

シャペロニンと GFP フォールディング

田口 英樹^{1*}・上野 太郎²・吉田 賢右¹・船津 高志²

タンパク質の立体構造こそが、タンパク質の多様な機能の源であることに疑いはなからう。そして、立体構造を決定するのに必要な情報は、タンパク質のアミノ酸配列の中にすべて含まれているということになっている (Anfinsen のドグマ)。しかし、ポリペプチドが正しく折れ畳んで (フォールディング) 機能のある立体構造を形成するのはたやすいことではない。たとえば、医薬や工学で有用なタンパク質を組換え体で作っても、不溶性の封入体 (インクルージョン・ボディ) になってしまった、さらには、その封入体を試験管内でフォールディングさせようとしてもどうしてもうまくいかない、なんてことはよく聞く話である。これは、フォールディング途中でポリペプチド同士が不可逆に凝集してしまうのが主たる原因である。

では、細胞内ではどのようにして不可逆なタンパク質凝集を阻止しているのか。細胞内では分子シャペロンが活躍している。¹⁾分子シャペロンがフォールディングの介添え役として凝集を防ぐために細胞内ではフォールディングが効率よく進行するのである。さまざまな分子シャペロンが知られているが、中でもシャペロニンとも研究が進んでいる分子シャペロンである。大腸菌のシャペロニン GroEL に関しては、X 線結晶解析とエレガントな生化学研究が見事に結びついて巧妙な分子機械としての振る舞いの詳細がかなりわかってきた。GroEL がタンパク質のフォールディングを助けるメカニズムの詳細は他の総説¹⁻³⁾に譲るが、簡単にまとめると以下のようなになる。まず立体構造であるが、GroEL は 7 つのサブユニット (分子量 57 k) からなる「かご」状のリングが 2 層に重なった構造をとる。GroEL に ATP (ADP) が結合すると補助因子である「ふた」状の GroES と結合して巨大な空洞をもった複合体を形成する。この空洞は GroEL がシャペロンとして機能する上で、実に意味深いものである。なぜなら、この空洞の中でシャペロニ

ンの基質となるタンパク質のフォールディングが起こることがわかったからだ。その反応サイクルの概要は以下の通りである (Fig. 1)。

(A) 基質となるポリペプチド (変性タンパク質) と ATP が結合した GroEL に、補助因子 GroES が結合して、ポリペプチドが GroEL-GroES 複合体の空洞内に落とし込まれる (ポリペプチドを内部に取り込んだ GroEL-GroES 複合体はシス複合体と呼ばれている)。閉じこめられたポリペプチドはフォールディングを開始する。

(B) GroEL に結合した ATP の加水分解が進行する。

(C) ADP 結合型となったシス複合体の反対側のリングに ATP が結合することで、GroES と ADP が解離してフォールディングしたタンパク質が解放される。

この一連のサイクルが 10 秒程度で進行して、さらにサイクルが繰り返されていく (これ以外のフォールディング経路も実際にはある。たとえば GroEL に結合したポリペプチドが ATP 結合を引き金に外部に放り出され、自発的にフォールディングする場合など。が、効率はシャペロニンのゆりかご内を経由した方がよい)。

さて、本特集の GFP がどこで関わるのか? ここで示したシャペロニンのメカニズムを明らかにするために既に GFP が使われてきている。^{4,5)} シャペロニンの空洞内でのフォールディングを一番簡単にモニターできるのが、GFP を使う実験系なのだ。なぜか? GFP は変性状態と天然状態を蛍光の有無で簡単に区別できるからである。しかも、蛍光出現に何の補因子も必要としない (注: ここで使用する変性 GFP は既に発色団形成が終了して蛍光を発する GFP を変性させて調製する)。我々は、GFP の特性を存分に活かして、1) シャペロニンの空洞の大きさ、2) 1 分子 GFP フォールディング、を最近調べてきた。以下に詳しく紹介しよう。

1. シャペロニンの空洞内でフォールディングするポリペプチドの大きさの上限は? ⁶⁾

シャペロニンは凝集しやすいフォールディング途上のポリペプチドを内部にかくまうことで、「無限希釈」を実現している。ポリペプチドは、その分子の「ゆりかご」の中で凝集体形成の危険から解放され、天然構造までぬくぬくとフォールディングできるわけだ。とは言っても、

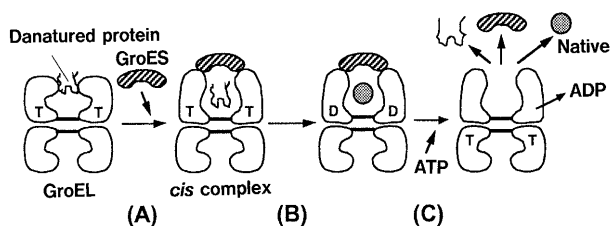


Fig. 1. Proposed model for GroEL-GroES cycling.

¹東京工業大学資源化学研究所, ²早稲田大学理工学部物理学科

*著者紹介 (代表) 東京工業大学資源化学研究所 (助手)

〒226-8503 横浜市緑区長津田町4259 TEL. 045-924-5232 FAX. 045-924-5277

E-mail: htaguchi@res.titech.ac.jp

<http://www.res.titech.ac.jp/seibutu/index-j.html>

GroEL/ES 複合体の空洞の大きさには限りがある。そこで単純なる疑問。「この空洞内では、どのくらいの大きさまでのポリペプチドがフォールディングできるのか？」

この疑問に答える手始めとして我々はまず、GroEL/ES 複合体の中に格納されるポリペプチドのサイズを決定した。⁶⁾さまざまな分子量のポリペプチドを含む材料として、大腸菌の粗抽出液を使った結果、シャペロニンの空洞内には～57 kD までのポリペプチドならば収納可能ことがわかった(ちなみに、GroELに結合するだけならば8～110 kDの多種多様なポリペプチドが結合可能である)。しかし、この実験では、ポリペプチドが空洞内に格納されるかどうかはわかっても、シャペロニンの内部でフォールディングしたかどうかを知ることはできない。そこでGFPの出番である。

先に述べたようにGFP(分子量約27 kD)がGroEL/ES 複合体の内部でフォールディングすることはすでに調べられている。この分子量を大きくして57 kDに近づければよい。都合のよいことにGFPの2量体は約54 kDである。そこで、GFPをタンデムにつなげた2量体を作成することにした。が、単なる2量体では、2量体の両方がフォールディングしたのか、それとも2量体のどちらか片方だけフォールディングしたのか判別するのが非常に難しい。2量体の両方がフォールディングしたことを検出するために、蛍光のエネルギー移動

(FRET)を利用した。幸いGFPとその変異体にはFRETを起こす組み合わせがいくつか知られている。ドナー、アクセプターの組み合わせとして、それぞれBlue Fluorescent Protein (BFP), GFPを選び、融合タンパク質(BFP-GFP)を作成した(Fig. 2A)。⁶⁾なお、ここで使用したGFP, BFPにはFRETに向くように励起波長のピークが単一かつ鋭くなる変異(F64L/S65C)およびフォールディングの効率が高くなる変異(F99S/M153T/V163A)が導入されている。精製したBFP-GFPを380 nm (BFPの励起波長)で励起するとGFPの蛍光(～510 nmにピーク)が出現する(Fig. 2B)。BFPとGFPをつなぐリンカーをトリプシンで切断するとGFP由来の蛍光は大きく減少するので、このGFP蛍光はFRETから起こるものであることが確認できる。では、このBFP-GFPがシャペロニン内部でフォールディングするか？

シャペロニンの内部でフォールディングしたかどうかの判断基準として、ゲルろ過を用いる実験を行った。GroEL/ES 複合体は分子量900 kDにおよぶ巨大なタンパク質複合体なので遊離のGFPと簡単に分離できる。これまでの研究からGroEL/ES 複合体の溶出位置にGFPの蛍光が検出できれば、そのときシャペロニンの空洞内でGFPのフォールディングが完了していることがわかっている。今回の実験では、BFPとGFPが両方フォールディングしたときのみ起こるFRETをモニターした。ゲルろ過実験の結果、GroEL/ES 複合体の溶出位置に確かにFRETが生じていた(Fig. 3)。フォールディングしたBFP-GFPがシャペロニン内部にいることは、BFP-GFPのプロテアーゼに対する耐性が高まることから確認している(BFP-GFPはシャペロニンのゆりかごの中で保護される)。さらにGFPの3量体(～81 kD)を作成してみたが、予想通り、シャペロニン内部に

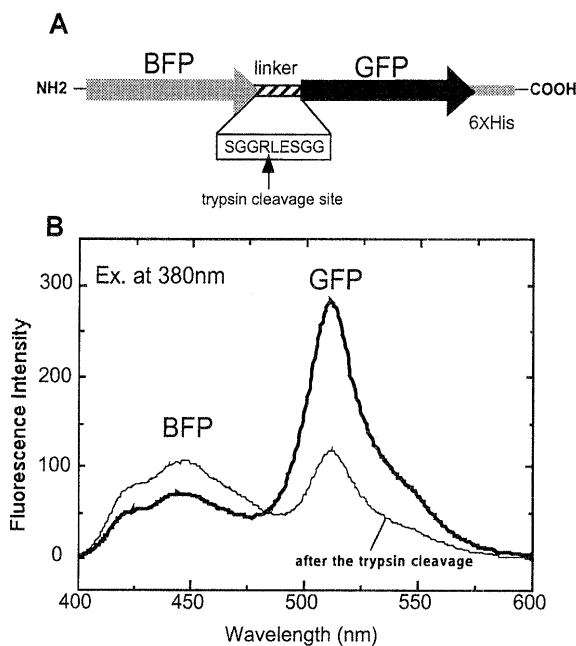


Fig. 2. The BFP-GFP. (A) Schematic drawing of the BFP-GFP fusion protein. (B) Fluorescence spectra of the BFP-GFP.

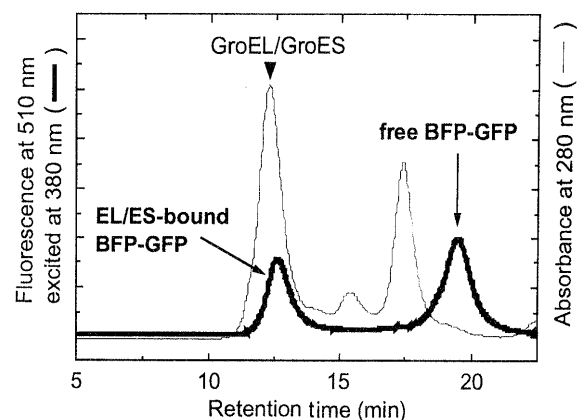


Fig. 3. Folding of the BFP-GFP. Gel filtration HPLC elution of the GroES/BFP-GFP/GroEL complex formed in the presence of ATP.

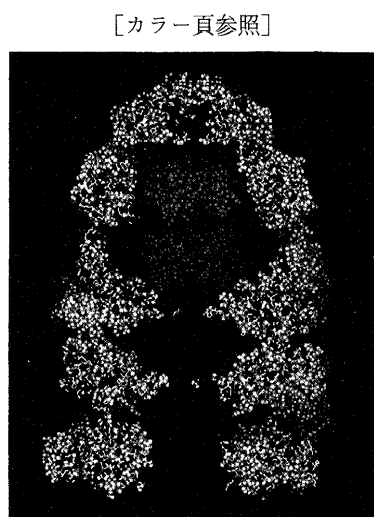


Fig. 4. Simulated packing of two GFP molecules in the GroEL/GroES *cis*-cavity.

入ることすらできなかった。

以上の実験からシャペロン複合体の空洞の内部には、 ~ 57 kD までのポリペプチドが収納可能で（少なくとも 54 kD までは）フォールディングまで完了できることがわかった。そこで、2つの GFP 分子をシャペロンの空洞内にスーパーインポーズしてみた (Fig. 4)。ご覧のように、かなり窮屈ではあるが GFP 2分子を内部に置くことができた。通常、フォールディング途中の分子の体積は天然状態よりも大きいと考えられている。だとすると、シャペロンの空洞も一時的に大きくなるのかもしれない。

2. 1分子蛍光イメージング技術を用いた GFP フォールディングの解析

従来の生化学実験は、試験管内の多数の分子 ($\sim 10^{12}$ 個) の平均を扱うので、複雑な多段階反応を素過程に分離して解析することは非常に難しい。巧妙なる分子機械であるシャペロンの研究はかなり進んだと言えるが、作用機構サイクルを究めるには多数の分子の平均では限界がある。そこで我々は、シャペロン研究に 1分子蛍光イメージングの技術を応用した。これまでに、i) 1分子のレベルで GroEL と GroES の相互作用のダイナミクスを解析、ii) GroEL/ES 複合体の内部で起こる GFP フォールディングを 1分子蛍光イメージングする実験系を構築した (田口ら, 投稿中)。本稿では、1分子 GFP フォールディングに関して詳しく解説する。

まず、1分子の蛍光を見るための技術について概説しよう。タンパク質などの生体分子を生きのまま観察するためには光学顕微鏡が有効である。が、光学顕微鏡の空

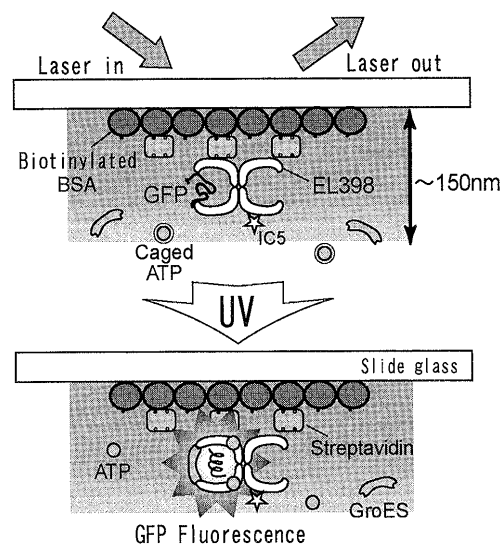


Fig. 5. System used for single-molecule GFP folding.

間分解能はおよそ 300 nm なので、タンパク質 1分子を直接観察することは不可能である。そこで対象となるタンパク質を蛍光色素で生きのまま標識し、その蛍光を 1分子レベルで検出すればよい。とは言うても通常の蛍光顕微鏡では背景光が明るいため 1分子の蛍光を見ることができない。この問題は全反射蛍光顕微鏡によるエバネッセント照明を用いることで解決できる。^{7,8)} この顕微鏡は照射面から約 150 nm の領域しか励起しないため、背景光を劇的に減らすだけでなく、スライドガラス表面に固定した蛍光標識タンパク質を局所励起できるという利点をもつ。

我々は次のような方法で、シャペロン分子内で起こる GFP フォールディングの瞬間を観察した (Fig. 5)。まず酸変性させた GFP (S65T 変異体) を GroEL の入った緩衝液中に希釈することで、GFP-GroEL 複合体を作製した。この状態で GFP は変性したままである。GFP-GroEL 複合体を観察セルに流し込み、スライドガラス上にビオチン化 BSA, Streptavidin を介して固定した (ここで用いる GroEL にはビオチンと蛍光色素 IC5 が二重標識されている)。なお、GroEL としては、ATP 加水分解能が非常に低く、一度結合した GroES をなかなか解離しない変異体 (EL398) を用いている。この変異体を用いることで GFP を複体内に保持することができる。その後 GroES, Caged ATP で観察セルを満たした。顕微鏡上で、この観察セルに紫外線を照射して ATP を生成すれば、GFP-GroEL 複合体に GroES が結合して GFP のフォールディングが始まり、その蛍光が観察されるはずである。フォールディング情報を蛍光として検出できる GFP は 1分子のフォールディングを見るのにうって

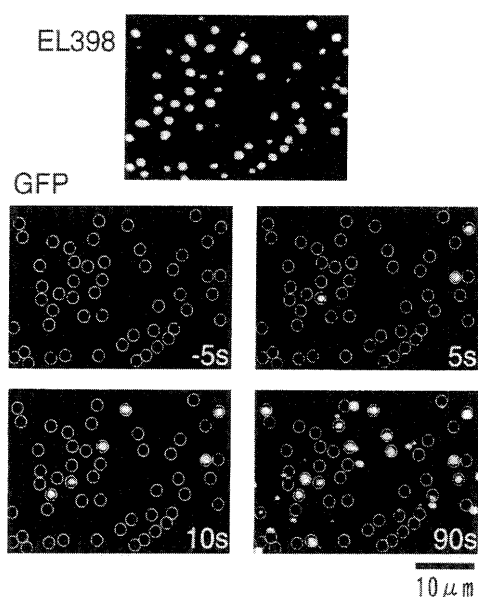


Fig. 6. Fluorescence images of single folded GFP molecules. EL398, the position of the immobilized GroEL398 illuminated by IC5; GFP, superposition of the fluorescence images of GFP. ATP was generated at time 0s.

つけ（というよりも今のところ唯一）の基質タンパク質といえる。

実験結果としては、まず、GroEL (EL398) の蛍光像をビデオ撮影し、固定されている GroEL の位置を確認した (Fig. 6). 続いて 473 nm 半導体レーザーを照射して GFP の蛍光を観察しながら、紫外線照射により ATP を生成した。その結果、紫外線照射前には存在しなかった GFP の蛍光が、GroEL の位置に次々と現れた (Fig. 6). このように実時間でタンパク質フォールディングを捉えることに初めて成功したわけだが、それだけで終わりではない。1 分子実験の本領発揮は統計的な解析にある。紫外線照射から GFP 折れたたみまでの時間の分布図を作成したところ、時定数が約 3 秒と 25 秒の 2 段階反

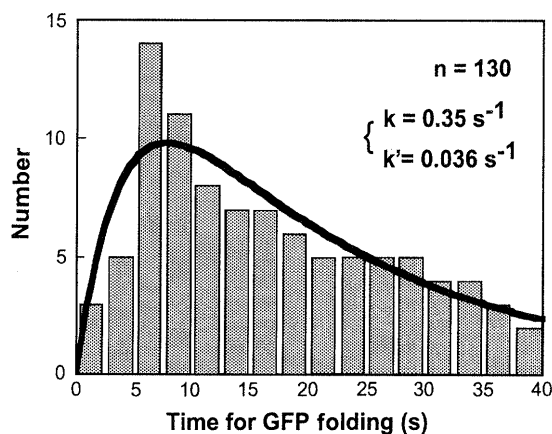


Fig. 7. Distribution of time required for GFP folding after the photorelease of ATP.

応であることが分かった (Fig. 7). GFP の自発的なフォールディング反応は約 30 秒の 1 段階反応で近似できることから、シャペロン依存の GFP フォールディングには 3 秒のタイムラグがあることがわかった。この実験条件下では紫外線照射後、GroES と GroEL が結合するのに要する時間は約 0.1 秒である。よって変性 GFP と GroES が GroEL の淵に同時に結合している中間体が存在することになる。そして結合していた変性 GFP が、GroEL/ES 複合体内に落とし込まれて自由にフォールディングを始めるまでが約 3 秒のタイムラグとして観測されたと考察した。このような GroEL が GroES と変性タンパク質を同時に結合している中間体はこれまでに知られていないが、1 分子実験の別の結果や最近の他のグループの報告なども合わせてこの種の中間体が実際に存在すると考えている。さらに言えば、この中間体はシャペロンが変性タンパク質を空洞内に効率よく閉じこめるために非常に都合がよい。なぜなら、もし GroES 結合と同時に変性タンパク質が解離すれば、変性タンパク質はシャペロン内部に取り込まれる前に外部に放り出されてしまうおそれがある。しかし、GroEL は変性タンパク質、GroES と順を追って解離することで、確実に基質となるタンパク質を閉じ込めることができると考えられる。このように、GFP を用いることにより、シャペロン内で起こるタンパク質 1 分子のフォールディングを可視化することに成功し、シャペロンの新たな機能が明らかになったのである。

ついでに言えば、この 1 分子 GFP フォールディングの実験系は、1 分子レベルでのフォールディング研究一般に使える可能性を秘めている。近年、タンパク質のフォールディングの研究を 1 分子レベルで研究しようとする動きが出てきた。これは、タンパク質のフォールディングとアンフォールディングが異なった経路を通ったり、分子ごとに複数の経路を通ったりする可能性を考えれば、自然な流れである。現在、タンパク質の 2 つの部位を異なる蛍光色素で標識し、そのフォールディングを検出する技術が開発されつつあるが、溶液中に漂うタンパク質のフォールディングのダイナミクスを追跡するのは、ブラウン運動のためほぼ不可能である。しかし、我々の実験系を応用し、タンパク質フォールディングのための「ゆりかご」としてシャペロンを利用すれば、一連のフォールディング過程を定点観測できるはずである（定点とは言っても分子の動きに制約はない）。1 分子フォールディング研究の画期的な手法となる可能性も秘めている。

おわりに

GFP (特に精製したもの) を一度扱ったことのある人ならば、誰しもがその蛍光色の美しさに最初は感動したであろう (筆者は今でも感動し続けている)。そして、この色の付いたタンパク質 GFP のおかげでシャペロン研究に新しい分野 (特に 1 分子蛍光イメージング) を切り拓くことができた。ここに書いた以外でも、GFP は他のシャペロンやプロテアーゼの研究におけるツールとしてますます幅広く使われるようになってきている。⁹⁾ 感動を共有できる人がこれからも増え続けるのは疑いのないところであろう。

文 献

- 1) Hartl, F. U.: *Nature*, **381**, 571 (1996).
- 2) Bukau, B. and Horwich, A. L.: *Cell*, **92**, 351 (1998).
- 3) 元島史尋, 吉田賢右: 蛋白質核酸酵素, **43**, 170 (1998).
- 4) Rye, H. *et al.*: *Nature*, **388**, 792 (1997).
- 5) Makino, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 12468 (1997).
- 6) Sakikawa, C. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **274**, 21251 (1999).
- 7) Funatsu, T. *et al.*: *Nature*, **374**, 555 (1995).
- 8) 齊藤 究, 船津高志: 蛋白質核酸酵素, **44**, 807 (1999).
- 9) Weber-Ban, E. U. *et al.*: *Nature*, **401**, 90 (1999).

Ca²⁺ イメージング革命

宮脇 敦史

なぜ *cameleon* は新世代の蛍光 Ca²⁺ 指示薬なのか。当特集では、GFP (Green Fluorescent Protein) の蛍光利用、および分子内 FRET (蛍光エネルギー移動) の実現によって付与された *cameleon* の利点に焦点を当てて、その答えを考えてみたい。生理的状況下で局所的な Ca²⁺ 動態を定量的に解析するために、*cameleon* がいかに活躍できるのかを展望してみる。^{1,2)}

1. 従来の Ca²⁺ イメージングをふりかえって

Fura-2 を代表とする蛍光 Ca²⁺ 指示薬のおかげで、細胞内 Ca²⁺ 濃度の測定は驚くほど簡単になった。それら指示薬の AM 体 (細胞膜透過性指示薬) は、非侵襲的に細胞内にロードすることができる。またレーザー共焦点顕微鏡など光学技術の進歩、画像処理などコンピューター技術の進歩と相まって、我々の Ca²⁺ イメージング技術は確実に向上した。しかし細胞内 Ca²⁺ 動態の我々の理解はまだ大して深くない。実際、たとえば小胞体内腔の遊離 Ca²⁺ 濃度や、核内 Ca²⁺ の自律的制御の有無、などといった基本的問題がほとんど片付いていない。論争の中で、データの食い違いは、解析した細胞の異質性あるいは用いた Ca²⁺ 指示薬の特性の違いに帰することがたびたびである。

私はあえて現今の蛍光 Ca²⁺ 指示薬 (fura-2, indo-1, fluo-3 など) の以下のような問題点を真剣に考えてみたい。

1) 細胞内の高分子 (特に疎水性タンパク質) と相互作用することによる artifact. *in vitro* と *in vivo* のシグナルはたいいていの場合異なる。ただ指示薬の Ca²⁺ 親和性はそれほど生体高分子によって影響されることがない

(Ca²⁺ 濃度の *in vivo* キャリブレーションの妥当性は大丈夫である)。

2) 取り込ませた後の漏れ。これを防ぐため、ほとんどの Ca²⁺ イメージングは温度を下げて、室温で行われている。Ca²⁺ ポンプ (Ca²⁺ ATPase) など、Ca²⁺ を制御する酵素は少なからずある。私はそういう酵素の温度依存性 (至適温度, Q₁₀ など) をよく知らないが、恒温動物細胞の室温における Ca²⁺ イメージングがどれだけ生理的なのかといつも疑問に思う。

上記 1, 2 は低分子化合物の指示薬に常に付随する問題点と言えるだろう。指示薬の AM 体 (細胞膜透過性指示薬) は、非侵襲的に細胞内にロードすることができる点で簡便であるが、

3) 非特異的に細胞内小器官 (小胞体など) に貯留して、artifact を生む。細胞質 Ca²⁺ 濃度を測定するつもりが、ER 由来の高濃度 Ca²⁺ シグナルを拾う危険性がある。核と細胞質の Ca²⁺ 濃度を同時に比較検討した実験データのいくつかは、この批判に曝される。さらに ER の Ca²⁺ 濃度を測るのに、Mag fura-2, Mag indo-1 など低親和性 Ca²⁺ 指示薬が用いられる。これら指示薬が細胞内小器官に貯留する問題点を逆用しているが、ER 特異的導入は不可能である。ER 以外の小器官、たとえばミトコンドリア、ゴルジ体からのシグナルも拾ってしまう。またこの ER Ca²⁺ 測定法は、細胞が活着している状態では行えない。小器官に指示薬が貯留した後、細胞質内に存在する指示薬を wash out するため、細胞質膜に穴をあけたり、細胞をパッチしなければならぬ。細胞質を人工的溶液で浸していることになる。