

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

1 分子蛍光イメージング法を用いた
GroEL によるタンパク質折れたたみ機構の解析

Single molecule imaging of protein folding
mediated by chaperonin GroEL.

申請者

氏

上野

太郎

Taro

Ueno

専攻・研究指導

生命理工学専攻・生体情報力学研究

2004 年 4 月

生体内でタンパク質が機能を発揮するためには、DNA の塩基配列情報にしたがって翻訳された一本鎖状のポリペプチドが正しい立体構造を形成する必要がある。タンパク質の立体構造は、それを構成する各アミノ酸がさまざまな配置を取りながら最も安定になるように自発的に折れたたむことで形成されるが、この際にさまざまな補助因子がかかわっていることが解っている。タンパク質の折りたたみを介助するこれらのタンパク質群は分子シャペロンと呼ばれ、その多くは生物の生存に必須である。その中でも、大腸菌のシャペロニン GroEL が最もよく研究されている。GroEL は基質タンパク質を結合する 2 つのリングが合わさった構造をしており、さらに GroES をふたとして結合することで基質タンパク質を内部空洞に落とし込み、他のタンパク質と凝集する心配のない安全な折れたたみ空間を提供する。本論文は、筆者が開発したタンパク質分子間相互作用を 1 分子蛍光イメージングする技術をまとめたものである。さらに、この手法を応用して GroEL の反応サイクルの分子機構が詳細に解析されている。本論文は、シャペロニンの反応サイクルが 3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程から構成されていることを明らかにし、反応中間体が、変性タンパク質を確実に GroEL の空洞に落とし込むのに重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第 1 章では、1 分子蛍光イメージング法とその応用例が紹介されている。また、分子シャペロンによるタンパク質折れたたみの介助機構について述べられているとともに、本論文の概要がまとめられている。

第 2 章では、筆者らが開発した、1 分子蛍光イメージング法による生体分子間相互作用の解析法が述べられている。2 種類の生体分子に、それぞれ異なる蛍光波長をもつ蛍光色素分子を結合させ、それぞれの蛍光分子をイメージングすることにより、生体間分子相互作用を 1 分子蛍光顕微鏡観察することに、筆者は世界で初めて成功した。この技術を用いて、シャペロニン GroEL と GroES の結合解離過程を 1 分子イメージングした。まず、GroEL と GroES を異なる蛍光波長を持つ蛍光色素 IC5、Cy3 で標識し、GroEL をガラス基板上に固定した。溶液中に GroES、ATP を入れて全反射型エバネッセント照明法により観察したところ、GroES が GroEL に結合・解離する様子を 1 分子レベルで観察することに成功した。また、GroES が結合してから解離するまでの時間分布を解析することにより、GroEL の反応サイクルが 3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程から構成されていることを明らかにした。

第 3 章では、GroEL-GroES 複合体の内部で起こる基質タンパク質の折れたたみのイメージング法について述べられている。基質タンパク質として、変性状態では蛍光を発さず、折れたたむと蛍光を発する緑色蛍光タンパク質 (GFP) を利用した。予め酸変性させた GFP を GroEL に結合させ、その複合体をスライドガラス上に固定した。溶液中に GroES と Caged ATP を加え、紫外線照射により ATP を生成させて GroEL の反応サイクルを開始させた。その結果、スライドガラス上に固定した GroEL の位置に折りたたまれ

た GFP の輝点が次々と現れた。このようにして、筆者はタンパク質の折りたたみの瞬間を 1 分子レベルでイメージングすることに、世界で初めて成功した。紫外線照射から GFP の蛍光が現れるまでの時間分布を作成したところ、GroES の結合後 3 秒間は GFP の折れたたみが始まらないことが分かった。すなわち、始めの 3 秒間は GFP が GroEL-GroES 空洞内のどこかに結合しており、折れたたみが阻害されていると考えられた。この折れたたみの阻害時間は、GroEL と GroES の結合時間の解析から明らかになった第 1 律速過程 (3 秒間) の寿命と一致していた。

第 4 章では、GroES の結合解離実験で明らかになった第一律速過程と GFP の折れたたみ阻害との関連が詳細に検討されている。GroEL・GroES の結合時間の解析で明らかになった第一律速過程の寿命と GFP の折れたたみ阻害時間の温度依存性を調べた結果、18、23、28 と温度が上昇するにつれて両者は共に短くなり、全ての温度で時定数が一致していた。以上の結果から、GroEL の反応サイクルのうち、第一律速過程では GFP の折れたたみが阻害され、第二律速過程で折れたたみが進行することが示された。

第 5 章では、GroEL の反応サイクルにおける、基質タンパク質と GroEL の縁部分との距離が蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) を用いて調べられている。第 3 章において、第一律速過程で GFP の折れたたみ阻害が起こっていることが示された。しかし、GFP は GroEL が無くても自発的に折りたたむため、GroEL と GroES、ATP が存在しないと折りたたまない基質タンパク質でも同様な現象が起っているのかが問題となる。しかし、タンパク質の酵素活性を秒単位でリアルタイムに測定することは、現時点では技術的に不可能である。そこで、酵素活性を測定する代わりに、GroEL-GroES 複合体内部での基質タンパク質の位置の変化を測定した。具体的には、FRET を利用して GroEL の縁部分 (315 番目のアミノ酸残基) と基質タンパク質の距離の変化を観察した。GFP の他に、GroEL と GroES、ATP が存在しないと折りたたまない基質タンパク質としてリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) を用いた。まず、acceptor を GroEL 変異体 (E315C) に、donor を変性タンパク質に結合させた。変性した donor-基質タンパク質を acceptor-GroEL に結合させたところ、GFP、MDH のいずれの場合も、FRET により donor の蛍光強度が減少した (~60% の FRET 効率)。次に、GroES と ATP を加えると、0.5 秒で FRET 効率が ~45% に下がり、3 秒で再び ~65% まで上昇した後、続く 3 秒で FRET がほぼ解消された。すなわち、GroEL-基質タンパク質複合体に GroES が結合すると、基質タンパク質が 0.5 秒で内部空洞の下方に落とし込まれ、3 秒後に空洞内で浮き上がった後、さらに 3~4 秒で GroES が解離して基質タンパク質が外部に放出されることが明らかになった。この結果から、第一律速過程での折りたたみ抑制が基質タンパク質に普遍的に起こっていることが示唆された。

第 6 章では、GroEL の反応サイクルにおける ATP の化学状態の移り変わりと、2 つの律速過程の関連について調べられている。GroEL の反応サイクルのうち、いつ ATP 加水

分解が起こり、Pi や ADP が GroEL から放出されるのかを明らかにするため、基質タンパク質存在下における ATP 加水分解、Pi 放出、ADP 放出の初速度解析が行われている。ATP の加水分解速度を調べるため、反応開始後の任意の時間後に GroEL を変性させて反応サイクルを止め、Pi の生成量をマラカイトグリーン法で測定した。一方、Pi の放出速度は、溶液中に放出された Pi と結合して自身の蛍光強度を上昇させるタンパク質 (Pi Binding Protein) を共存させておき、その蛍光強度変化から求めた。さらに、GroEL からの ADP 放出速度を、NADH の酸化と共役した ATP 再生系を用いて測定した。すなわち、NADH の酸化にともなう 340nm の吸収の減少を測定することにより ADP の放出速度を実時間測定した。これら 3 つの実験の結果、ATP 加水分解と Pi の放出は GroES が結合して 3 秒後に起こり、さらにその 5 秒後に ADP が放出されることが分かった。

第 7 章では、シャペロニン反応サイクルに関する考察が述べられ、筆者が提唱する「2 つのタイマーモデル」が説明されている。ATP 加水分解が非常に遅い GroEL 変異体 (D398A) 内でも野生型 GroEL 内と同様に GFP の折れたたみが起こることから、基質タンパク質の落とし込みは ATP 加水分解より前に起こると考えられる。また、GroES が結合して 3 秒後に ATP 加水分解と Pi の放出が起こることから、GroEL は GroES が結合すると時定数 3 秒間で構造変化しながら自身の空洞内へ変性タンパク質を落とし込み、その後、極めて速く ATP 加水分解と Pi 放出が起こると考えられる。以上のことから、筆者は、次のモデルを提案した。GroES が GroEL に結合した後 3 秒間は GFP の折れたたみが阻害されている (第 1 律速過程)。3 秒後に GFP が GroEL 内部に放出され、瞬時に ATP 加水分解と Pi 放出が起こって GroEL-GroES-ADP 複合体となる。この複合体は 5 秒間の寿命をもち (第 2 律速過程)、この間に GFP の折れたたみが進行する。最後に GroEL を構成する 2 つのリングのうち GroES が結合していない方 (トランス側) に基質タンパク質と ATP が結合し、元々結合していた GroES、ADP、GFP が GroEL から放出される。以上は、従来の GroEL の反応サイクルモデルを大きく修正するものである。また、GroEL に GroES と基質タンパク質が 3 秒間同時に結合する中間状態が存在することは、GroES が結合した際に基質タンパク質が GroEL の外に追い出されず、高い効率で内部空洞に取り込まれる理由をうまく説明している。

第 8 章では、本論文のまとめと今後の展望が述べられている。

研究業績

論文	<ol style="list-style-type: none">1) T. Ueno*, H. Taguchi*, H. Tadakuma, M. Yoshida & T. Funatsu: “GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism” <i>Molecular Cell</i>, in press 2004. (*These authors contributed equally to this work)2) H. Taguchi*, T. Ueno*, H. Tadakuma*, M. Yoshida & T. Funatsu: “Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system” <i>Nature Biotechnology</i>, 19, 861-865, 2001. (*These authors contributed equally to this work)
総説	<ol style="list-style-type: none">1) 上野太郎、多田隈尚史、船津高志、“1分子イメージングによるシャペロン研究”、蛋白質・核酸・酵素、vol.49、No.3、2004.2) 上野太郎、田口英樹、“GFP 1分子の折れたたみ観察から GroEL の機能を探る”、実験医学、vol.22、No.1、1月、2004.3) 上野太郎、多田隈尚史、船津高志、“シャペロニン機能の1分子蛍光イメージング”、日本電気学会誌、vol123、no4、4月、2003.4) 田口英樹、上野太郎、吉田賢右、船津高志、“シャペロニンと GFP フォールディング”、日本生物工学会誌、vol178、no9、9月、2000.

講演

< 国際学会 >

- 1) T. Ueno, H. Taguch, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu: “Nucleotide state in ATP hysrolysis cycle of GroEL”, 47th Biophysical Society Annual Meeting, Biophysical Journal 828-Pos, San Antonio, U.S.A., February 2003 .
- 2) T. Zako, R. Iizuka, M. Okochi, T. Ueno, M. Yohda, T. Funatsu: “Fluorescence detection and kinetic analysis of interaction between *Pyrococcus* prefolding and substrate protein”, 47th Biophysical Society Annual Meeting, Biophysical Journal 131-Pos, San Antonio, U.S.A., February 2003 .
- 3) M. Yoshida, H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, T. Funatsu: “Two timer mechanism of GroEL”, Cold Spring Harbor Laboratory meeting, New York, U.S.A., May 2001 .
- 4) H. Taguch, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu: “Single molecule imaging of the chaperonin GroEL-GroES function”, 44th Biophysical Society Annual Meeting, Biophysical Journal 78:36A, New Orleans, U.S.A., February 2000 .
- 5) H. Taguch, H. Tadakuma, T. Ueno, M. Yoshida, T. Funatsu: “Single Molecule Imaging of GroEL-GroES Interactions”, The 7th JST International Symposium, Molecular Processes and Biosystems 107, Tokyo International Forum, February 2000 .

< 国内学会 >

- 1) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“ FRET による GroEL 内部での基質タンパク質の運動解析 ”、第 41 回日本生物物理学会年会、生物物理 43: B123、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、9 月、2003 .
- 2) 細野和彦、上野太郎、座古保、田口英樹、吉田賢右、船津高志、“ GroEL 変異体 AEX のキャラクタライゼーション ”、第 41 回日本生物物理学会年会、生物物理 43: B155、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、9 月、2003 .
- 3) 座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志、“ 蛍光顕微鏡を用いた、高熱菌由来プレフォルディングと基質タンパク質の相互作用解析 ”、第 41 回日本生物物理学会年会、生物物理 43: B155、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター、9 月、2003 .
- 4) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“ GroEL の ATP 加水分解サイクルにおけるヌクレオチド状態 ”、第 40 回日本生物物理学会年会、生物物理 42: 1L1545、名古屋大学、11 月、2002 .
- 5) 細野和彦、上野太郎、田口英樹、吉田賢右、船津高志、“ チロシンの蛍光強度変化を指標とした GroEL の構造変化検出 ”、第 40 回日本生物物理学会年会、生物物理 42: 1L1615、名古屋大学、11 月、2002 .
- 6) 座古保、飯塚怜、大河内美奈、上野太郎、養王田正文、船津高志、“ 古細菌由来プレフォルディングと、基質タンパク質、シャペロニンとの相互作用について ”、第 40 回日本生物物理学会年会、生物物理 42: 1L1515、名古屋大学、11 月、2002 .
- 7) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“ 1 分子蛍光イメージング法を用いた GroEL・GroES 結合時間と GFP folding の温度依存性の解析 ”、第 39 回日本生物物理学会年会、生物物理 41: 3P036、大阪大学吹田地区、10 月、2001 .

- 8) 小池理恵子、上野太郎、田口英樹、吉田賢右、船津高志、“基質タンパク質と GroEL の結合解離時間の測定”、第 39 回日本生物物理学会年会、生物物理 41: 3P037、大阪大学吹田地区、10 月、2001 .
- 9) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“1 分子蛍光イメージング法を用いたシャペロニン反応サイクルの解析”、第 38 回日本生物物理学会年会、生物物理 40: 3E0930、東北大学川内北キャンパス、9 月、2000 .
- 10) 船津高志、田口英樹、多田隈尚史、上野太郎、吉田賢右、“シャペロニン機能の 1 分子イメージング”、細胞生物学会年会、東京大学、8 月、1999 .
- 11) 上野太郎、田口英樹、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“シャペロニンによるタンパク質折れ畳みの 1 分子蛍光イメージング”、第 37 回日本生物物理学会年会、生物物理 39: S131、和光市市民文化センター / 理化学研究所、10 月、1999 .
- 12) 田口英樹、上野太郎、多田隈尚史、吉田賢右、船津高志、“シャペロニンによるタンパク質折れ畳みの 1 分子イメージング”、第 72 回日本生化学会大会、生化学 71:964、パシフィコ横浜、10 月、1999 .
- 13) 多田隈尚史、田口英樹、上野太郎、吉田賢右、船津高志、“GroEL と GroES の相互作用の 1 分子蛍光イメージング”、第 36 回日本生物物理学会年会、生物物理 38: S159、九州大学、10 月、1998 .