲が限られる場合がある。吉田和典氏はタンパク質工学の手法を駆使してリパーゼの基質適用範囲の拡張や熱安定性の向上を図り、顕著な研究成果をあげた。第 2 章では、リパーゼの基質適用範囲を拡張するため、合理的設計によって二重変異体を設計し、基質特異性とエナンチオ選択性を格段に改良した。また、二重変異体のエナンチオ選択性の向上の起源を熱力学的パラメータより解明した。さらに、溶媒効果を検討し興味深い結果を得た。第 3 章では、リパーゼの熱安定性を改良する変異手法として、ループ・ウォーキング法と命名された方法を開発し、耐熱変異体を創出することに成功した。創出された耐熱変異体の pH 安定性、有機溶媒耐性、第 2 級アルコールに対する基質特異性やエナンチオ選択性を調査した。また、本手法の有効性を一重変異体と三重変異体の比較より確認した。第 4 章では、第 3 章で発見した耐熱化のホット・スポット・ループから最良の耐熱変異体を創出するため、実験データの機械学習（多変量解析）によって、さらに耐熱性を向上させる三重変異を予測した。第 3 章で取得した実験データから耐熱化に寄与するアミノ酸置換の法則性を抽出し、耐熱化が期待される三重変異体を予測した。実験の結果、優れた耐熱変異株の創出に成功した。

以上のようにこれらの研究を通じて、基質適用範囲、エナンチオ選択性、および熱安定性などの機能が改善されたいくつかの優れたリパーゼ変異体を創出し、学術的にも産業的にも価値ある知見を得ている。学位授与に値する優れた研究であると判断した。