

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博士論文審査報告書

## 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

上野 太郎  
Taro Ueno

氏

専攻・研究指導

生命理工学専攻・生体情報力学研究

2004 年 7 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。大腸菌のシャペロニン GroEL は、最もよく研究されている分子シャペロンの一つである。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、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。数ナノメートルの小さな空間に基質タンパク質を閉じ込めるメカニズムを解明することは GroEL の機能を理解するうえで極めて重要であるが、その詳細は未だに明らかにされていなかった。

本論文は、タンパク質分子間相互作用を 1 分子蛍光イメージング法によって解析するための技術開発と、それを応用した GroEL の反応サイクルの分子機構の解析をまとめたものである。本論文により、GroEL が基質タンパク質を数ナノメートルの小さな空間に閉じ込めるメカニズムが解き明かされた。

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概説するとともに、本論文の概要がまとめられている。

第 2 章では、申請者が開発した、1 分子蛍光イメージング法によるタンパク質分子間相互作用の解析法が述べられている。2 種類のタンパク質に、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、タンパク質分子間相互作用（タンパク質の結合と解離）を 1 分子観察することに、申請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、それぞれ蛍光色素 IC5、Cy3 で標識した。GroEL をガラス基板上に特定の向きに固定し、これに GroES、ATP、変性タンパク質を含む溶液を加え、全反射型エバネッセント照明顕微鏡により 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時間経過（kinetics）を、緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いて解析している。GFP は、変性状態では蛍光を出さず、折れたたむと蛍光を発するので、折りたたんだ瞬間を容易に検出できる。まず、酸変性させた GFP を GroEL に結合させ、その複合体をガラス基板上に固定した。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、ガラス基板上に固定した 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、申請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解析したところ、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解った。これは、最初の 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ことを示している。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 1 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 1 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るが、全ての温度で両者の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 1 律速過程では GFP の折れたたみが阻害され、第 2 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。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 秒で空洞内部に落とし込まれ、3 秒後に空洞内の基質タンパク質と GroEL の縁部分との距離が近くなり、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 1 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。Pi の全生成量を酸変性後にマラカイトグリーン法で測定し、Pi の溶液中への放出速度を蛍光色素で標識した Pi 結合タンパク質を用いて測定した。さらに、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。これら 3 つの実験の結果から、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、申請者が提唱する「2つのタイマーモデル」が説明されている。基質タンパク質を結合した GroEL は、ATP と GroES を結合後 cis-ATP\* complex という反応中間体を作る。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 cis-ADP\* complex 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。2 つの律速過程が存在するという上記の知見は、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 cis-ATP\* complex が存在することは、GroES が結合する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。

以上で述べたように、本申請者は、1) 1分子蛍光イメージング法を用いてシャペロニン GroEL・GroES の結合解離を可視化し、タンパク質間相互作用の 1分子蛍光イメージングに成功した。その結果、GroEL-GroES の反応サイクルに未知の中間体が存在し、3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程があることを明らかにした。また、2) シャペロニン GroEL-GroES 複合体内で GFP が折れたたむ時間経過を 1分子イメージングすることに成功し、シャペロニン複合体内では GFP の折れたたみが 3 秒間妨げられることを発見した。さらに、3) GroEL による ATP 加水分解反応を詳細に解析し、新しい 2 つの反応中間体の化学状態を決定した。以上の結果をまとめ、申請者は、シャペロニン反応サイクルにおける「2つのタイマーモデル」を提唱した。これは、GroEL が基質タンパク質を効率よく空洞内部に取り込む理由をうまく説明しており、GroEL の機能を理解する上で重要な知見をもたらした。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2004 年 7 月

審査員	主査	早稲田大学教授	理学博士（名古屋大学）	石渡 信一
		早稲田大学教授	理学博士（東京大学）	櫻井 英博
		早稲田大学教授	理学博士（早稲田大学）	加藤 尚志
		東京大学教授	理学博士（早稲田大学）	船津 高志