

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 和田 愛未

リンは植物の生育に必須の元素であるが、土壌中のリンは、フィチン酸という植物が利用できない形態で蓄積する。したがって、リン鉱石の枯渇問題を克服し、リンを有効利用するためには、フィチン酸から効率的にリンを取り出すことが重要である。フィターゼ AppA という酵素は、フィチン酸を加水分解してリンを取り出すことができるが、日本の平均的な土壌温度である 15°C での活性は、至適温度における活性の 1/5 にまで低下する。そこで本研究では、15°C という低温における AppA の活性向上を目的として、進化分子工学実験に基づく経験的設計と、酵素の立体構造情報に基づく合理的設計を並行して実施している。

本論文は英語で書かれており、6つの章からなる。第1章は序章であり、第2章から第4章までの3つの章において、3つのアプローチでの研究が述べられている。第2章ではまず、AppA の遺伝子にエラープローン PCR 法によってランダム変異を導入後、2段階のスクリーニングで低温高活性化変異体を選別する進化分子工学的手法を開発している。この方法で 800 個以上の変異体をスクリーニングした結果、活性が 1.6 倍向上した変異体を得られている。

次に、第3章と第4章は、合理的設計による AppA の高活性化が述べられている。第3章では、活性部位を含むループにおいて、各残基を一つずつアラニンもしくはグリシンに置換していく網羅的な変異解析を行い、変異を導入しても大きな活性減少が見られない残基を見出した後、それらの部位をさまざまなアミノ酸に置換し、低温での活性が向上した変異体を得ている。つづく第4章では、AppA の立体構造に基づいてアミノ酸置換変異を導入し、低温における AppA の活性を向上させた変異体の創出に成功している。

第5章は総合討論であり、3つの手法を比較し、合理的設計の有効性を論じている。最後に第6章では今後の展望を述べており、さらに高活性化した変異体を創出するための方法が論じられている。

以上のように本研究は、リン資源を有効活用する上で重要な酵素であるフィターゼ AppA の低温での活性を向上させることに成功しており、農業におけるリンの有効活用に貢献するものと期待される。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。