

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 高野 和文
副査 渡部 邦彦
副査 織田 昌幸

1 氏 名
倉橋 亮

2 学位の種類
博士（農学）

3 学位授与の要件
学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目
Insight into the relationship between activity and stability during protein evolution
(タンパク質進化過程における活性と安定性の関係に関する洞察)

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文は、タンパク質進化過程におけるタンパク質安定性の役割を解明するために、超好熱菌アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来エステラーゼ (Sto-Est) を用いて、そのランダム変異浮動実験から活性と安定性の関係を検証・探求し、得られた知見を基に高機能化酵素の新たな効率的な獲得法を提案したものである。

第1章では、タンパク質進化およびその進化工学についてのこれまでの知見を概説し、本研究の背景と目的についてまとめている。とくに、アミノ酸変異はタンパク質の環境適応や新機能の獲得を可能にする点で進化にとって有益であるが、その変異のほとんどがそのタンパク質を不安定化してしまうといった問題に直面する。そのため、様々な変異を受容するだけの安定性が進化にとって重要であると考えられているが、その詳細はまだ明らかでない。そこで進化過程における安定性の役割の解明が必要となっている。

第2章では、本研究における研究方法について記載している。

第3章では、異なる安定性を持つタンパク質をテンプレート（親タンパク質）として、それぞれにランダム変異体（子タンパク質）を作製し世代を追跡することで、タンパク質の分子進化過

程における安定性の役割を調べている。ここで、親タンパク質よりも活性が向上した変異体の割合を *Evolvability* と定義して、*Evolvability* は親タンパク質の安定性に依存し、安定性が高いタンパク質ほど活性が向上する変異体を産出することができることを明らかにしている。これは、タンパク質進化がその安定性によって潜在的に支配されていることを意味している。また、活性が低い変異体は、その安定性が高ければ、その後の世代で活性を回復することが可能であり、弱有害変異（活性低下変異）であっても、高い安定性を有していれば、タンパク質進化における配列空間を浮遊/拡張できることを示唆し、「分子進化のほぼ中立説」と関連付けて理解できるものである。

第4章では、これまでに得られた多数のランダム変異体の活性と安定性のデータを用いて、ランダム変異による活性と安定性の関係を精査している。その結果、タンパク質の安定性が高い場合には多くの高活性変異体を産出すが、安定性が低い場合、極少数ではあるが非常に高い活性をもつ変異体が生じることを見出している。つまり、活性をより向上させるには、安定性を犠牲にしなければならない、「活性と安定性のトレードオフ」が働いている。さらに、新たな指標として *Robustizability*（親タンパク質よりも安定性が向上した変異体の割合）を評価し、*Robustizability* は親タンパク質の活性と正の相関を示すことを明らかにしている。これは、高い活性のタンパク質は変異により活性を犠牲にして安定性を高める能力を有することを意味している。以上の結果、ランダム変異浮動においても、活性と安定性のトレードオフの原理が強く支配していることを確認している。さらに、これらの知見から、タンパク質進化学における安定性を考慮した新たな手法を提案している。新手法は、広範囲な配列空間の探索と活性と安定性のトレードオフ問題の回避が期待できるものである。

第5章では、本研究の成果をまとめ、タンパク質進化研究および進化学における本研究成果の意義を述べている。

以上、本論文はタンパク質進化過程における安定性の役割を明らかにするとともに、その知見を利用した新たな進化学手法の提案をしている。したがって、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価した。

6 最終試験の結果の要旨

令和元年8月16日（金）午後3時より、博士学位論文発表会を、稲盛記念会館101講義室にて、公開で行った。口頭発表のあと、質疑応答が行われた。質問の内容は、熱処理時の設定温度の適格性やランダム変異体作製時の変異導入効率などの実験条件詳細に関すること、タンパク質進化を概念的に示す適応度地形や配列空間探索の意味を問うもの、導入された変異の種類・場所と活性・安定性への影響の相関性を問うもの、本研究から得られた知見の新規性と自然界におけるタンパク質進化との関係性、またその知見をもとに提案した新たなタンパク質進化学手法の新規性を問うもの、等、多岐に及ぶものであった。いずれの質問に対しても、的確に回答した。

最終試験の結果については、審査委員全員一致で合格とした。