

1. 学位論文審査の要旨、最終試験の結果の要旨および審査上の意見

学位請求論文提出者氏名 下澤勇弥 (19D901)

論文題目 酸化還元酵素の構造-機能相関解明とそれに基づく
プロテイン・エンジニアリングの効率化

論文審査委員 主査：尾山廣, 副査：木村朋紀, 副査：西矢芳昭

① 予備審査

2021年12月7日(火曜日)に提出された上記論文の草稿について、12月16日(木曜日)に博士学位授与委員会が開催され、予備審査開始、ならびに上記の主査、副査による審査会の構成が承認され、博士論文予備審査が開始された。予備審査は、主査1名、副査2名による論文草稿の事前審査を行った後、下記の予備審査会において実施された。

<予備審査会>

- (1)日時：2022年1月7日(金曜日) 16:00~17:00 (発表30分, 質疑応答30分)
2022年1月14日(金曜日) 15:00~16:00 (発表30分, 質疑応答30分)
- (2)場所：1号館8階, 生命科学科ゼミ室2
- (3)主な質疑応答内容

- ・本研究の成果が、どのような社会的貢献をもたらすかを踏まえて、より明確な説明を加える。
- ・酵素反応に関する従来の鍵-鍵穴説以外の影響の重要性について、一般的、汎用的な解釈を考察にて加える。
- ・酵素の基質阻害のメカニズムについて、可能な限り説明を加える。
- ・結晶構造解析の議論について専門的になり過ぎる箇所があり、プレゼンテーションに工夫を加えることで公聴会などでの理解を促す。
- ・特異性と親和性など、専門用語の違いを明確にする。
- ・リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (gs-MDH) の構造変化について、これまでの結晶構造からどこまでが理解されており、どのような課題が残されているのか、既知情報と研究成果がより明確になるよう工夫する。

② 博士論文審査

主査、副査による論文草稿審査および予備審査での指導事項を踏まえ、加筆修正が行われたので、予備審査を「可」とし、正式に博士論文が2022年1月21日（金曜日）に提出された。主査、副査による審査会は継続しつつ、下記の公聴会を実施した。

<博士学位請求論文審査公聴会>

(1)日時：2022年2月18日（金曜日）15:00～16:00（発表40分、質疑応答20分）

(2)場所：10号館3階、プチテアトル

(3) 主な質疑応答内容

- ・gs-MDHのモバイルループの柔軟性について、その制御機構は電荷が主体かとの質問に対し、構造解析および変異解析の結果から複数の要素が絡んでいることが説明された。
- ・本研究で見出した高基質特異性に関係する4要素は、酵素全般に関わるものかとの質問があり、gs-MDHだけではなく一般的な要素と考えている旨が理由と共に説明された。
- ・gs-MDHのopen構造における基質認識に対する水分子や塩などの影響について幾つか質問があった。これについて、分子動力学解析では水分子を導入してシミュレーションしているが影響は見られないこと、塩の影響解析は行っていないがpH特性は電荷と対応しており同様の傾向と考えられることが説明された。
- ・gs-MDHの基質阻害機構について、どこまで理解されているかに関する質問があり、これまでに殆ど情報がないことから、本研究で変異体の構造解析から得られた基質阻害機構の考察は貴重な一例であることが説明された。
- ・その他、本研究で開発された変異体の応用手段、本酵素の可逆的反応に関する論理的解釈、C末端欠失変異の特性評価についてなど多数の質問があったが、丁寧かつ十分な説明がなされた。

③ 学会等公表状況

本論文は、下記の原著論文（査読付き）4編、総説（査読付き）1編、および学会等における発表34件から構成されており、社会的に公表され評価を受けた内容からなっている。

さらに、4件の査読付き参考論文も公表している。

■ 原著論文（査読付き）

1) Yoshiaki Nishiya, Yuya Shimosawa

“Properties of *Geobacillus stearothermophilus* malate dehydrogenase used as a diagnostic reagent and its characterization by molecular modeling”

International Journal of Analytical Bio-Science, **4**, 21–27 (2016).

博士論文 第 1 章, 第 2 章

2) Yuya Shimosawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, and Yoshiaki Nishiya
“Structural analysis and reaction mechanism of malate dehydrogenase
from *Geobacillus stearothermophilus*”
Journal of Biochemistry, **170**, 97–105 (2021).

博士論文 第 2 章, 第 3 章, 第 4 章, 第 5 章

3) Yuya Shimosawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, and Yoshiaki Nishiya
“Increasing loop flexibility affords low-temperature adaptation
of a moderate thermophilic malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus*”
Protein Engineering, Design and Selection, **34**, gzab026 (1-6) (2021).

博士論文 第 4 章

4) 下澤勇弥, 氷見山幹基, 中村努, 西矢芳昭
“臨床検査用酵素の立体構造的解釈：
リンゴ酸デヒドロゲナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの基質特異性の違いについて”
生物試料分析, **44**, 151–159 (2021).

博士論文 第 3 章

(参考) Yuya Shimosawa, Tomoki Himiyama, Tsutomu Nakamura, and Yoshiaki Nishiya
“Reducing substrate inhibition of malate dehydrogenase from *Geobacillus stearothermophilus* by C-terminal truncation” *Protein Engineering, Design and Selection, in preperation*

博士論文 第 5 章

■ 総説 (査読付き)

Yuya Shimosawa and Yoshiaki Nishiya

“Malate dehydrogenase of *Geobacillus stearothermophilus*: A practically feasible enzyme for
clinical and food analysis”

International Journal of Analytical Bio-Science, **7**, 59–67 (2019).

博士論文 第 1 章, 第 3 章

・学会等による発表

- 1) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“*Geobacillus stearothermophilus* 由来マレートデヒドロゲナーゼの反応性
考察と機能改変”
第 68 回日本生物工学会, 2016 年 9 月
- 2) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“AST 測定検査薬用 MDH の特性評価および *Geobacillus
stearothermophilus* 由来 MDH の機能改変”
第 27 回生物試料分析科学会年次学術集会, 2017 年 2 月: 優秀演題賞 受賞
- 3) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“*Geobacillus stearothermophilus* 由来 Malate dehydrogenase の特性評価と
機能改変”
第 1 回有機・バイオイオニクス研究会, 2017 年 3 月
- 4) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“マレートデヒドロゲナーゼの部位特異的変異による比活性向上および
構造的解釈”
第 69 回日本生物工学会, 2017 年 9 月
- 5) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼのタンパク質工学による機能改変および
臨床検査薬やバイオセンサーへの応用”
第 28 回生物試料分析科学会年次学術集会, 2018 年 3 月
- 6) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“シミュレーションに基づく臨床検査薬用酵素の開発”
第 2 回有機・バイオイオニクス研究会, 2018 年 3 月
- 7) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの不安定化による比活性の向上”
日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月

- 8) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの Closed 構造不安定化による比活性の向上
および低温適性化”
第 70 回日本生物工学会, 2018 年 9 月
- 9) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化と基質認識メカニズムの関係”
日本農芸化学会 2019 年度大会, 2019 年 3 月
- 10) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“Relationship between structural change and reaction mechanism of
malate dehydrogenase”
第 19 回日本蛋白質科学会年会, 2019 年 6 月
- 11) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質特異性と立体構造解析に基づく
構造変化メカニズムの考察”
第 71 回日本生物工学会, 2019 年 9 月
- 12) 下澤勇弥, 西矢芳昭
“酵素は正しい鍵で変形するナノバイオマシン?”
第 5 回融合科学研究所講演会, 2019 年 10 月: 招待講演
- 13) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による基質認識メカニズム”
第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月
- 14) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 泉智仁, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“乳酸脱水素酵素の実用的課題に対する考察 ～構造・機能的側面から～”
第 30 回生物試料分析科学会年次学術集会, 2020 年 2 月
- 15) 泉智仁, 下澤勇弥, 西矢芳昭
“乳酸脱水素酵素の実用的課題に対する考察 ～進化的側面から～”

第 30 回生物試料分析科学会年次学術集会, 2020 年 2 月

- 16) 加藤優里, 池田和也, 吉田早希, 下澤勇弥, 川端隆, 松尾康光, 西矢芳昭
“膜結合型乳酸脱水素酵素の開発および乳酸センサーへの応用”
第 30 回生物試料分析科学会年次学術集会, 2020 年 2 月
- 17) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの結晶構造に基づく動的反応メカニズムの考察”
日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月
- 18) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 CE-4 酵素の X 線結晶構造解析”
日本農芸化学会 2020 年度大会, 2020 年 3 月
- 19) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“The Structural Change Mechanism In The Catalytic Cycle Of Malate Dehydrogenase”
第 20 回日本蛋白質科学会年会, 2020 年 7 月
- 20) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“X-ray crystallographic analysis of acetylxlanyl esterase from *Caldanaerobacter subterraneus*”
第 20 回日本蛋白質科学会年会, 2020 年 6 月
- 21) 佐々本康平, 下澤勇弥, 西矢芳昭
“「相利」関係を目指した高大連携教育”
第 68 回年次大会・工学教育研究講演会, 2020 年 9 月
- 22) 西矢芳昭, 下澤勇弥
“安定性の高い膜結合型乳酸脱水素酵素の簡便な調製法”
第 60 回日本臨床化学会年次学術集会, 2020 年 10 月

- 23) 下澤勇弥, 中村努, 佐々本康平, 氷見山幹基, 西矢芳昭
“活性部位の進化により分岐したリンゴ酸脱水素酵素の基質認識”
第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月
- 24) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“天然変性タンパク質としてのアセチルキシランエステラーゼの構造・機能解析”
第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月
- 25) 西矢芳昭, 下澤勇弥, 佐々本康平
“食品微生物培養実験の教材開発”
日本生物教育学会第 105 回全国大会, 2021 年 1 月
- 26) 下澤勇弥, 中村努, 氷見山幹基, 佐々本康平, 西矢芳昭
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による触媒残基の switching と基質特異性への寄与”
日本農芸化学会 2021 年度大会, 2021 年 3 月
- 27) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 TTE0866 アセチルキシランエステラーゼの構造・機能解析”
日本農芸化学会 2021 年度大会, 2021 年 3 月
- 28) 下澤勇弥, 佐々本康平, 西矢芳昭, 氷見山幹基, 中村努
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質選択における構造変化の役割”
第 19 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2021 年 5 月
- 29) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“糖脱アセチル化酵素 TTE0866 の構造・機能解析”
第 19 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会, 2021 年 5 月

- 30) 下澤勇弥, 西矢芳昭, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努
“触媒ループの Switching によるリンゴ酸デヒドロゲナーゼの基質認識への寄与”
第 21 回日本蛋白質科学会, 2021 年 6 月
- 31) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“*Caldanaerobacter* 由来アセチルキシランエステラーゼの構造決定と反応性評価”
第 21 回日本蛋白質科学会, 2021 年 6 月
- 32) 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“酢酸セルロース分解酵素の構造・機能解析”
SAT バイオテクノロジー・ショーケース 2022, 2022 年 1 月
- 33) 下澤勇弥, 佐々本康平, 氷見山幹基, 中村努, 西矢芳昭
“リンゴ酸デヒドロゲナーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼの基質選択機構の違い”
第 31・32 回生物試料分析科学会合同年次学術集会, 2022 年 3 月
- 34) 武田悠杜, 佐々本康平, 下澤勇弥, 氷見山幹基, 森芳邦彦, 大本貴士, 上垣浩一, 西矢芳昭, 中村努
“好熱菌由来アセチルキシランエステラーゼの触媒反応と基質認識に関する機能解析”
日本農芸化学会 2022 年度大会, 2022 年 3 月

・参考論文 (査読付き)

- 1) 佐々本康平, 下澤勇弥, 北田広明, 花本圭史, 清水太一, 松尾康光, 西矢芳昭
“酵素特性を理解するための実験法の開発と高校生物教育への実践”
摂南大学融合科学研究所論文集, 第 5 卷 (第 1 号), 87-101 (2019).
- 2) Misaki Hiruta, Saki Yoshida, Yuya Shimosawa, Yoshiaki Nishiya
“Altered substrate specificities of mandelate oxidases

generated by site-directed mutagenesis of L-lactate oxidase”
International Journal of Analytical Bio-Science, **7**, 35-39 (2019).

- 3) Yuya Shimosawa, Hiroshi Aiba, Yoshiaki Nishiya
“Structural prediction and analysis of the highly reactive alkaline phosphatase from *Shewanella* sp. T3-3”
International Journal of Analytical Bio-Science, **8**, 39-43 (2020).
- 4) Yuya Shimosawa, Saki Yoshida, Kazuya Ikeda, Yuri Kato, Fuka Toyama, Yoshiaki Nishiya
“Easy preparation of a stable membrane-bound lactate dehydrogenase for application in lactate biosensor”
International Journal of Analytical Bio-Science, **8**, 1-6 (2020).

④ 最終試験

下記の専門関連英語論文の要約を、レポート課題として提出させた。

(1) 課題論文

著者： Thitipan Meemongkolkiat, Jane Allison, Frank Seebacher, Julianne Lim, Chanpen Chanchao and Benjamin P. Oldroyd

タイトル： Thermal adaptation in the honeybee (*Apis mellifera*) via changes to the structure of malate dehydrogenase

出典： *Journal of Experimental Biology*, **223**, jeb228239 (2020).
doi:10.1242/jeb.228239

総ページ数： 11 ページ

(2) 結果

上記課題論文の要約が 16 ページにまとめられており、英語の能力および学術論文の読解力は十分に高いと認められたので、最終試験を合格とした。

3. 論文審査の結果の要旨

- ・ 学位論文申請者：摂南大学大学院理工学研究科生命科学専攻・下澤勇弥（19D901）
- ・ 論文題目：酸化還元酵素の構造-機能相関解明とそれに基づく
プロテイン・エンジニアリングの効率化
- ・ 論文審査委員：摂南大学大学院理工学研究科教授・尾山廣（主査）
同准教授・木村朋紀（副査），同教授・西矢芳昭（副査）

本論文では、生体内で極めて重要な役割を果たす酸化還元酵素であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）の結晶構造解析と構造分析により、構造変化機構と基質認識機構が解明されている。さらに、好熱性細菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来 MDH（gs-MDH）の反応サイクルに基づいた合理的な機能改変により、臨床検査用および食品分析用酵素としての有用性向上が報告されている。

本論文は6つの章で構成されており、第1章は序論、第2章はgs-MDHの結晶構造解析による反応サイクルの解明、そして第3章はMDHと近縁の酸化還元酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）との比較により、基質選択における構造変化の役割が示されている。第4章と第5章はプロテイン・エンジニアリング（PE）によるgs-MDHの機能改良として、構造変化の制御による低温適正化およびC末端残基欠失による酵素特性改変が示され、第6章は総括である。

第1章では、酵素がさまざまな分野で産業利用されている状況を紹介し、PEを用いた機能改変の必要性が説明されている。産業利用酵素は、優れた代謝回転数、安定性、基質親和性および基質特異性などの特性が求められる。特に、目的物質のみに反応する優れた基質特異性は、多くの産業利用酵素において最も求められる特性である。基質特異性に関する研究は、主に酵素と基質のコンプレックス構造における相互作用や活性中心の空間などの静的解析が議論の中心になっている。しかしながら、ほとんどの酵素は特異的に基質を認識する機構を説明する構造的要因が明らかにされていない。

本研究では、基質特異性を制御する構造的要因の理解に向けて、代表的な臨床検査用・食品分析用酵素であるMDHに着目した。本酵素は極めて高い基質特異性を有するのに対し、構造が類似するLDHは低基質特異性である。背景として、MDHおよびLDHに関するさまざまな研究が紹介されている。いずれの研究においても、MDHとLDHのアミノ酸残基の保存性や活性部位周辺の相互作用の違いを明らかにしているものの、基質特異性の差異に関する構造的な原因究明には至っていない。すなわち、酵素基質複合体構造に基づ

く機能解明の限界を示す顕著な事例であり、MDH と LDH の反応機構は共通しているとの従来の酵素学的見解からは説明が困難である。

第 2 章では、gs-MDH の X 線結晶構造解析による可動ループの構造変化機構および反応サイクルの解明が報告されている。まず、gs-MDH の基質が結合していない構造 (apo 構造) から基質が結合し反応可能な構造 (closed 構造) に至るまでの詳細な結晶構造の取得を目指して、様々な条件での結晶化が行われている。結果として、MDH の各反応に対応した 4 種の結晶構造の決定に成功し、MDH の詳細な構造変化機構が解明されている。このことにより、以下に示す MDH の高基質特異性に寄与するコンフォメーション変化が初めて理解された。Step 1: MDH の apo 構造への補酵素の結合が起こるが、活性部位に対する影響が殆ど無く全体構造は大きく変化しない。Step 2: MDH の活性部位に基質オキサロ酢酸 (OAA) が相互作用し、その α -カルボキシ基が基質結合ポケットのアルギニン残基との結合により固定される。Step 3: OAA の β -カルボキシ基は可動ループのアルギニン残基と相互作用し、OAA を介した 2 つのアルギニンの架橋が可動ループのコンフォメーション変化のドライビング・フォースとなる。Step 4: 触媒反応を実現する可動ループの構造変化に伴った触媒残基の switching (反応可能な状態へのスイッチオン) が行われる。

以上の反応サイクルにおいて、apo 構造における正電荷ポケットおよび可動ループの構造変化に伴った触媒残基の switching は、カルボキシ基に依存した負電荷の強度による基質選択に重要な役割を果たし、MDH の高基質特異性への寄与を示唆している。また、本研究が明らかにした基質認識機構は、多くの酵素に共通の機構として基質特異性の分子レベルでの理解に寄与すると考えられる。

第 3 章では、構造変化の観点から MDH と LDH の構造比較を行い、基質特異性の違いの構造的な要因が調べられている。具体的には、アミノ酸配列、結晶構造、変異体特性および分子動力学シミュレーションの結果を比較し、両酵素の基質認識機構の違いが示されている。結果として、MDH の構造変化に関連した 4 つの基質認識の要素: (1)活性部位における正電荷ポケット、(2)触媒残基の switching、(3)構造変化における可動ループの柔軟性、(4)Closed 構造における活性部位空間、の協同効果が高基質特異性を実現することを明らかにしている。

本研究の成果により、PE の先行研究に対する合理的な解釈も行われている。MDH の基質認識 4 要素の協同効果は複雑な機構により制御されているため、変異により反応が低下しやすい。しかし、LDH のシンプルな反応機構は基質特異性を相対的に低下させるが、変異による改変が容易となる。高基質特異性の構造的な理解は、変異による酵素機能への影響を明確にし、極めて特異的な酵素の開発に向けた機能改変デザインの基盤として期待できる。

第 4 章では、MDH の詳細な反応サイクルに基づく合理的な変異デザインにより、gs-

MDH の低温適正化が試みられている。結果として、実用性が高い変異体の開発に成功している。具体的には、gs-MDH の closed 構造における可動ループの柔軟性を向上させることで、高温での安定性と低温での比活性を兼ね備えた変異体を *in silico* でデザインしている。そして本変異体を実際に作製し、狙い通りの好ましい特性を持つ酵素であることを確認している。また、本変異体の結晶構造解析を行い、その closed 構造が野生型と比較して可動ループのねじれたコンフォメーションを有していること、それにより OAA との相互作用も野生型と異なっていることを解明している。本変異体の特徴的なコンフォメーションは、closed 構造の可動ループの柔軟性を向上させ、closed から open 構造への構造変化の促進による活性向上に寄与すると考えられる。

臨床検査や食品分析の実使用温度での高反応性および保存安定性の両立に成功した本変異体により、gs-MDH の有用性を高めることができた。さらに、構造変化を利用して基質結合から触媒反応までの特定のステップや構造に局所的な変異を導入するという本デザイン手法は、PE による機能改変の幅を広げる新たな観点となる。

第 5 章では、gs-MDH の第二層領域（活性部位への間接的作用領域）である C 末端における機能解析が行われ、欠失変異による影響が検討されている。*in silico* 解析において、C 末端の欠失が活性中心との相互作用数の増加と可動ループのコンフォメーションのシフトをもたらすと予測し、実際に欠失変異体を作製、速度論解析を行ったところ、高基質親和性と基質阻害の低下による高 OAA 濃度での比活性向上を示した。本欠失変異体は、基質過剰条件においても高活性を発揮するため、免疫検査用酵素など新たな用途が期待される。

また、本欠失変異体の結晶構造も解明しており、野生型とは C 末端領域の配向の揺らぎや可動ループのコンフォメーションに違いを有することを発見している。さらに、コンピューター・シミュレーションにて欠失変異体が基質阻害を顕著に低下させることも明らかにしている。これらにより、可動ループのコンフォメーション制御への C 末端領域の関与、過剰な基質結合の制限による基質阻害の低下への可動ループの寄与を推察している。本研究結果は、MDH のコンフォメーション制御における C 末端領域の役割に関する新たな知見であり、基質阻害の構造的理解への寄与が期待できる。

第 6 章は本研究の総括が示されており、本研究で得られた成果がまとめられている。

本研究は、酵素の基質認識機構の理解に対し、酵素基質複合体における活性部位と基質の相互作用に重きを置く従来の考え方を払拭し、apo 構造から酵素基質複合体構造までの一連の分析の重要性を実証した初めての知見である。また、apo 構造と酵素基質複合体構造の役割の違いに着目し、特定のステップ・構造のみを改変させた変異デザインは、PE による機能改変の幅を広げる新たな手法として期待できる。したがって、本論文は学術的重要性および産業利用への貢献が高いと考えられ、博士（理学）の学位論文として十分に価値あるものと判断できる。