

**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**

平成 16 年(2004 年) 7 月

早稲田大学大学院 理工学研究科
生命理工学専攻 生体情報力学研究

上野 太郎

【目 次】**第 1 章 序論**

1-1) はじめに	4
1-2) 研究の背景	
1-2-1) タンパク質間相互作用の 1 分子イメージング	5
1-2-2) 分子シャペロンとタンパク質の折れたたみ	6
1-3) 本論文の概要	8
第 1 章の図	12

第 2 章 材料と方法

2-1) タンパク質の調製	
2-1-1) GroEL・GroES の調製法	14
2-1-2) タンパク質の蛍光標識	23
2-2) GroEL のガラス基板への固定法	25
2-3) 1 分子蛍光顕微鏡の設計	26
第 2 章の図	28

第 3 章 GroEL・GroES の結合解離の 1 分子蛍光イメージング

3-1) 蛍光標識した GroEL の活性測定	30
3-2) 固定した IC5-GroEL の退色回数の解析	31
3-3) GroES の結合解離に要する時間	33
3-3-1) GroES の結合解離の 1 分子イメージング	33
3-3-2) 化学反応式を用いた回帰曲線解析	35
3-4) 変性タンパク質が反応サイクルに与える影響	39
3-5) 低濃度 ATP が反応サイクルに与える影響	42
3-6) ADP 複合体、ADP-Pi 複合体の安定性	44
第 3 章の図	47

第 4 章 GroEL・GroES 内部で起こる GFP 折れたたみの観察

4-1) 序文	60
4-2) GroEL 変異体(D398A)内での GFP 1 分子の折れたたみ	61
4-2-1) GroEL(D398A)-GroES 複合体の解離時間	61
4-2-2) GFP 折れたたみの 1 分子蛍光イメージング	62
4-3) 野生型 GroEL 内での GFP 1 分子の折れたたみ	64
4-3-1) Apyrase 存在下での GroES の解離時間	64
4-3-2) GFP 折れたたみの 1 分子蛍光イメージング	65
4-4) 多分子観察系で見られる GFP の折れたたみ	67
第 4 章の図	69

第 5 章 第一律速反応の温度依存性の解析

5-1) 序文	75
5-2) 第一律速過程の反応速度定数 k の温度依存性	76
第 5 章の図	77

第 6 章 GroEL 内部で起こる基質タンパク質の運動解析

6-1) 序文	79
6-2) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理	80
6-3) タンパク質の調製	82
6-4) ストップフローを用いた FRET 効率変化の測定	83
6-4-1) GroEL 内部での GFP の運動	83
6-4-2) GroEL 内部での MDH の運動	85
第 6 章の図	87

第 7 章 反応サイクルにおける ATP の化学状態の決定

7-1) 序文	90
7-2) ATP 加水分解反応における初速度の測定	91
7-2-1) GroEL による ADP と P_i への ATP 加水分解	91
7-2-2) GroEL からの P_i の放出	92
7-2-3) GroEL からの ADP の放出	94
第 7 章の図	96

第 8 章 2 つのタイマーで制御された GroEL 反応機構の考察

8-1) GroEL が持つ 2 つの律速反応	．．．．． 100
8-2) 基質タンパク質を保持する反応中間体 <i>cis</i> -ATP* complex	．．．．． 100
8-3) 折れたたみは反応中間体 <i>cis</i> -ADP* complex 内で進行する	．．．．． 102
第 8 章の図	．．．．． 104

第 9 章 まとめ

9-1) 本論文のまとめ	．．．．． 105
9-2) 将来の展望	．．．．． 106

参考文献	．．．．． 108
研究業績	．．．．． 114

謝辞	．．．．． 118
----	-----------

第 1 章 序論

1-1) はじめに

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分かっている（図 1-1）。タンパク質の折れ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 はその中で最もよく研究されているが、GroEL に関する従来研究のほとんどは多分子の振る舞いを平均した情報のみを測定しており、GroEL のタンパク質折れたたみ機構を詳細に解明するには不十分であった。なぜなら、多分子の平均を扱う手法ではそれぞれの分子が持っている複数の過程が埋もれている可能性があるからである。本研究では、GroEL の分子機構を明らかにする目的で、GroEL によるタンパク質折れたたみ反応の 1 分子蛍光イメージングを試みた。

1-2) 研究の背景

1-2-1) タンパク質間相互作用の 1 分子イメージング

近年、生命現象を明らかにする強力な手法として、1 分子蛍光イメージング法が普及しつつある。本手法では、対象となる生体分子を蛍光標識して水溶液中で観察することができるため、電子顕微鏡や X 線結晶構造解析では分からない動的な機能を 1 分子レベルでイメージングできる利点がある。また、少量の試料で何度も実験可能なことから、プロテインチップへの応用にとどまらず、チップ上で網羅的に行われる生化学的な機能解析にも大きく貢献すると期待されている。1 分子蛍光イメージング技術は、タンパク質 1 分子の位置や向きの変化を測定できるため、特に筋肉を構成するモータータンパク質の研究分野で、1990 年代中頃から急速に発展してきた(Funatsu et al., 1995; Harada et al., 1998)。これは、生物分子モーターが一方向性の運動や力発生をするために、多数の分子の平均を扱う手法では正確な測定ができず、本技術が大いに威力を発揮できたからである (Vale et al. 1996、Adachi et al., 2000; Ishijima and Yanagida, 2001)。しかし、生命活動を支える大多数のタンパク質は結合・解離を繰り返すだけで、モータータンパク質のような方向性を持った運動は行わず、他分野でこの技術を生かした例は少なかった。1 分子蛍光イメージング技術を一般的なタンパク質-タンパク質間の相互作用の観察に用い、その生理機能を明らかにすることで、今後のプロテオーム研究に大きな影響を与えると期待される。

1-2-2) 分子シャペロンとタンパク質の折れたたみ

分子シャペロンは、主にポリペプチドや変性したタンパク質同士の凝集を防ぐことで、効率の良いタンパク質の折れたたみを保証している。Goloubinoff らは、試験管内でシャペロニン GroEL の機能を調べるため、変性剤を用いて立体構造を破壊したタンパク質を GroEL の入った溶液で稀釈し、タンパク質の折れたたみ効率を測定する系を確立した (Goloubinoff et al., 1989)。このように変性したタンパク質の再構成が GroEL に依存的に行われることが示されたのを境に、GroEL の作用機構は広く調べられ、分子シャペロンの中でもっとも研究が進んでいるタンパク質の一つとなっている (Sigler et al., 1998; Walter, 2002)。GroEL は、分子量 58,000 のサブユニット 7 つが連なるリング構造を取っており、さらにそのリング 2 つが背中合わせに結合して 14 量体を形成している (図 1-2 a)。内部に 2 つの空洞を持つ “たる型” の GroEL は、共同的に働く “ふた型” の GroES を結合することで内部空洞を完全に閉鎖し、基質となるタンパク質 (ポリペプチド) に安全な折れたたみ空間を提供する。

これまでに明らかになった GroEL の反応サイクルのモデル (図 1-2 b) では、GroEL は基質となる変性タンパク質をたるの縁部分に結合して複合体をつくり、さらに GroES を同じ部位に結合することで基質タンパク質を GroEL 内の空間に落とし込む。この状態は *cis*-ATP complex と呼ばれ、その内部空洞で自由になった基質タンパク質は自発的に折れたたむことができる。折れたたみと並行して、GroEL が 7 つの ATP を加水分解する。約 8 秒後に ATP が加水分解されて *cis*-ADP complex になると、GroEL の反対側 (トランス側) のリングに、別の ATP が結合するのが引き金となって、シス側の GroES の解離が起こる。さらに新たな GroES がトラン

ス側に結合し、次の反応サイクルが始まる。このように GroEL は 2 つのリングを交互に使う Two stroke engine として働いている(Weissman et al., 1995; Rye et al., 1999)。

しかし、これまで用いられた手法では多数の GroEL 分子の振る舞いが混在した平均的なデータしか得られず、GroEL のように複雑な作用機構をすべて解明するのは困難である。なぜなら、GroEL は 1 つ目の反応サイクルを終えた分子から順に次々に新しい反応を始めるため、従来の方法では 1 つ目の反応時間だけを抽出することができず、必ず何らかの方法で反応の途中まで、あるいは途中からに限定したシグナルを測定しているからである。そのため、通常どおり繰り返し反応が行われる条件下において、GroES の結合・解離と変性タンパク質の折れたたみやその解離のタイミングが、本当に上述したモデルに従っているのかどうかは、シャペロニンの作用機構を理解する上で重要であるにもかかわらず成し遂げられていない。一分子蛍光イメージング法は個々の分子が行う反応を区別して解析するため、上述したようなジレンマを持たない。筆者らは、一分子蛍光イメージング法を用いてシャペロニンを研究することで従来のモデルを直接検証し、シャペロニンが持つ未知の分子機構を明らかにした (Taguchi et al., 2001、Ueno et al., 2004)。

1-3) 本論文の概要

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るとともに、本論文の概要をまとめた。

第 2 章では、本研究で用いたタンパク質の調製法ならびに蛍光顕微鏡の仕様について述べている。

第 3 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 GroEL・GroES の相互作用の解析法と結果が述べられている。まず、GroEL と GroES をそれぞれ異なる蛍光波長を持つ蛍光色素 IC5、Cy3 でそれぞれ標識し、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・解離する様子が 1 分子レベルで観察された。また、GroEL に結合した GroES が解離するまでの時間を解析し、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 4 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 の位置に折れたたまれた GFP の輝点が次々と現れた。これは、タンパク質が折れたたむ瞬間を 1 分子イメージングした初めての例である。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、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一律速過程 (3 秒間) の寿命と一致していた。

第 5 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 6 章では、GroEL の反応サイクルにおける、基質タンパク質と GroEL の縁部分との距離変化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れたたむため、GroEL と GroES、ATP が存在しないと折れたたまない基質タンパク質 (Stringent Substrate Protein) でも同様な現象が起っているのかが重要な論点となる。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困

難である。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、代表的な Stringent Substrate Protein である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 がほぼ解消される 3 段階の反応が観察された。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た。以上から、GFP と MDH は GroEL 内部では同様の運動をしており、約 3 秒間の折れ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 7 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述べられている。GroEL の反応サイクルにおいて、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た。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 340 nm 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 8 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(第一律速過程)。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(第二律速過程)、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 9 章では、本論文のまとめと今後の展望が述べられている。

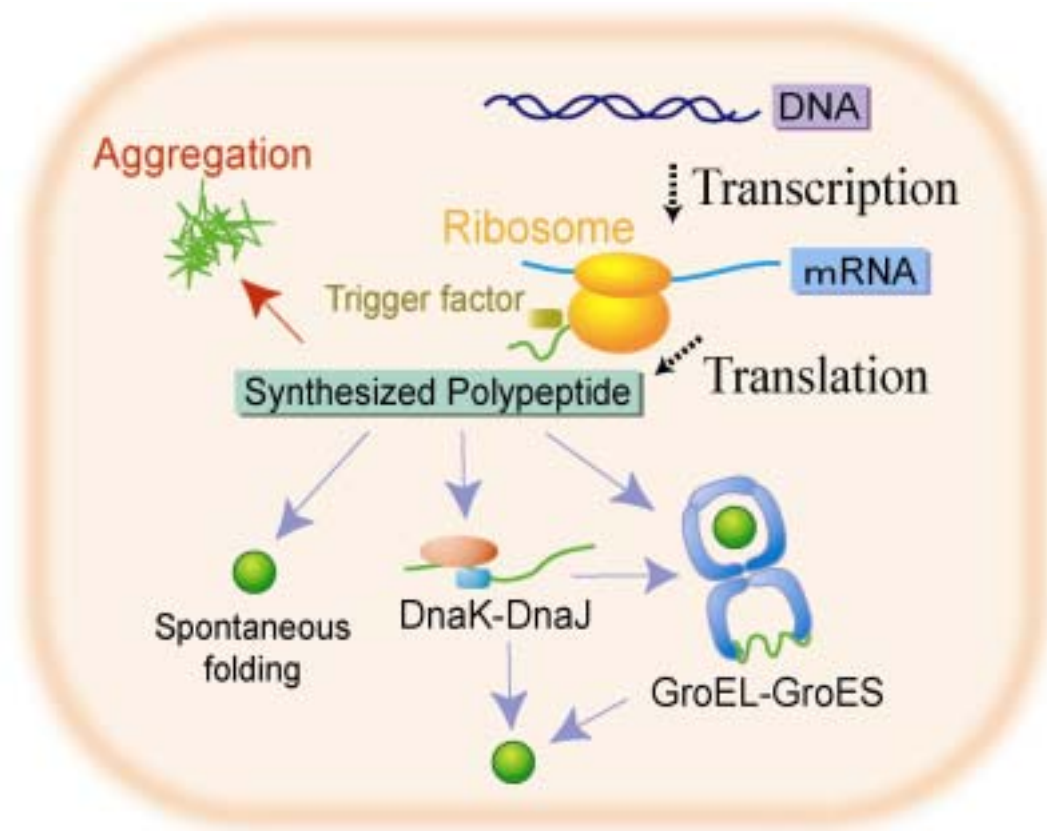


図 1-1 大腸菌での分子シャペロンによるタンパク質折れたたみ介助機構

リボソーム上で合成されたポリペプチドは、その出口で待ち構える trigger factor と相互作用しながらリボソームから解離する。大腸菌に存在する数千種類のタンパク質のうち、3分の2は自発的に立体構造を形成する。しかし、数十%のタンパク質はさらに分子シャペロンと呼ばれるタンパク質に結合し、他のポリペプチドと絡まらないよう制御される。DnaK/DnaJ が新生ポリペプチドの疎水部分に結合して凝集 (Aggregation) を防ぎ、さらに ATP 依存的に結合解離を繰り返しながら折れたたみを促す一方で、GroEL/GroES は新生ポリペプチドや変性したタンパク質を自身の空洞内に捕捉し、他のポリペプチドから隔離された環境で折れたたみを進行させる (Bukau and Horwich, 1998)。GroEL 内部に隔離できる基質タンパク質の分子量は 60kDa 以下であることが分かっている (Sakikawa, 1999)。しかし、GroES が結合できないほどの大きな分子量の変性タンパク質に対しても、GroEL の縁部分に結合することで、折れたたみを制御する機構も知られている (Farr et al., 2000)。

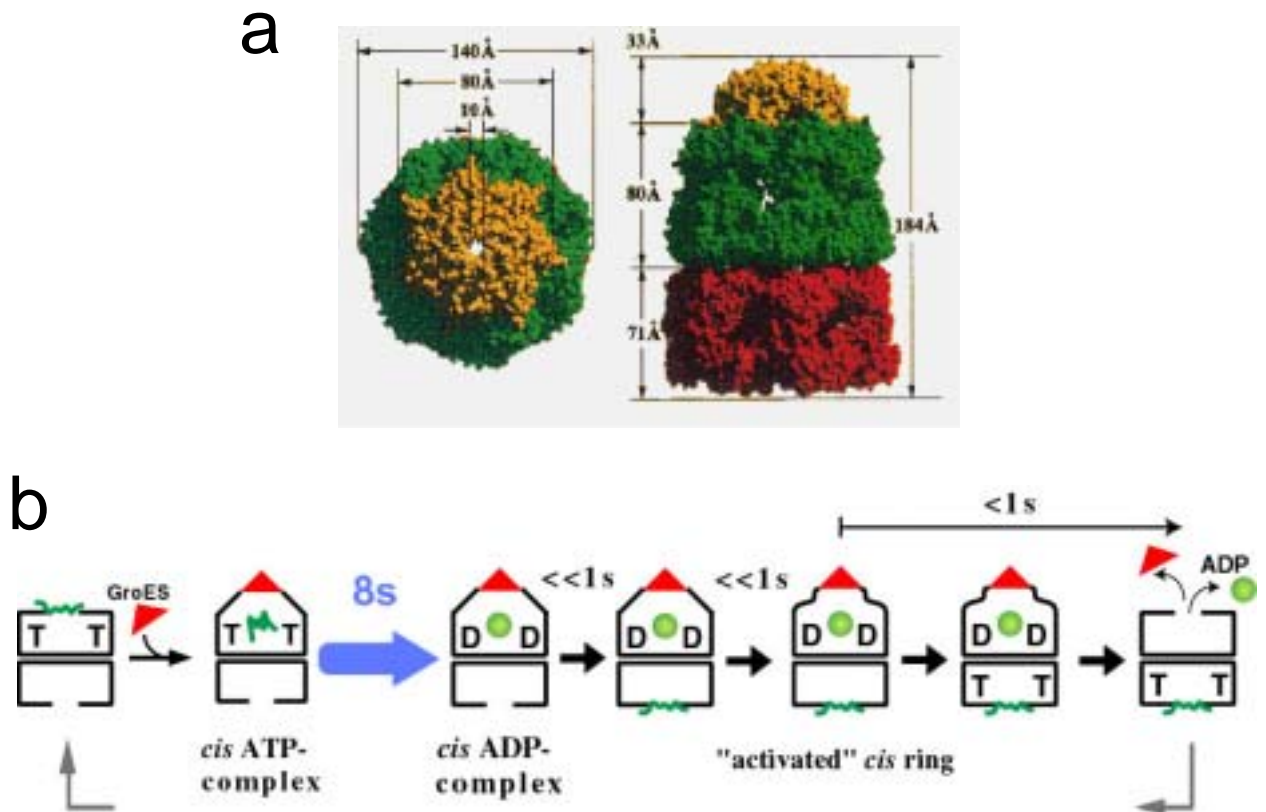


図 1-2 シャペロニン GroEL の構造と機能

a. GroEL-GroES-ADP 複合体の X 線結晶構造。GroEL を構成する 2 つのリングのうち、片側（緑色のリング）に 7 つの ADP が結合し、さらに GroES（黄色）が結合している。GroES を結合したリング内の体積は、GroES を結合していないリングの約 2 倍に増えている（出典, Xu et al, 1997）。

b. 1999 年に Rye ら が発表した、GroEL による折れたたみ介助サイクルのモデル。反応サイクルには、8 秒間の ATP 加水分解過程が唯一の律速過程として存在している。但し、本研究と比較しやすいよう、変性タンパク質と ATP が十分に存在している場合を記載した。まず変性タンパク質を空洞の入り口部分（apical domain）に結合した GroEL は、さらに ATP と GroES を結合することで、変性タンパク質を内部に落としこむ。この状態は *cis*-ATP-complex と呼ばれ、タンパク質は自由に自発的な折れたたみを行うことができる。それと並行して ATP が加水分解され、*cis* ADP-complex となる。続いて、GroEL の反対側に、別の変性タンパク質が結合することで構造変化が起こり、トランス側に ATP が結合する。これが引き金となって GroES が解離し、再び次のサイクルに移る。

第 2 章 材料と方法

本章では、本研究で用いたタンパク質の発現・精製方法とともに、タンパク質の蛍光標識法について説明する。また 1 分子蛍光観察装置の仕様について述べる。

2-1) タンパク質の調製

本研究で用いた GroEL・GroES は、それぞれの cDNA を用いて遺伝子工学的に発現・精製された。以下に記載するプロトコルは、共同研究者である東京工業大学 資源研 吉田久掘研究室の田口英樹 助手（現 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 助教授）に指導していただいた精製法を上野がまとめたものである。GroEL・GroES の精製には FPLC（Amersham Biotech, AKTA Explore10S）を用いた。GroEL 変異体の発現・精製方法も、同様である。

2-1-1) GroEL・GroES の調製法

目的のタンパク質（GroEL・GroES）をコードした発現ベクターを大腸菌のコンピテントセル BL21(DE3)に導入し、固体培地上にコロニーを作らせる。さらに液体培地中で培養した後、集菌してタンパク精製を行う。GroEL、GroES の cDNA は pET21c ベクター（T7 プロモーターに対応）に組み込まれており、アンピシリン耐性遺伝子を持つ。また、タンパク精製は全て室温で行った。

【1 日目前夜】

大腸菌への cDNA の導入

必要なもの (DNA 一種類の場合)

- オートクレーブ済み サンプルチューブ
 - 滅菌水
 - TE buffer (10 mM Tris-HCl(pH 7.8), 1mM EDTA)
 - コンピテントセル[BL21(DE3)] 50 μ l
 - DNA(100pg/ul) 1 μ l …LB プレート上にコロニーが約 100 個できる濃度
 - SOC or LB 培地
1. オートクレーブ済みサンプルチューブに competent cell を 50 μ l 入れる
 2. DNA(plasmid)を 1 μ l ずつ混入し、タッピング又はピペティングで混ぜる
 3. On ice for 20 ~ 30 min
 4. Heat shock for 45 sec at 42
 5. On ice for 2 min
 6. SOC (or LB) 培地を 100 μ l (2 倍量) 入れ、30~60 分間 37 で放置する
 7. LB プレートを冷蔵庫からだし、ふたを下側にして 37 インキュベータに入れる。
 8. 6 の培養が終わったら、LB プレートの裏側に名前を書き、150 μ l の培養液を中心付近に撒いてガラス棒で染み込むまで塗りつける
 9. 37 で一晩放置

2 xYT 培地の作製

<u>2xYT (1 L 分) の組成</u>		2.5L 分
Tripton	16g	40g
Yeast Extract	10g	25g
NaCl	5g	12.5g

NaOH (1 粒 / 500ml) をいれて、pH 7.2 に合わせる。

純水で 1 L (or 2.5L) にメスアップする。

口をアルミホイルで塞ぎ、テープを貼ってオートクレーブする。

【1 日目】

大腸菌の培養

1. 手を良く洗う
2. 振とう器を 37 に設定する
3. 50 ml 遠心チューブの壁に 100 mg/ml Ampicillin を 30 μ l つける
4. さらに 30 ml LB 培地を入れる
5. つまようじを炎であぶり、single colony をつついて、そのまま遠心チューブに入れる
6. 振とう器に交互にさし（すべて斜めにする）、205 rpm (MAX) で 3~4 時間培養する
7. 大量培養用の LB 培地にアンピシリンを最終 50 μ g/ml になるよう加え、バツフル付き三角フラスコに入れる。この際、炎でピンの口を処理しておく
8. 溶液をタッピングしてもやもやが見えたら (OD_{600} を測る必要はないが、目安は $OD_{600} = 0.3 \sim 0.5$)、オートクレーブした大量培養用の培地に入れて振とう器で培養する
9. 一定時間ごとに OD_{600} を測定する
10. $OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$ で IPTG を投入してタンパク質の発現誘導をかけ、さらに 3 時間培養する
11. 1 M IPTG を 1/1000 希釈して最終 1 mM にする (IPTG は、純水で溶かした後クリーンベンチで 0.2 μ m のフィルターに通し、-30 度保存しておく)
12. 遠心管に分け、遠心して集菌 (for 10 min at 4 , 6000 rpm)
13. 上清をデカントし、再度少量の上清で溶かして 50ml 遠心チューブに移し、遠心 (for 10 min at 4 , 6000 rpm)
14. 上清をデカントし、ペレットの重さを測定したのち -80 度冷凍庫に保存

【2 日目】

疎水カラム (Butyl カラム) で粗精製

準備

- Tris buffer 100ml

	ストック濃度	使用量	Final 濃度
Tris-HCl(pH8.0)	1M	2.5ml	25 mM
EDTA	0.5M	200 μ l	1 mM
PMSF(エタノール溶液)	0.1M	1ml	1 mM
DTT	1 M	100 μ l	1 mM

純水で 100ml にメスアップ

- Low Ion buffer 2L

	ストック濃度	使用量	Final 濃度
Tris-HCl(pH8.0)	1M	40ml	20 mM
EDTA	0.5M	4ml	1 mM
DTT (分子量 154Da)	粉末	308mg	1 mM

純水で 2L にメスアップ

- High Ion buffer 20% 硫安 buffer

GroEL 精製時

Low Ion buffer 0.75L

硫安 85.5g

GroES 精製時

Low Ion buffer 1L

硫安 114g

- C buffer 20% 硫安 + 20% メタノール 溶液 (GroES のときは作らない)

Low Ion buffer 400mL

硫安 57g

特級メタノール 100ml

以上の buffer を 0.22 μ m のフィルターに通し、脱気する。

使用したカラム樹脂

Butyl カラム

Tosoh Butyl Toyopearl 650M 型番 07477

陽イオンカラム

Tosoh SP Toyoperl 650M 型番 07997

ゲルろ過カラム

アマシャム・ファルマシア Sepharose CL4B 型番 17-0150-01

AKTA の準備

1. AKTA 本体の電源、パソコンの電源、ユニコーン（ソフトウェア）の順に立ち上げる
2. AKTA 右の脱気装置の電源を入れる
3. AKTA のポンプのパージを行う。A1,B1、A2,B2 の順に数 ml ずつシリンジで引く
4. Column Position を “ Position 2 ” にする
5. “A11”のチューブを High Ion buffer に入れ、ポンプの流速を 3ml/min に設定して少し出し、“ Pause ” して Butyl カラムにつなぐ。カラムの出口のチューブも空気抜きし、同様につなぐ
6. “ Continue ” で Butyl カラムに High Ion buffer を 150ml(5CV)流して平衡化する
7. “ End ” を押して止めておく

AKTA を用いたタンパク質精製の手順

1. 大腸菌を Tris buffer 約 40ml で溶かし、ステンレスビーカーを冷やしながら細胞膜が壊れるぐらいまで 20~30 分間ソニケーションする。黒っぽくなり、透き通れば完成。
2. ソニケーション溶液を超遠心する (for 40min at 4 , 40000rpm)
3. 上清を取り出して 20%硫酸にする (電気泳動用に硫酸前の溶液を 100 μ l 取っておく) (参考) 上澄みが 70ml なら、8.0g の硫化アンモニウム (硫酸) を入れる。
4. サンプルを 50ml チューブに分けて遠心する。at 9000 rpm for 10 min
5. (150ml - 上清の量) の High Ion buffer を、スーパーループに入れふたをする
6. 逆側に上清を入れてふたをし、AKTA にセットする
7. **(GroEL は 8.へ)(GroES は 17.へ)**
8. Injection Valve を “Inject”、Column Position を “Position 2”、Outlet Valve を “F3”にし、F3 のチューブを容器で受け取る < 素通り + wash 溶液 >

9. “A11”のチューブが High Ion buffer のピンに入っていることを確認し、Flow Rate を 3ml/min に設定して流す。サンプルがアプライされていることを確認し、サンプル最上部の泡が入る手前で”Pause”を押す
10. Injection Valve を”Road”にし、”A11”のチューブを C buffer(20%硫酸 + 20%メタノール 溶液) のピンに差す。Continue を押して 150ml (5CV) 流し、Wash する
11. 時間がきたら、”End”を押し、”A11”のチューブを”High Ion buffer”に、”B1”のチューブを”Low Ion buffer”に差す
12. “ Run ” で”TosohButylGroEL”のプログラムを立ち上げる
13. OK を押しつづけて保存ファイル名を記入し、フラコレが準備できていることを確認した後、”Start”を押す
14. 280nm の吸収からタンパクの位置を予想し、それらを 13%SDS ゲルに流す
(参考) マーカー (10 ~ 250 kDa, BioRad, code#161-0373) Sonic 超遠心の上清、Fraction、pure タンパクを 10 μ l ずつ使い、2 \times Loading buffer* 10 μ l と混ぜて熱処理し、ゲルに流す
15. (3 日目の電気泳動用に、硫酸を入れる前の溶液を 20 μ l 程度取っておき) ゲルを見て、GroEL がたくさんあるフラクションを 65%硫酸溶液にして 4 度保存
16. ゲルろ過の準備をする。(3 日目の項参照)

(GroES 精製では、手順 6. からここに移動)

17. “ Run ” で”TosohButylGroES”のプログラムを立ち上げる
18. Sample Injection の量を、サンプルの泡が入らない程度の量に書き換える
19. Fraction Collector の準備が整っていることを確認し、プログラムを開始する
20. 280nm の吸収からタンパクの位置を予想し、それらを 13%SDS ゲルに流す
(参考) マーカー、Sonic 超遠心の上清、Fraction、pure タンパクを 10 μ l ずつ使い、2 \times Loading buffer 10 μ l と混ぜて熱処理し、ゲルに流す
21. (3 日目の電気泳動用に、硫酸を入れる前の溶液を 100 μ l 程度取っておき) ゲルを見て、GroES がたくさんあるフラクションを 65%硫酸溶液にして 4 度保存
22. 透析の準備をする。(3 日目の項参照)

● 2 \times Loading buffer*

0.5 M Tris-HCl(pH6.8)	2 ml
10% SDS	4 ml
-メルカプトエタノール	1.2 ml
グリセロール	2 ml
1% BPB	数滴
純水	0.8 ml

【3 日目】

Butyl カラムを用いた精製後の試料に対する処理は、GroEL と GroES で異なる。GroEL はゲルろ過カラム、GroES は陽イオンカラムを用いてさらに精製する。

GroEL の精製 (ゲルろ過カラム)

準備

- Tris buffer(20%メタノール) (1 種類のタンパク精製分) 5L

	ストック濃度	使用量	Final 濃度
Tris-HCl(pH8.0)	1M	100ml	20 mM
Na ₂ SO ₄ (分子量 142Da)	粉末	71g	100 mM
特級メタノール	100%	1L	20%

純水で 5L にメスアップ

手順

前日の作業

1. Tris buffer(20%メタノール)をフィルター & 脱気し、"A11"のチューブを入れる
2. 少し流した後、カラムにつなぎ、樹脂の押さえを押し込む。buffer を流すと樹脂が沈み込むので、その都度押し込む
3. ゲルろ過カラムを OverNight で平衡化する。流速 3.5ml/min で 12 時間流すと、約 2.5L で平衡化できる

当日の作業

4. 4 度保存してある硫酸 65%溶液を遠心 (for 20min at 4 , 9000rpm)
5. ペレットを少量の Tris buffer(20%メタノール)で溶かす
6. さらに遠心 (for 10min at 4 , 9000rpm)
7. 上清を取り、Butyl カラムのときと同様に、スーパーチューブにセットする
8. プログラムをスタート (Run) する
9. 280nm の吸収波形から GroEL があると予想される Fraction を SDS ゲルに流す (参考) マーカー、昨日の硫酸沈殿前サンプル、Fraction、pure EL を 10 μ l ずつ使い、2 \times Loading buffer 10 μ l と混ぜて熱処理し、ゲルに流す
10. SDS で決定したタンパク液を、5 分の 1 量 (~ 30ml) になるまで限外ろ過にかけ濃縮する。このとき、排出液をプロテインアッセイしてタンパク質がもれていないことを確認

する。また、濃縮した溶液を取り出したら、20 mM Tris-HCl buffer を限外ろ過の膜に加え、さらにスターラーをまわして膜についたタンパクを回収する

11. HKM buffer 120ml + 硫酸 64.5g の溶液を作り、濃縮タンパク液 30ml と混ぜて最終 65% 硫酸溶液にして 4 度冷蔵保存する（濃縮してから再度 buffer で希釈するのは、メタノール濃度を下げて硫酸沈殿をさせるためである）

GroES の精製法（陽イオンカラム）

準備

- A buffer [20 mM Citrate buffer (pH 4.5), 0.1 mM DTT] 10L

<ちなみに、クエン酸二水素カリウム 57.5g/250ml 純水 = 1M>

（注意）1 回で 5 L ずつ作ればよい。

作成したい A buffer の総量		5 L
1M クエン酸二水素カリウム buffer (pH 3.8)		100ml
1M DTT (粉末 77mg で入れても良い)		500 μ l
KOH で pH を 4.5 に合わせる (5L で約 3.3g)		
純水でメスアップする (1L 分は AKTA に、9L 分は透析に用いる)		

- B buffer [A buffer + 1M NaCl] 200ml

A buffer 200ml

NaCl (粉末) 11.6g

手順

前日の作業

1. ブチルカラム後の 65% 硫酸溶液を遠心する (for 30min at 4 , 7000rpm)
2. スポイトで上清を捨て、A buffer 約 100ml で溶かす
3. 透析膜を 15cm ほど切って純水をいれ、純水入りのビーカーに数分浮かべる
4. 透析膜に A buffer で溶かしたタンパク溶液を入れる
5. A buffer 中で透析を行う (2 times for 2hours in 4.5L buffer、over night でも良い)

当日の作業

6. 透析膜の口をあけて上清を取り、0.45 μ m のフィルターに通す。溶液の pH が 4.5 であることを確認する
7. Butyl カラムのときと同様に、SP カラムを A buffer で平衡化しておき、サンプルをスーパーループに入れて AKTA にセットする

8. プログラムの Sample Injection の量を書き換え、プログラムをスタートする
9. 280nm の吸収波形から GroES があると予想される Fraction を SDS ゲルに流す。
(参考) マーカー、昨日の硫酸沈殿前サンプル、透析後の上清、素通し、Fraction、pure ES を 10 μ l ずつ使い、2 \times Loading buffer 10 μ l と混ぜて熱処理し、ゲルに流す
10. きれいな Fraction のものをまとめて、Tris buffer (pH8.0) で pH を 7 付近まで戻す (全量の 10% の Tris buffer を入れると pH7.0 になる)
11. 65% 硫酸溶液にし、4 冷蔵保存

使用したカラムの洗浄方法

Butyl TSK トヨパール・・・汚れがひどいときは、逆向きに設置して流す

1. 1M NaOH 80ml
 Tosoh ブチルの入った太いカラムケースは 0.5M KCl で洗浄
 2. 純水 80ml
 3. 70% EtOH 80ml
 4. SW 60ml
- (長期保存の場合)
5. 20% EtOH 60ml

陽イオンカラム・・・汚れがひどいときは、逆向きに設置して流す

1. 2M NaCl 40ml
 2. 純水 100ml
 3. 2M NaCl 40ml
- (長期保存の場合)
- 20% EtOH 60ml

ゲルろ過カラム

精製と続けて Tris buffer(20%メタノール)を 1.5L ほど流し、そのまま保存

2-1-2) タンパク質の蛍光標識

シャペロニン GroEL・GroES の結合解離反応を 1 分子蛍光イメージングするには、どちらかをガラス上に固定する必要がある(図 2-1 a)。本論文では、GroEL をガラス面上に固定し、溶液中に浮遊する GroES が GroEL に結合・解離する様子を観察した。2つのカップが背中合わせになった形をしている GroEL は、通常その両方のふちに交互に GroES を結合する。しかしガラス面上に GroEL の片側リングの縁が接触するように縦向きに固定すれば、物理的障害により片側に GroES を結合できなくなってしまうため、生理的な条件での測定が不可能である。そこで、スライドガラス上に biotin 化 BSA と streptavidin を固定した後、biotin 化した GroEL を横向きに乗せることにした(図 2-1 a)。このようにガラスと GroEL の間に BSA (A2058-1G, Sigma 社) や streptavidin (S-888, Molecular Probe 社) をはさむことには、GroEL をしっかりと横向きに固定できるという利点だけでなく、ガラスに直付けした場合に起こりやすい活性の低下を抑える効果がある。また、ガラス面を BSA や streptavidin などのタンパク質でコートするため、溶液中に浮遊する GroES が非特異的にガラス基板に結合するのを減少させることができる。GroEL に選択的に biotin や蛍光色素を結合させるため、GroEL の 490 番目のアスパラギン酸をシステインに置換した変異体 D490C (以降、EL490 とする) を作成した。490 番目のアミノ酸は GroEL の側面にあるため、そこに biotin を共有結合させ、さらに streptavidin を介して固定すれば、GroEL を横向きに固定できると期待される。490 番目のアミノ酸は、equatorial ドメインの外側にあり、X 線構造解析によれば ATP や GroES 結合による構造変化が少ないため、本来の GroEL の活性を損なわないと予想される (Xu et al, 1997; Xu and Sigler, 1998)。

GroEL に対し、1.3 倍のモル比で IC5 と biotin を混合し、HKM buffer (25 m

M HEPES-KOH(pH7.4), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl) 中で 1.5 時間反応させた。この溶液をゲルろ過カラム (Nap5; アマシャム・ファルマシア社) に通して未反応の IC5 と bitoin を取り除き、分光光度計により EL490-IC5-biotin 複合体 (以後、IC5-EL490 とする) の濃度を算出した。それぞれのモル吸光係数を以下に示す。

<水溶液中でのモル吸光係数>

GroEL	Abs280 = 130,480	M ⁻¹ cm ⁻¹
GroES	Abs280 = 9,860	M ⁻¹ cm ⁻¹
IC5	Abs645 = 178,000	M ⁻¹ cm ⁻¹
Cy3	Abs550 = 150,000	M ⁻¹ cm ⁻¹

2-2) GroEL のガラス基板への固定法

スライドガラスには Matsunami 社製の石英ガラスを用いた。石英ガラスはバックグラウンドが低く 1 分子蛍光イメージングに適しているが、高価なため再利用している。以下にフローセル (図 2-1 b) を用いた GroEL の固定方法を記す。

スライドガラスへの IC5-,Bio-EL490 の固定方法

1. スライドガラスの上に厚さ 50 μm のスペーサー 2 枚を平行に並べ、その上にカバーガラスをかぶせてクリップで固定し、トンネル (フローセル) を作る
2. トンネルの一方から 15 μl の biotin 化 BSA (約 3 mg/ml) を流し、フローセルの中に染み込ませる
3. HKM buffer (25 mM HEPES-KOH(pH7.4), 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl) を入り口から 15 μl 流し込みながら、出口で濾紙を使って 15 μl 分だけ吸い取る。これにより、ガラスに付かなかつた biotin 化 BSA だけが流れ出る
4. 同様に streptavidin (約 0.33 mg/ml) を流して biotin 化 BSA に結合させる。再び buffer を流して余分な streptavidin を取り去る
5. biotin 化した GroEL (0.05 ~ 1 nM) を流して streptavidin に結合させる
6. buffer を流して streptavidin に結合していない GroEL を取り去る
ここまでの操作で、biotin 化 BSA、streptavidin の上に GroEL が固定される (図 2-1 a)
7. 酸素除去系 (10 mM DTT, 25 mM glucose, 10 nM catalase (Sigma 社), 2.5 μM Glucose oxidase (Sigma 社)) を含む観察溶液を流し込む。酸素除去系は、蛍光色素の退色を早める原因となる溶存酸素量を低減させる役割を持つ
8. ピンセットでスペーサーをゆっくりと滑らせながら取り、カバーガラスの上から吸い取り紙で軽く押さえ、周りに染み出した溶液を吸い取る
9. プレパレートの中の溶液が乾燥しないように、マニキュアでカバーガラスの四方を塞ぐ

2-3) 1 分子蛍光顕微鏡の設計

Olympus 社製の倒立顕微鏡 (IX70) を使用し、プリズム型全反射照明用に光学系を組み立てた (Funatsu et al, 1995)。他に、明視野照明、対物型エバネッセント照明、水銀ランプによる落射照明が可能になっている。蛍光色素 IC5、Cy5 と GFP の観察には、それぞれ 633 nm He-Ne レーザー (NEC, GLG5240)、532 nm 半導体固体レーザー (uniphase 社, μ Green 4061 あるいは メレスグリオ社, 58GCS)、473 nm 半導体固体レーザー (島津, HK5510 あるいは 日本アビオニクス社, ML0250A) を用いた。また、蛍光フィルターはそれぞれ、690DF55、605DF80、530DF60 を使用した。ただし、Cy3 の観察には Rejection Band Filter : 532RB を重ねて用いた。これらのレーザー光は全て直線偏光であり、 $\lambda/4$ 板により円偏光に変換された後、プリズムを通過して試料面に入射する。円偏光にすることにより、試料面にさまざまな向きで固定されている蛍光色素の励起効率のばらつきを少なくすることができる。全反射した界面では、反射面から垂直方向に指数関数的に減衰するエバネッセント領域が作られ、約 150 nm の領域が照らされる (Axelrod, D. 1989; 図 2-1 a)。試料から出た蛍光は、100 倍の油浸対物レンズ (PlanApo, N.A. 1.4, Olympus 社) で集められ、上記のフィルターにより励起光から分光される。続いて蛍光は Image Intensifier (VS4-1845, VideoScope 社) で増幅され、SIT カメラ (CT2400-08, 浜松ホトニクス社) に入射して電気信号に変換される。この電気信号は、2 つの画像ボード (1. CT-3000A, CYBERTEC 社, 2. VG5, Scion 社) を通り、S-VHS ビデオで録画される。得られた画像はコンピュータ上で蛍光強度解析された。MVTec 社のソフト GmbH をベースにした手製のプログラム (船津高志先生、多田隈尚史氏作製) を用いて解析した。さらに、1 分子観察を行いながら Caged ATP を瞬時に分解するために、新たに電磁シャッター 2 枚を組み込んだ (図 2-2 a)。

紫外線照射時のカメラの不感時間は、0.4 秒であった（図 2-2 b）。以下に、全反射型エバネッセント顕微鏡を用いた 1 分子蛍光イメージングの手順を記す。

全反射型エバネッセント顕微鏡の使用方法

1. マニキュアがある程度乾いたら、カバーガラスの上に無蛍光イメージジョンオイル（ $n_d=1.516$, Olympus 社）を 1/4 滴ほど乗せる
2. 裏返してカバーガラス面を下に向けてから、スライドガラスの上にグリセリンをたっぷり（イメージジョンオイルの 5~10 倍ぐらい）乗せる
3. そのまま水平移動させて 100 倍対物レンズの上に置き、テープでステージに固定する
4. 石英プリズムをゆっくりと降ろし、スライドガラスとプリズムの間が約 0.5 mm になるまでグリセリンを押し付け、プリズム右横のねじを締めて固定する
5. スライドガラスにレーザーを照射し、レーザーの散乱光を視認しながらレーザーの照射位置およびピントを調整する
6. フィルター、ダイクロイックミラーの種類を使用するレーザー光に応じて変更する
7. 部屋の明かりを消して SIT カメラと Image Intensifier のゲインを上げ、顕微鏡の右側面にある光路切り替え用ノブを手前に回してカメラに蛍光像を映す。強い蛍光が入るとカメラが壊れるので、十分注意する
8. ステージをゆっくりと動かして蛍光像を観察し、S-VHS ビデオに録画する
9. 画像を DV テープにダビングし、コンピューターで画像解析する

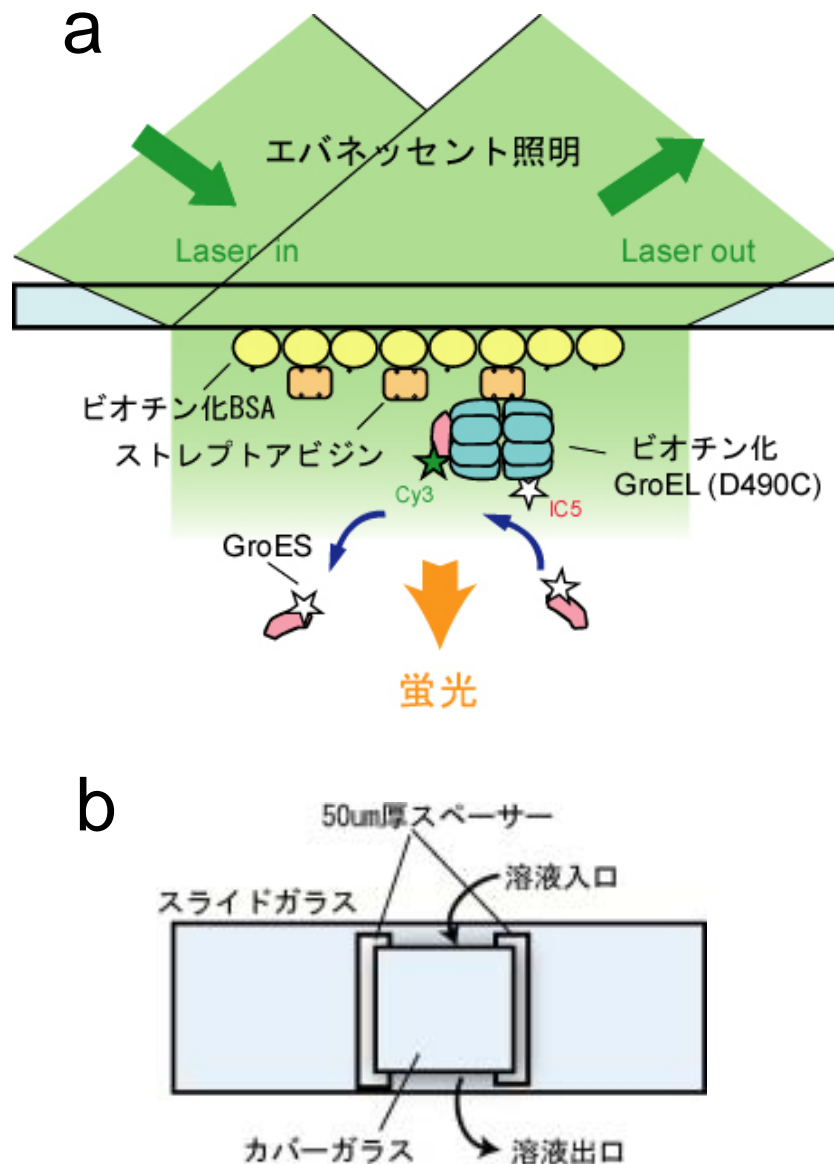


図 2-1 ガラス基板への GroEL の固定

a. GroEL の固定法と全反射型エバネッセント照明法による 1 分子蛍光イメージング。上図のように IC5-GroEL をスライドガラス面上に固定する。レーザー光をスライドガラスと水溶液の界面で全反射させると、一部が水溶液中にしみだし、ガラス面から約 150nm の厚みで指数関数的に減衰するエバネッセント場が発生する。この領域に Cy3-GroES が侵入すると Cy3 が励起されて蛍光を出す。それだけではブラウン運動をしているために輝点として観察できない。しかし、Cy3-GroES が GroEL に結合してブラウン運動が停止すると、1 個の輝点として観察できる。

b. フローセルの概略図。入り口からタンパク質溶液を 15 μ l ずつ順に流し、biotin 化 BSA、streptavidin、IC5-EL490 を固定する。

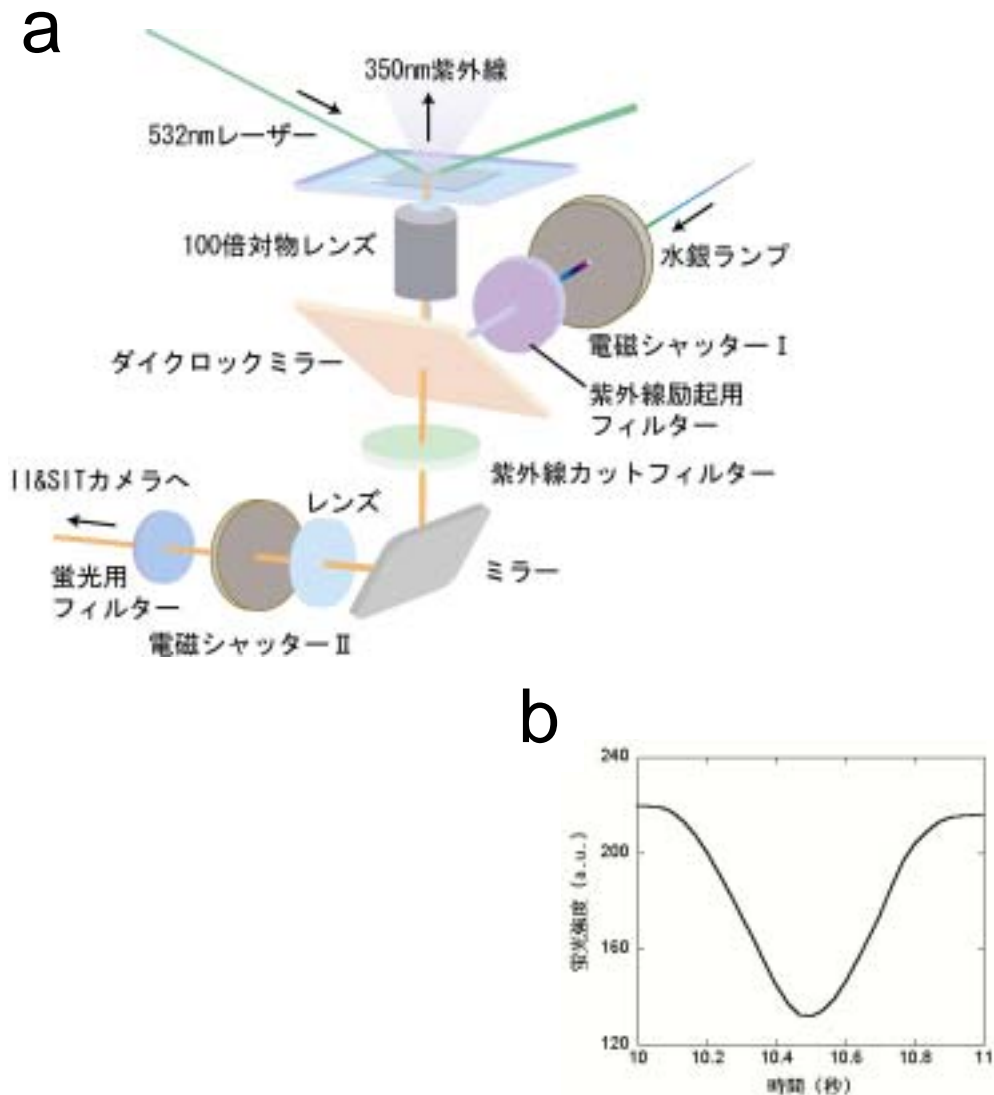


図 2-2 1 分子蛍光観察装置の概略図

a. 蛍光顕微鏡に組み込まれた Caged ATP 分解システム。水銀ランプから紫外線を分光して試料面に照射し、直径約 $300 \mu\text{m}^2$ の円内にある Caged ATP を分解した。電磁シャッター と は連動しており、 が開いている間はのシャッターが閉じるように設定されている。観察用のレーザー光を照射しながらシャッターを開閉することで、実験途中の任意の時刻に Caged ATP を分解し、反応を開始することができる。

b. 紫外線照射時の不感時間。ガラス上に固定した Cy3-GroES を全反射照明により観察しながらシャッターを開閉した。紫外線を 250ms 照射する際に、その前後 50ms を含む 350ms 間シャッターを閉じてカメラを保護した場合、約 0.4 秒間蛍光像を観察できない。本論文では、蛍光強度が最も低くなる時刻を、紫外線照射時刻 (Caged ATP 分解時刻) と定義した。

第 3 章 GroEL・GroES の結合解離の 1 分子蛍光イメージング

本章では、1 分子蛍光イメージングを用いた GroEL と GroES の結合・解離実験について述べる。

3-1) 蛍光標識した GroEL の活性測定

IC5 や biotin を結合した EL490 が、野生型 GroEL と同様の活性を保っているかを確かめるため、Rhodanese (Sigma 社) と Malate dehydrogenase (MDH; Roche 社) に対する折れたたみ介助活性を測定した。どちらの基質タンパク質においても、野生型と変わらないことが確認された (図 3-1)。GroEL は 14 量体であるため、遺伝子改変により導入した 490 番目のシステインは EL490 一分子当り 14 個ある。EL490 に IC5-maleimide (Dojindo 社) biotin-PEAC-maleimide (Dojindo 社) を連続して反応させることで、EL490 一分子に対して IC5、biotin をどちらも結合させることができた。一方、野生型の GroEL を IC5-maleimide と反応させたところほとんど標識されなかったことから、標識されたアミノ酸残基が 490 番目のシステインであることが確かめられた。GroES は、Cy3-NHS (アマシャム・ファルマシア社) を用いてアミノ基を標識した。実験に用いた GroEL のラベル率 (IC5 数 / GroEL 数 × 100%) は 50 ~ 130%、GroES のラベル率 (Cy3 数 / GroES 数 × 100%) は 80 ~ 120% であった。また、streptavidin Alkaliphosphatase を用いてウエスタンブロッティングを行い、EL490 が biotin で標識されていることも確認した。蛍光色素や biotin を結合させた後も、EL490 や GroES はほぼ通常の活性を保っていた (図 3-1)。

3-2) 固定した IC5-GroEL の退色回数の解析

一分子蛍光イメージングを行う際には、ガラス面上に見える輝点が必ずしも一分子のタンパク質である保証はないということに注意する必要がある。しばしばタンパク質は凝集して複数の分子同士で固まってしまう。もし複数の分子が行う反応を一分子のタンパク質の反応として解析すれば、誤った結果を招く原因となる。そこで、今回使用する GroEL がそれぞれ分散して固定されているかどうかを評価するため、以下の実験を行った。まず、IC5 で標識された GroEL (変異体 EL490/398、ラベル率 162%) を biotin 化 BSA と streptavidin を介してガラス上に固定した (図 2-1 a)。一方、streptavidin を入れずに GroEL を固定しようとする GroEL の輝点数が激減することから、ほとんどの GroEL は streptavidin を介して横向きに固定されていると考えられる。次に、全反射照明法により IC5-GroEL に赤レーザーを当てて退色させたところ、輝点の蛍光強度が階段状に減少した (図 3-2 a)。この退色回数からその位置にある IC5 分子の個数を見積もることができる。各輝点に対して退色回数を解析し、ヒストグラムを作成した (図 3-2 b)。

一方で、分光光度計による多分子測定から求められた IC5-GroEL のラベル率 (IC5 数 / GroEL 数 \times 100%) を用いて、GroEL に結合している IC5 の個数の分布を逆算することができる。ラベル率から IC5 標識数の分布を求めるための計算式を以下に記す。この計算式は、GroEL に人工的に導入した 490 番目のシステイン (1 分子あたり 14 個) に対し、IC5 が均等な確率で結合することを前提としている。溶液中の GroEL のラベル率が $Q \times 100$ (%) だったとする。14 個のうちある 1 箇所のシステインに注目すれば、そこに IC5 が結合している確率は $Q / 14$ である。逆に、IC5 が結合していない確率は、 $(14-Q) / 14$ となる。次に 1 分子の GroEL に注目すると、それが持つ 14 個のシステインのうち、 N 個に IC5 が結合し、かつ残

りの(14 - N)個に IC5 が結合していない確立 $p(N)$ は、

$$p(N) = {}_{14}C_N \times (Q / 14)^N \times (14 - Q / 14)^{14 - N}$$

となる。したがって、IC5 を 3 個結合している GroEL は、全ての GroEL のうち $p(3) \times 100$ (%)を占めていると計算できる。また、一つも IC5 を結合していない GroEL の割合は、 $(14 - Q / 14)^{14} \times 100$ (%)となり、例えばラベル率 100 (%)の GroEL の溶液中には、意外にも無標識の EL490 が 35.4 (%)も存在している。

輝点の退色回数の分布は、ラベル率 162%をもとに算出された理論的な分布と少し異なっていた(図 3-2 b、赤と白)。正確に退色回数と一致するようにラベル率を変えて理論的な分布を作成していくと、約 110%のとき完全に分布が一致した(図 3-2 b、青)。2つの分布間の違いは、GroEL が 14 量体という多数のサブユニットから構成されており分布が複雑なことに加え、GroEL 全体の 18%が無標識であるために測定誤差が大きいことが原因だと思われる。しかし、もし複数の GroEL が同一の場所に固定された場合は退色回数分布が右方向にシフトすることを考慮すれば、左方向にシフトした今回の結果は、GroEL 分子がガラス基板に独立に固定されていることを支持している。

3-3) GroES の結合解離に要する時間

GroEL・GroES の結合解離は、シャペロニンのタンパク質折れたたみ介助機構を支える重要な反応である。GroEL の機能を解き明かすための第一歩として、GroEL・GroES の結合解離の 1 分子蛍光イメージングを行った。

3-3-1) GroES の結合解離の 1 分子イメージング

GroEL を固定したフローセルに、4~10 nM Cy3-GroES、2 mM ATP、変性タンパク質 [75 μ M 還元 -Lactalbumin (還元 LA; Sigma 社)、酸素除去系 [10 mM DTT, 25 mM glucose, 2.5 μ M glucose oxidase, 10 nM catalase] を含む HKM buffer [100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM HEPES (pH 7.4)] 15 μ l 流し込み、マニキュアで封をして顕微鏡観察を行った。また、本論文では一貫して観察溶液で満たしてから約 5 分後に観察を始めた。GroEL の基質タンパク質として、還元状態の LA を使用した。分子量 14,200 である LA は、Native 構造で 4 つの S-S 結合を持っており、さらに Ca²⁺ が結合して構造が安定化されている。還元状態にして S-S 結合を切り離すか Ca²⁺ を取り除くことにより恒常的に変性させることができるため、特に還元条件下でシャペロニンの基質タンパク質としてしばしば用いられ、その性質もよく調べられている (Hayer-Hartl et al., 1994; Robinson et al., 1994)。一方で、Ca を取り除かれた変性 LA (apo-LA) は、還元された LA に比べ GroEL への結合能が低いことが報告されている (Okazaki et al., 1994)。

まず He-Ne レーザー (633 nm) を照射し、固定されている IC5-EL490 の位置を確認した。次にステージを固定したまま、He-Ne レーザーの代わりに 532 nm

半導体固体レーザーを 5 分間照射し、Cy3-GroES の蛍光を観察した。以上の操作を、一枚のプレパラートにつき 2 個所で行い、さらに 5~10 枚のプレパラートで同様の実験・解析を行った。その結果、あらかじめ確認した IC5-EL490 の位置に、繰り返し明滅する Cy3-GroES の蛍光が観察された (図 3-4)。溶液中に浮遊する Cy3-GroES は、激しいブラウン運動のためカメラで捕らえられないが、GroEL に結合して運動が止まったときのみ、その蛍光が観察される。一方、ATP 非存在下では蛍光の明滅がほとんど見られなかったことから、この反応が ATP 依存的に起こることが示された。以上の結果から、この明滅現象は GroES が GroEL に結合・解離する様子を表していることが確かめられた。また、EL490 の輝点がない場所に GroES が結合・解離する様子も観察された。これは Cy3-GroES が IC5 で標識されていない EL490 に結合しているか、あるいはガラス面上に非特異的に吸着しているためであると考えられる。

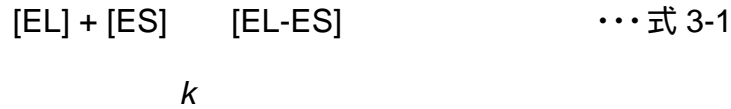
ビデオテープに録画した蛍光像をパーソナルコンピュータで取り込み、Cy3-GroES の結合・解離時間を解析した。まず、図 3-3 で見られるように GroEL の位置を直径 10 pixels (約 2 μm) の円で囲った。次に、Cy3-GroES の結合解離反応を録画した 5 分間の画像に対し、その領域内の平均蛍光強度の変化を解析した (図 3-4)。円で囲った GroEL のうち、83%の GroEL で Cy3-GroES の結合による蛍光強度の上昇が複数回観察されたことから、ガラス基板の上に固定された IC5-GroEL のほとんどが活性を保っていることが分かった。また、GroEL に結合した Cy3-GroES の蛍光強度は量子的であった (図 3-4)。これは、GroEL1 分子に結合している IC5 数に分布があったように、GroES に結合している Cy3 の個数にも分布があるからだと考えられる。GroEL に結合・解離する Cy3-GroES が一分子であることを確認するため、GroEL に結合した瞬間の Cy3-GroES の明るさからそのとき結合していた Cy3 の個数を求め、その頻度分布を作成した (図 3-5)。その

結果、退色回数の頻度分布はラベル率から逆算したものとほぼ一致し、GroEL に対して 1 分子の GroES が結合していることが確認された。

図 3-4 の蛍光強度変化のグラフから、GroES が解離してから次の GroES が結合するまでの時間を”off-time”、GroES が結合してから解離するまでの時間を”on-time”として解析し、それらのヒストグラムを作成した(図 3-6、図 3-7)。ただし、IC5-GroEL の輝点を囲った直径 10pixels の円内においても、前述したように Cy3-GroES が非特異的に吸着・解離する場合がある。この影響を取り除くため、IC5-GroEL の真横に同じ面積の円を囲い(以後、back ground とする) 同様に平均蛍光強度の変化を測定した。この円内に現れる Cy3-GroES の吸着・解離反応に対しても”on-time”のヒストグラムを作成し、先に作成した”on-time”のヒストグラムから差し引くことで、吸着の影響を取り除いた”on-time”のヒストグラムを作成した(図 3-7)。また”off-time”の補正では、次のような手順を踏んだ。IC5-GroEL と back ground の 2 つの”on-time”のヒストグラムの比を取り、各ビンにおける非特異的 Cy3-GroES の割合を求めた(図 3-8 a)。この割合をもとに、蛍光強度変化のグラフから Cy3-GroES の結合イベントを一定の法則で間引き(図 3-8 b) ”off-time”のヒストグラムを作成した(図 3-7)。

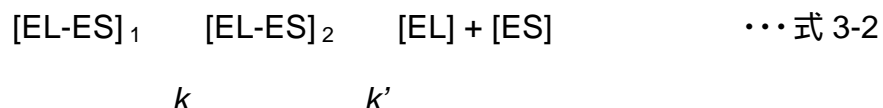
3-3-2) 化学反応式を用いた回帰曲線解析

補正された”off-time”のヒストグラムは、単一の指数関数で Fitting できた(図 3-6)。これは、Cy3-GroES の EL490 への結合がランダムに起こる 1 次反応であることを表している(式 3-1)。



Fitting 結果と観察溶液中の Cy3-GroES の濃度から、結合速度定数 k_{on} は $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と算出された。一方で、Cy3-GroES が GroEL と結合すると Cy3 の蛍光強度が約 20%高くなることを利用し、蛍光分光光度計により溶液中での GroEL と GroES の結合速度定数を求めた。10 nM GroEL(D398A), 10 nM Cy3-GroES, 75 μM 還元 LA, 5 mM DTT を含む溶液に ATP を最終 0.6 mM になるように加えて反応を開始させたところ、Cy3 の蛍光強度が増加した (図 3-6, inset)。その結果、結合速度定数は $3.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、1 分子計測で"off-time"から求めた値と大きな違いはなかった。このことから、ガラス面上に EL490 を固定しても GroES との親和性に大きな影響はなく、GroEL の活性は溶液中と変わらないことが示唆された。

"off-time"のヒストグラムが単一の指数関数で減少したのに対し、"on-time"のヒストグラムは約 4 秒のところにピークを持つ山型の分布になった (図 3-7)。これは"on-time"の反応過程が単一ではない、すなわち GroES が GroEL に結合した後、複数の連続した反応過程を経て解離することを表している。そこで、GroES が 2 つの反応過程を経て GroEL から解離すると仮定し (式 3-2) "on-time"のヒストグラムを Fitting した。



この化学反応式から連立微分方程式を立て、GroEL に結合してから t 秒後に解離す

る GroES の数 y を求めると、

$$y = C \{ - \exp(- kt) + \exp(- k't) \} \quad \cdots \text{式 3-3}$$

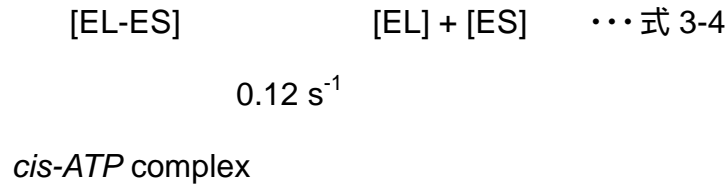
ただし、 C は任意の定数である。式 3-3 による Fitting から求めた 2 つの反応速度定数は、 $k = 0.34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.18 \text{ s}^{-1}$ 、時定数に換算してそれぞれ 3.0 秒、5.6 秒となった。このことは、"on-time"反応の途中に 2 つの安定な GroEL-GroES 複合体が存在することを示している。ただし、式 3-3 から分かるように、2 つの反応速度定数 (k, k') に対称性があるため、この時点で k と k' の反応過程の順序を特定することはできない。

ここで、7 量体である GroES は低濃度ではモノマーに解離して存在しており、1 分子蛍光イメージングで用いる 10 nM GroES では、正しい活性を測定できていない可能性が考えられた (Zondlo et al., 1995)。そこで、6 nM Cy3-GroES と 136 nM の無標識 GroES を混在させ、計 142 nM GroES、モノマー濃度に換算して $1 \mu\text{M}$ GroES-monomer 存在下で "on-time" のヒストグラムを作成した。得られたヒストグラムは山型の 2 段階反応として Fitting され、反応速度定数は $k = 0.36 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.27 \text{ s}^{-1}$ となり、低濃度の Cy3-GroES での値とほぼ同じであった (図 3-9 a)。

さらにゲルろ過法を用いて低濃度 GroES のオリゴマー形成能を評価した。HKM buffer で平衡化したゲルろ過カラム (TSK-G300SWxL) を HPLC に接続し、HKM buffer 中で 2 分間放置した 3 nM Cy3-GroES 溶液を $100 \mu\text{l}$ 挿入した。 0.5 ml/min の流速で流したところ、約 17 分後と 20 分後に Cy3 の蛍光が観察された。分子量からそれぞれ 7 量体および 1 量体であると推測され、ほぼ全ての GroES が 7 量体を 20 分以上保っていることが確かめられた (図 3-9 b)。

一方、これまでの報告では、GroES の結合から解離までの反応には、シス

側での ATP 加水分解反応 (8 秒) が唯一の律速過程として存在し、その他の反応は全て 1 秒以内に終了してしまう (図 1-2 b)。このモデルを律速反応だけで記述すると、式 3-4 のように表される。



この約 8 秒の寿命を持つ GroEL-GroES 複合体は、*cis-ATP complex* と呼ばれ、反応サイクルの中で唯一安定な状態であると考えられていた (Weissman et al., 1995, Rye et al. 1999)。このとき、on-time のヒストグラムは、図 3-6 で示した off-time のグラフのように、時定数 8 秒の単一の指数関数になるはずである。しかし、1 分子蛍光イメージングの結果は式 3-4 の反応モデルを否定し、これまで発見されていなかった反応中間状態の存在を明らかにした。

3-4) 変性タンパク質が反応サイクルに与える影響

1 分子蛍光イメージングによって明らかになった 2 つの律速反応過程が、変性タンパク質として用いた還元 Lactalbumin に特有であるか否かを調べるため、別の 3 種類の変性タンパク質存在下で GroES の結合時間を測定した。この 3 種類のタンパク質はどれも自発的に折れたたまないため、常に一定濃度の変性タンパク質存在下で GroES の結合・解離を観察することができる。Pepsin (Sigma 社) は、分子量 34,500 のタンパク質で、脊椎動物の胃液中に存在している。pH3 付近で正常な立体構造をもち、食物から得たタンパク質を分解するプロテアーゼとして働くが、中性条件下では構造が壊れるため常に変性している。また、2 つ目の Random Peptide [RP3-42] (東京工業大学 資源研 青木氏より提供) は、分子量 15,000 で、139 アミノ酸から構成されている。人工的にランダムにアミノ酸を並べたポリペプチドであり、2 次構造はほとんど持っていない。RP3-42 は、自然界に存在する変性タンパク質と同様に GroEL と結合して ATP 加水分解速度を促進することが分かっている (Aoki et al., 2000)。3 つ目の Porcine heart Malate Dehydrogenase (以降、MDH と呼ぶ) (Roche 社) は分子量 33,000 のタンパク質で、二量体化して酵素活性を持つ。ミトコンドリアや細菌の細胞膜に存在し、クエン酸回路に携わる酵素の一つとして働いている。一度尿素で変性させると、その後中性条件に戻しても自発的にはほとんど折れたたまず、GroEL・GroES に依存的な折れたたみを行う代表的なタンパク質の 1 つとして知られている。本論文では、6.4M 尿素中で 30 分以上変性させた後、約 30 倍に希釈して使用した。フローセルに IC5-EL490 を固定した後、10 nM Cy3-GroES、2 mM ATP、酸素除去系とともにそれぞれの変性タンパク質を含む溶液で満たした。変性タンパク質の GroEL への結合が律速にならないように、GroEL に対する親和性から、それぞれの変性タンパク質の濃度を 75

μM 中性 Pepsin、 $50\ \mu\text{M}$ random peptide、 $5\ \mu\text{M}$ 尿素変性 MDH と決定した。

rLA を基質タンパク質として用いた場合と同様に、どの変性タンパク質を用いた場合も、図 3-7 のように”on-time”のヒストグラムが 2 段階反応を示す山型の分布になった。4 種類の変性タンパク質で比較しやすいよう、これらのヒストグラムを積分したグラフを示す (図 3-10)。このグラフは、形成された GroEL-GroES 複合体の分子数が GroES の解離により減少していく様子をあらわしている (以降、解離曲線と呼ぶ)。したがって、式 3-3 の積分形である式 3-5 で Fitting される。

$$y = Ckk'[\exp(-kt) - \exp(-k't)] / (k' - k) \quad \dots \text{式 3-5}$$

Pepsin、Random peptide、MDH 存在下での”on-time”の反応速度定数は、それぞれ $k = 0.32, 0.28, 0.26\ \text{s}^{-1}$ 、 $k' = 0.24, 0.23, 0.23\ \text{s}^{-1}$ となった。このように、どの変性タンパク質存在下でも k 、 k' に大きな違いが見られないことから、この 2 つの律速反応過程はシャペロニンが行う全てのタンパク質折れたたみ過程に共通に存在し、その種類に対して不変的であることが明らかになった。

続いて、溶液中に変性タンパク質を入れずに GroES の”on-time”を測定した。先行研究により、変性タンパク質非存在下での 1 サイクルに要する時間は 25 ~ 35 秒程度であり、存在下 (8 ~ 15 秒) より 3 倍ほど長くなることが知られていた (Burston et al., 1995; Rye et al., 1999)。しかし、一分子蛍光イメージングによって求めた GroES の解離曲線は、一部が長くなったのを除いて変性タンパク質存在下の場合とあまり変わらなかった (図 3-10, None)。すなわち、GroES のほとんどは変性タンパク質存在下の時と同じ 2 段階の反応経路を通過して解離しており、少数の GroES が別の反応経路を通過してゆっくりと解離していた。この原因として、観察溶液に含まれる glucose oxidase や catalase、またガラス面上に固定している

BSA や streptavidin などの一部が変性し、基質タンパク質として働いている可能性が考えられた。そこで、GroEL の変異体 N265A (以降、EL265 とする) を用い、観察溶液中の変性タンパク質を捕捉しながら実験を行うことにした。EL265 は、GroES を結合せずに変性タンパク質だけを結合するため、Cy3-GroES の濃度を一定に保ったまま溶液中の変性タンパク質濃度を下げることができる。その結果、GroES の解離速度が長くなり、変性タンパク質の混入が原因であったことが確かめられた (3-9, None(+EL265))。この解離速度は、4 種類の変性タンパク質存在下の解離速度と比べて明らかに遅く、すでに報告されている文献値と一致した (Rye et al., 1999)。以上から、GroEL は変性タンパク質の種類は区別しないが、その有無によって反応サイクルの時間を変化させていることが確かめられた。これは、変性タンパク質が少ない環境では、GroEL の ATP 消費が抑えられることを示している。

3-5) 低濃度 ATP が反応サイクルに与える影響

次に、GroES の"on-time"の ATP 濃度依存性を調べるため、20 μ M、50 μ M、2 mM ATP 存在下で GroEL と GroES の結合解離を観察した。変性タンパク質として 75 μ M rLA を用いた。"on-time"の解析により得られた GroES の解離曲線には、これまでと同様に数秒間の"遅れ"が見られ、2 段階反応として式 3-5 で Fitting された(図 3-11)。その結果、20 μ M、50 μ M、2 mM ATP 存在下で反応速度定数は、それぞれ $k = 0.33$ 、 0.33 、 0.34 s^{-1} 、 $k' = 0.086$ 、 0.18 、 0.18 s^{-1} となった。すなわち、50 μ M、2 mM ATP 存在下では、どちらも寿命 3.0 秒、5.6 秒を持つ 2 つの律速過程を経て GroES が解離したが、20 μ M ATP 存在下では、3.0 秒、11.6 秒を持つ 2 つの律速過程を経て GroES が解離した。これは、20 μ M ATP 存在下では ATP 結合過程が新たに律速過程に加わったからだと考えられる。

現在提唱されているシャペロニンの反応サイクルについて見直すと、GroES が結合してから解離するまでの間に存在する ATP 結合過程は、GroES が解離する直前、すなわち GroEL のトランス側への ATP 結合のみであることが分かる(図 1-2 b)。したがって、20 μ M ATP では合計 3 つの律速過程が存在しており、3 番目の過程は GroEL のトランス側への ATP 結合過程である。これを 2 つの律速過程を仮定した式 3-5 で Fitting すると、近似的に 3 番目の律速反応が 2 番目の律速反応と重なって解析される。

ここで、3-3-2)で述べたように式 3-3 の k と k' の対称性により、2 つの律速過程(3 秒と 5 秒)の順序を区別できていなかったことに注意する必要がある。20 μ M ATP で得られた 2 つの律速過程の寿命 3.0 秒、11.6 秒を考慮すると、時定数が変化しなかった 3.0 秒の過程が 1 番目、変化した 5.6 秒の過程が 2 番目であり、GroEL のトランス側への ATP 結合は 6 秒で 3 番目に起こることが分かった(式 3-6)。

20 μ M ATP での 3 段階反応モデル

3.0 秒 5.6 秒 6 秒

(ATP 結合過程)

また、50 μ M ATP と 2 mM ATP の両方の時定数に全く差がないことから、50 μ M 以上の ATP 存在下では GroEL のトランス側への ATP 結合過程が律速になっていないことが明らかになった。したがって、ATP が数 mM 程度で存在する生体内では、GroEL は式 3-6 の第一律速過程(3.0 秒)と第二律速過程(5.6 秒) を経て GroES を解離する。

3-6) ADP 複合体、ADP-Pi 複合体の安定性

ATP の加水分解後に現れる GroEL-GroES-ADP 複合体 (*cis*-ADP complex) は、トランス側へ ATP を結合することで 1 秒以内に GroES を解離することが報告されている (図 1-2 b)。また変性タンパク質非存在下では、GroEL のトランス側への ATP 結合が新たに律速過程になり、GroES の解離が遅くなる (Rye et al., 1999)。本項では、一分子蛍光イメージング法を用いて *cis*-ADP complex の解離速度を測定した。あらかじめ 1.4 μ M IC5-EL490、2.8 μ M Cy3-GroES、2 mM ADP を室温で 10 分間放置し、GroEL-GroES-ADP 複合体を作成した。さらにこの複合体を、ガラス面上に streptavidin を介して固定し、1 mM Caged ATP、75 μ M rLA、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。

Caged ATP は、紫外線照射により Cage がはずれ、ATP として働く。図 2-3 の顕微鏡システムを用い、1 分子観察を行いながら任意の時間に直径 300 μ m の円状の領域に紫外線を照射することで局所的に ATP を生成させた。画面上で位置を確認した IC5-GroEL のうち、Cy3-GroES が結合して複合体を形成していたものは、約 10%であった。Caged ATP から ATP を生成すると、結合していた Cy3-GroES のほとんどは、紫外線照射後 1 秒以内に解離した (図 3-12)。しかし、全複合体の 13%は約 40 秒の時定数でゆっくりと解離した。このような分子群の存在はすでに報告されており、解離速度もよく一致しているが、原因は不明である (Rye et al., 1999)。さらに、Caged ATP 非存在下でも同様の実験を行ったところ、Cy3-GroES の解離時間が Cy3 の退色寿命 (~200 秒) とほぼ一致していた (図 3-12)。以上から、ADP 複合体は非常に安定であるが、ATP が結合するとほとんどが 1 秒以内に解離することが確かめられた。

GroEL-GroES-ADP-Pi 複合体

cis-ADP complex は、ATP 存在下で 1 秒以内に解離した (図 3-12)。一方、*cis*-ATP complex と呼ばれる GroEL-GroES-ATP 複合体は、ATP 存在下でも非常に安定である (Rye et al., 1999)。したがって、両者の中間に存在する、ATP の加水分解が終了した直後の GroEL-GroES-ADP-Pi 複合体が、ATP 存在下で解離するかどうかは興味深い問題である。これを検証するため、Pi のアナログである AlF_3 (アルミニウムフロライド)、 NaVO_3 (バナジン酸)、 BeF_2 (ベリリウムフロライド) を用いて、GroEL-GroES-ADP-Pi アナログ複合体を作成し、GroES の解離速度を測定した。これらは、GroEL が ATP 加水分解を終えて Pi を放出した後、空いた Pi 結合部位に入り込むことで GroEL-GroES-ADP-Pi アナログ複合体を作る。

250 nM IC5-EL490、500 nM Cy3-GroES、75 μM LA、2 mM ATP、Pi アナログ (or none) を室温で 10 分間放置し、GroEL-GroES-ADP-Pi アナログ複合体を作製した。ただし、3 種類の Pi アナログとして、アルミニウムフロライド (5 mM NaF + 1 mM AlCl_3)、バナジン酸 (1 mM NaVO_3)、ベリリウムフロライド (5 mM NaF + 1 mM BeCl_2) を用いた。複合体を形成させた溶液を約 1000 倍に希釈してフローセルに流し、ガラス基板に固定した。続いて、1 mM Caged ATP、75 μM rLA、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。

1 分子蛍光イメージングにより画面上で確認した IC5-EL490 のうち、Cy3-GroES が結合していた GroEL は、それぞれ 81% (バナジン酸)、35% (アルミニウムフロライド)、52% (ベリリウムフロライド) であった。続いて紫外線を照射して ATP を生成したところ、どの Pi アナログ複合体でも Cy3-GroES の解離速度は Cy3 の退色速度と等しく、ATP 存在下でも非常に安定であった (図 3-13)。

しかし、アルミニウムフロライドとベリリウムフロライドでは、約 10%の複合体が ATP 生成後 1 秒以内に解離した。これらは、ATP を加水分解してできた GroEL-GroES-ADP 複合体であり、かつ Pi アナログが結合しなかった分子群であると考えられた。なぜなら、GroEL-GroES-ADP 複合体ならば、ATP 生成後 1 秒以内に解離するからである (図 3-12)。

そこで Pi アナログ非存在下で、250 nM IC5-EL490、500 nM Cy3-GroES、75 μ M LA、2 mM ATP を室温で 10 分間放置した後、約 1000 倍に希釈してフローセルに流し込み、ガラス基板に固定した。続いて、上述した観察溶液を流し込んで観察したところ、IC5-EL490 のうち約 10%に Cy3-GroES が結合していた。紫外線を照射して ATP を生成すると、そのうち 70%の Cy3-GroES が数秒で解離した。この事実は、アルミニウムフロライド、ベリリウムフロライドの実験でみられた 1 秒以内に解離する分子群が、GroEL-GroES-ADP 複合体であることを示唆している。

以上から、GroEL-GroES-ADP-Pi 複合体は ATP 存在下でも非常に安定であり、トランス側へ ATP を結合して複合体が解離するのはシス側の Pi の放出後であることが示唆された。

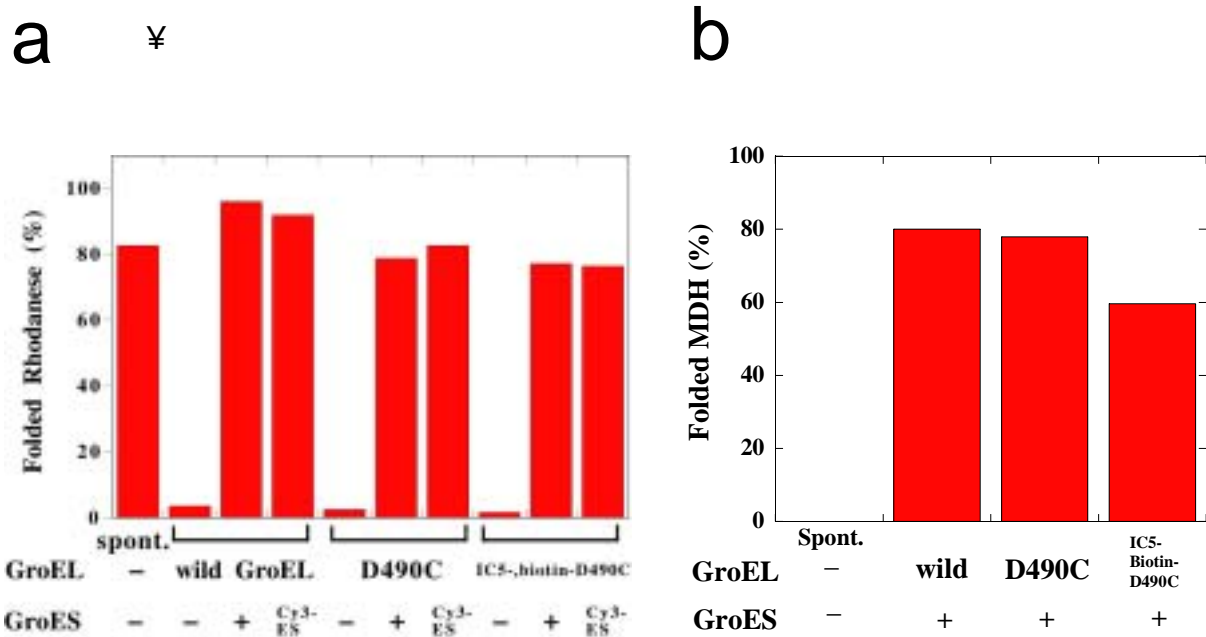


図 3-1 蛍光標識した GroEL の活性評価

a. GroEL による Rhodanese 折れたたみ活性評価。Rhodanese の折れたたみ効率を指標に変異を導入した GroEL の活性を評価した。D490C の変異や IC5,biotin で標識した GroEL の活性は、野生型とほとんど変わらなかった。また、アミノ基を Cy3 で標識された GroES も通常の活性を保っていた（共同研究者の田口氏のデータを引用）。

b. GroEL による MDH 折れたたみ活性評価。0.1 μ M 尿素変性 MDH を、0.2 μ M GroEL、0.4 μ M GroES、2mM ATP 存在下で 30 分間折れたたみ反応させ、MDH の酵素活性を測定した。野生型 GroEL と D490C 変異体では、ほぼ同程度の活性を示した。IC5,biotin で標識した GroEL（ラベル率 88%）の折れたたみ活性は野生型 GroEL より低かったが、大きな活性阻害は見られなかった。

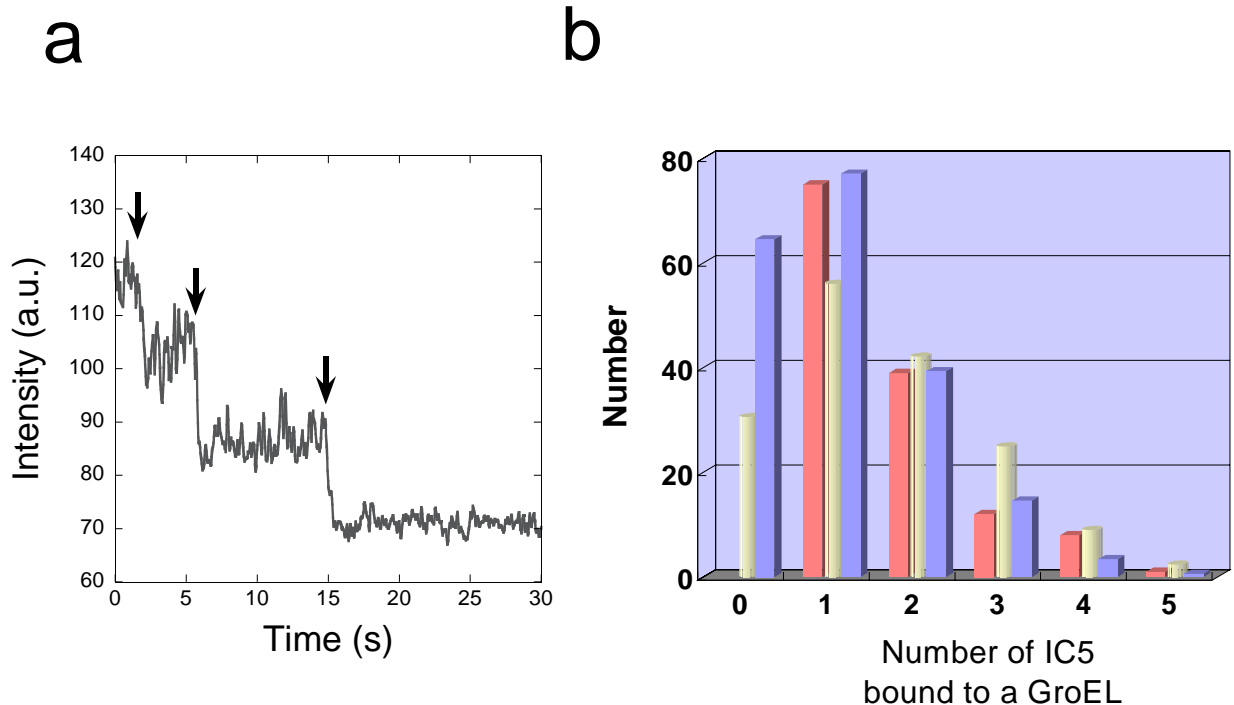


図 3-2 固定した GroEL の退色回数の解析

a. 退色によって階段状に変化する IC5 の蛍光強度。490 番目にシス테인を持つ GroEL の変異体 (D490C/D398A, IC5 のラベル率 162%) に蛍光色素 IC5 と biotin を結合させ、streptavidin を介してガラス上に固定した。赤レーザーを照射して輝点を退色させたところ、それぞれの輝点の蛍光強度は階段状に低下した。例として示した蛍光強度変化は 3 段階で退色した輝点である。

b. ガラス基板へ固定された IC5-GroEL の退色回数の分布 (赤) とラベル率から理論的に算出した GroEL1 分子への IC5 結合数の分布 (白、青) を示した。後者の分布は、分光光度計で測定したラベル率 (IC5 数/GroEL 数 \times 100%) をもとに GroEL1 分子あたりに結合している IC5 数の確率を算出し、作成した (3-2 項)。ラベル率が 162% および 110% として算出した分布を、それぞれ白および青の棒グラフで示した。3 種類の分布を比較しやすいように、退色回数が 1 回以上の分子の総数が同じになるよう算出した分布を正規化した。

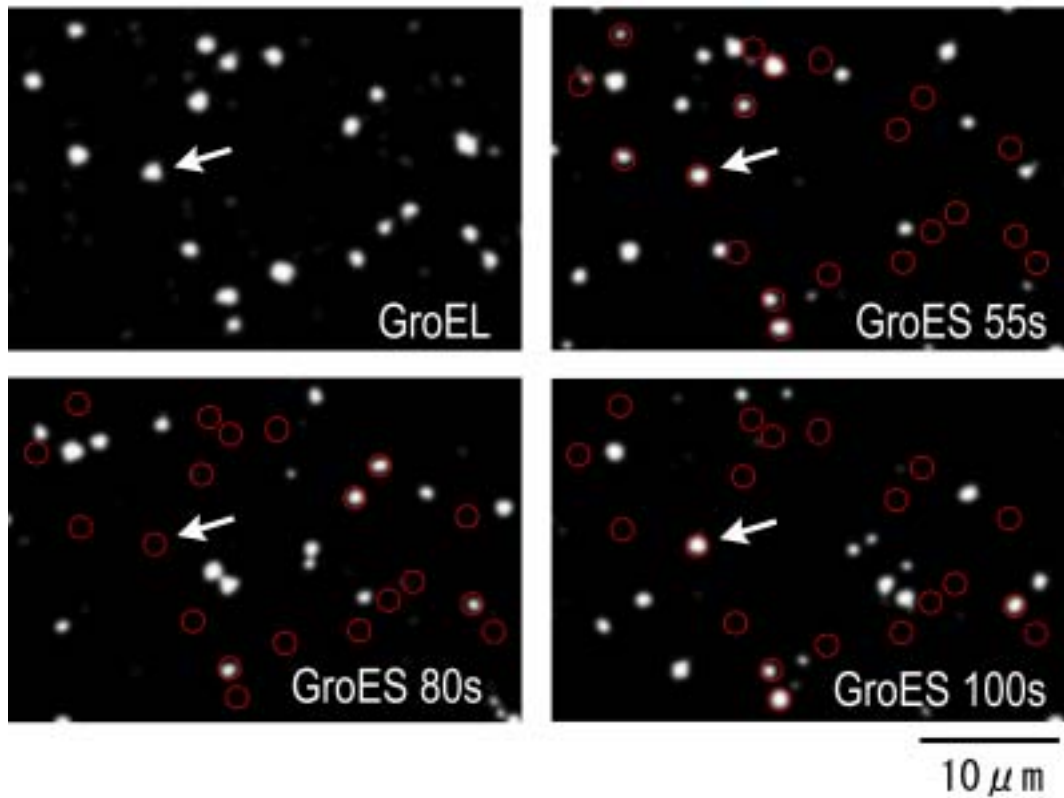


図 3-3 エバネッセント顕微鏡による GroEL・GroES の 1 分子蛍光像

最初に赤レーザーを照射し、IC5-EL490 の蛍光像を観察してその位置を確認した（左上図）。続いて、緑レーザーで Cy3-GroES を励起すると、赤丸で囲った GroEL の位置に Cy3-GroES の輝点が現れたり消えたりする様子が観察された。矢印で示した EL490 に結合・解離する Cy3-GroES の様子を、図 3-4 に示す。ただし、各画像は、2 秒間の積算像である。

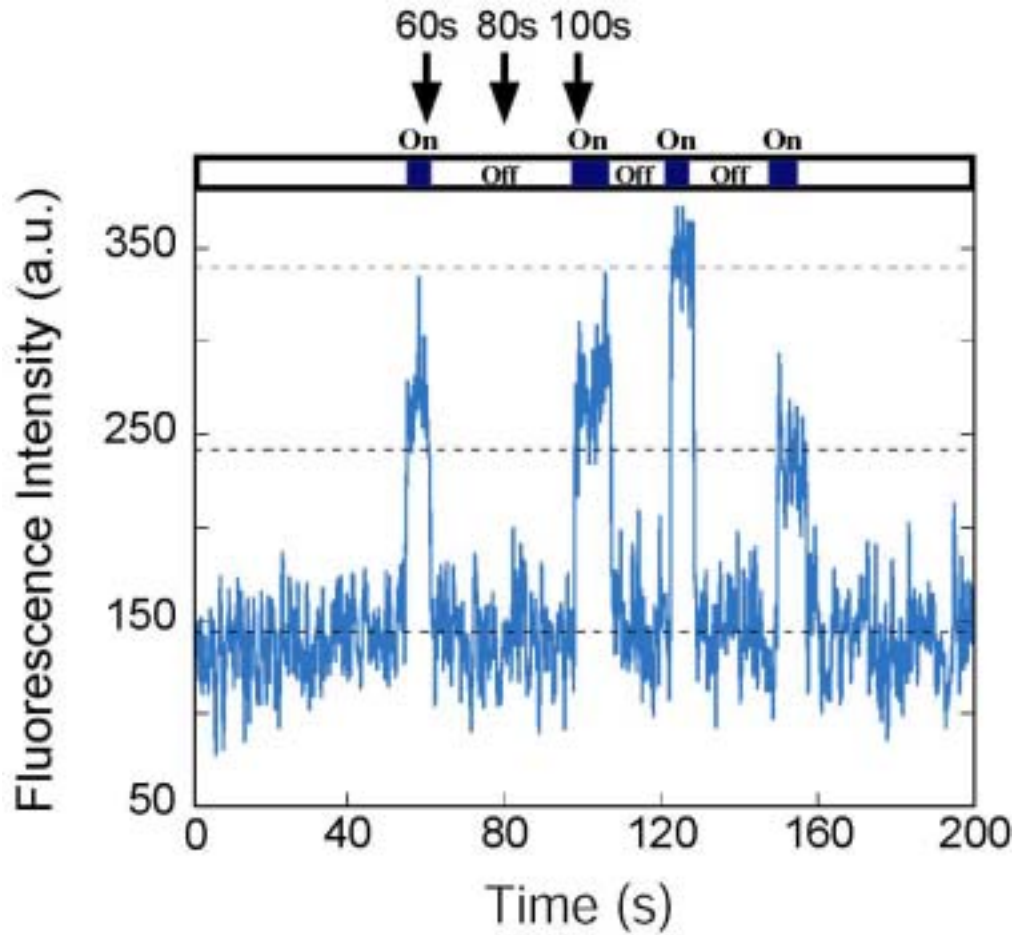


図 3-4 Cy3-GroES の結合・解離に伴う蛍光強度変化

図 3-3 の矢印で示した GroEL の領域に対し、Cy3-GroES の結合による蛍光強度の変化を示した。グラフの上部にあるように、蛍光強度が高い時間を“on-time”、低い時間を“off-time”と定義している。

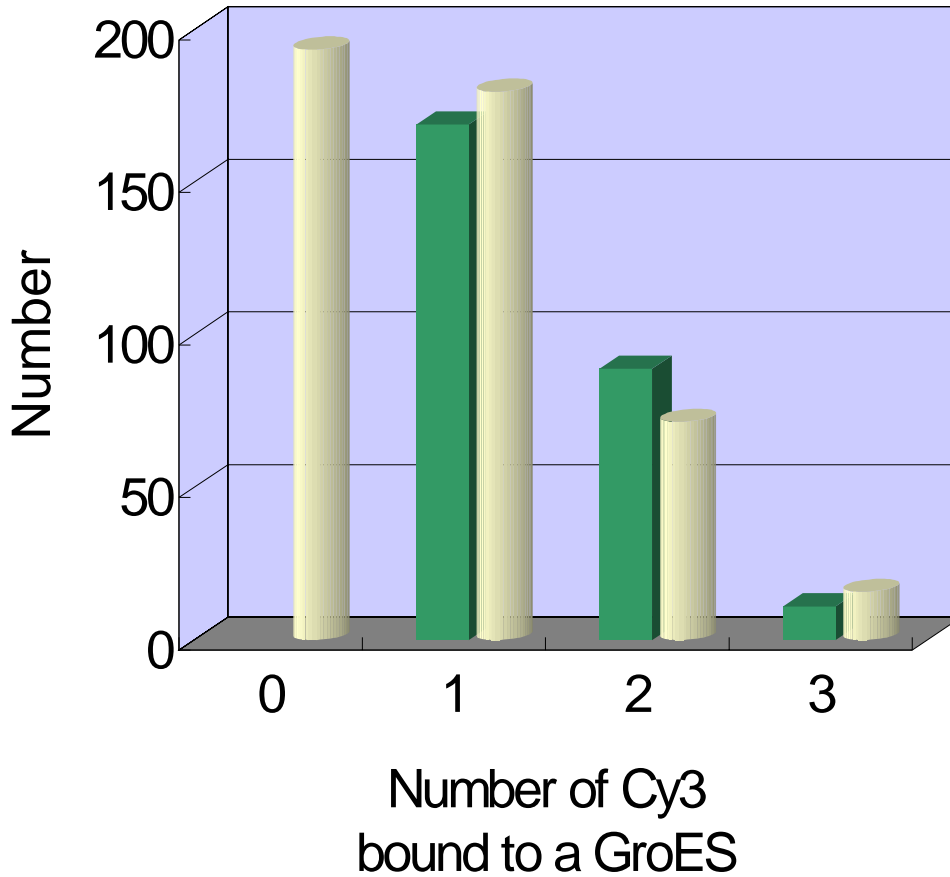


図 3-5 GroES に結合した Cy3 の個数の分布

図 3-4 のグラフで見られるように、Cy3-GroES が GroEL に結合すると量的に蛍光強度が増加する。この蛍光強度から GroES に結合している Cy3 の数を個々に見積もり、そのヒストグラムを作成した（緑）。また、図 3-2 と同様にラベル率（82%）から Cy3 の結合数の分布を算出し、ヒストグラムを作成した（白）。ただし無標識の GroES は観察できないため、退色回数が 1 回以上の分子の総数が同じになるよう算出した分布を正規化した。蛍光強度から見積もった GroES1 分子に結合している Cy3 の数の分布は、ラベル率から算出したものとほぼ一致した。

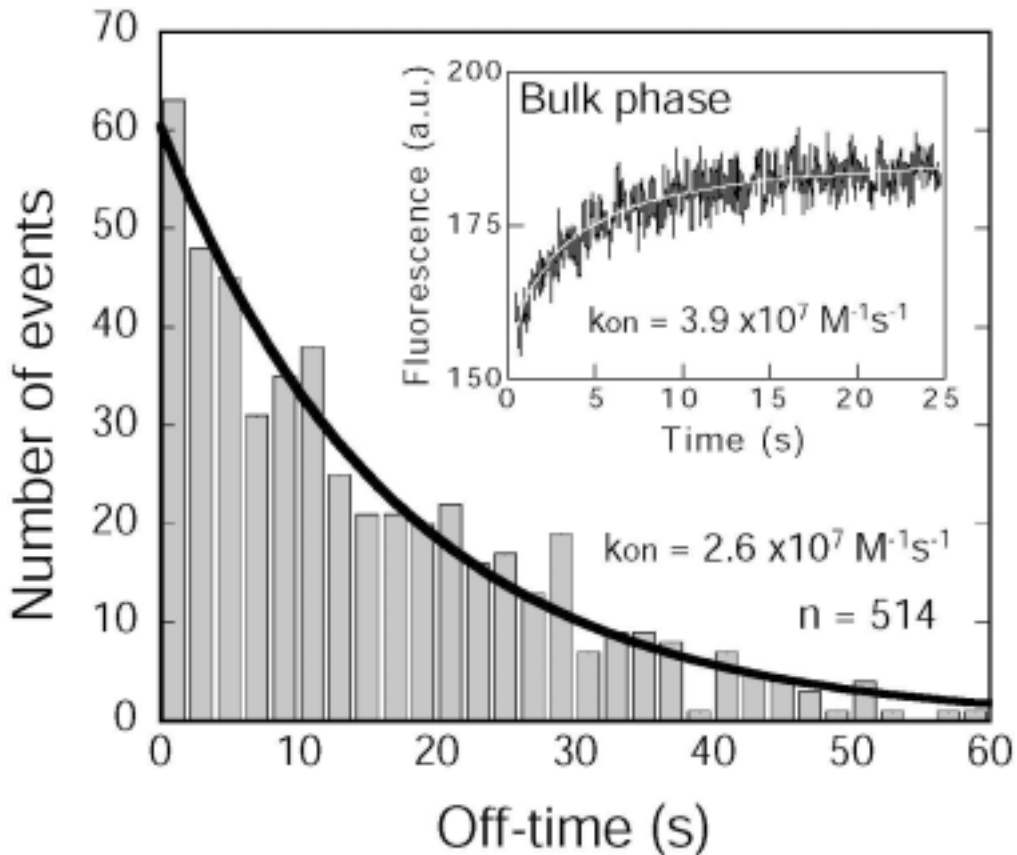


図 3-6 off-time のヒストグラム

図 3-4 のデータを解析し、off-time のヒストグラムを作成した。ただし、非特異的に結合した GroES の影響を除くため、図 3-8 に示す補正を行った。このグラフを $y = C \exp(-kt)$ で Fitting した結果、 $k = 0.059 \text{ s}^{-1}$ となった。Cy3 を 1 個以上結合している GroES の濃度が 2.3nM であることから、結合速度定数 k_{on} を次のようにして得ることができた。

$$k_{on} = 0.059 \text{ s}^{-1} / 2.3 \text{ nM} = 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

inset. 溶液中での GroEL と Cy3-GroES の結合による蛍光強度の上昇。結合した GroES が再び GroEL から解離する影響を取り除くため、結合速度は同じだが解離速度が 1/50 の変異体 (D398A) を GroEL として用いた。このグラフを Fitting した結果、結合速度定数は、 $3.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ となった。ただし、等濃度で存在する 2 分子間の結合速度の算出には、既報の方法を用いた (Rye et al., 1999)。545 nm で Cy3 を励起し、563 nm の蛍光を検出した。(田口氏のデータを引用)

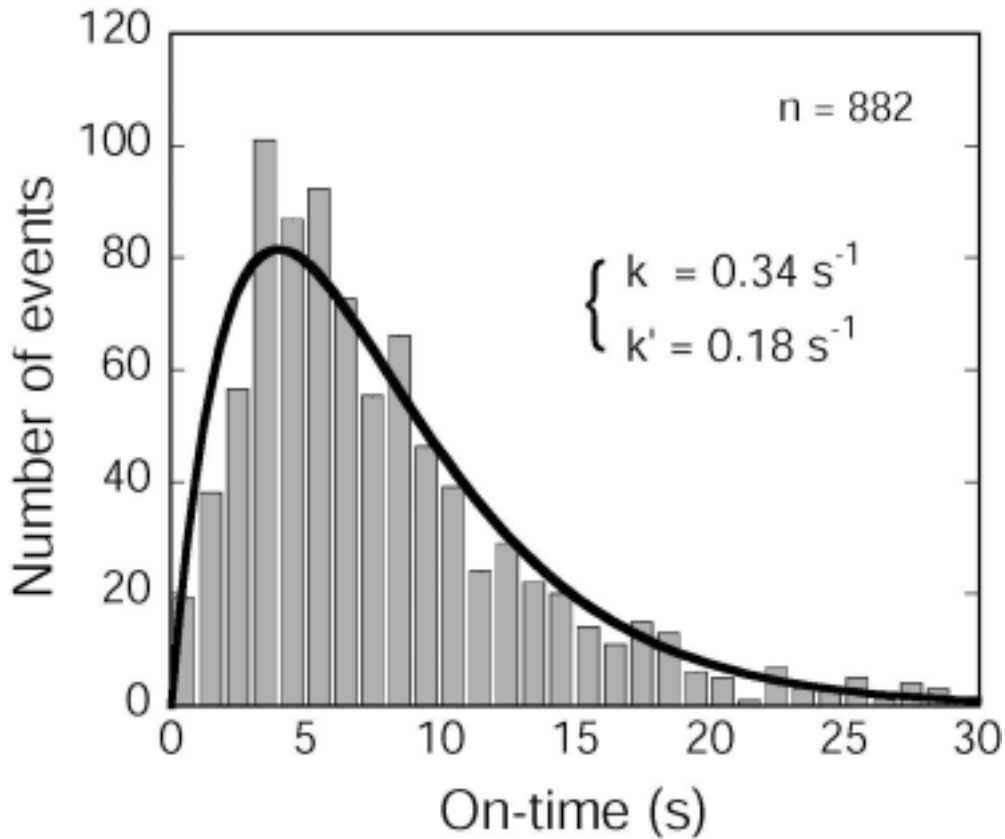


図 3-7 on-time のヒストグラム

図 3-4 のデータを解析し、on-time のヒストグラムを作成した。グラフは約 4 秒にピークを持つ山型分布となり、2 つの律速過程が存在するとして Fitting できた。ただし、IC5-GroEL が固定された位置と、すぐ隣の位置 (background) に対して、それぞれ on-time のヒストグラムを作成し、前者から後者を減算することで図 3-7 を得た。Background に非特異的に結合する Cy3-GroES の on-time の分布は、約 2 秒で指数関数的に減少した (図 3-8 a; グレーの棒グラフ)。

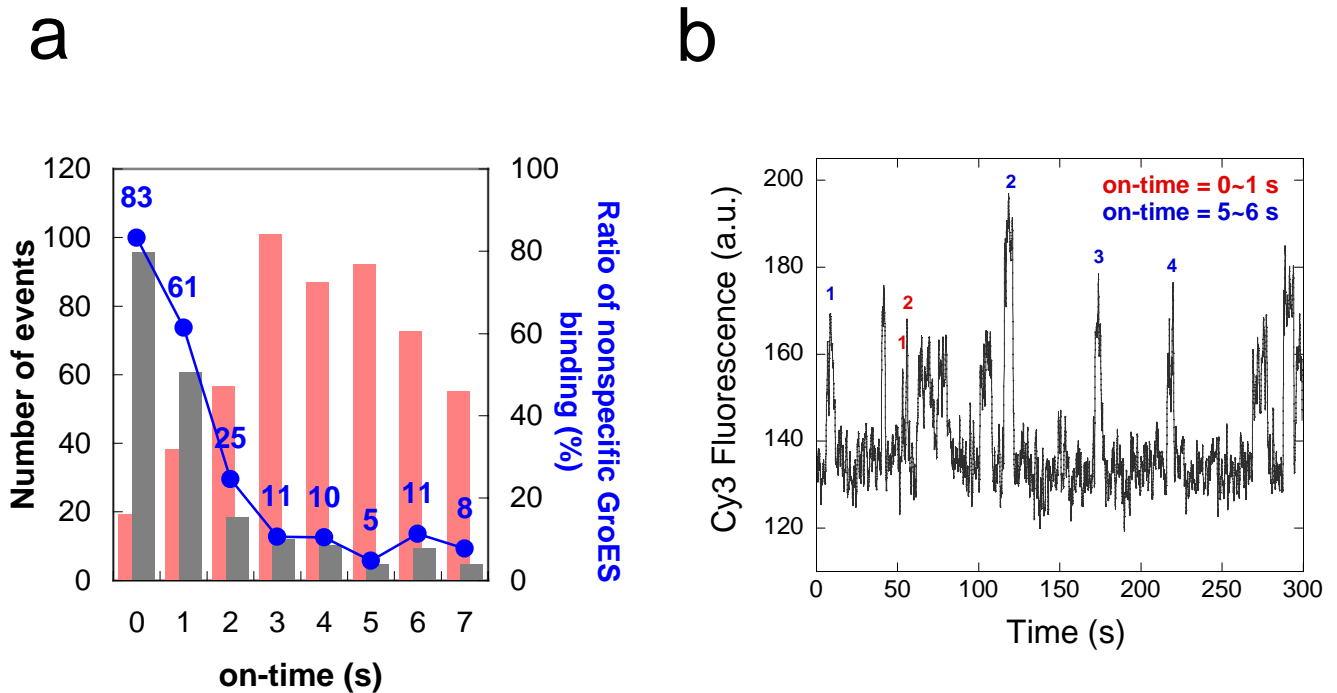


図3-8 非特異的なGroESの結合頻度とoff-timeの補正法

a. on-timeヒストグラム(図3-7)の各ビンにおける非特異的なGroESの割合。GroELに結合したGroES(赤)とback ground領域に結合したGroES(グレー)の比率を、ヒストグラムの各ビンについて算出した。その結果、結合後0~1秒で解離したGroESのうち、4/5が非特異的なGroESの結合であった。同様に、1~2秒では2/3、2~3秒では1/4、3~4秒では1/10、4~5秒では1/10、5~6秒では1/20・・・が非特異的なGroESの結合によるものであった。

b. Cy3-GroESの蛍光強度変化のグラフ(図3-4)からの非特異的なGroESの間引き方。あるGroELに結合するCy3-GroESの蛍光強度変化を示した。このグラフでは、例えば0~1秒間結合したGroESが2個(赤)、5~6秒間結合したGroESが4個(青)観察された。このように、on-timeの値ごとにグループに分け、図3-8aの割合に従って非特異的なイベントを順番に間引いた。0~1秒の場合では、4個を間引いて1個を残し、5~6秒の場合では、1個を間引いて19個を残した。全てのGroELに順番をつけ、蛍光強度変化のグラフを並べて、この作業を繰り返した。得られた蛍光強度変化のグラフから、図3-6のoff-timeのヒストグラムを作成した。

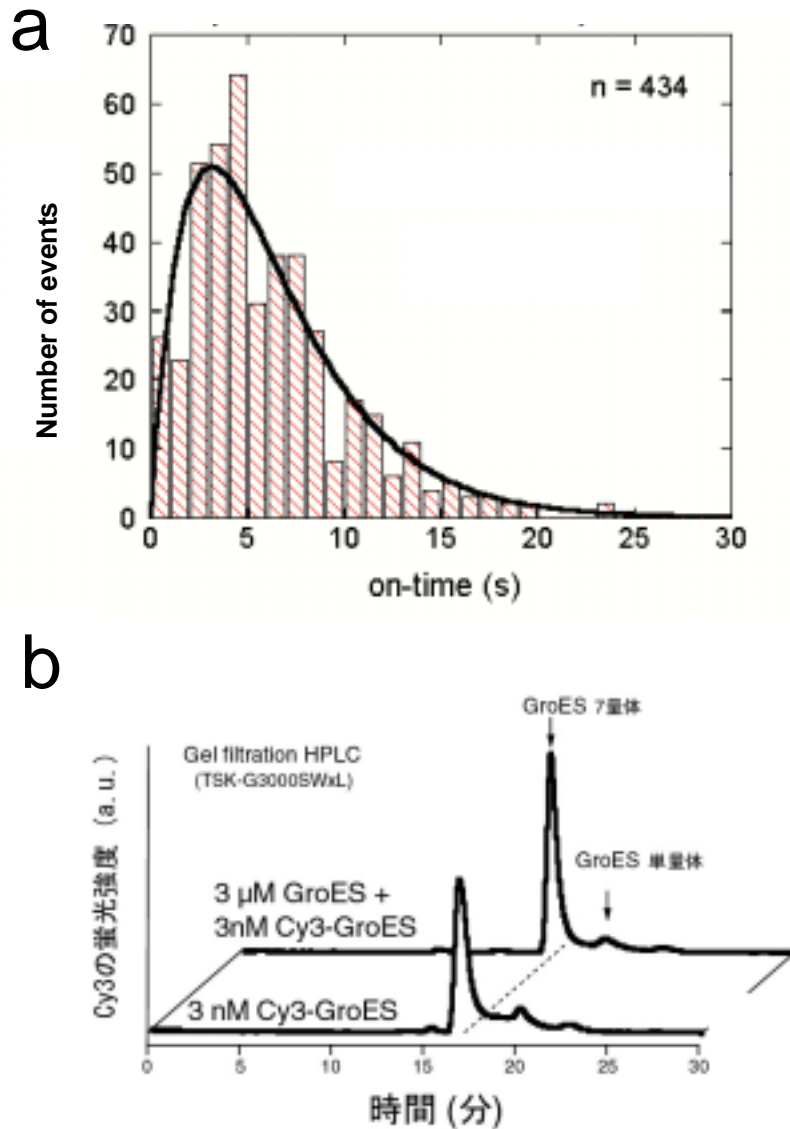


図 3-9 低濃度 GroES の安定性の評価

a. 高濃度 GroES 存在下での“on-time”ヒストグラム。6nM Cy3-GroES と 136nM GroES(無標識)を混在させた上で、Cy3-GroES の結合・解離を観察し、“on-time”のヒストグラムを作成した。グラフは山型分布になり、解離速度定数も 4 nM GroES の時とほぼ同じ値であった。

b. ゲルろ化による低濃度 GroES の安定性評価。3 nM でゲルろ過カラムに導入した Cy3-GroES のほとんどが 7 量体の位置で検出された。この結果は、3 μ M GroES と共存させた場合でも変わらなかった (田口氏のデータを引用)。

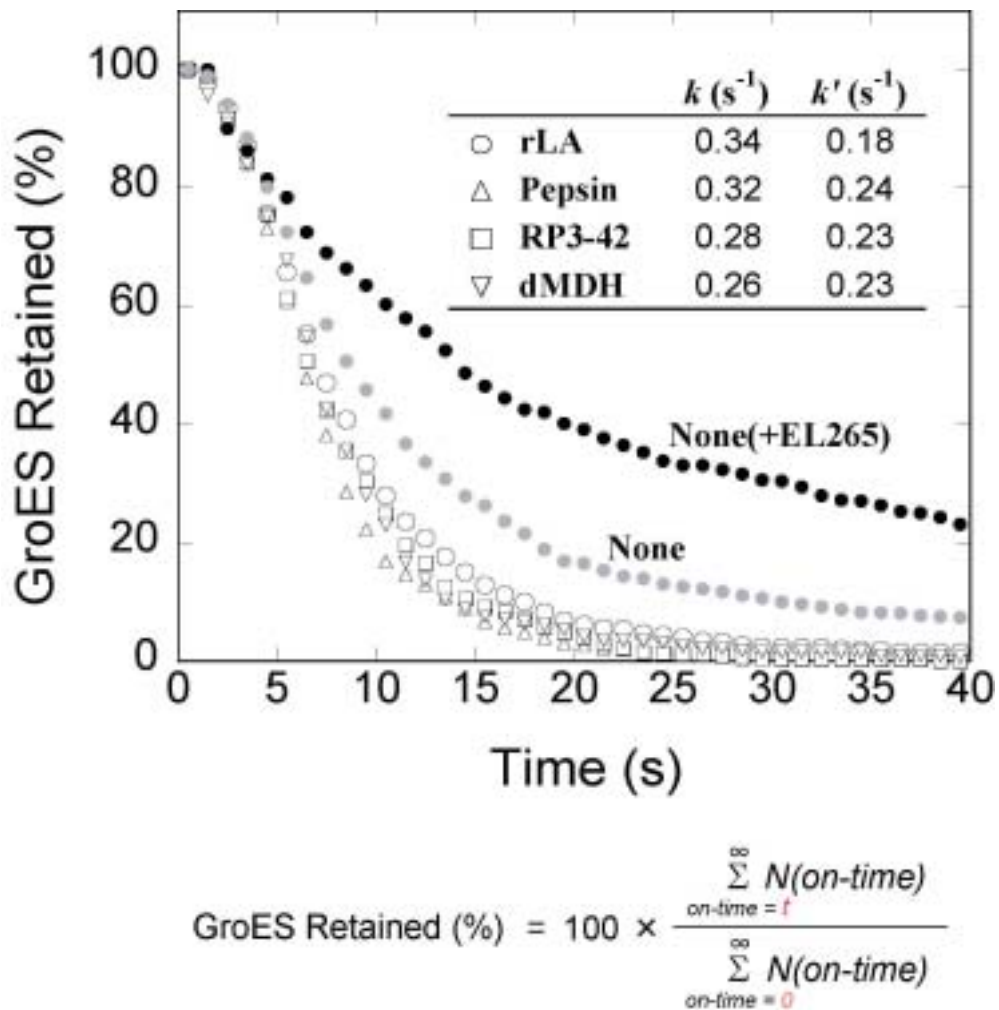


図 3-10 4 種の変性タンパク質存在下での GroES の解離曲線

図に示した方法を用いて、図 3-7 のグラフを図 3-10 のグラフに変換した。このグラフは、時刻 0 秒で GroES が結合したあと、GroES の解離により徐々に GroEL-GroES 複合体数が減少する様子を表している。変性タンパク質存在下では、どのグラフにも数秒間の“肩”が見られた。一方、変性タンパク質非存在下では GroES の解離が若干遅くなった。EL265 を用いて混在する変性タンパク質の濃度を下げると、さらに GroES の解離が遅れた。

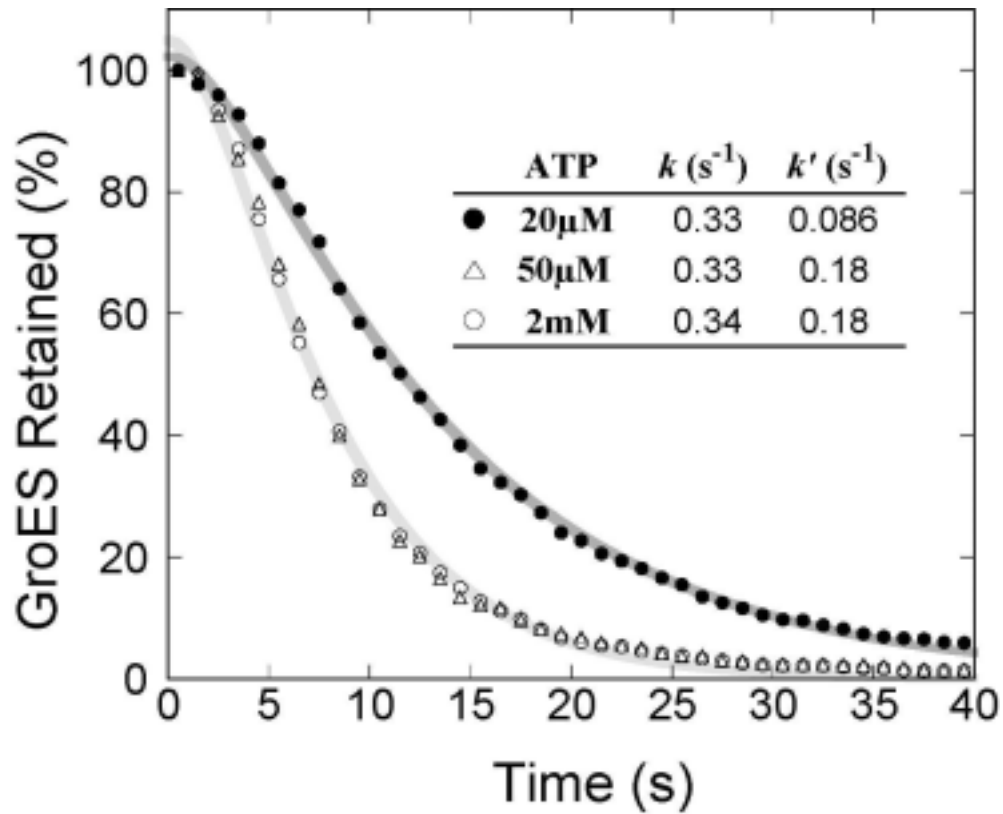


図 3-11 GroES 解離速度の ATP 濃度依存性

ATP 2mM, 50 μ M, 20 μ M 存在下で Cy3-GroES の“on-time”を解析し、その解離曲線を作成した。2 段階反応を表す式 3-5 で Fitting し、2 つの結合速度定数を求めた。50 μ M, 2mM ATP ではほぼ同じ値が得られた。一方、20 μ M ATP 存在下では k' のみ大きく変化し、この濃度では新たに ATP の結合が律速になることが分かった。

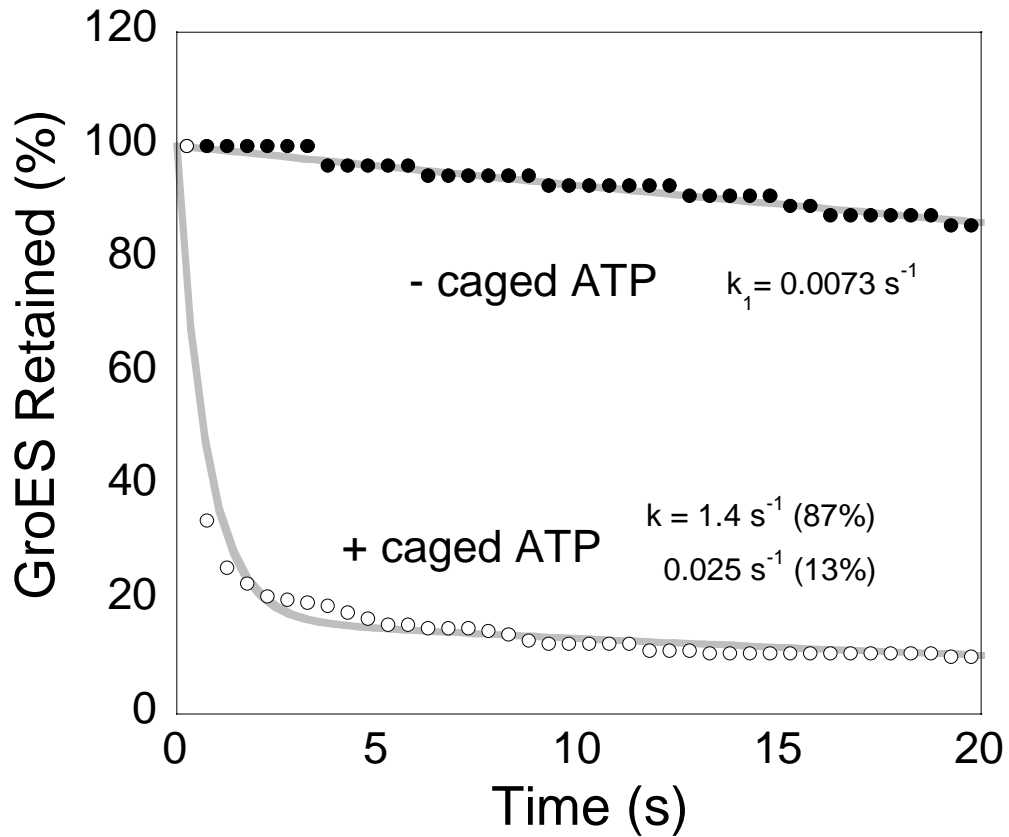


図 3-12 GroEL-GroES-ADP 複合体の解離速度

GroEL、GroES、ADP を混合してあらかじめ作製した ADP 複合体をガラス面上に固定し、ATP を生成してから解離するまでの時間を測定した。ほとんどの ADP 複合体が 1 秒以内に解離したが、13%の ADP 複合体は、約 40 秒の時定数で解離した。一方、Caged ATP 非存在下では約 140 秒となり、退色寿命と一致した。

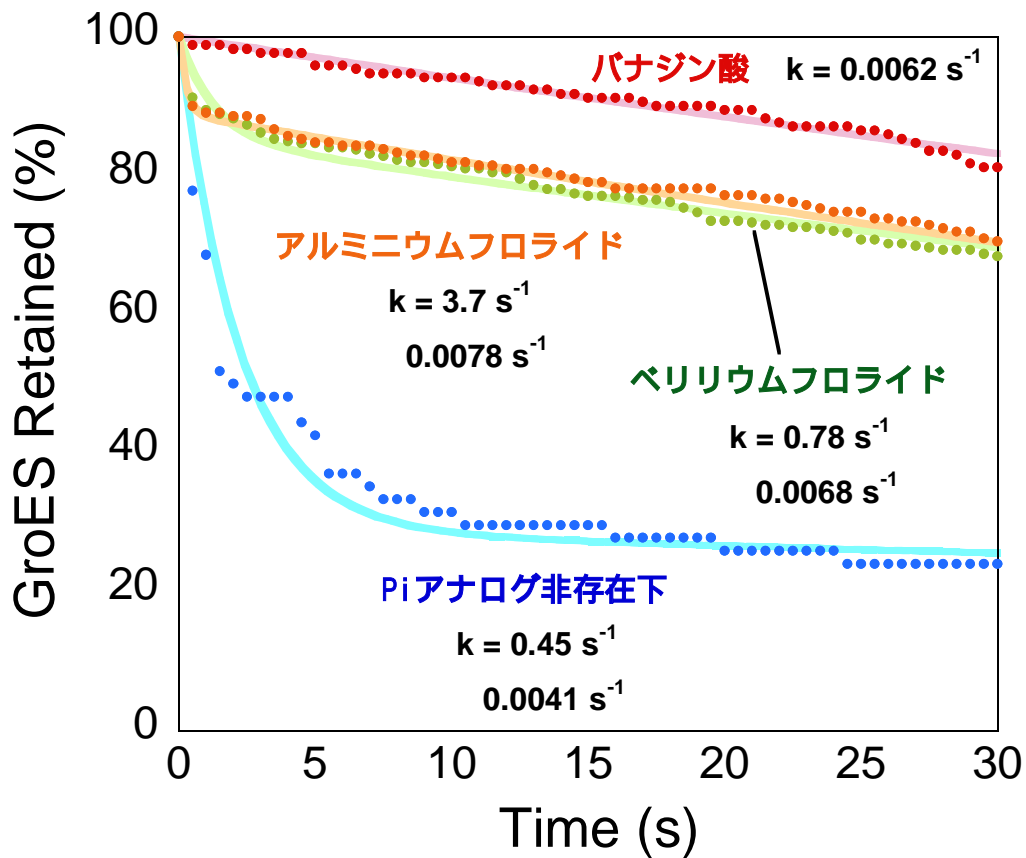


図 3-13 GroEL-GroES-ADP-Pi アナログ複合体の解離速度

あらかじめ作製した複合体をガラス基板に固定し、ATP を生成してから GroES が解離するまでの時間を測定した。時刻 0 秒で caged ATP から ATP を生成した。バナジン酸では、全ての複合体の解離速度が退色寿命と一致した。アルミニウムフロライドではほとんどの GroES が長時間結合していたが、全体の 11%の複合体は 1 秒以内で速く解離した。また、ベリリウムフロライドでは、全体の 15%が速く解離した。

一方、Pi アナログ非存在下では、70%の複合体が数秒で解離した。但し、バナジン酸以外は 2 個の指数関数の和で Fitting した。

第 4 章 GroEL・GroES 内部で起こる GFP 折れたたみの観察

4-1) 序文

第 3 章では、GroEL と GroES の結合・解離反応を 1 分子イメージングすることで未知の反応中間体の存在を明らかにした。この中間体の性質を明らかにするためには、GroEL 内部での基質タンパク質の状態をリアルタイムに検出する必要がある。本章では、基質タンパク質として GFP (緑色蛍光タンパク質) を用い、GFP が折れたたむ様子を 1 分子イメージングした。GFP は、シート構造で覆われた缶状をしており、その内部に蛍光団を形成している。このため、GFP の蛍光団は外部溶液の影響を受けにくく、一分子蛍光イメージングで特に問題になる活性酸素による退色速度の促進などはほとんど起こらない。また、野生型 GFP の性質を改善した変異体 S65T は、高い吸光係数 ($39,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) と量子効率 (~ 0.8) を有しており、一分子蛍光観察に耐えうる十分な条件を備えている。GFP は酸で変性させると蛍光を完全に失うが、中性条件に戻すことで再度自発的に折れたたんで蛍光を取り戻すことができる (Makino et al., 1997)。そこで、酸変性させた GFP を GroEL と結合させてガラス基板上に固定し、ATP と GroES を加えて GFP の蛍光が回復する様子を 1 分子イメージングした。その結果、GroEL 内部で起こる GFP 1 分子の折れたたみが観察され、その解析から、折れたたみが始まるのは GroES が結合して 3 秒後であることを明らかにした。

4-2) GroEL 変異体(D398A)内での GFP1 分子の折れたたみ

GroEL は、複合体内に捕捉している変性タンパク質の折れたたみ状態に関係なく、約 8 秒後には GroES を解離する。そのため、自発的な折れたたみに 30 秒近くを要する GFP では、折れたたんで蛍光を発する前に GroEL から放出されてしまい、ほとんどの GFP の折れたたみを観察することができない。そこで GroEL の変異体 (D398A) を利用した。この変異体は、ATP の加水分解能が野生型の約 50 分の 1 しかないため、約 30 分間も GroES を解離しないことが知られており、GroES を結合したあと変性タンパク質を複合体内に長時間保持することができる。

4-2-1) GroEL(D398A)-GroES 複合体の解離時間

D398A 変異体が GroES を長時間保持することを確かめるため、3-6)と同様の手法で Cy3-GroES の結合時間を測定した。実験に用いた GroEL は、D398A のほかに D490C の変異が導入されている (以降、EL398/490 とする)。まず、490 番目のシステインに IC5 と biotin を結合させた。この IC5-EL398/490 を、streptavidin を介してガラス面上に固定し、4 nM Cy3-GroES、1 mM Caged ATP、75 μ M rLA、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。

紫外線を照射して ATP を生成したところ、IC5-EL398/490 に Cy3-GroES が結合した。また、Cy3-GroES の解離曲線は、時定数 230 秒の単一の指数関数で Fitting できた (図 4-1)。この値はガラス基板上に直接固定した Cy3-GroES の退色寿命 (約 90 秒) より長く、報告されている通り長時間 GroES を結合していることが分かった。Caged ATP の影響を調べるためにコントロールとして IC5-EL490 を用いて

Cy3-GroES の結合・解離を観察したところ、2 mM ATP を用いた場合と同様に、8 秒以内にほとんどの GroES が解離した。

以上から、IC5-EL398/490 は ATP と GroES を結合後、少なくとも 230 秒間は複合体を保つことが確かめられた。

4-2-2) GFP 折れたたみの 1 分子蛍光イメージング

54 μ M GFP (S65T) を 0.1 N HCl 存在下、23 °C で 2 分間変性させた。次に、酸変性させた GFP を 400 nM IC5-EL398/490 を含む HKM buffer に最終 2 μ M になるよう希釈し、室温で 5 分間放置した。この複合体溶液を約 500 倍に希釈し、フローセルに流し込んでガラス面上に biotin 化 BSA、streptavidin を介して固定した。さらに、1 μ M GroES (nonlabel)、1 mM Caged ATP、75 μ M rLA、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。

紫外線を照射して ATP を生成すると ATP が GroEL に結合し、続いて GroES が GroEL に結合する。さらに GFP が GroEL 内部に落とし込まれて自発的に折れたたむことで蛍光を発すると期待される (図 4-2)。まず、赤レーザーを照射して IC5-GroEL が固定されている位置を確認した。青レーザーで GFP の蛍光を観察したところ輝点は全く観察されなかったが、紫外線を照射して ATP を生成すると、ガラス上に固定された IC5-GroEL の約 30% の位置に、次々と GFP の蛍光が現れた (図 4-3)。一方、GroES 非存在下で同様の実験をしたところ全く GFP の蛍光が現れなかったことから、GFP が GroEL-GroES 複合体の内部 (*cis* リング) で折れたたんだことが示された。これは、タンパク質 1 分子が折れたたむ様子をリアルタイムに観察した初めての例である。

本条件における GroEL-GFP 複合体への GroES の結合速度は、GroES の結合速度定数 ($3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) を用いて次のように計算された。

$$1 [\mu\text{M}] \times 3 \times 10^7 [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}] = 30 [\text{s}^{-1}]$$

従って、ATP を生成した後 0.1 秒以内にほとんどの GroEL-GFP 複合体に GroES が結合する。そこで、紫外線照射時刻から GFP の蛍光が現れるまでの時間を解析することで、GroES が結合してから GFP が折れたたむまでの時間のヒストグラムを作成した (図 4-4 a)。驚いたことに、GFP のヒストグラムは山型の分布を示した。これは、GroES 結合から GFP の折れたたみ終了までの間に、2 つの律速過程が存在することを示している (式 4-1)。



ヒストグラムを、式 4-1 を満たす方程式 (式 3-3) を用いて Fitting したところ、反応速度定数は $k = 0.31 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.034 \text{ s}^{-1}$ であった。 $k' = 0.034 \text{ s}^{-1}$ の過程が、GroEL 内部で自由になった GFP が自発的に折れたたむ過程であると考えられることから (Makino et al., 1997; 4-4 項)、GroEL へ GroES が結合してから 3 秒後に GFP が自由になり、自発的な折れたたみ (30 秒) を開始することが示唆された。

4-3) 野生型 GroEL 内での GFP1 分子の折れたたみ

EL398/490 を用いた実験により、GroEL 内部での GFP の折れたたみに 2 つの律速過程が存在し、最初の律速過程 (= 3 秒) では GFP の折れたたみが阻害されていることが分かった。しかし、EL398/490 は ATP 加水分解が遅く、野生型と機能的に大きく異なっているため、新たに見つかった 3 秒間の反応過程が変異体特有のものである可能性が残ってしまう。そこで、本項では野生型の活性を持つ EL490 内部で起こる GFP の折れたたみを 1 分子観察した。

4-3-1) Apyrase 存在下での GroES の解離時間

上述したように、EL490 は GFP が折れたたんで蛍光を発する前に GroES を解離してしまう。GroES の解離をできるだけ遅くするため、観察溶液に 25 units/ml の Apyrase を加え、紫外線により生成された ATP を数秒間で枯渇させた。ATP の枯渇は GroEL のトランス側への ATP 結合を妨げ、GroES の解離を遅らせると期待される (図 1-2)。本条件における GroES の解離速度を測定するため、IC5-EL490 をガラス基板に高密度で固定した後、1 μ M Cy3-GroES、1 mM Caged ATP、25 units/ml Apyrase、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。1 μ M Cy3-GroES 存在下では、高い背景光のため 1 分子の輝点を観察できないことから、画面上の平均蛍光強度の変化を指標に、Cy3-GroES の GroEL への結合量を測定した。紫外線を照射して Caged ATP から ATP を生成し、Cy3-GroES を GroEL にすばやく結合させた。GroES は紫外線照射後 0.1 秒以内に結合したが、EL398/490 のように完全には解離が抑えられず、ゆっくりと解離した (図は省略)。紫外線照

射から t 秒後に EL490 に結合している GroES の割合 y (GroES の残存率) は、2 つの指数関数の和で Fitting できた (式 4-2)。

$$y = 0.27\exp(-0.069 t) + 0.73 \exp(-0.0033 t) \quad \dots \text{式 4-2}$$

次項 4-3-2)で行われる EL490 内での GFP の折れたたみ観察でも、式 4-2 と同じ速度で GroES が解離すると予想される。本論文では、式 4-2 をもとに蛍光を発する前に放出された GFP の量を逆算し、GroEL-GroES 複合体の内部に落としこまれた全ての GFP に対するヒストグラムを作成した。

4-3-2) GFP 折れたたみの 1 分子蛍光イメージング

4-2-2)と同様に EL490 と酸変性 GFP の複合体を作製したあと、EL490-GFP 複合体をフローセルに流し込んでガラス面上に固定し、11 μ M GroES(nonlabel)、1 mM Caged ATP、25 units/ml Apyrase、酸素除去系を含む観察溶液でフローセルを満たした。ガラス基板に固定されている IC5-EL490 と GFP 複合体の位置を確認した後、紫外線を照射したところ、IC5-EL490 のうち約 25% に GFP の蛍光が現れた。一方、Apyrase 非存在下で同様の実験を行ったところ、ほとんど輝点が現れなかった。Apyrase 存在下での GFP の折れたたみに要する時間のヒストグラムは、EL398/490 で行った実験と同様に山型になった。しかし、EL398/490 に比べて全体が短めにシフトしていた (図 4-4 b)。これは、EL490 から徐々に GroES が解離してしまうため、ゆっくりと折れたたむ GFP ほど蛍光を発する前に放出されてしまうからである。そこで、3-4-1)項で求めた GroES の残存率 (式 4-2) を用いてヒストグラムを

補正し、そのヒストグラムを積分した (図 4-4 b, *inset*)。式 3-5 で Fitting すると、反応速度定数はそれぞれ $k = 0.34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.029 \text{ s}^{-1}$ となった。以上から、GFP は野生型 GroEL 内部でも、EL398/490 と同様に約 3 秒と 30 秒の 2 つの律速過程を経て折れたたむことが明らかになった。

4-4) 多分子観察系で見られる GFP の折れたたみ

一分子蛍光イメージング法で得られた結果を追試するため、生化学的手法を用いて GFP の折れたたみ時間を測定した。これまでも GroEL による GFP の折れたたみ経路についての先行研究はあったが (Makino et al., 1997)、1 分子蛍光イメージングにより発見された初期の短い反応 (寿命 3 秒) に注目した解析はされていなかった。本項の実験は、共同研究者である田口英樹氏によって行われ、筆者は結果の解析を担当した。

予め酸変性させた $40 \mu\text{M}$ GFP (S65T) を、 150 nM EL490、 $1.5 \mu\text{M}$ GroES、 5 mM DTT を含む溶液で 400 倍に希釈して室温で 15 分間放置し、EL490-GFP 複合体を作製した。続いて、ATP を最終 0.45 mM になるよう加えることで、シャペロニン依存的な GFP の折れたたみを開始させ、この溶液の蛍光強度変化を測定した (図 4-5 a)。ATP 添加後からのシャペロニン依存的な GFP の折れたたみには、数秒のラグが観察された (図 4-5 b)。これは、図 4-4, *inset* と同じ形状をしており、2 段階の反応として Fitting できる。その結果、反応速度定数は $k = 0.35 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.038 \text{ s}^{-1}$ となり、一分子蛍光イメージング法で得られた値とほぼ一致した。

続いて、GroEL 変異体である D398A (以後、EL398 とする)、片側のリングしか持たない Single Ring GroEL (以後、SR1 とする) を用いて GFP の折れたたみを観察した。これらの変異体は、GroES を結合したまま解離しないため、折れたたんだ GFP を GroEL-GroES 内部に長時間保持する (Weissman et al, 1995)。GFP の折れたたみを観察したところ、これらの変異体でも 2 つの律速過程が観察され、反応速度定数はそれぞれ $k = 0.35, 0.30 \text{ s}^{-1}$ および $k' = 0.040, 0.037 \text{ s}^{-1}$ となった (図 4-5 c)。

一方、GroEL、GroES を含まない溶液で酸変性 GFP を希釈し、自発的な

GFP の折れたたみを観察した。その結果、GFP の自発的な折れたたみには数秒のラグが観察されず、グラフは単一の指数関数 ($k = 0.032 \text{ s}^{-1}$) で Fitting された (図 4-5 b)。以上から、GroEL 内部で起こる GFP の折れたたみ過程には、自発的な折れたたみ過程 (30 秒) 以外に、GroEL に依存的な反応過程 (3 秒) が存在することが分かった。このことは、GroES が結合してから 3 秒間は GFP の折れたたみが抑えられていることを示している。

GFP の折れたたみが妨げられるのは、GFP が GroEL-GroES 複合体の内部で自由になっておらず、何らかに結合しているためである可能性が高い。例えば、GroEL に GroES が結合した後も GFP が内部空洞に開放されず、3 秒間 GroEL の縁にある疎水部位に捕捉されたまま残っているのかも知れない。

この仮説にのっとれば、GroES と GFP がどちらも GroEL に結合している状態が、3 秒間も安定に存在することになる。すなわち、GFP が GroEL 内に落とし込まれて自由なるのは、GroES が結合してから 3 秒後であり、基質タンパク質が折れたたみを進行させることができると言われる *cis-ATP* complex 状態は、GroES 結合直後ではなく、3 秒後に形成されることになる。以上から、GroES と基質タンパク質が同時に GroEL に結合している状態を *cis-ATP** complex と名づけ、図 4-6 のモデルを提案した。

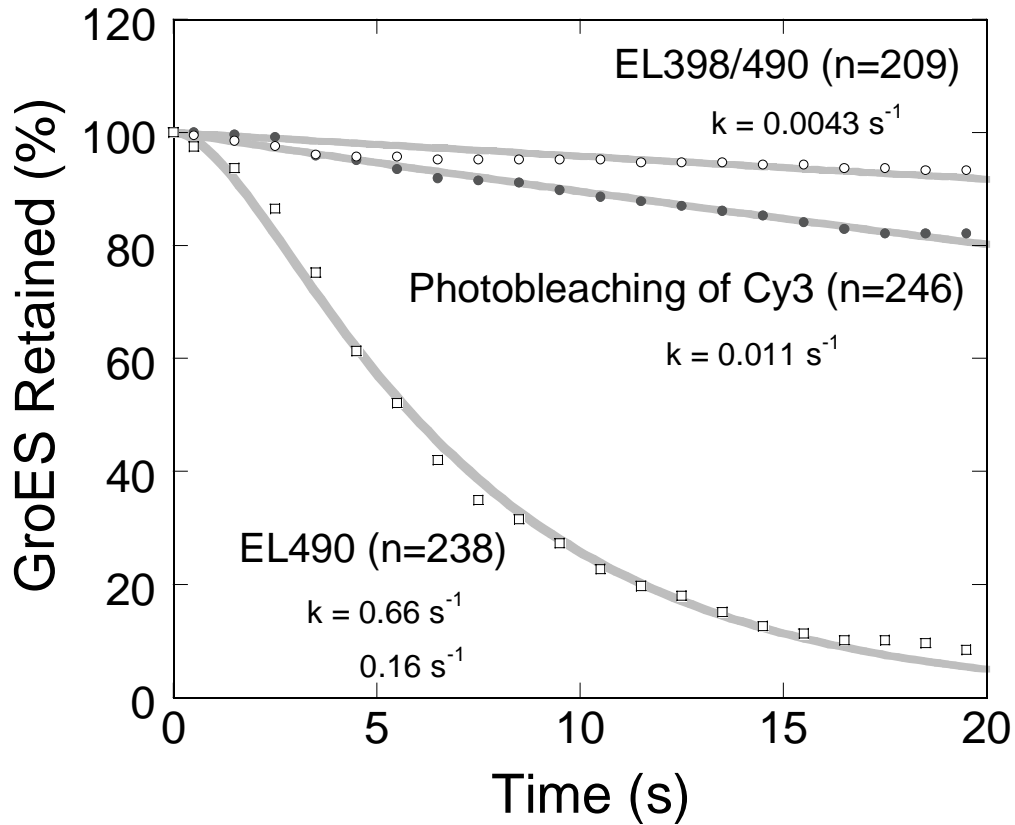


図 4-1 Caged ATP 存在下での Cy3-GroES の解離曲線

EL398/490 からの Cy3-GroES の解離時間 (230 秒) は、ガラス面上に固定した Cy3-GroES の退色時間 (90 秒) より長く見積もられた。この原因として、Cy3-GroES が EL398 に結合したことにより Cy3 の環境が変わり、溶液中の酸素分子から守られることで退色寿命が延びた可能性があげられる。2段階反応を仮定した式 3-5 により Fitting した結果、 $k = 0.66 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.16 \text{ s}^{-1}$ が得られた。2mM ATP 存在下で得られた反応速度定数 ($k = 0.34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.18 \text{ s}^{-1}$) と少し異なっているが、これは、局所的に生成した ATP がブラウン運動により拡散して ATP 濃度が減少したためと考えられる。

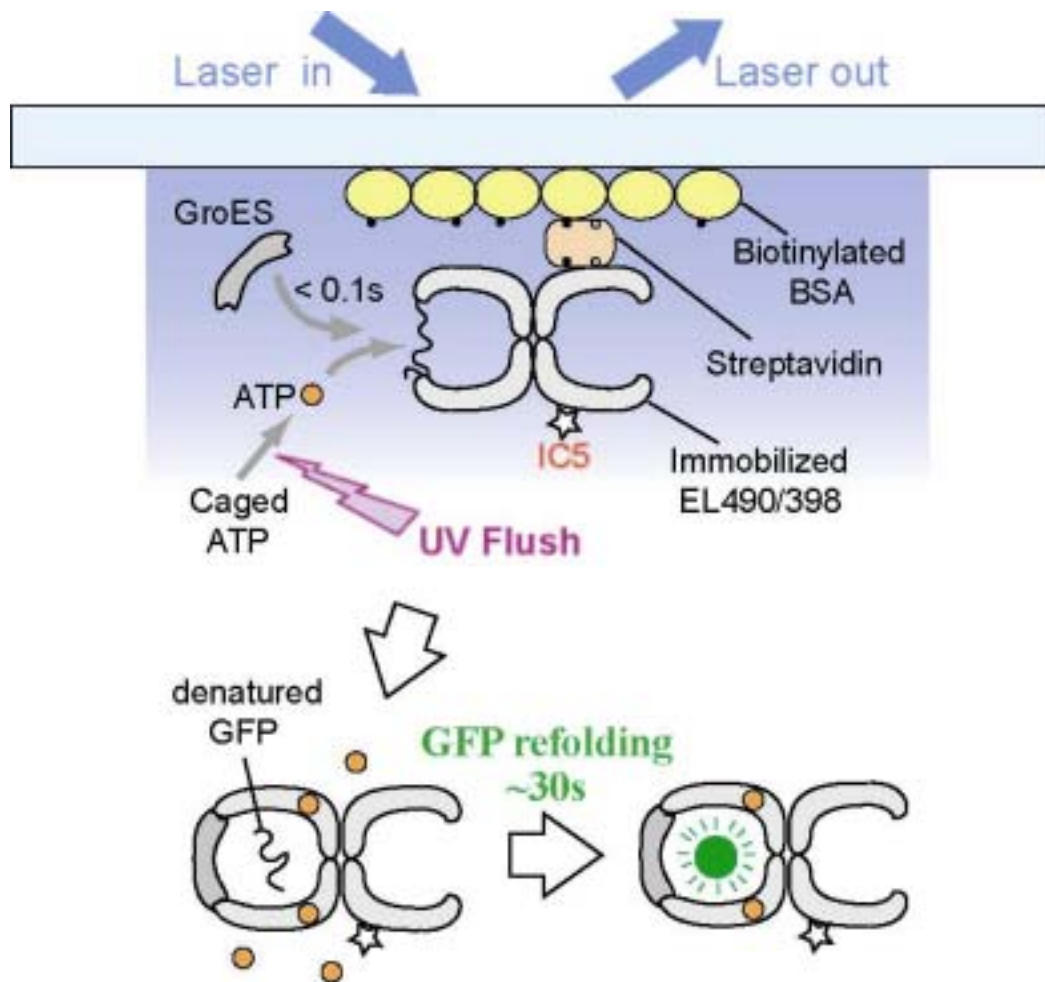


図 4-2 GFP 折れたたみの観察方法

あらかじめ酸変性 GFP と EL398/490 の複合体をガラス面上に固定した。紫外線を照射すると ATP が生成されて GroEL に結合し、0.1 秒以内に GroES が結合する。その後 GFP は GroEL 内部に落としこまれ、自発的に折れたたんで蛍光を発する。

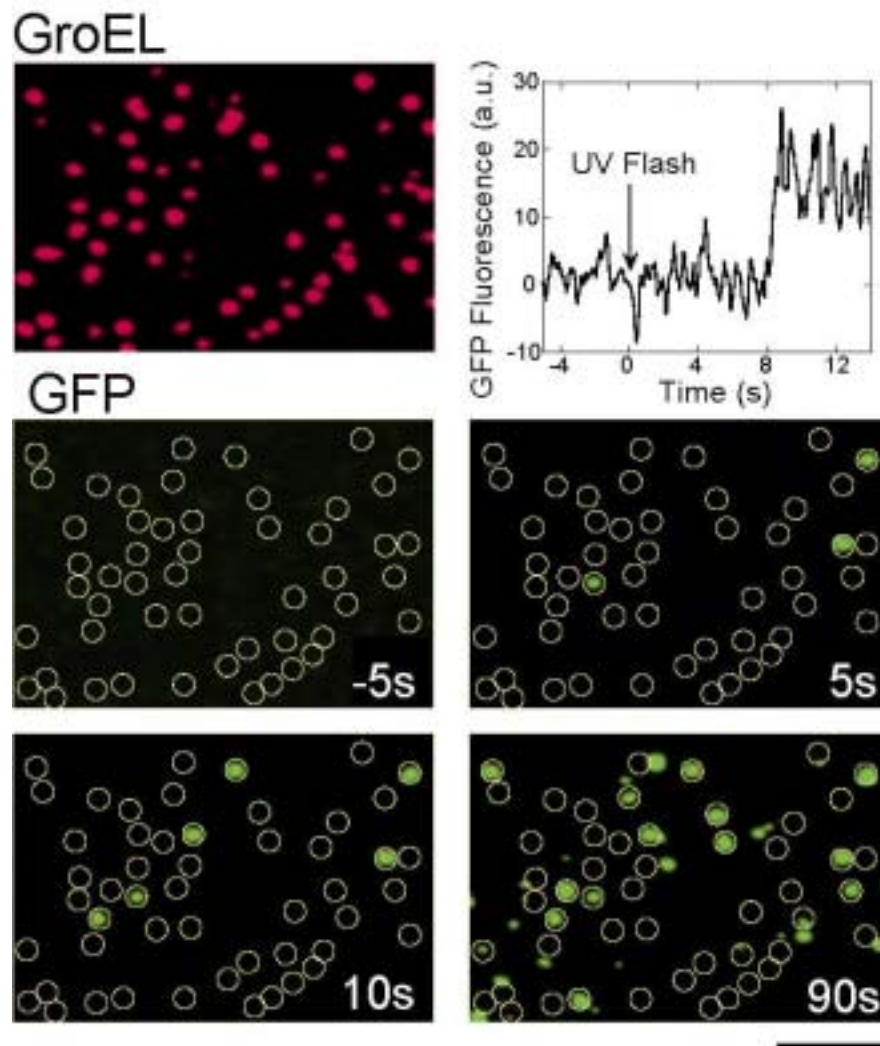


図 4-3 EL398/490 内部で折れたたむ GFP の蛍光像

IC5- EL398/490 が固定されている位置を確認後 (GroEL)、青レーザーで GFP の蛍光を観察した (GFP)。GroEL の位置を黄色の円で示した。紫外線を照射すると、GroEL の位置に次々と GFP の輝点が現れた。右上図に現れた輝点の一例を示す。蛍光を発する GFP は約 10 秒で退色してしまうため、現れた GFP の輝点を重ね合わせることで上の蛍光像を作成した。黄色の円以外の場所に現れた輝点は、無標識の GroEL 内部で折れたたんだ GFP の蛍光であると考えられる。右下の直線は $5\ \mu\text{m}$ 。

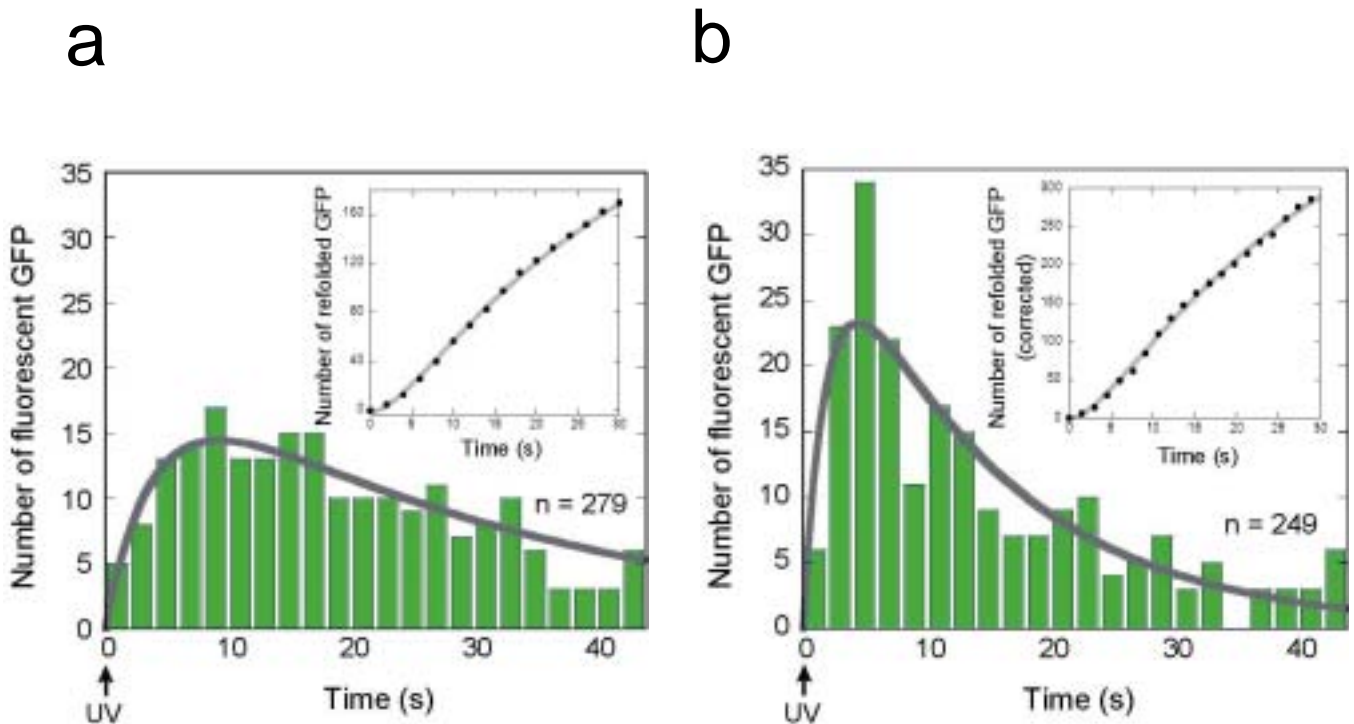


図 4-4 GFP の折れたたみに要する時間のヒストグラム

a. IC5-EL398/490 内部での GFP の折れたたみに要する時間のヒストグラム。

このヒストグラムを、図 3-12 で示した解離曲線の作成法を用いて積分し、さらに正負の符号を逆にした曲線を *inset* に示す。このグラフは、時間が経つごとに GFP の輝点数が増えていく様子を示す。

b. IC5-EL490 内部での GFP の折れたたみに要する時間のヒストグラム。緑

の棒グラフで表したヒストグラムは、GroES の解離時間を補正する前のデータであり、図 4-4 a より左にシフトしている。*Inset* に、補正後の積分曲線を示した。式 3-5 で Fitting したところ、反応速度定数 $k = 0.34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.029 \text{ s}^{-1}$ が得られた。

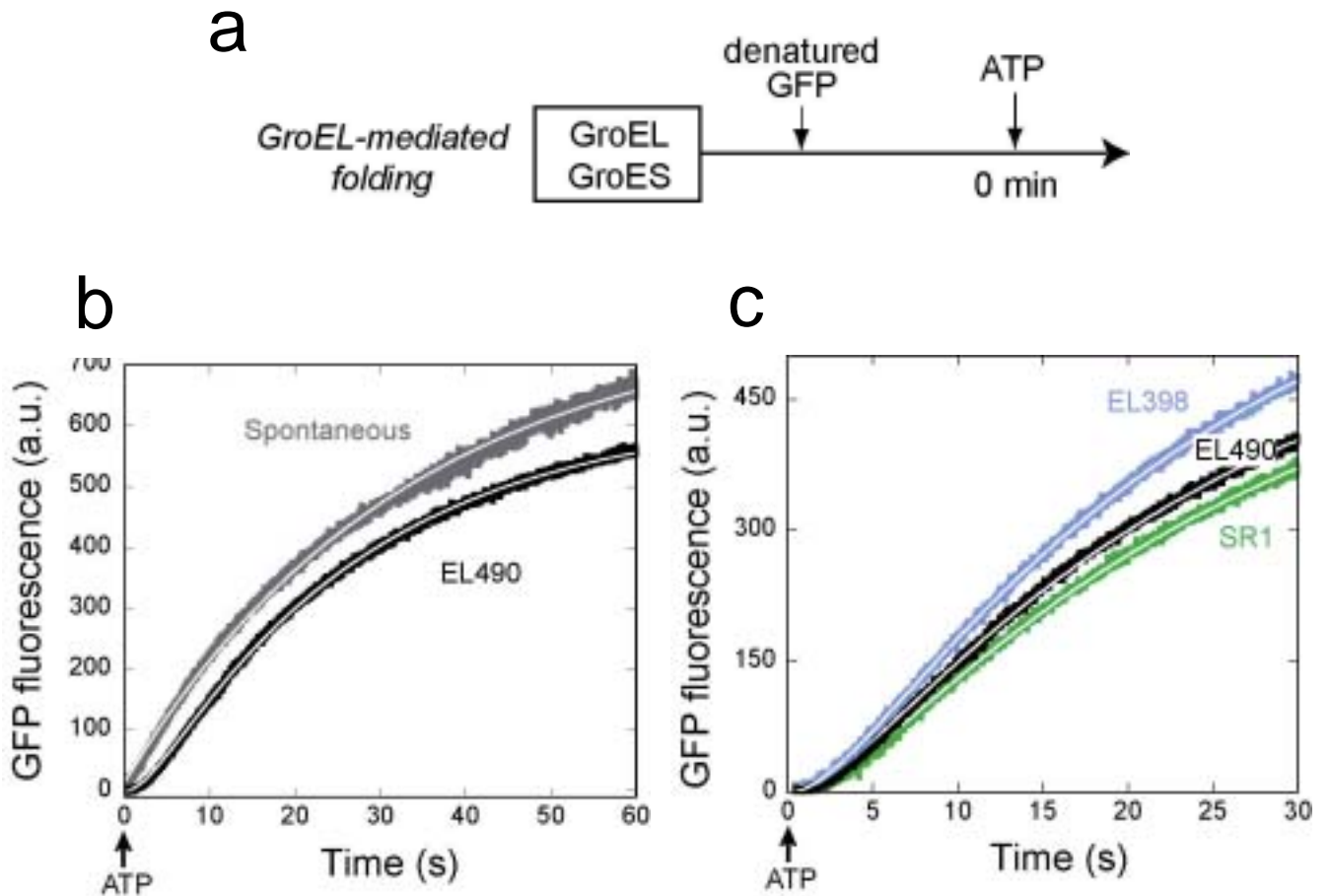


図 4-5 多分子観察系での GFP の折れたたみ

a. GroEL 依存的な GFP 折れたたみの測定方法。GroEL、GroES を含む溶液で酸変性 GFP を希釈し、GroEL-GFP 複合体を作製する。15 分後、励起光 475 nm、蛍光 515 nm で測定しながら ATP を混入する。

b. c. 多分子系での GFP 折れたたみ測定結果。GFP の折れたたみに伴う蛍光の増加を蛍光分光光度計によって測定した。シャペロニン非存在下での GFP の自発的な折れたたみは、 $k = 0.032 \text{ s}^{-1}$ の 1 段階の反応であった (Spontaneous)。一方、EL490 に依存的な GFP 折れたたみには、初めの数秒間ラグが観察され、反応速度定数は $k = 0.35 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.038 \text{ s}^{-1}$ の 2 段階反応として Fitting された。また、EL398、SR1 に依存的な GFP の折れたたみも 2 段階反応として Fitting され、反応速度定数はそれぞれ $k = 0.35, 0.30 \text{ s}^{-1}$ および $k' = 0.040, 0.037 \text{ s}^{-1}$ となった (田口氏のデータを引用)。

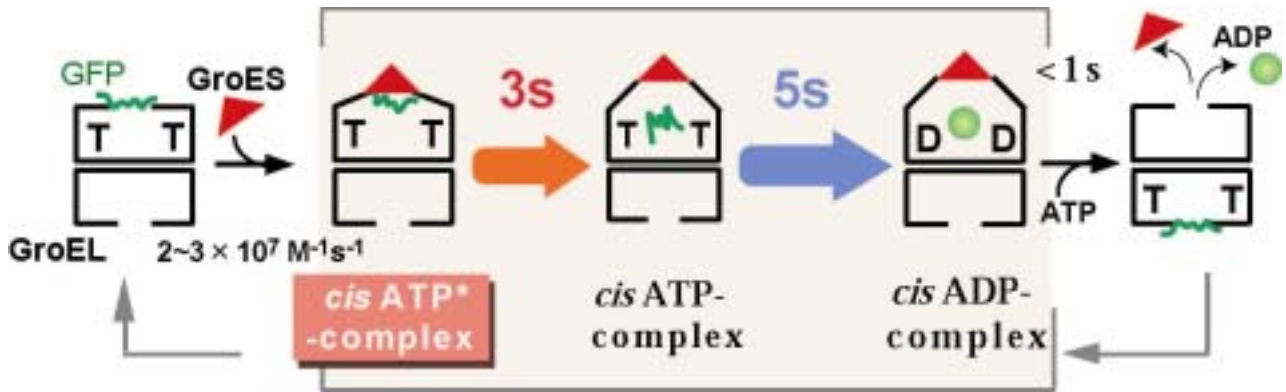


図 4-6

3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程を持つ GroEL 反応サイクルモデル。
 変性タンパク質を結合した GroEL は、ATP 存在下で GroES を結合して、*cis*-ATP*-complex になる。この状態では GFP の折れたたみが抑制されている。3 秒後、GFP は GroEL 内部へ落としこまれて *cis*-ATP complex になる。D398A 変異体の場合でも、3 秒後に GFP が GroEL の内部に落とし込まれて折れたたみを開始するが、ATP 加水分解が起こらないため、*cis*-ATP complex 状態で長時間保持される。ATP 加水分解が起こると *cis* ADP-complex となり、この複合体のトランス側に別の変性タンパク質と ATP が結合する。それが引き金となり、シス側の GroES、GFP、ADP が放出される。

第 5 章 第一律速反応の温度依存性の解析

5-1) 序文

ここまでに、1 分子蛍光イメージング法を用いて GroES の結合解離過程が約 3 秒・5 秒の 2 つの反応から構成されていること、また、GroEL に結合した酸変性 GFP は、GroES が結合した後の 3 秒間、折れたたみが抑制されていることを明らかにした。この結果は、GroES と変性タンパク質が同時に GroEL に結合している新たな反応中間体 *cis-ATP** complex (寿命 3 秒) が存在することを示唆している。しかし、GroES 結合解離反応の第一律速過程 (約 3 秒) と GFP 折れたたみ阻害時間 (約 3 秒) の時定数の一致は、単なる偶然かもしれない。本章では、測定温度を変えて両方の反応時間を測定することで、それらの温度依存性に相関があるかどうか調べた。その結果、どちらの反応時間も、温度の上昇に伴って反応速度が高くなり、どの温度でもほぼ等しいことが明らかになった。この事実から、GFP の折れたたみ阻害反応が GroEL により制御されており、反応サイクルと密接に関わっていることが示唆された。

5-2) 第一律速過程の反応速度定数 k の温度依存性

第 3 章で行った GroES の結合・解離を 3 つの異なる温度で観察した。酸変性 GFP を基質タンパク質として用いた場合、30 秒で自発的に折れたたんで Native 状態になってしまうため、一定条件で観察できない。そこで、Pepsin を基質タンパク質として用いた。3-4)項で述べたように、GroES の”on-time”に見られる 2 つの律速過程の反応速度定数は、4 種類の変性タンパク質で $k = 0.26 \sim 0.34 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.18 \sim 0.24 \text{ s}^{-1}$ とほぼ一定であった。このことから、どのような基質タンパク質を用いた場合も、得られる 2 つの反応速度定数に大きな違いはないと考えられる。

3-3)項の手法を用いて”on-time”のヒストグラムを作成したところ、どの温度においても 2 段階反応を示す山型の分布が得られた (図 5-1)。18、23、28 での反応速度定数は、それぞれ $k = 0.19, 0.33, 0.44 \text{ s}^{-1}$ 、 $k' = 0.86, 0.14, 0.21 \text{ s}^{-1}$ と大きくなった。

続いて、第 4 章で行った GFP の折れたたみを 3 つの異なる温度で観察した。EL398/490、EL490 内で GFP 折れたたみを 1 分子蛍光イメージングし、全ての温度において山型の分布を得た。それらの積分曲線を式 3-5 で Fitting した結果、18、23、28 での折れたたみ阻害過程の反応速度定数 k は、それぞれ $k = 0.14, 0.31, 0.51 \text{ s}^{-1}$ (EL398/490; 図 5-2 a)、 $k = 0.17, 0.34, 0.50 \text{ s}^{-1}$ (EL490) となり、GroES の”on-time”から得られた速度定数 k とほぼ一致した (図 5-2 b)。さらに、蛍光分光光度計を用いた EL398 に依存的な GFP の折れたたみ解析でも、反応速度定数 $k = 0.20, 0.27, 0.44 \text{ s}^{-1}$ が得られた (図 5-2 b)。

以上の結果は、GroES の結合解離反応における第一律速過程と GFP の折れたたみ阻害過程に関連があることを示唆しており、*cis*-ATP* complex は GroEL の反応サイクル全体を制御する重要な反応中間体であると考えられる。

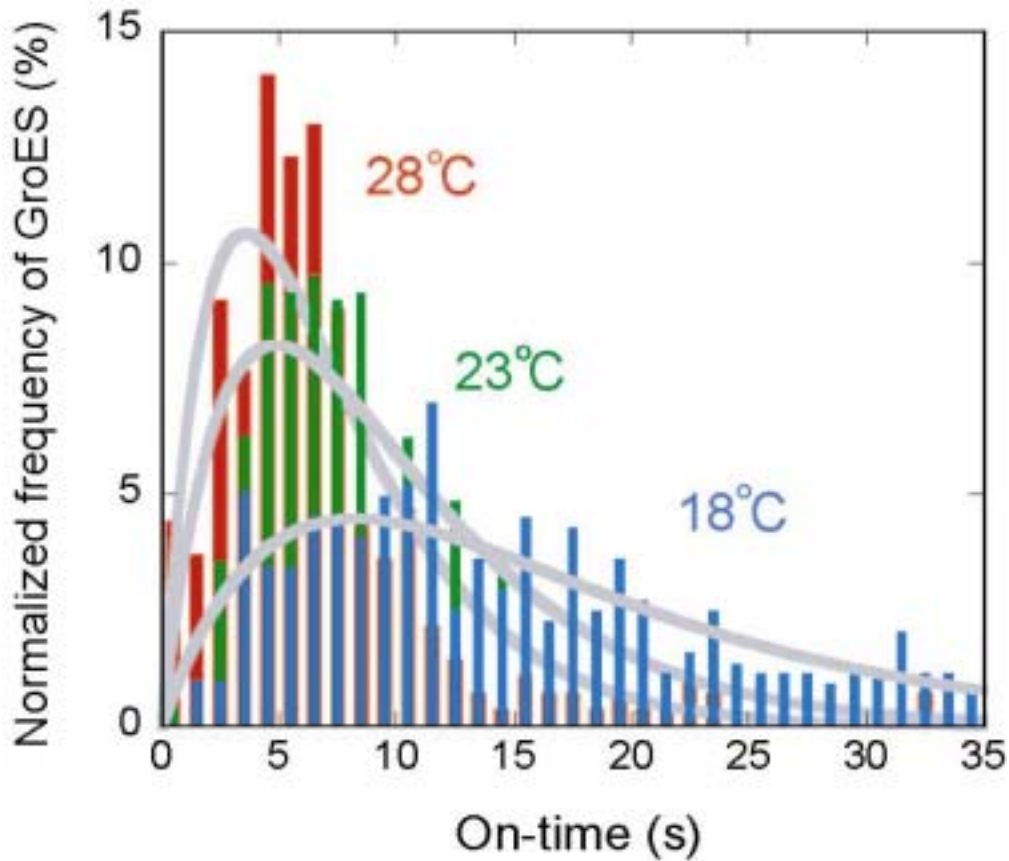


図 5-1 18、23、28 における GroES の”on-time”のヒストグラム

変性タンパク質として、75 μ M Pepsin を用いた。どの温度でも 2 段階反応を表す山型のヒストグラムが得られた。比較のため、”on-time”の全イベント数を 100%として正規化した。それぞれのヒストグラムを式 3-3 で Fitting したところ、18、23、28 での反応速度定数は、それぞれ $k = 0.19$ 、 0.33 、 0.44 s^{-1} 、 $k' = 0.86$ 、 0.14 、 0.21 s^{-1} であった。

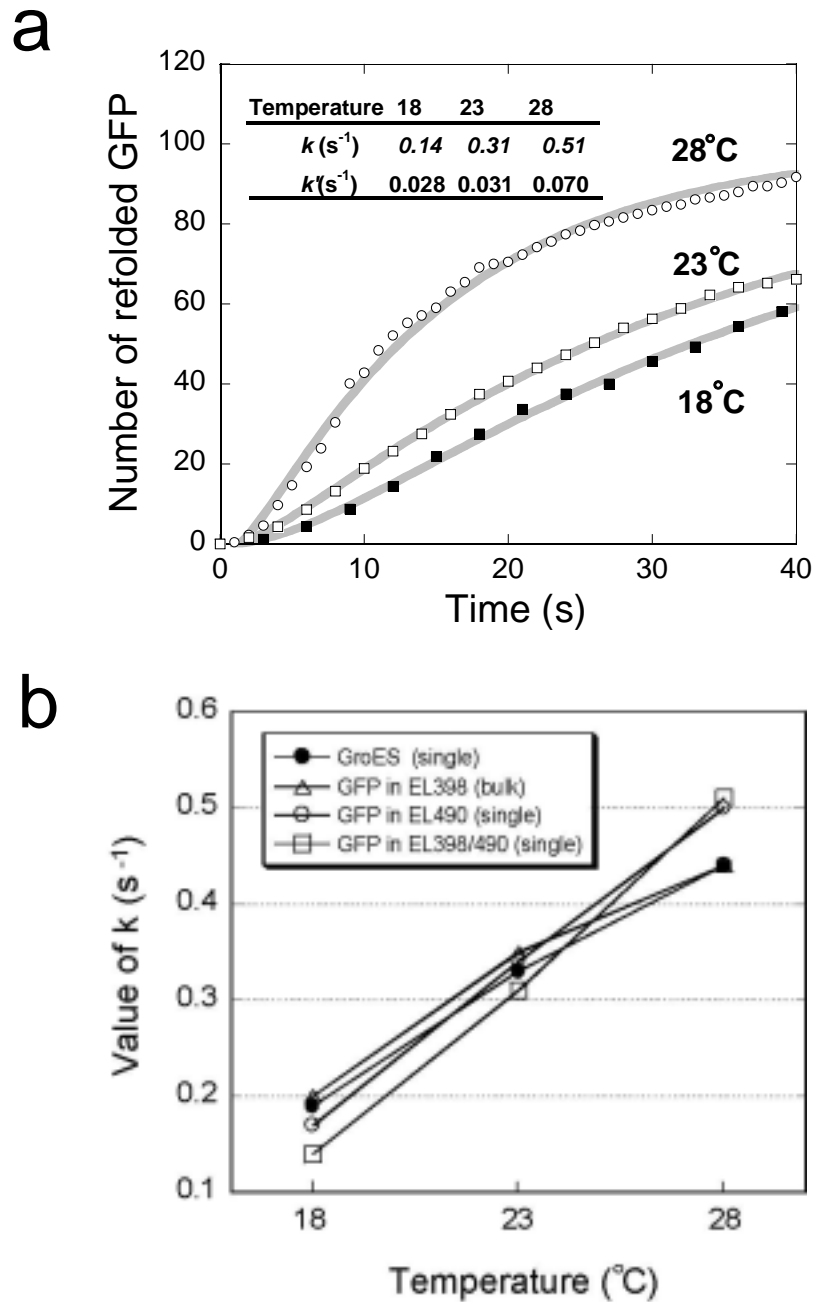


図 5-2 GFP の折れたたみ時間の温度依存性

- a. 18、23、28 における EL398/490 内での GFP 折れたたみ速度。ヒストグラムの積分曲線を表す。温度が上昇するにつれ、GFP の折れたたみ速度が上昇した。
- b. GroES の on-time 解析と GFP 折れたたみ反応解析から求めた第一律速過程 k の温度依存性。4 つの独立した実験から求めた第一律速過程 k の値は、どの温度においても一致した。

第 6 章 GroEL 内部で起こる基質タンパク質の運動解析

6-1) 序文

GroEL は 2 つの律速反応を用いてタンパク質の折れたたみサイクルを制御しており、第一律速過程では GFP の折れたたみが阻害されていることが分かった。しかし、この現象が GFP に特有なもので、それ以外の基質タンパク質では成り立たない可能性も否定できない。この疑問に答えるためには別の基質タンパク質で折れたたみを検出する必要があるが、GFP のように数秒から数十秒の範囲で折れたたみが起こり、かつ折れたたむ瞬間を検出できる基質タンパク質は、他に例がない。そこで、GroEL 内部での基質タンパク質の運動を検出し、GFP と他のタンパク質が同じ運動を行っているかを調べることにした。Malate Dehydrogenase (MDH) は、折れたたみに GroEL・GroES・ATP の全てを必要とすることから、GroEL の基質タンパク質のモデルとして頻繁に利用されている (Peralta et al., 1994; Chen et al., 2001)。本章では、GroEL の縁部分と基質タンパク質との間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動を利用することで、GFP と MDH の GroEL 内部での運動を検出し、両者を比較した。その結果、GroEL-GroES 内部での GFP と MDH の運動は、時間的、空間的に共通していることが明らかになった。また、両者に共通に見られた第一、第二律速反応の合計時間が約 3 秒であり、GFP の折れたたみ阻害時間とよく一致したことから、GFP だけでなく MDH も 3 秒間折れたたみが阻害されていることが示唆された。

6-2) 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理

励起されて高エネルギー状態にある蛍光色素 (ドナー) から、数 nm 近傍にある別の蛍光色素 (アクセプター) にエネルギーが移動する現象を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と呼ぶ。FRET は数 nm 程度の距離変化に敏感で、生体分子の構造変化検出などに広く利用されている (Zhuang et al., 2000 & 2002; Schuler et al., 2002; Lipman et al., 2003)。ドナーからアクセプターに移動するエネルギーの割合 (FRET 効率: E) は式 6-1 のように定義される (Wu and Brand, 1994)。

$$E = 1 - F_{D(+ \text{ acceptor})} / F_{D(- \text{ acceptor})} \quad \dots \text{式 6-1}$$

ただし

- $F_{D(+ \text{ acceptor})}$: アクセプター存在下でのドナーの蛍光強度
- $F_{D(- \text{ acceptor})}$: アクセプター非存在下でのドナーの蛍光強度

また、 $E = 0.5$ となる時の色素間の距離をフェルスター距離 (R_0) と呼び、FRET 効率 E と色素間の距離 R との間に次の関係が成り立つ。

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad \dots \text{式 6-2}$$

ただし

- $R_0^6 = 8.785 \times 10^{-5} \kappa^2 \phi_D n^{-4} J \quad [\text{\AA}^6] \quad \dots \text{式 6-3}$
- $J = \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) d\lambda / \int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda \quad [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{nm}^4]$
- κ^2 : 配向因子
- ϕ_D : Donor の量子効率
- n : 溶媒の屈折率

- $\epsilon_A(\lambda)$: 波長 λ での Acceptor のモル吸光係数 [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
- $F_D(\lambda)$: 波長 λ での Donor の発光量

ドナー、アクセプターとしてそれぞれ Cy3 と IC5 を用いた場合のフェルスター距離は、式 6-3 を用いて計算することができる。まず、BodipyFL の蛍光スペクトルと IC5 の吸収スペクトル (図 6-1 a) を用いて J を求めたところ、 5.9×10^{14} となった。水溶液中での BodipyFL の量子収率 ϕ_D を 1、 $n = 1.33$ 、 $k^2 = 2/3$ とすると、 $R_0 = 4.7 \text{ nm}$ と求められた。また、Cy3 と IC5 を用いた場合のフェルスター距離は、水溶液中の Cy3 の量子収率 ϕ_D を 0.15 とした場合、 $R_0 = 4.9 \text{ nm}$ となった。

ドナーとアクセプター間の距離が R_0 程度離れている場合、FRET 効率はわずかな距離の変化に対して敏感に変動する (図 6-1 b)。GroEL の空洞内部が直径 4 nm の球状であることから、GroEL 内部で運動する基質タンパク質をモニターする上で、約 5 nm のフェルスター距離を持つ Cy3-IC5、BodipyFL-IC5 の組み合わせは最適であると考え、本章での FRET の検出に用いた。

6-3) タンパク質の調製

Rye らは、GroEL の縁にある 315 番目のアミノ酸をシステインに置き換え（以降、EL315 とする）そこにドナーとなる蛍光色素を結合させた。さらに GroES（98C）にも別の蛍光色素を結合させ、両者間で FRET させることで GroEL と GroES の結合解離反応を解析した（Rye et al., 1999）。

本章ではこの手法を応用し、EL315 の縁辺部（apical domain）と基質タンパク質間の距離変化の検出を試みた（図 6-2）。まず、第 2 章 2-1-1)項に従って EL315 を精製し、蛍光色素 IC5-maleimide を結合させた。その結果、片側リングあたり 1.4 個の IC5 を結合した IC5-EL315 を得た。この IC5-EL315 の活性は、GFP の折れたたみ介助効率および ATP 加水分解能で共に野生型 GroEL と同等の活性を示した。一方、基質タンパク質として GFP(S65T)に Cy3-NHS を、MDH に BodipyFL-SE を共有結合させ、Cy3-GFP(ラベル率 36%)と BodipyFL-MDH(ラベル率 25%; 以降、FL-MDH とする)を得た。Cy3 と BodipyFL は基質タンパク質のアミノ基に結合させているため、どのアミノ酸に結合しているかは未確認である。Cy3-GFP、FL-MDH とともに未変性のまま保存し、実験ごとに変性させて EL315 と複合体を作らせた。

6-4) ストップフローを用いた FRET 効率変化の測定

FRET 効率の測定は、ドナーの蛍光強度変化を指標に蛍光分光光度計 (FP-6500, JASCO, Japan) に、2 溶液を高速で混合可能なストップフロー装置 (RX2000, Applied Photo Physics, UK) をつないで行った。この装置の混合に要する不感時間は 0.07 秒であった。ドナーである Cy3 の蛍光強度を測定するため、540 nm の波長で励起して 565 ~ 575 nm の蛍光を検出した。また、BodipyFL の蛍光強度を測定する場合は、475 nm の波長で励起して 507.5 ~ 512.5 nm の蛍光を検出した (図 6-1 a)。

6-4-1) GroEL 内部での GFP の運動

まず 8.3 μ M Cy3-GFP を 0.1N HCl 内で 3 分間変性させ、100 nM IC5-EL315、5 mM DTT を含む溶液で最終 50 nM になるよう希釈した。室温で 5 分間放置して複合体を形成させた後、さらに 3 μ M GroES を加えてストップフロー装置のシリンジに入れた。もう一方のシリンジには、2 mM ATP、1 μ M 尿素変性 MDH、5 mM DTT を入れ、2 つの溶液を高速で混合しながら Cy3 の蛍光強度を測定した。1 μ M 尿素変性 MDH は、一度 GroEL から解離した Cy3-GFP が再度 GroEL に結合するのを防ぐために加えた。混合後、Cy3 の蛍光強度は始めすばやく上昇し、数秒間安定になった後、再び数秒で上昇する 3 段階反応を経て変化した (図 6-3 a, +ES(+acceptor))。しかし、この蛍光強度変化は、FRET の影響だけでなく Cy3 自身の環境変化により起きた可能性がある。そこで、アクセプターを結合していない EL315 を用いて全く同じ実験を行うことで、Cy3 自身の環境変化が蛍光強度に与

える影響を測定した (図 6-3 a, +ES(-acceptor))。Cy3 の蛍光強度はアクセプター存在下と同じ 3 段階の反応過程を経て変化したが、逆に減少した。式 6-1 から分かるように、これらのグラフの比をとることで Cy3 自身の環境変化を取り除き、正確な FRET 効率を算出することができる。ただし、式 6-1 は各時刻において成り立つが、あくまで多数の Cy3-GFP-IC5-EL315 複合体内の反応を平均して観察しているため、その時刻における様々な FRET 効率が平均されていることに注意する必要がある。

両者のドナーの蛍光強度比をとり、その時間変化をグラフ化したところ、やはり 3 段階の反応過程を経て FRET が解消された (図 6-3 b)。それぞれの反応速度定数を k_1 、 k_2 、 k_3 (s^{-1})、3 段階反応の各状態での Relative intensity を D_1 、 D_2 、 D_3 、 D_4 (%) とすると、この反応は、

$$\begin{array}{ccccccc} D_1 & & D_2 & & D_3 & & D_4 & \dots \text{式 6-4} \\ & & k_1 & & k_2 & & k_3 & \end{array}$$

と表され、各時刻における溶液全体の Relative Intensity (y) は、

$$\begin{aligned} y = & D_4 + (D_1 - D_4) \exp(-k_1 t) + (D_2 - D_4) k_1 / (k_1 - k_2) [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)] \\ & + (D_3 - D_4) k_1 k_2 / (k_1 - k_2) / (k_2 - k_3) / (k_1 - k_3) [(k_2 - k_3) \exp(-k_1 t) \\ & - (k_1 - k_3) \exp(-k_2 t) + (k_1 - k_2) \exp(-k_3 t)] \end{aligned} \quad \dots \text{式 6-5}$$

となる。GroES の "on-time" のヒストグラムを表す式 3-3 とは異なり、式 6-5 は D_2 、 D_3 などの各中間状態の情報を含むため、 k_1 、 k_2 、 k_3 の反応過程の順序を確定することができる。式 6-5 を用いて Fitting したところ、 $k_1 = 2.1 s^{-1}$ 、 $k_2 = 0.33 s^{-1}$ 、 $k_3 =$

0.30 s^{-1} 、 $D_1 = 39\%$ 、 $D_2 = 55\%$ 、 $D_3 = 36\%$ 、 $D_4 = 90\%$ が得られた。

ここで、2 段階反応が観察されたこれまでの結果(図 4-6)と比較する。FRET で見られた 3 段階反応のうち 1 番目の過程 (0.5 秒) は非常に短いため、2 番目の過程 (3 秒) と共に、折れたたみ阻害過程 (約 3 秒) に含まれて解析されていたと考えられる。さらに、FRET で見られた 3 番目の過程 (3 秒) は GroEL 内部空洞から外部溶液への放出とみられる。図 4-6 の第二律速過程 (5 秒) と FRET で見られた 3 番目の過程 (3 秒) で時定数が異なる原因は不明であるが、解離した Cy3-GFP の再結合があるのかもしれない。

一方、GroES 非存在下では反応速度定数 $k = 0.13 \text{ s}^{-1}$ の単一の指数関数で Fitting されたことから (図 6-3 b)、GroES 非存在下では、複数の反応過程は観察されず、GFP-GroEL 複合体がランダムに解離することが分かった。

6-4-2) GroEL 内部での MDH の運動

Cy3-GFP と同様に、FL-MDH を用いて IC5-EL315 との FRET 効率の変化を測定した。まず $2 \mu\text{M}$ FL-MDH を 6.4M 尿素内で 30 分間変性させ、 100 nM IC5-EL315、 5 mM DTT を含む溶液で最終 50 nM になるよう希釈した。室温で 5 分間放置して複合体を形成させた後、さらに $3 \mu\text{M}$ GroES を加えてストップフロー装置のシリンジに入れた。もう一方のシリンジには、 2 mM ATP、 $1 \mu\text{M}$ 尿素変性 MDH、 5 mM DTT を入れ、2 つの溶液を高速で混合しながら BodipyFL の蛍光強度を測定した。BodipyFL の蛍光強度は、始めすばやく上昇し、数秒間安定になった後、再び数秒で上昇する 3 段階反応を経て変化した(図 6-3 c, +ES(+acceptor))。一方、アクセプターを結合させていない EL315 では、BodipyFL の蛍光強度がほと

んど変化しなかった。両者のドナーの蛍光強度比をとると、3段階の反応過程を経て FRET が解消された(図 6-3 d)。式 6-5 を用いて Fitting したところ、 $k_1 = 2.9 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.46 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_3 = 0.31 \text{ s}^{-1}$ 、 $D_1 = 52\%$ 、 $D_2 = 68\%$ 、 $D_3 = 62\%$ 、 $D_4 = 89\%$ が得られた。一方、GroES 非存在下では単一の指数関数で Fitting され、反応速度定数は $k = 0.19 \text{ s}^{-1}$ であった。この結果は、GroEL 内部空洞で Cy3-GFP と FL-MDH がほぼ同じ速度定数、かつ同じ方向に位置を変化させることを示している。FRET により観測された第 2 過程までの 3 秒間、GFP の折れたたみが阻害されてことから、初めの 3 秒間は GFP だけでなく MDH も GroEL の内壁に結合し、折れたたみが阻害されていることが示唆された。

また、両者のドナーの蛍光強度比の時間変化から、基質タンパク質と GroEL 間の距離は ATP 混入前に最も小さく、約 0.5 秒で大きくなった後、3 秒後に再び小さくなり、さらに 3 秒後に完全に解離することが分かる。したがって、折れたたみが阻害されている 3 秒間基質タンパク質が結合している部位は、GroEL の縁部分(315 番目のアミノ酸)から最も離れたところであり、空洞の奥のほうであると予想される。一方で、ATP を混入して 3 秒後にドナーの蛍光強度比が低くなる原因として GroEL の apical domain が上方へ構造変化した可能性も考えられ、現時点では結合部位がどこであるかは全く不明である。

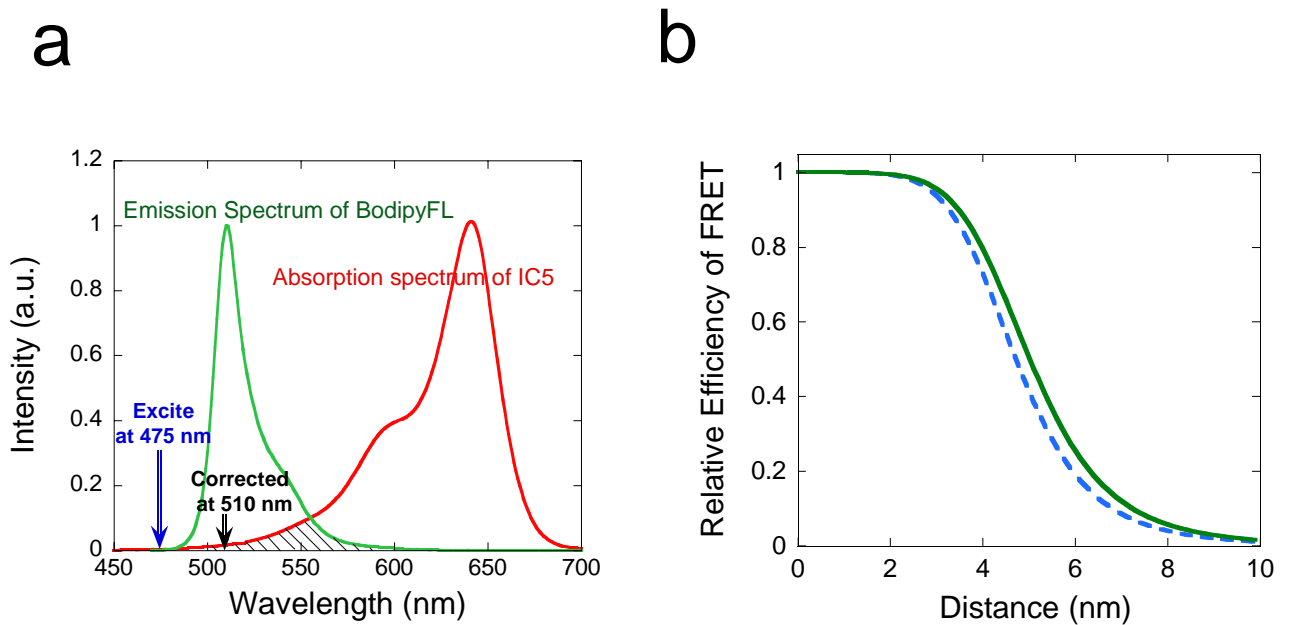


図 6-1 ドナー・アクセプターの蛍光・吸光スペクトルと FRET 効率

a. BodipyFL (ドナー) の蛍光スペクトルと IC5 (アクセプター) の吸収スペクトル。斜線で示した重なり部分の面積が、FRET しやすい指標である R_0^6 に比例する。アクセプターの影響を極力避けるため、475 nm の励起光で励起し、510 nm でドナーの蛍光強度変化を測定した。

b. アクセプター (IC5) とドナー間の距離に対する FRET 効率の変化。2 つの曲線は、それぞれ BodipyFL (青の点線) をドナーとした場合、Cy3 をドナーとした場合の FRET 効率の変化を示す。

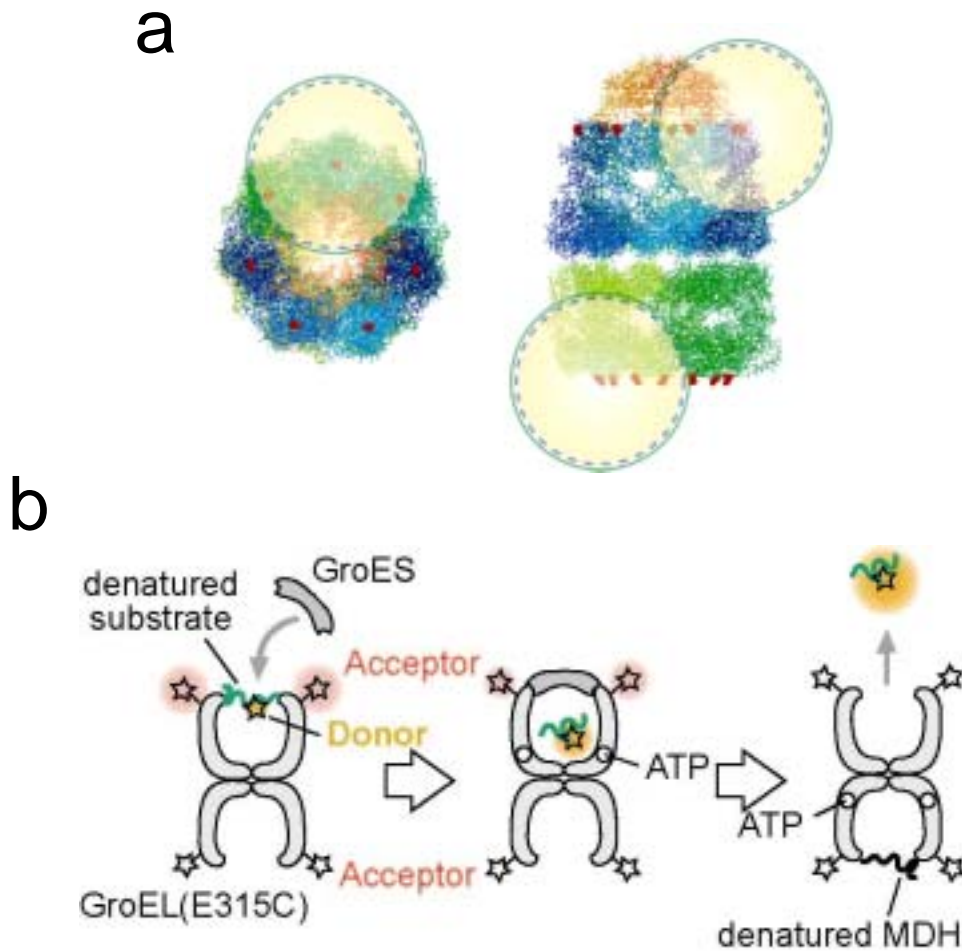


図 6-2 落としこみに伴う GroEL 内部での FRET 効率の変化

a. GroEL の 315 番目のアミノ酸(赤)からのフェルスター距離を円で示す。青の点線が BodipyFL をドナーとした場合、緑の実線が Cy3 をドナーとした場合。

b. 基質タンパク質と GroEL の apical domain 間の距離変化の測定。まずドナーで標識された基質タンパク質を変性させ、IC5-EL315 と複合体を作らせる。さらに GroES、変性 MDH、ATP とともに高速混合し、反応を開始させる。GroES が結合すると基質タンパク質が内部空洞に落とし込まれ、FRET が解消される。これに伴ってドナーの蛍光強度が回復する。続いて GroES とともに基質タンパク質が外部に放出されると、両者間の FRET は完全に解消される。高濃度の変性 MDH を共存させておくことで、解離した基質タンパク質の再結合を防ぐ。

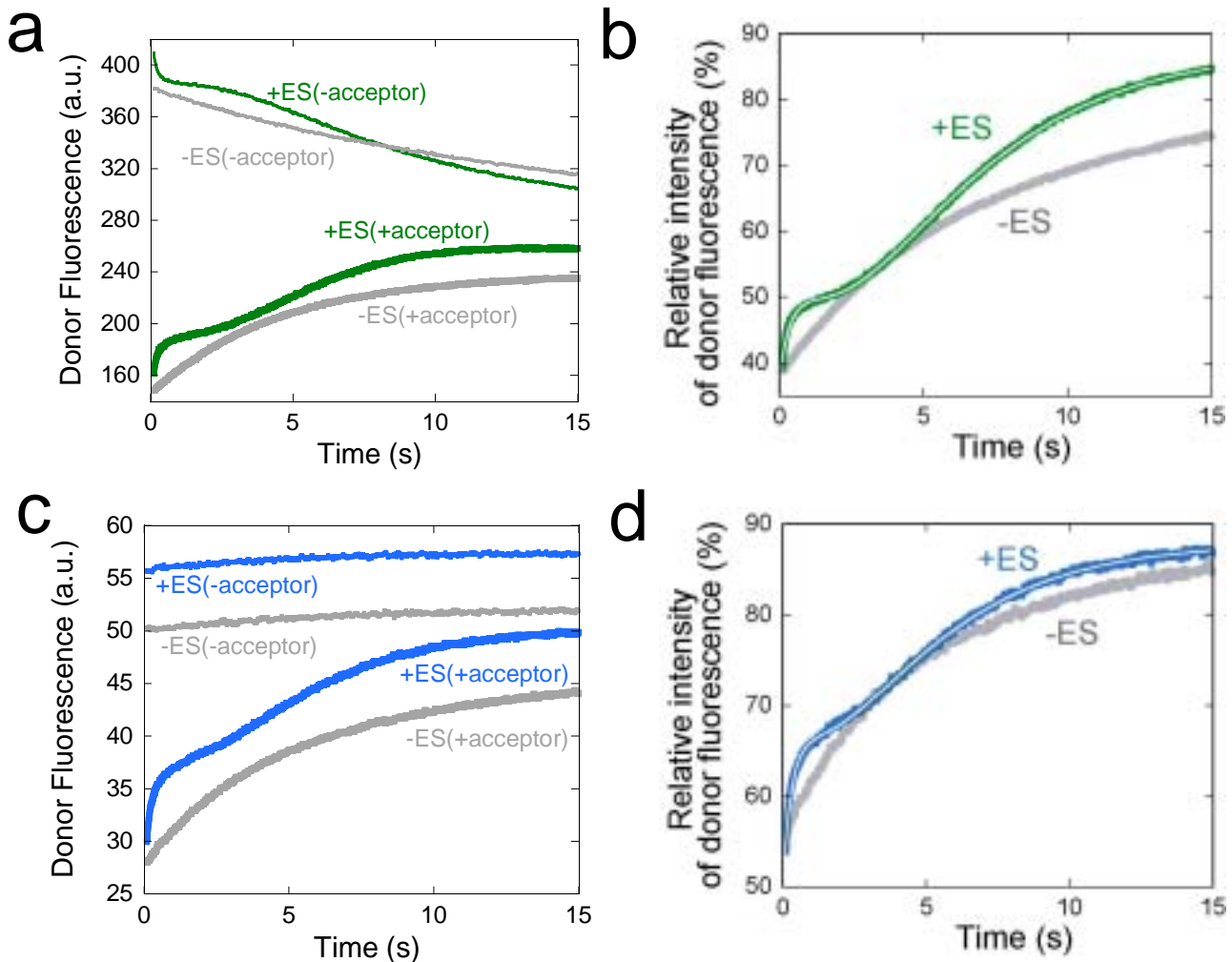


図 6-3 FRET 効率の変化に伴うドナーの蛍光強度変化

a. ATP 混入後の Cy3-GFP の蛍光強度変化。GroES 存在下では 3 段階の反応が観察されたが(緑)、GroES 非存在下では 1 段階で変化した(グレー)。

b. **a** で得られた +ES(+acceptor) の曲線を +ES(-acceptor) の曲線で除したグラフ(緑)を作成した。3 段階反応として式 6-5 で Fitting したところ、 $k_1 = 2.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.33 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_3 = 0.30 \text{ s}^{-1}$ となった。また、-ES では $k = 0.13 \text{ s}^{-1}$ の 1 段階反応として Fitting できた。

c. ATP 混入後の FL-MDH の蛍光強度変化。+ES(+acceptor) では GFP と同様に 3 段階反応が観察された。一方で +ES(-acceptor) ではほとんど蛍光強度が変化しなかった。これは、Bodipy FL の方が Cy3 より環境変化に対して鈍感で、比較的 FRET の観察に適していることを示している。

d. **c** をもとに作成した FL-MDH の蛍光強度比の変化。Fitting の結果、+ES では $k_1 = 2.9 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.46 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_3 = 0.31 \text{ s}^{-1}$ 、-ES では $k = 0.18 \text{ s}^{-1}$ となった。

第 7 章 反応サイクルにおける ATP 化学状態の決定

7-1) 序文

ここまでの研究で、GroEL のタンパク質折れたたみ過程には 2 つの律速過程が存在し、最初の律速過程では基質タンパク質の折れたたみが阻害されていることが明らかになった。GroEL の機能発現には、化学エネルギーである ATP が必須であるため、2 つの律速過程と ATP 加水分解反応には密接な関係があるはずである。従来の GroEL の ATP 加水分解過程の解析は定常状態を扱うものが多く (Todd et al, 1994) 2 つの律速反応との関わりを明らかにできるものではなかった。また、反応速度論的解析を行った先行研究もあるが、基質タンパク質非存在下での測定であり、本研究と比較検討できるものではない (Cliff et al, 1999)。本章では、GroES と変性タンパク質存在下での ATP 加水分解反応の初速度解析を行うことで、ATP 加水分解反応と 2 つの律速過程の関係を調べた。ただし、この章で取り扱う実験は共同研究者である田口氏が為されたものであり、筆者はその結果の解析を担当した。

ATP 加水分解反応サイクルには、大きく 3 つの反応がある。1 つは、GroEL により ATP の γ -リン酸が切り離され ADP と Pi に分解される反応であり、残り 2 つは、分解された ADP と Pi が GroEL から解離する反応である (図 7-1)。

これらを異なる 3 種類の手法で測定した結果、全ての反応が 2 つの律速反応と密接に関わっていることが明らかになった。さらに、ATP からの ADP と Pi の生成反応および Pi の放出反応は第一律速反応の直後、ADP の放出反応は第二律速反応の直後に起こることが分かった。

7-2) ATP 加水分解反応における初速度の測定

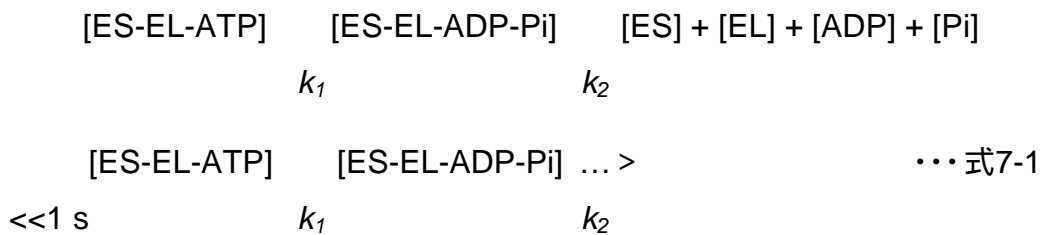
GroEL は、何度も反応サイクルを繰り返しながら ATP を加水分解している。この反応を速度論的に解析するために、GroEL と ATP を混合してから定常状態に達するまでの反応を解析した。

7-2-1) GroEL による ADP と Pi への ATP 加水分解

ATP から Pi が生成される瞬間を捉えるため、ATP を混合して GroEL による ATP 加水分解反応を開始させた後、任意の時間に酸で GroEL を変性させて反応を停止させ、マラカイトグリーン法により溶液中の全ての Pi 量を測定した。この手法では GroEL を変性させるため、GroEL から未放出な Pi も測定される。

6M 尿素で変性させた MDH (86 μM) を、1.5 μM GroEL、4.5 μM GroES、5 mM DTT を含む HKM buffer で最終 3 μM になるよう希釈し、5 分間放置した。そのうち 35 μl を分取し、0.4 mM ATP 溶液 35 μl と急速に混合した。反応開始から任意の時刻に 5% perchloric acid 溶液 600 μl を加えて反応を停止させた。氷上に数分置いたのち 12000 rpm で 10 分遠心し、上清 750 μl に malachite green 発色液 250 μl を加えて室温で 20 分放置した後、630nm の吸収を測定した (Geladopoulos et al., 1991)。測定結果を図 7-2 に示す。GroES 非存在下では、反応開始後から一定の速度で Pi が生成し、GroEL1 分子が 7 つの Pi を生成する速度は 0.18 s^{-1} と算出された。一方、GroES 存在下では、初めすばやい立ち上がり (バースト) が見られた後、 0.12 s^{-1} の一定速度で Pi が生成された。これは、GroEL による ATP 加水分解反応サイクルに 2 つの律速過程があり、Pi の生成は 1 つ目の律

速過程後に起きることを示している。すなわち、反応開始後 1 回目の Pi の生成は第一律速過程を経てすぐに起こるが、2 回目以降の Pi の生成は第二律速過程と次のサイクルの第一律速過程を経てから起こるため、見かけの生成速度が下がる。この反応を 2 サイクル目まで表記すると、次式のようなになる。



したがって、時刻 t における Pi の生成量 y は、

$$y = C k_1 (k_2 t - k_1 / (k_1 + k_2) \{ \exp[- (k_1 + k_2) t] - 1 \}) / (k_1 + k_2) \quad \dots \text{式 7-2}$$

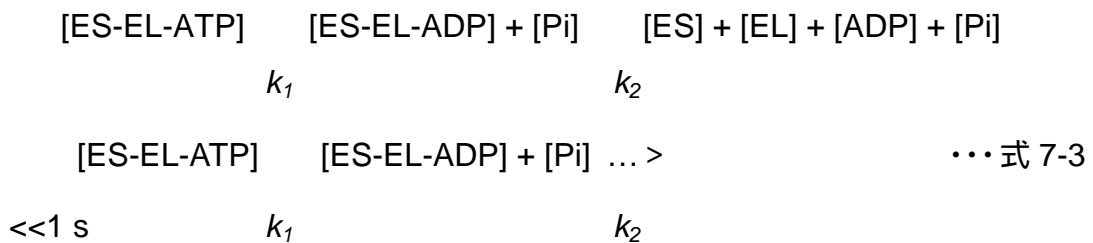
となる。ただし、 C は任意の定数である。式7-2を用いてGroES存在下でのPi生成速度をFittingした結果、 $k_1 = 0.31 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.16 \text{ s}^{-1}$ となった(図7-2)。以上は、ATP加水分解サイクルが約3秒と6秒の2つの律速過程を持っており、さらにPiの生成が第一律速過程の後に起こることを示している。

7-2-2) GroEL からの Pi の放出

GroEL からの Pi の放出量は、Pi 結合タンパク質(PBP)を用いて測定した。MDCC で標識された PBP (MDCC-PBP) は、Pi を結合すると 430 nm の励起光により 466 nm のピークを持つ蛍光を発する(Brune et al., 1994 & 1998)。MDCC-PBP

と Pi との結合速度は非常に速く ($k_{on} = 1.36 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、また高い親和性を持つため ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$)、GroEL から放出された Pi を蛍光分光光度計によりリアルタイムに測定することが可能である。

6M 尿素で変性させた MDH ($60 \mu\text{M}$) 溶液 $12 \mu\text{l}$ を、 $0.07 \mu\text{M}$ GroEL、 $10 \mu\text{M}$ MDCC-PBP、 $0.057 \mu\text{M}$ GroES を含む溶液 1.2 ml に加えて 5 分間放置した。 466 nm の蛍光強度を測定しながら、さらに 80 mM ATP、 0.8 mM 7-methylguanosine、 0.1 unit/ml purine nucleoside phosphorylase を含む溶液を $1.5 \mu\text{l}$ 加えた。7-methylguanosine および purine nucleoside phosphorylase は、ATP に含まれる Pi のコンタミネーションを取り除くために使用した。GroES 非存在下では、反応開始後から一定の速度で Pi が生成し、GroEL1 分子が 7 つの Pi を放出する速度は 0.18 s^{-1} と算出された (図 7-3)。一方、GroES 存在下では、Pi 生成速度のグラフと同様に数秒の早い立ち上がりが観察された (図 7-3)。この反応は、次式で表される。



式 7-3 を [Pi] に対して解くと、式 7-2 と同一の方程式が得られる。そこで式 7-2 で Pi 放出速度のグラフを Fitting した結果、 $k_1 = 0.33 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.37 \text{ s}^{-1}$ となった。

さらに変性タンパク質として Pepsin および rLA を用いて Pi 放出速度を測定したところ、 $k_1 = 0.36$ 、 0.26 s^{-1} と、 $k_2 = 0.46$ 、 0.37 s^{-1} となった。以上は、ATP 加水分解サイクルに 2 つの律速過程が存在し、Pi の生成は第一律速過程の後に起こ

ること、すなわち生成された Pi はすぐに GroEL から放出されることを示している。

7-2-3) GroEL からの ADP の放出

GroEL からの ADP の放出過程を測定するため、ADP からの ATP の再生反応を利用した。この手法では、ATP 再生の際に NADH が酸化されて NAD に変わるため、340 nm に吸収波長を持つ NADH の減少量を測定することで放出された ADP の量を知ることができる (Pullman et al., 1960; Kato et al., 1995)。まず、100 μ g/ml pyruvate kinase、100 μ g/ml Lactate dehydrogenase、5 mM phosphoenol pyruvate、0.2 mM NADH、2.5 mM DTT、1 mM ATP を含む HKM buffer 溶液を用意した。さらに尿素変性 MDH と GroES を加え、それぞれ最終濃度を 1 μ M、1.4 μ M に設定した。340 nm の吸収を測定しながら、この溶液に GroEL を加えることで反応を開始させた。GroES 非存在下では、反応開始後から一定の速度で ADP が放出された。一方 GroES 存在下では、Pi の生成、Pi の放出速度と異なり、立ち上がりが遅れるラグが観察された (図 7-4)。この反応は、式 7-3 で表される。式 7-3 を時刻 t における ADP の放出量 y に対して解くと、

$$y = C + k_1 k_2 / (k_1 + k_2) (t + \exp[- (k_1 + k_2) t] / (k_1 + k_2)) \quad \cdots \text{式 7-4}$$

となる。ただし、C は任意の定数。グラフを式 7-4 で Fitting したところ、 $k_1 = 0.39 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.23 \text{ s}^{-1}$ となり、ADP は反応開始後 ~3 秒、~5 秒の 2 つの律速過程を経て解離された。

以上 3 つの ATP 加水分解反応の初速度解析により、GroEL の反応サイクル

は $k_1 = 0.31\sim 0.39 \text{ s}^{-1}$ $k_2 = 0.16\sim 0.37 \text{ s}^{-1}$ の 2 つの律速過程から構成されており、Pi の生成と放出は第一律速過程の直後、ADP の放出は第二律速過程の最後に起こることが明らかになった。

これまで、GroEL、GroES、ADP を混合して作られる *cis*-ADP complex は、トランスリングに ATP を結合することで 1 秒以内に解離することが確かめられており、さらに ATP 加水分解直後の中間体と考えられてきた (Rye et al., 1999; Taguchi et al., 2001)。しかし、ATP 加水分解の初速度解析により、GroEL からの Pi の生成・放出後も 5 秒間の律速過程が存在することが明らかになった。このことは、これまで定義されてきた *cis*-ADP complex とは性質の異なる中間体が存在することを示している。そこでこの中間体を *cis*-ADP* complex (寿命 5 秒) と名づけた。

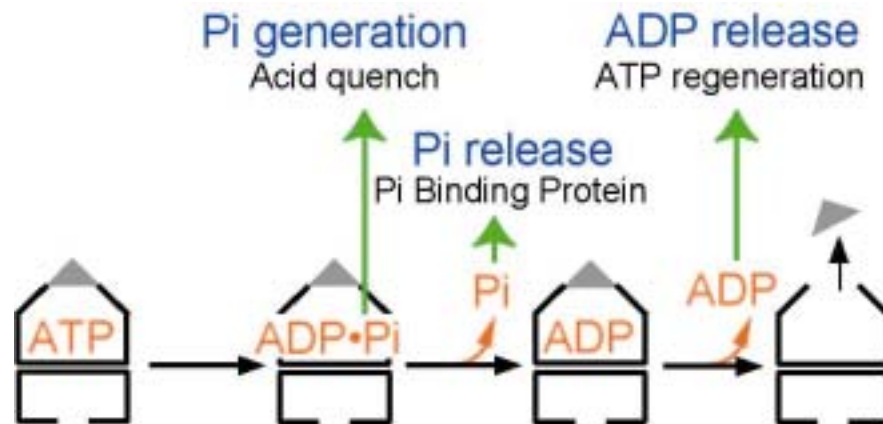


図 7-1 GroEL による ATP 加水分解反応と 3 種類の検出方法

一般的に ATP 加水分解能を有するタンパク質は、ATP を ADP と Pi に加水分解した後、両者を順に溶液中に放出する。ATP からの ADP と Pi の生成反応は酸変性による GroEL の反応停止法、Pi 放出反応は蛍光性 Pi 結合タンパク質、ADP 放出反応には ATP 再生系を利用して測定した。

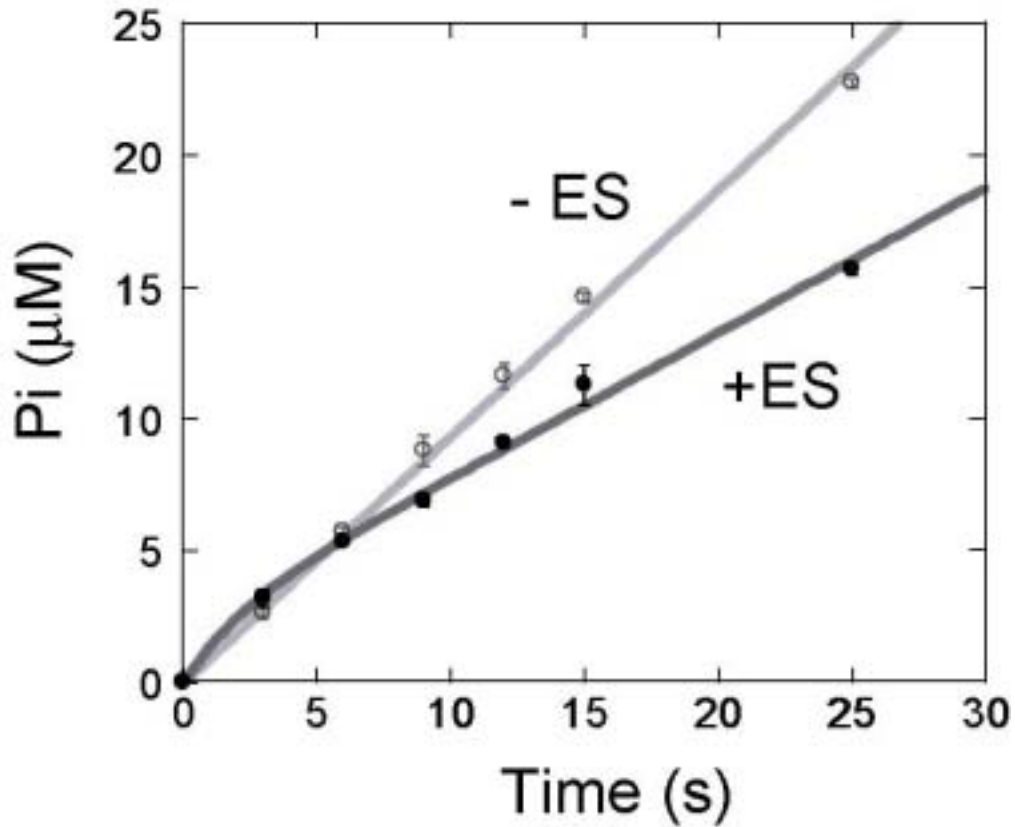


図 7-2 Pi 生成反応の初速度解析

GroEL、GroES、変性 MDH を含む溶液と ATP を高速混合して ATP 加水分解サイクルを開始させ、任意の時刻に 5% perchloric acid 溶液で GroEL の反応を停止させ、その時点の Pi 生成量をマラカイトグリーン法により定量した。GroES 非存在下では、ATP 混合後一定の速度で Pi が生成されたが、GroES 存在下では数秒のバーストが見られた後、一定速度で Pi が生成された。式 7-2 で Fitting したところ (黒線) $k_1 = 0.31 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.16 \text{ s}^{-1}$ が得られた。

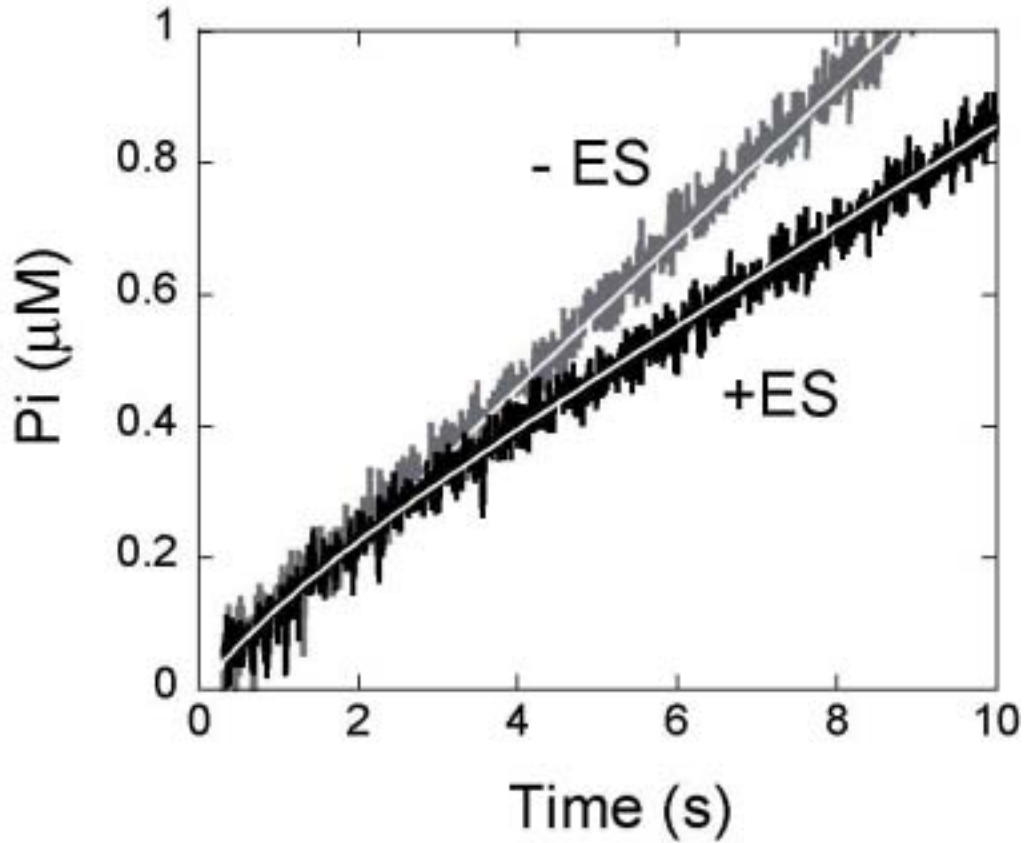


図 7-3 Pi 放出反応の初速度解析

GroEL、GroES、変性 MDH を含む溶液と ATP を高速混合して ATP 加水分解サイクルを開始させ、共存させている蛍光性の Pi 結合タンパク質 (MDCC-PBP) の蛍光強度を測定した。この手法では、GroEL を酸変性させる図 7-2 とは異なり、GroEL から溶液中に放出された Pi の量だけを測定可能である。その結果、GroES 存在下での Pi 放出過程には、Pi 生成過程と全く同様に、数秒のバーストが観察された。式 7-2 で Fitting したところ、 $k_1 = 0.33 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.37 \text{ s}^{-1}$ が得られた。

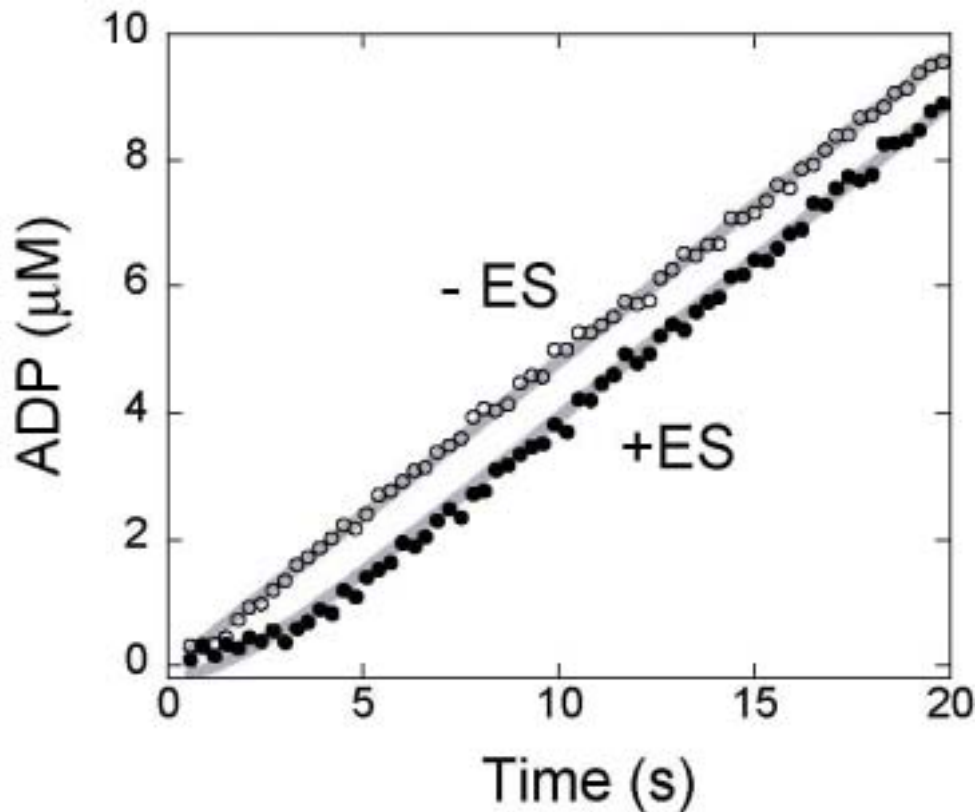


図 7-4 ADP 放出反応の初速度解析

GroEL、GroES、変性 MDH を含む溶液に NADH の酸化反応と共役させた ATP 再生系を入れ、放出された ADP 量をリアルタイムに測定した。ATP との混合により GroEL の ATP 加水分解サイクルを開始させたところ、GroES 存在下での ADP 放出過程には、 P_i 生成や P_i 放出で見られたバーストが観察されず、数秒のラグが観察された。式 7-4 で Fitting したところ、 $k_1 = 0.39 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_2 = 0.23 \text{ s}^{-1}$ が得られた。本実験では、 \pm GroES における ADP 放出速度が定常状態でほぼ同じになるように、GroEL の濃度を GroES 存在下では 490 nM、非存在下では 270 nM に調整した。

第 8 章 2 つのタイマーで制御された GroEL 反応機構の考察

8-1) GroEL が持つ 2 つの律速反応

従来の研究では、GroEL は ATP 加水分解反応を唯一の律速過程とし、単一のタイマーにしたがって働くと考えられていた(図 8-1 A)。しかし、本論文で行った全ての測定結果はこれを否定し、GroEL に 2 つのタイマーが存在することを示した。ここで、今回得られた知見をまとめ、新しいモデルを提案する(図 8-1 B)。基質タンパク質を結合した GroEL は、さらに ATP と GroES を結合して *cis-ATP** complex を作る。この寿命 3 秒の中間体は、単一タイマーモデルで定義されていた *cis-ATP* complex とは異なり、基質タンパク質の折れたたみが阻害されている。3 秒後に *cis-ATP** complex が *cis-ATP* complex になるとすぐに、基質タンパク質の折れたたみ開始、Pi の生成、Pi の放出という 3 つの反応が引き起こされ、*cis-ADP** complex となる。そのため *cis-ATP* complex の寿命は非常に短いが、基質タンパク質の折れたたみは *cis-ADP** complex 内で引き続き進行する。この中間体は 5 秒で *cis-ATP* complex へと移行し、さらにトランスリングへの ATP 結合を合図に GroES や基質タンパク質、ADP を放出する。

8-2) 基質タンパク質を保持する反応中間体 *cis-ATP** complex

図 8-1 B で示すように、GroEL は ATP-transition と ADP-transition という数秒にわたる大きな状態変化を引き起こす。ATP-transition を定義したのは、ATP 加水分解能が極めて低い変異体 EL398 内でも、野生型 GroEL と同様に 3 秒間の阻害

を経て GFP の折れたたみが起こったからである (図 4-4、図 4-5)。このことは、*cis-ATP** complex から 3 秒間の状態遷移を経て GFP の折れたたみが開始されるまでに、ATP 加水分解が起きないことを示している。

また、*cis-ATP** complex で起こる基質タンパク質の折れたたみ阻害は、GroEL 内部での基質タンパク質の自由度を測定した研究結果にも見られている (Weissman et al., 1996; Rye et al., 1997)。彼らは、基質タンパク質として Pyrene 標識した Rhodanese あるいは無標識の Rubisco を用い、それぞれ Pyrene と内在性のトリプトファンの蛍光偏光 (Anisotropy) 解消を測定した。その結果、GroEL の apical domain に結合していた基質タンパク質は、GroES 結合後約 1.5 秒かけて Anisotropy が減少し、続いて上昇が見られた。約 1.5 秒の Anisotropy の減少過程は、基質タンパク質が GroEL の結合部位から開放される過程であり、2 番目の上昇過程は基質タンパク質が GroEL 内部で自発的に折れたたむ過程であると考えられる。約 1.5 秒の Anisotropy の減少過程は、本論文で見られた第一律速過程の約 3 秒と寿命が異なっているが、彼らの実験では基質タンパク質を構成するアミノ酸一個の Anisotropy を測定しているため基質タンパク質全体の情報を得られておらず、本論文で見られた第一律速過程と同一の反応過程を見ている可能性がある。一方、重水素交換法を用いた研究は、GroES が結合した際に基質タンパク質が GroEL によって引き伸ばされ、その後折れたたむことを示唆している (Shtilerman et al., 1999)。これは GroEL の apical domain から基質タンパク質が離れる際に起こると考えられるため、ATP-transition に伴って基質タンパク質の引き伸ばしが行われている可能性がある。しかし、彼らが観察した引き伸ばし過程は 1 秒以内と非常に短いのに加え、重水素交換法を用いた別の研究により、引き伸ばし以外の反応を見ている可能性も指摘されており (Chen et al., 2001) この部分は未知のままである。

さて、GroEL の重要な機能の 1 つとして、基質タンパク質を内部の非常に狭

い空間に確実に閉じ込め、その折れたたみを進行させる点が挙げられる (Weissman et al., 1995; Mayhew et al., 1996; Xu et al., 1997; Sakikawa et al., 1999)。しかし、基質タンパク質を確実に閉じ込めるメカニズムについては、ほとんど解明されていない。GroEL は GroES と基質タンパク質を apical domain 上の同じ結合部位に捕捉するため、GroES の結合と基質タンパク質の内部空洞への放出は、ほぼ同時に起こると考えられている (Fenton et al, 1994; Chen and Sigler, 1999; Motojima et al, 2000)。したがって、単一タイマーモデルでは GroES が完全にふたをする前に基質タンパク質が激しいブラウン運動により外部溶液に放出されてしまう危険性を回避できない。一方、今回のモデルで定義した *cis*-ATP* complex は、GroES を結合すると同時に基質タンパク質を GroEL の内壁のいずれかに結合させて折れたたみを阻害していることから、*cis*-ATP* complex が基質タンパク質を確実に内部空洞へ閉じ込める機能を担っていると考えられる。この仮説を支持する GroEL の変異体として、C138W が挙げられる (Kawata et al., 1999)。この変異体は 25 で GroES を結合しているにもかかわらず基質タンパク質の折れたたみが抑えられているが、37 に移すと折れたたみが進行することから、25 では *cis*-ATP* complex 状態で保たれている可能性がある。

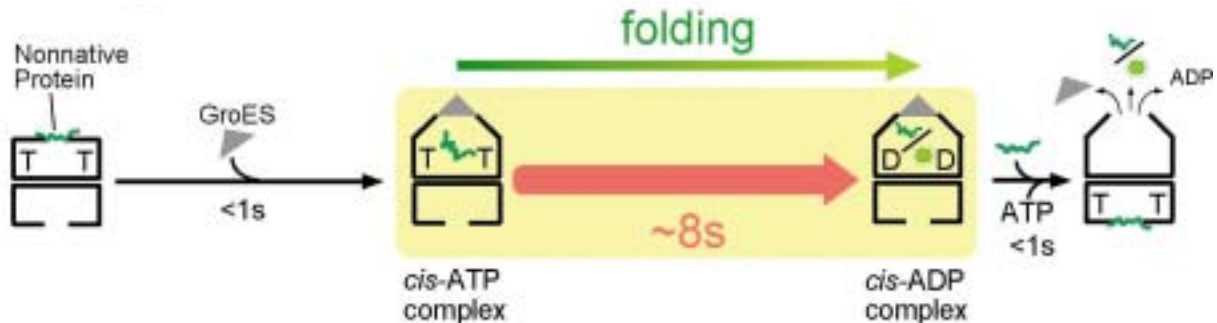
8-3) 折れたたみは反応中間体 *cis*-ADP* complex 内で進行する

cis-ATP complex が加水分解されるとすぐに、*cis*-ADP* complex が現れる。基質タンパク質の折れたたみは、主にこの *cis*-ADP* complex 内部で進行する。5 秒後に *cis*-ADP complex になると、トランスリングに ATP が結合して GroES、変性タンパク質、ADP が放出される (図 8-1 B)。これら 2 つの GroEL-GroES-ADP

複合体の構造上の違いは、おそらくトランスリングの ATP 結合部位にあると予想されるが、詳細は不明である。しかし少なくとも、寿命 5 秒の *cis*-ADP* complex が基質タンパク質の折れたたみ時間を決定するタイマーとして働いていることは明らかであり、この反応中間体のさらなる機能の解明が待たれる。

以上のように、図 8-1 B に示した ATP-transition と ADP-transition は、本論文により初めて発見された反応である。これらは、ヌクレオチドの化学状態に変化を引き起こさないことから、自身の構造上の障壁を乗り越える単純な緩和過程であると言える。このことは、GroEL の機能を制御する 2 つのタイマーが、分子同士の結合律速や ATP の加水分解反応律速に由来するものではなく、GroEL の構造自体に内蔵されていることを示している。

A. single timer model



B. two timer model

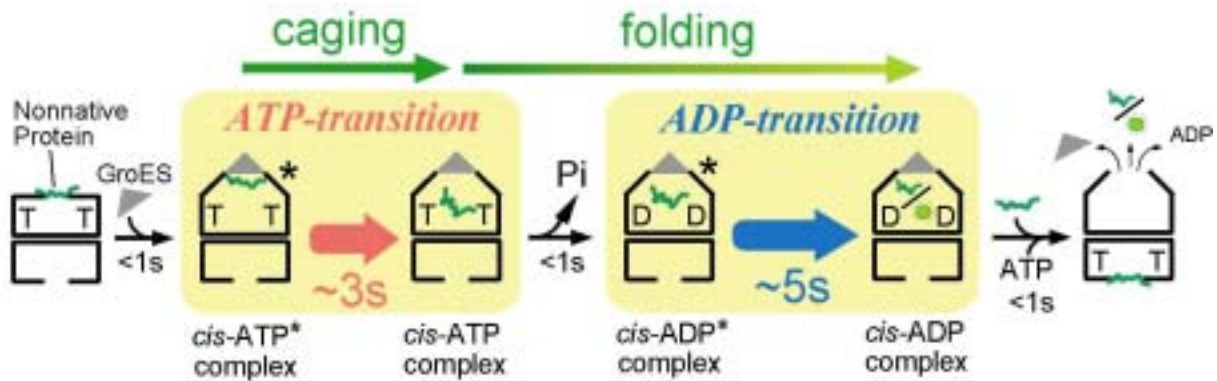


図 8-1

従来の GroEL 反応サイクルのモデル (A) と、本論文で提案する新モデル (B)。従来のモデルでは、GroEL による ATP 加水分解反応や Pi、ADP、GroES の放出反応の全てが ~8 秒の単一の律速反応 (タイマー) によって制御されている。一方、新モデルでは全ての反応が 2 つのタイマーによって制御されている。変性タンパク質を結合した GroEL は、GroES を結合すると *cis*-ATP* complex となる。この状態は ~3 秒間継続し、変性タンパク質の折れたたみは阻害されている。3 秒後に *cis*-ATP complex へと遷移し、変性タンパク質は内部空洞に落とし込まれて折れたたみを開始する。直後に Pi の生成と放出が起こり *cis*-ADP* complex となる。この複合体が ~5 秒間かけて *cis*-ADP complex へと遷移するのと並行して、変性タンパク質の折れたたみが進行する。GroEL のトランス側に別の変性タンパク質と ATP が結合すると、シス側の GroES や折れたたんだ変性タンパク質と ADP が放出され、新たなサイクルへと移る。

第 9 章 まとめ

9-1) 本論文のまとめ

本論文の結果は次のようにまとめられる。

- (1) シャペロニン GroEL と GroES の結合解離を、一分子蛍光イメージング法を用いて可視化することができた。
- (2) GroEL-GroES の反応サイクルには、主に 3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程が存在しており、それらの反応速度定数は、変性タンパク質の種類に依存しない。
- (3) GroEL-GroES-ADP 複合体および GroEL-GroES-ADP-Pi 複合体はどちらも非常に安定であるが、ATP 存在下では前者のほとんどが 1 秒以内に解離する。
- (4) シャペロニン GroEL-GroES 複体内で GFP が折れたたむ様子を、一分子イメージングすることが可能になった。
- (5) シャペロニン複体内で起こる GFP の折れたたみは、GroES が結合した後も約 3 秒間妨げられる。また、ここまでの過程には ATP 加水分解は必要ない。
- (6) シャペロニン複体内での GFP と MDH の運動は、時間的・空間的に共通していることから、GroEL 内部での折れたたみは基質タンパク質の種類によらず GroES 結合後 3 秒間抑制されていると思われる。
- (7) ATP 加水分解による Pi の生成、Pi の放出が第一律速過程の直後に起こる一方で、ADP の放出は第二律速過程の直後に GroES と同時に起こる。
- (8) シャペロニン GroEL を取り巻く全ての反応は、GroEL の構造に埋め込まれている 2 つのタイマーにより制御される。

9-2) 将来の展望

1 分子蛍光イメージング法は、筋肉の収縮活動を担うアクトミオシン系や、小胞の輸送にかかわる微小管 - キネシン系などの分子モーターの研究によって開発された(Funatsu et al., 1995; Vale et al., 1996)。この手法によって得られる情報は、独特かつ重要であるため、現在この分野で広く使われるようになっている。また、地球上で最小の回転モーターと言われる F1-ATPase でも、一分子レベルで回転する様子が捉えられ、詳細な解析結果が報告されている(Noji., 1997; Yasuda., 1998)。顕微鏡下で直接動きを観察することができるこれらのタンパク質は、溶液系の実験では得られない速度、移動距離、角度・位置変化などの情報を与えてくれるからである。一方、大きな動きや回転のない多くのタンパク質では、一分子蛍光イメージング法の最大の利点である位置情報を活用することができない。そのために、モータータンパク質以外のタンパク質間相互作用の研究に一分子蛍光イメージング法を用いた例は少なかった。しかし最近になって、生きた細胞膜上での 1 分子蛍光イメージングや(Sako et al, 2000)、細胞内 1 分子蛍光イメージングを目指す試みがなされ(Tadakuma et al, 2001)、徐々に応用範囲は広がりつつある。

このような流れの中で、本研究は、分子モーター以外のタンパク質の *in vitro* 実験系においても一分子蛍光イメージング法が十分に有効であることを証明し、一般的な生体分子の機能解析への応用に道を示した。1 分子蛍光イメージングが生体分子の相互作用研究に有効であったのは、さまざまな要素が複雑に絡み合った反応機構を理解するには、個々の分子が行っている一連の反応を直接観察することが必要となるからである。今後、シャペロニン以外のタンパク質間相互作用の研究においても、一分子蛍光イメージング法が使われる場が増えるであろう。

本論文は、これまで提唱されてきた GroEL のタンパク質折れたたみ介助の

モデルに、新しい知見を与えた。この中で特に重要な知見は、基質タンパク質の確実な囲い込みや、その折れたたみ時間の確保のために、GroEL が 2 つの律速過程をうまく利用していること、さらにそのタイマーを自身の構造に内蔵していることである。このようなタイマーの仕組みをさらに理解するためには、*cis*-ATP* complex および *cis*-ADP* complex について構造、機能の両面からアプローチする必要がある。具体的には、*cis*-ADP* complex のトランスリングに対して ATP や変性タンパク質、さらには GroES が結合できるかどうかなどの機能解析、あるいは特定のアミノ酸に標識したプローブを指標にした構造変化解析を行うことにより、性質が明らかになるものと期待される。GroEL で見られたように、ATP の化学状態の変化だけでなく、ヌクレオチドの状態変化を伴わない構造的な遷移過程に注目することで、今後さらにタンパク質の機能の理解が進むかもしれない。

【参考文献】

- Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. and Kinosita, K. Jr. (2000). Stepping rotation of F1-ATPase visualized through angle-resolved singlemolecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97(13)**, 7243-7247.
- Aoki, K., Motojima, F., Taguchi, H., Yomo, T. and Yoshida, M. (2000). GroEL binds artificial proteins with random sequences. *J. Biol. Chem.* **275**, 13755-13758.
- Axelrod, D. (1989). Total internal reflection fluorescence microscopy. *Method. Cell Biol.* **30**, 245-270.
- Brune, M., Hunter, J.L., Corrie, J. E., and Webb, M. E. (1994). Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* **33**, 8262-8271.
- Brune, M., Hunter, J.L., Howell, S. A., Martin, S. R., Hazlett, T. L., Corrie, J.E. and Webb, M. E. (1998). Mechanism of inorganic phosphate interaction with phosphate binding protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 10370-10380.
- Bukau, B. and Horwich, A. L.. (1998). The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.
- Burston, S. G., Ranson, N. A. and Clarke, A. R. (1995). The origins and consequences of asymmetry in the chaperonin reaction cycle. *J. Mol. Biol.* **249**, 138-152.
- Chen, J., Walter S., Horwich A. L. and Smith D. L. (2001). Folding of malate

- dehydrogenase inside the GroEL-GroES cavity. *Nat. Struct. Biol.* **8(8)**, 721-728.
- Chen, L. and Sigler, P. B. (1999). The crystal structure of a GroEL/Peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* **99**, 757-768.
- Farr, G. W., Fenton, W. A., Chaudhuri, T. K., Clare, D. K., Saibil, H. R. and Horwich, A. L. (2000). Folding with and without encapsulation by cis- and trans-only GroEL-GroES complexes. *EMBO J.* **22(13)**, 3220-3230.
- Farr, G. W., Furtak, K., Rowland, M. B., Randon, N. A., Saibil, H. R., Kirchhausen, T. and Horwich, A. L. (2000). Multivalent Binding of Nonnative Substrate Protein by the Chaperonin GroEL. *Cell* **100**, 561-573.
- Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. and Horwich, A. L. (2000). Multivalent binding of nonnative substrate protein by the chaperonin GroEL. *Cell* **100**, 561-573.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and Yanagida, T. (1995) Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* **374**, 555-559.
- Geladopoulos, T. P., Sotiroudis, T.G., and Evangelopoulos, A. E. (1991). A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* **192**, 112-116.
- Goloubinoff, P., Christeller, J. T., Gatenby, A. A. and Lorimer, G. H. (1989). Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* **342**, 884-889.
- Hayer-Hartl, M. K., Ewbank, J. J., Creighton, T. E. and Hartl, F. U. (1994). Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact

- folding intermediates of α -lactalbumin. *EMBO J.* **13**, 3192-3202.
- Ishijima, A. and Yanagida, T. (2001). Single molecule nanobioscience. *Trends Biochem. Sci.* **26(7)**, 438-444.
- Kato, Y., Sasayama, T., Muneyuki, E. and Yoshida, M. (1995). Analysis of time-dependent change of Escherichia coli F₁-ATPase activity and its relationship with apparent negative cooperativity. *Biochim Biophys Acta.* **1231**, 275-281.
- Kawata, Y., Kawagoe, M., Hongo, K., Miyazaki, T., Higurashi, T., Mizobata, T. and Nagai, J. (1999). Functional communications between the apical and equatorial domains of GroEL through the intermediate domain. *Biochemistry.* **38**, 15731-15740.
- Lipman, E. A., Schuler, B., Bakajin, O. and Eaton, W. A. (2003). Single-molecule measurement of protein folding kinetics. *Science* **301**, 1233-1235.
- Makino, Y., Amada, K., Taguchi, H. and Yoshida, M. (1997). Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 12468-12474.
- Mayhew, M., da Silva, A. C. R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Hartl, F. U. (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* **379**, 420-426.
- Motojima, F., Makio, T., Aoki, K., Makino, Y., Kuwajima, K. and Yoshida, M. (2000). Hydrophilic residues at the apical domain of GroEL contribute to GroES binding but attenuate polypeptide binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267(3)**, 842-849.
- Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K., Jr. and Yoshida, M. (1997). Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Cell* **386**, 299-302.

- Okazaki, A., Ikura, Teikichi., Nikaido, K. and Kuwajima, K. (1994). The chaperonin GroEL does not recognize apo- α -lactalbumin in the molten globule state. *Struct. Biol.* **1**, 439-446.
- Peralta, D., Hartman, D.J., Hoogernraad, N. J., and Hof, P. B. (1994). Generation of a stable folding intermediate which can be rescued by the chaperonins GroEL and GroES. *FEBS Lett.* **339**, 45-49.
- Robinson, C. V. , Gross, M., Eyles, S. J., Ewbank, J. J., Mayhew, M., Hartl, F. U., Dobson, C. M. and Radford, S. E. (1994). Conformation of GroEL-bound α -lactalbumin probed by mass spectrometry. *Nature* **372**, 646-651.
- Rye, S. H., Burston, S. G., Fenon, W. A., Beechem, J. M., Xu, Z., Sigler, P. B. and Horwich, A. L. (1997). Distinct actions of *cis* and *trans* ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature* **388**, 792-798.
- Rye, S. H., Roseman, A. M., Chen, S., Durtak, K., Fenon, W. A., Saibil, H. R. and Horwich, A. L. (1999). GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings. *Cell* **97**, 325-338.
- Sakikawa, C., Taguchi, H., Makino, Y. and Yoshida, M. (1999). On the maximum size of proteins to stay and fold in the cavity of GroEL underneath GroES. *J. Biol. Chem.* **274**, 21251-21256.
- Sako, Y., Minoguchi, S. and Yanagida, T. (2000). Single-molecule imaging of EGFR signaling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 168-172.
- Schuler, B., Lipman, E. A., and Eaton, W. A. (2002). Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* **419**, 743-747.
- Shtilerman, M., Lorimer, G. H. and Englander, S. W. (1999). Chaperonin function:

- folding by forced unfolding. *Science* **284**, 822-825.
- Sigler, P. B., Xu, Z., Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A. and Horwich, A. L. (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 581-608.
- Tadakuma, H., Yamaguchi, J., Ishihama, Y. and Funatsu, T. (2001). Imaging of single fluorescent molecules using video-rate confocal microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287(2)**, 323-327.
- Taguchi, H., Ueno, T., Tadakuma, H., Yoshida, M. and Funatsu, T. (2001). Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system. *Nat. Biotech.* **19**, 861-865.
- Todd, M. J., Viitanen, P. V. and Lorimer, G. H. (1994). Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* **265**, 659-666.
- Ueno, T., Taguchi, H., Tadakuma, H., Yoshida, M. and Funatsu, T. (2004). GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Mol. Cell* **14**, 423-434.
- Vale, R. D., Funatsu, T., Peerce, D. W., Romberg, L, Harada, Y. and Yanagida, T. (1996). Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* **380**, 451-453.
- Walter, S. (2002). Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol. Life Sci.* **59(10)**, 1589-1597.
- Weissman, J. S., Hohl, C. M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Brang, K., Saibil, H. R., Fenton, W. A. and Horwich, A. L., (1995). Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position

- under GroES. *Cell* **83**, 577-587.
- Weissman, J. S., Rye, H. S., Fenton, W. A., Wbeechem, J. M. and Horwich, A. L., (1996). Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* **84**, 481-489.
- Wu, P. G. and Brand, L. (1994). Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1-13.
- Xu, Z. and Sigler, P. B. (1998). GroEL/GroES: structure and function of a two-stroke folding machine. *J. Struct. Biol.* **124**, 129-141.
- Xu, Z., Horwich, A. L. and Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750.
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M. and Kinosita, K., Jr. (1998). F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* **93(7)**, 1117-1124.
- Zhuang, X., Bartley, L. E., Babcock, H. P., Russell, R., Ha, T., Herschlag, D. and Chu, S. (2002). Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* **296**, 1473-1476.
- Zhuang, X., Kim, H., Pereira, M. J B., Babcock, H. P., Walter, N. G. and Chu, S. (2000). Single-molecule study of RNA catalysis and folding. *Science* **288**, 2048-2051.
- Zondlo, J., Fisher, K. E., Lin, Z., Ducote, K. R. and Eisenstein, E. (1995). Monomer-heptamer equilibrium of the escherichia coli chaperonin GroES. *Biochemistry* **34**, 10334-10339.

【研究業績】

論文	GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism.	<i>Molecular Cell</i> 14: 423-434	2004	H. Taguchi 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	H. Taguchi H. Tadakuma M. Yoshida T. Funatsu
著書	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(3), 855-856 増刊号「細胞における蛋白質の一生」共立出版.	2004	多田隈尚史 船津高志
	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(1), 90-91 羊土社	2004	田口英樹
	シャペロニン機能の 1分子蛍光イメージング	センサマイクロマシーン 準部門誌, vol123(4), 107-111	2003	多田隈尚史 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 vol78(9), 384-388	2000	田口英樹 吉田賢右 船津高志

講演	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 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター	2003.9	田口英樹 多田隈尚史 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 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター	2003.9	細野和彦 座古保 田口英樹 吉田賢右 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 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター	2003.9	座古保 飯塚怜 大河内美奈 養王田正文 船津高志
	Nucleotide state in ATP hydrolysis cycle of GroEL	47th Biophysical Society Annual Meeting San Antonio, U.S.A.	2003.2	H. Taguch H. Tadakuma M. Yoshida, T. Funatsu
	Fluorescence detection and kinetic analysis of interaction between <i>Pyrococcus</i> prefolding and substrate protein	47th Biophysical Society Annual Meeting San Antonio, U.S.A.	2003.2	T. Zako R. Iizuka M. Okochi M. Yohda T. Funatsu:
	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 名古屋大学 .	2002.11	田口英樹 多田隈尚史 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 名古屋大学 .	2002.11	細野和彦 田口英樹 吉田賢右 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 名古屋大学	2002.11	座古保 飯塚怜 大河内美奈 養王田正文 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 大阪大学吹田地区	2001.10	田口英樹 多田隈尚史 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 大阪大学吹田地区	2001.10	小池理恵子 田口英樹 吉田賢右 船津高志
Two timer mechanism of GroEL	Cold Spring Harbor Laboratory meeting New York, U.S.A.	2001.5	M. Yoshida H. Taguchi H. Tadakuma T. Funatsu
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 東北大学川内北キャンパ ス	2000.9	田口英樹 多田隈尚史 吉田賢右 船津高志
Single molecule imaging of the chaperonin GroEL-GroES function	44th Biophysical Society Annual Meeting New Orleans, U.S.A.	2000.2	H. Taguchi H. Tadakuma M. Yoshida T. Funatsu:
Single Molecule Imaging of GroEL-GroES Interactions	The 7th JST International Symposium "Molecular Processes and Biosystems 107" Tokyo International Forum	2000.2	H. Taguchi H. Tadakuma M. Yoshida T. Funatsu
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 .	1999.8	船津高志 田口英樹 多田隈尚史 吉田賢右

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 和光市市民文化センター / 理化学研究所	1999.10	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分子イメージング	第72回日本生化学会 パシフィコ横浜	1999.10	田口英樹 多田隈尚史 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 九州大学	1998.10	多田隈尚史 田口英樹 吉田賢右 船津高志

謝辞

本研究を御指導くださいました恩師、船津高志先生に心から感謝いたします。博士論文の御助言を頂きました石渡信一先生、櫻井英博先生、加藤尚志先生に感謝いたします。本研究を共同で推進し、多くの知識と経験を与えていただいた吉田賢右先生、田口英樹先生に心から感謝いたします。研究室の先輩であり、研究に対する姿勢や考え方に多大な影響を与えてくださった多田隈尚史氏に深く感謝します。最後に、私を支えてくれた船津研究室のメンバーに、感謝いたします。

2004 年 6 月 1 日 上野 太郎