

## 論文審査の結果の要旨

氏名 榎 佐和子

本論文は5章からなる。第1章は全体的な序論である。蛋白質のフォールディング及び緑色蛍光蛋白質 GFP について概説されたのち、本研究の目的について述べられている。第2章では実験の試料と方法の詳細がまとめられている。第3章では、GFPの酸変性状態からのフォールディングの速度論的研究について述べられている。序論で研究の背景について述べられたのち、実験の結果が示され、それに対する考察が行われている。第4章では、GFPの酸変性の平衡論的研究及び、平衡論的中間状態と速度論的中間体の関係を明らかにする研究についてまとめられている。序論で研究の背景について述べられたのち、実験の結果が示され、球状蛋白質のフォールディング機構について考察が行われている。第5章では本論文の研究の結論について述べられている。

本論文において研究の対象となった緑色蛍光蛋白質 GFP は、発光オワンクラゲ由来の、238 残基からなる球状蛋白質である。GFP は、11 個の  $\alpha$ -ストランド に囲まれた緑色蛍光を発するクロモフォアをもち、バレル型の構造を取っている。本論文では、GFP のフォールディング機構を調べることにより、モルテングロビュール状態を経由する階層的フォールディングモデルが球状蛋白質のフォールディングの一般的機構であることを明らかにしようとしている。GFP は、天然状態で独自の緑色蛍光を発することから、細胞内における分子シャペロンとの相互作用を通じたフォールディング機構の研究においてモデル蛋白質として適している。また、蛋白質の発現、局在を調べるためのマーカーとして、細胞生物学の分野で広く使われている。したがって、そのフォールディング機構の研究は、分子シャペロンの研究や細胞生物学の実験技術の開発にとっても重要であるといえる。

論文提出者は、GFP の変異型である Cycle3 (F99S/M153T/V163A) の酸変性状態からのフォールディングを詳細に調べた。Cycle3 は、野生型より巻き戻りの可逆性が高く、結晶構造は野生型とほとんど変わらないことが報告されている。フォールディングは、クロモフォアの蛍光、トリプトファン蛍光、遠紫外円二色性 (Far-UV CD) をプローブとして、ストップフロー装置 (迅速混合装置) を用いて測定された。その結果、GFP のフォールディングは、装置の不感時間 (5 ミリ秒) 以内の非特異的凝縮と、それに続くモルテングロビュール状態の性質をもつ2つの中間体 (第1中間体及び第2中間体) の形成を含む、6つの速度過程

で表されることが示された。第2の中間体は、GFPのクロモフォアをプローブとして測定した時に遅延相として観測されることから、経路上の中間体であることがわかった。また、NDN(天然 変性 天然)ダブルジャンプ測定とプロリン異性化酵素 Cyclophilin A 存在下におけるフォールディング実験により、最も遅い2つの速度過程は中間体のプロリル結合のシストランス異性化によるものであることが示された。

論文提出者は引き続き、GFPのフォールディングの中間体の性質を明らかにするために、クロモフォアの蛍光、トリプトファンの蛍光、X線小角散乱によりGFPの酸変性状態を詳細に調べた。異なるプローブで測定した時の酸変性転移曲線が一致しないことから、pH4において、少なくとも1つ平衡論的に中間状態が存在していることを見出した。詳細な解析の結果、pH4における中間状態はモルテングロビュール状態の性質をもつことが示された。

論文提出者はさらに、平衡論的な中間状態と速度論的中间体の関係を調べるために、pH2.0(酸変性状態)からpH7.5(天然状態)、pH4.0(中間状態)からpH7.5(天然状態)、pH2.0(酸変性状態)からpH4.0(中間状態)のpHジャンプによるフォールディングの実験を行った。GFPのクロモフォアとトリプトファンの蛍光をプローブとして調べた結果、速度論的フォールディング中間体がpH4で観測された平衡論的な中間状態と同一であることが示された。これらの結果から、GFPがモルテングロビュール状態の性質をもつ中間体を経て階層的にフォールディングすることが明らかにされた。

このような階層的フォールディング機構は、他の球状蛋白質においても観測されている。たとえば、主に $\alpha$ -ヘリックスからなる Apomyoglobin は、主に $\beta$ -シートからなる GFP とは主鎖トポロジーが大きく異なるにもかかわらず、GFP とよく似たフォールディング機構を示している。したがって、階層的なフォールディングは、球状蛋白質のフォールディングの一般的な機構であることが示唆されたといえる。

以上のように、論文提出者は、 $\beta$ -シートからなる複雑なトポロジーをもつ緑色蛍光蛋白質 GFP がモルテングロビュール状態を経由して階層的にフォールディングすることをはじめて明らかにした。そして、階層的フォールディングモデルが主鎖トポロジーの大きく異なる球状蛋白質でも一般的に見出されることを示し、蛋白質のフォールディングの研究に重要な足跡を残したといえる。

なお、本論文は佐伯喜美子、榎互介、桑島邦博との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験、解析及び考察を行ったもので、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(理学)の学位を授与できると認める。