

論文審査の結果の要旨

氏名 應 蓓文

本論文は3章からなり、第1章は遺伝情報から蛋白質の機能解析が可能な蛋白質の探索・創製システムの開発、即ち、生体外選択系の確立；第2章は蛋白質の誕生から成熟までのプロセスの再構築、及び蛋白質成熟に関与する因子群の生化学的な探索；第3章はシャペロニン GroEL/ES による基質蛋白質のフォールディングプロセスの詳細について述べられている。

第1章は2部からなり、第1部はセルフバイディング特徴を利用したスクリーニングシステムの確立、第2部は一般的な選択法としてのリボソームディスプレイ法の検討について述べられている。大腸菌リボソーム蛋白質 S15 を用いて、自らの mRNA に結合能を持つ蛋白質を選択するモデル系を構築している。その結果、自らの mRNA に結合する蛋白質の遺伝子のみが濃縮され、自らの核酸をターゲットとする蛋白質のスクリーニングシステムのモデル系を確立した。このことにより、特異的な mRNA-蛋白質相互作用を選択するシステムの構築が可能であることが示されている。また、リボソーム上に合成されたペプチドを提示させたまま、そのペプチドの機能によって、mRNA を単離するスクリーニング法- リボソームディスプレイ法を検討し、単鎖抗体の選択法の基盤開発を行った。本章は、新規蛋白質を創製するための基盤技術の開発が記述されており、機能既知の蛋白質の合成以外にも、未知のランダムなライブラリーから期待された機能を持つ蛋白質を創製することが今後の蛋白質研究に新たな展開をもたらすものと期待できる。また、ランダムなライブラリーより、生体外免疫システムの創製が可能となると期待できる。

第2章は2部からなり、第1部は蛋白質の翻訳とフォールディングを共役した複合型合成系の構築、第2部は大腸菌において主要なシャペロンシステムによる蛋白質フォールディングメカニズムの検証について記載されている。無細胞の蛋白質成熟システムとして翻訳とフォールディングが共役したシステムを再構築し、シャペロンによる抗体蛋白質 (scFv) のフォールディングの促進の有無を検討し、新生ポリペプチドのフォールディングにおけるシャペロンの役割を解析している。その結果、DnaK システム (DnaK-J/GrpE) とトリガーファクター (TF) はそれぞれ新生蛋白質の正確な折り畳みに著しく効果的であること、さらに、これまで報告されていなかった TF の機能- 蛋白質生合成と共役しなくても新生ポリペプチドの凝集抑制活性を持つことが示唆されている。その他、ジスルフィド形成に関与するシャペロン- プロテングスルフィドイソメラーゼ (PDI) や、真核細胞のシャペロン (HSP110) などの評価をしている。本章の内容から、いままでの粗抽出液に基づく翻訳系の研究とはちがった、蛋白質の誕生と成熟の分子メカニズムのより細かな解析が行えるようになっている。

第3章は大腸菌のシャペロニンシステム GroEL/ES による基質蛋白質のフォールディングメカニズムに関する研究が詳しく記述されている。生体内の蛋白質の約 30%のフォール

ディングには、様々なシャペロンが必要とされている。しかし、シャペロンがどの段階でそれらの役割を果たすのか実験的に明確にされた例はほとんどない。大腸菌由来の蛋白質の遺伝子十数種類をゲノムからクローニングし、シャペロンに依存する基質蛋白質を検索し、GroEL/ES に特異的に依存してフォールディングする基質蛋白質 (stringent substrate) を見出している。それらの中から、酵素活性も測定可能な基質蛋白質- S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (MetK) を対象として、GroEL/ES によるフォールディングプロセスの解析がなされている。これまでの定説では、GroEL は翻訳後に新生蛋白質と相互作用すると言われているが、GroEL は翻訳複合体 (新生ポリペプチド- リボソーム- mRNA) と特異的に相互作用していた結果から、GroEL は、post-translational プロセスでフォールディングを助けるという従来の定説とは異なり、co-translational にフォールディングを促進するという新たな仮説が提案されている。本章における解析から、ピュアアプローチという再構築的手法によって、蛋白質翻訳と共役したフォールディングプロセス及び様々なシャペロンの機能を詳細かつ厳密に解析することが可能であることが示されている。

以上、本論文は、分子から再構築した試験管内遺伝子発現- PURE システムを基盤とした *in vitro* での実験に基づいた研究が進められている。蛋白質の生合成、成熟、及びスクリーニングなどの分野において、生化学的な基礎研究と応用開発を行い、独創的な研究内容と興味深い解析結果を得ており、それらが適切かつ明快にまとめられている。

なお、本論文第1章前半 (第1部) は、鈴木 勉、清水 義宏、上田 卓也との、第2章後半 (第2部) は、田口 英樹、上田 宏、上田 卓也との、第3章は、田口 英樹、近藤 万由美、上田 卓也との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。