

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
松浦 祥悟

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4項該当

4 学位論文題目
Protein thermostabilization strategy by ion-ion interactions at temperatures of over 100 °C
(100°C 以上の温度領域における静電相互作用によるタンパク質の熱安定化戦略)

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、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 CutA1 (*PhCutA1*) タンパク質の高い安定性に果たす荷電性残基の役割を明らかにし、得られた知見を基に、大腸菌由来 CutA1 (*EcCutA1*) の高安定化を再現したものである。

第1章では、タンパク質の安定性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。本研究では、生育温度が高い生物種に由来するタンパク質は熱に強く荷電性残基の割合が高いことに着目し、静電相互作用の強化がタンパク質の熱安定化戦略において重要であると考え、*PhCutA1* と *EcCutA1* をモデルタンパク質として、荷電性残基導入によるタンパク質の熱安定化機構の解明と応用を目指した。

第2章では、*PhCutA1* の荷電性残基と熱安定性の関係性を明らかにするために、荷電性残基を非荷電性残基に置換することで熱安定性がどのように変化するかを調べた。また、分子全体の静電相互作用エネルギーを計算した。その結果、*PhCutA1* の荷電性残基は、分子全体の静電相互作用エネルギーを高くしていることを明らかにした。

第3章では、MD シミュレーションを用いて *PhCutA1* のイオン結合の評価を行った。その結

果、個々の静電相互作用は見かけ上小さいが、多くの荷電性残基による有利な相互作用が働いていることがわかった。

第4章では、*EcCutA1*の安定化の第一歩として、SPMP法（目的タンパク質の各アミノ酸部位に対して20種類全てのアミノ酸残基に置換した場合の安定化エネルギーの変化を予測するプログラム）を用いて熱安定性の改善を試みた。その結果、25℃以上安定化した変異体の作製に成功した。

第5章では、*EcCutA1*に荷電性残基を導入し、安定化を試みた。その結果、6個の荷電性残基を導入した（A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R）変異体が、*EcCutA1*と比較して47℃安定性が上昇した。

第6章では、*EcCutA1*にさらなる荷電性残基の変異導入を試みた。その結果、*EcCutA1*と比較して52℃安定性が上昇した9個の変異を含む変異体（S11V/Q25R/A39D/S48K/E61V/H72K/S82K/Q87K/T88R/T101E/N108E）の作製に成功した。これは*PhCutA1*と同程度の安定性を有するものである。

第7章では、本研究の成果をまとめ、タンパク質安定性研究における本研究成果の意義を述べている。

以上、本論文は高温領域でのタンパク質の安定化戦略を明らかにするとともに、それを実証した。このことは、今まで未知の領域であった100℃を超える高温領域において、タンパク質の安定化を試みる際に重要な知見を与えるものである。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2年2月14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、変異タンパク質の選定基準、他のタンパク質への適用の可否、分子内と分子間の静電相互作用の寄与の違い、安定化と柔軟性の関係、静電相互作用と疎水相互作用の貢献度、塩の効果、高温での応用の可能性、等を問うものなど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。

7 学力の確認の結果

別紙に記載するように、学力確認を行った結果、合格とした。

以上