

# タンパク質の翻訳と折りたたみ過程の 1分子蛍光イメージング

近年、1分子計測による生命科学の研究が盛んに行われるようになってきた。その研究対象は筋肉を構成する分子モーター、遺伝子発現系など多種多様である。筆者らは遺伝子発現系の中でも特に本質的であるタンパク質翻訳と折りたたみ過程を生きたまま1分子レベルで可視化することに成功した。本稿では1分子可視化によって得られた筆者らの最近の研究結果について解説する。

上村 想太郎, 船津 高志

## 1 はじめに

蛍光測定技術は、生体物質の機能や構造変化を生きたまま調べるのに有効な手段であることは言うまでもないが、顕微鏡技術の進歩とともにイメージング技術が格段に向上したことは強調したい点である。特に超高感度EMCCD (electron multiplying charge coupled device) カメラの開発によりシグナル感度は飛躍的に向上した。その結果、蛍光標識した生体分子のシグナルが十分強くなくても細胞内のダイナミクスを詳しく観察することができるようになった。さらに高出力で安定したレーザーや理想的な波長特性を持つ光学フィルター等もイメージング技術の向上に大きく貢献してきた。しかし、こうした計測技術の向上とともに、その技術をどの生命現象の系に適用させるのかを厳密に考慮しなければ、十分にその技術の価値を発揮することはできない。そこで筆者らは、イメージング技術を遺伝子発現系の中の重要な機能を担っているタンパク質翻訳系と折りたたみの系に適用した。その結果、1分子蛍光イメージング技術を用いることによって、タンパク質が翻訳される様子や折りたたみの際のシャペロニンの機能を1分子レベルで明らかにすることができた。本稿では、特にタンパク質翻訳過程とシャペロニンによる折りたたみ機構について、最近の研究結果を紹介する。

## 2 リボソームによるタンパク質翻訳の1分子解析

タンパク質の翻訳は発現系における中心的な役割を果たし、複雑な反応過程によって成り立っている。特にタンパク質翻訳を担っているリボソーム分子の機能解明は医学、薬学の発展にも大きく貢献すると期待される。一例を挙げると、HIV (human immunodeficiency virus)

やHCV (hepatitis C virus) ウイルスの感染は真核生物におけるタンパク質翻訳過程が関係していることがわかっている。過去に行われた多角的な研究により、この過程の詳しいメカニズムは理解されつつあるが、分子レベルでのより詳細な翻訳機能解明が要求されている。筆者らはまず、真核生物よりも単純な翻訳系をもつ原核生物の大腸菌リボソームを用いて、翻訳の1分子可視化を試みた。大腸菌リボソームはRNAとタンパク質から成る巨大分子で、50S (大サブユニット) と30S (小サブユニット) が結合し、70S複合体を形成する。リボソームは、tRNA及びmRNAと3者複合体を形成する

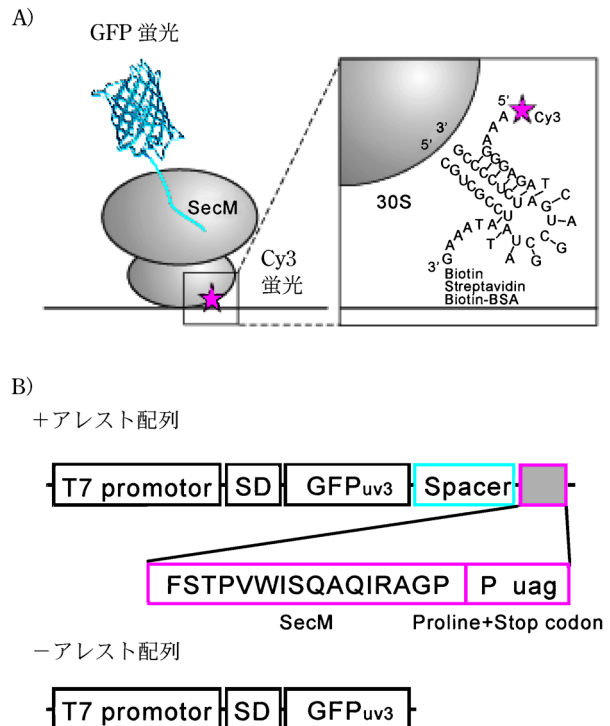


図1 基板固定リボソームによる GFP 翻訳の1分子蛍光イメージングとプラスミドデザイン

Single-Molecule Imaging of the Translational and Folding Processes of Proteins.

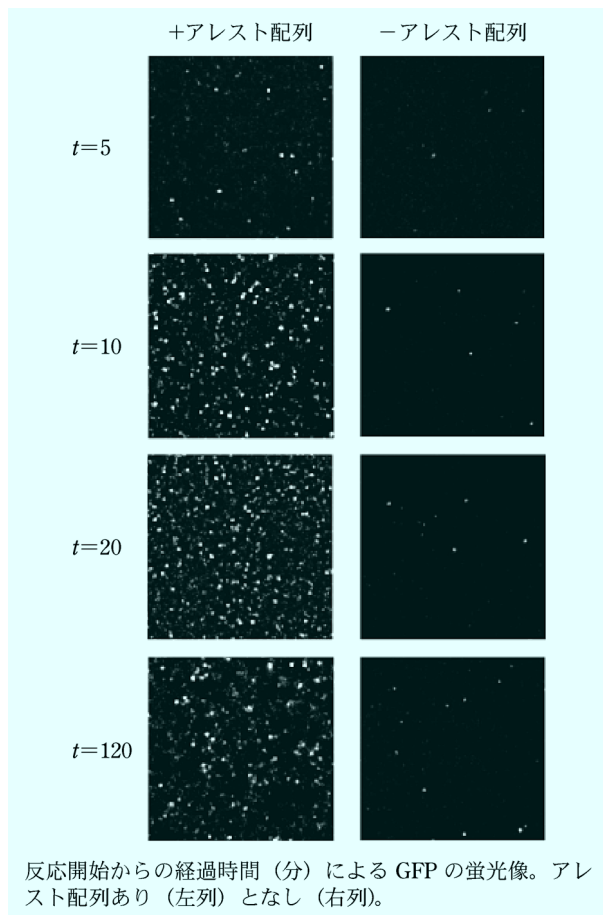


図2 翻訳による GFP 輝点数の上昇変化によるアレスト配列の評価

ことで tRNA のコドン を正確に読み取り、トランスロケーションを引き起こすことで、翻訳の伸長が行われる。翻訳過程は翻訳初期、伸長、終結の三つのプロセスから成り立っており、それぞれ翻訳開始因子、伸長因子、解離因子、及びリサイクリング因子が各過程に必須である。このような複雑な過程を詳細に解析するためには、1分子蛍光イメージング技術が有用である。これまでに tRNA を蛍光標識し、1分子蛍光イメージング法を用いて翻訳初期のメカニズムを解析した研究結果がすでに報告されている<sup>1)2)</sup>。しかし、翻訳過程を直接可視化する技術はまだ報告されていない。そこで筆者らは、翻訳直後の新生タンパク質を可視化するために、GFP (green fluorescent protein) 変異体をガラス基板上に固定したリボソームに翻訳させ、その GFP のイメージングを行った。

まず、1分子蛍光イメージングには測定したい分子の機能活性を損なわないような基板上への特異的な結合が必須である。そこで筆者らは、リボソーム 30S 小サブユニットの 16SrRNA にオリゴ RNA を付加した変異体を用いた<sup>3)</sup>。ビオチンが付加された相補的なオリゴ DNA を介して基板に特異的に固定することができた(図 1A)。さらに翻訳に必要な因子をすべて含んだ翻訳系が必須であるため、筆者らは無細胞合成系の一つであ

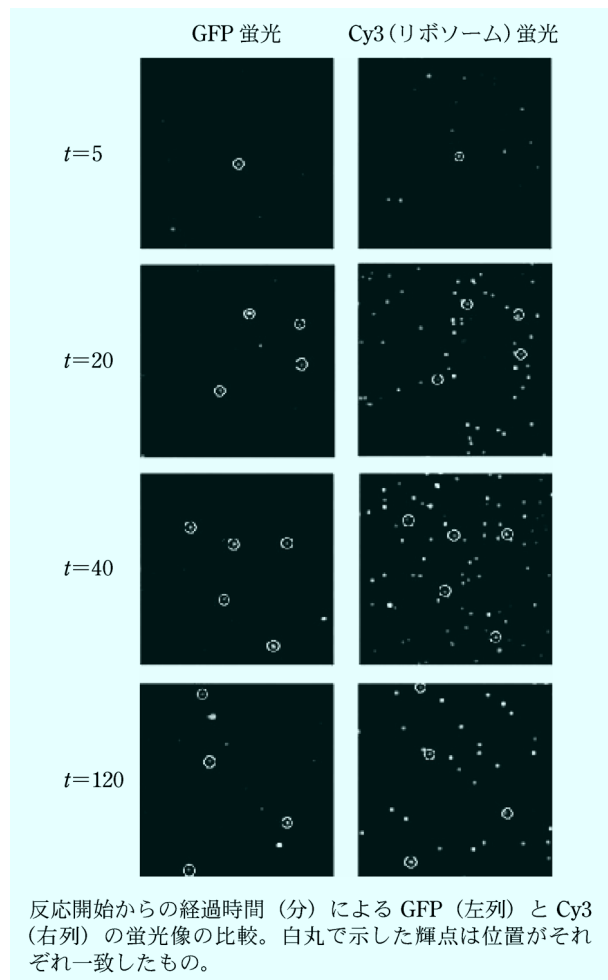
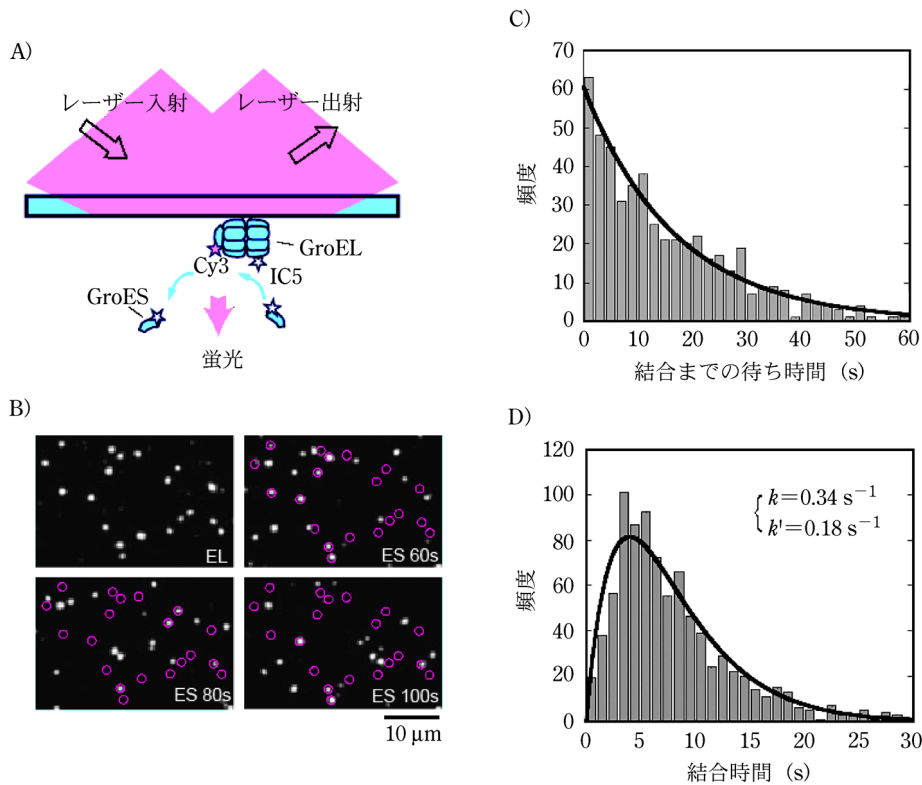


図3 GFP とリボソーム (Cy3) の輝点位置の一致による評価

る PURESYSYSTEM (ポストゲノム研究所) を用いることにした。PURESYSYSTEM とは、転写と翻訳を含むタンパク質合成系で、目的のタンパク質がコードされたプラスミドを導入すると、目的のタンパク質をインビトロで合成することができる<sup>4)</sup>。筆者らは、基板に固定したリボソームによる翻訳を可視化するため、PURESYSYSTEM  $\Delta$  リボソーム (PURESYSYSTEM に含まれている因子からリボソームのみを除去した溶液系) を用いることにした<sup>5)</sup>。

次に GFP を可視化するために、プラスミドを設計することにした。GFP が蛍光を発するためには、65~67 番目のアミノ酸により形成される発色団が酸化されることが必要である。この過程 (成熟過程) は天然 GFP では数時間と長いため、比較的成熟過程の早い GFP 変異体 (GFP<sub>uv3</sub>; F64L/S65T/F99S/M153T/V163A) を用いることにした。さらに GFP の蛍光イメージングには基板に固定されたリボソームによる翻訳サイクルを 1 回で停止させ、新生 GFP をリボソームに捕捉した状態<sup>ほそく</sup>にしておく必要がある。さもないと翻訳された GFP は、その蛍光を発する前にリボソームから解離して基板から離れてしまうため、イメージングには適さない。そこで、リボソームトンネル内でペプチドが捕捉されるこ



A) 実験方法の模式図, B) GroEL と GroES の蛍光顕微鏡写真, C) GroEL と GroES が結合するまでの待ち時間のヒストグラム, D) GroEL と GroES の結合時間のヒストグラム

図 4 GroEL と GroES の生体分子間相互作用の 1 分子蛍光イメージング

とが知られているアレスト配列の SecM 配列とリンカーを GFP 配列の後ろに導入した (図 1B)。

基板上でのリボソームの翻訳活性及びアレスト配列の効果を調べるために、まず無蛍光リボソームを高濃度 (5 nM ほど) で基板の上に固定させ、翻訳反応を開始させた上で GFP のイメージングを行った。するとアレスト配列を含まない GFP プラスミドを導入した場合は、GFP の蛍光が時間とともにほとんど変化しないのに対し、アレスト配列を含むプラスミドでは時間とともに GFP の蛍光輝点の数が上昇した (図 2)。この結果から、アレスト配列により新生 GFP が基板に固定されたリボソームと安定した複合体を形成していることが示唆された。GFP の輝点が固定されたリボソーム分子による翻訳であることをさらに証明するために、固定するリボソーム分子を低濃度 (50 pM ほど) にすることで、リボソームと GFP の輝点の位置が一致するかどうかを確認した。Cy3 蛍光色素が導入された相補的なオリゴ DNA を用いることで、リボソームを蛍光標識することができた。同様に GFP の合成を顕微鏡下で行ったところ、Cy3 と GFP の輝点の位置が一致しただけでなく、一致した分子の割合が時間経過とともに上昇した (図 3)。これら一致した分子は、蛍光強度分布からそれぞれ 1 分子であることも明らかになった<sup>5)</sup>。これらの一致率の上昇時間は約 20 分ほどであり、溶液系における GFP の蛍光強度の上昇時間とほぼ変わらない値を示し

た。この 20 分は成熟過程の時間が大半であるため、正確な翻訳時間を反映しているわけではない。

これらの手法は翻訳メカニズムだけでなく、翻訳と同時に起こるタンパク質の折りたたみメカニズムの解明に貢献するであろう。しかし、1 分子蛍光イメージング法による更なる翻訳の解析には、翻訳速度に比べて十分早い成熟過程を持つ蛍光タンパク質を用いる必要がある。

### 3 シャペロニンによるタンパク質の折りたたみの 1 分子解析

#### 3.1 シャペロニン GroEL, GroES 相互作用の 1 分子イメージング

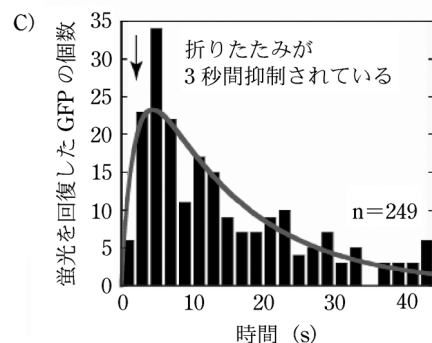
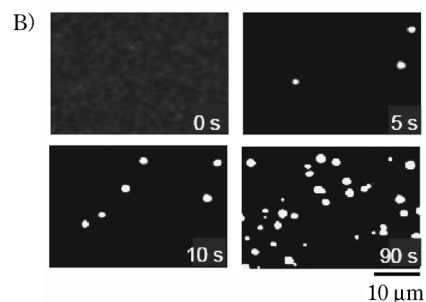
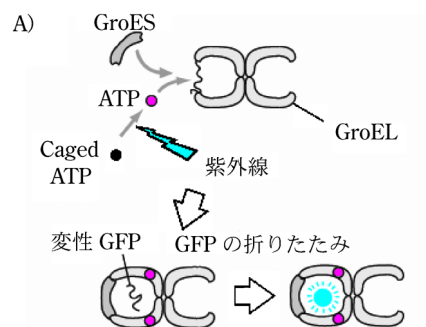
前節では、タンパク質の誕生について述べた。タンパク質が機能を発揮するためには、ポリペプチドが適切に折りたたまれ、正しい立体構造を形成する必要がある。この折りたたみを助けているのが、分子シャペロンである。正しく折りたたまれて機能を発揮するようになったタンパク質は、高温などのストレス条件下に置かれると立体構造が壊れて変性してしまう。その結果、凝集を引き起こすなど、細胞にとって好ましくない状況になる。変性したタンパク質を捕獲して凝集を防ぎ、さらに内部空洞に閉じ込めてタンパク質が正しく折りたたまれるのを助ける分子シャペロンは、シャペロニンと呼ばれている。この節では、変性したタンパク質がシャペロニンによって再生する様子を 1 分子解析した例を紹介したい。

様々な分子シャペロンの中で、最も研究が進んでいるのが大腸菌のシャペロニン GroEL である<sup>6)</sup>。GroEL は七つのサブユニット（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している。GroEL に ATP 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。この空洞の中でシャペロニンの基質となるタンパク質の折りたたみが起こる。

シャペロニンがどのようにして変性タンパク質を折りたたむのかを明らかにするため、変性タンパク質存在下で GroEL と GroES が相互作用（結合と解離）する様子を1分子蛍光イメージングした。まず、蛍光色素 IC5 で標識した GroEL をガラスに固定し、変性タンパク質と ATP 存在下で蛍光標識した GroES が GroEL に結合・解離するダイナミクスを観察した（図 4A）<sup>7)</sup>。GroEL の活性を保持したまま蛍光色素を結合させるために、変異 GroEL (D490C) を作製し、このシステイン残基に IC5 のマレイミド基を反応させ、さらに基板に固定した。次に、別の蛍光色素 Cy3 で標識した GroES を溶液中加入し、GroEL と結合・解離の様子を観察した。GroES のブラウン運動は非常に速いので、ビデオでは蛍光の輝点として観察されず背景光となるだけである。従って、ブラウン運動する分子は見えず、結合して止まった分子だけを観察できるのである。このように、分子のブラウン運動と全反射による局所励起を巧みに組み合わせることにより、GroEL と GroES の1分子間相互作用をイメージングすることが可能になった（図 4B）。ビデオ画像を解析し、GroES が GroEL に結合するまでの待ち時間と、結合時間のそれぞれのヒストグラムを作成した。GroES が結合するまでの待ち時間は指数分布となり、このことは GroES の結合が常に同じ確率でランダムに起こっていることを示している（図 4C）。溶液中の GroES の濃度と結合頻度から結合速度定数が  $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と求めた。この値は、溶液中の他分子を使って生化学的に求められた値とよく一致しており、GroEL がガラスに固定されていても機能を保っていること示している。次に、GroES の結合時間を解析した結果、GroES は、ある中間体を経てから解離する二段階反応であり、それぞれの反応の時定数は3秒と5秒と見積もられた（図 4D）。ここで疑問になるのは、この反応中間体をとることに、どのような意味があるのかということである。

### 3・2 シャペロニンによる GFP の折りたたみの1分子解析

この中間体がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、シャペロニン分子内で起こる変性タンパク質の折りたたみを1分子イメージングした<sup>8)</sup>。このために、基質タンパク質として GFP を利用した。GFP



A) 実験方法の模式図, B) 折りたたんだ GFP の蛍光顕微鏡写真, C) GFP が蛍光を回復するのに要した時間のヒストグラム

図 5 GFP 折りたたみの1分子蛍光イメージング

を大腸菌で発現させて精製すると緑色の蛍光を発する。しかし、これを酸性の条件におくと変性して蛍光を失う。変性した GFP がシャペロニンによって正しく折りたたまれると再び蛍光を発することを利用して、GFP が正しい立体構造に戻った瞬間をイメージングによって明らかにすることが可能である。

まず、酸変性させた GFP を GroEL の入った溶液に希釈し、変性 GFP-GroEL 複合体を作製し、スライドガラス上に固定した。その後、GroES と Caged ATP (ATP に保護基を結合させて不活化した化合物。紫外光照射により保護基が分解しミリ秒で ATP が生成される) を加え、顕微鏡下で紫外線を照射して ATP を生成し、シャペロニンの反応を開始させた（図 5A）。その結果、紫外線照射後、3秒たってから GFP の蛍光が次に現れた（図 5B）。このようにして、1分子のタンパク質がフォールディングするところを初めてイメージングすることに成功し、シャペロニンによるタンパク質折りたたみに特徴的な3秒のタイムラグが明らかになっ

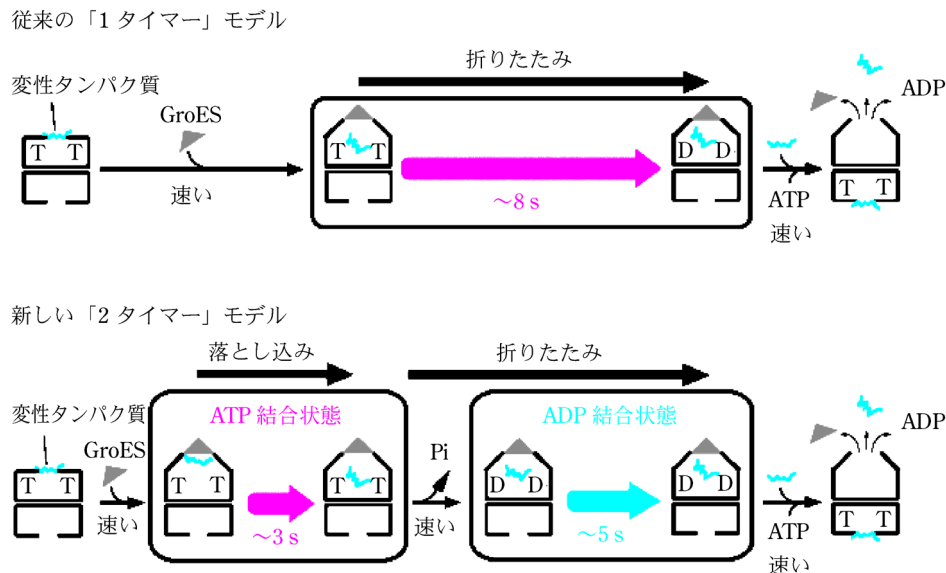


図6 シャペロニン反応サイクルのモデル

た(図5C)。新たに見つかったGroEL中間体は、GroESと変性タンパク質を両方結合していることを示している。GroELは、変性タンパク質、GroESと順を追って解離することで、確実に基質タンパク質を自らの空洞に閉じ込めていることが、1分子蛍光イメージングによって明らかになった。

### 3・3 シャペロニン反応サイクル

このように、1分子計測によってシャペロニン反応サイクルにおける二つの律速過程が明らかになった。さらに、GroELのATPase測定や、ATP加水分解速度の遅い変異体の解析を行い、筆者らは、新しいシャペロニン反応サイクルのモデル「2タイマー」モデルを提唱した(図6)。一つめのタイマーは変性タンパク質をGroELの空洞に確実に閉じ込めるのに使われ、二つめのタイマーは変性タンパク質が正しく折りたたまれるのに必要な時間を確保するために使われると考えられる。

## 4 さいごに

生物物理学から始まった1分子を見て操作するという“1分子生理学”は、生化学、細胞生物学、分子生物学などの手法と組み合わせたり、さらに発展するであろう。また、バイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合によって、単一分子計測は従来の計測限界を打ち破り、大きく発展することだろう。

ここで紹介した研究は、Joseph D. Puglisi教授(Stanford University School of Medicine)、上田卓也教授、田口英樹准教授、清水義宏博士(東京大学大学院新領域創成科学研究科)、吉田賢右教授(東京工業大学資源化学研究所)、船津研究室のメンバーによるものである。共同研究者のみなさんに感謝の意を表したい。

## 文献

- 1) S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Jr. Gonzalez, J. D. Puglisi, S. Chu : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 12893 (2004).
- 2) R. A. Marshall, C. E. Aitken, M. Dorywalska, J. D. Puglisi : *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 177 (2008).
- 3) S. Uemura, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, S. Chu : *Nature*, **446**, 454 (2007).
- 4) Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda : *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
- 5) S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, T. Funatsu : *Nucleic Acids Res.*, **36**, e70 (2008).
- 6) A. L. Horwich, G. W. Farr, W. A. Fenton : *Chem. Rev.*, **106**, 1917 (2006).
- 7) H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu : *Nat. Biotechnol.*, **19**, 861 (2001).
- 8) T. Ueno, H. Taguchi, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu : *Mol. Cell*, **14**, 423 (2004).



上村想太郎 (Sotaro UEMURA)  
 東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)。早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》リボソームによるタンパク質翻訳機構の1分子解析。《主な著書》“最新 分子マシン”(化学同人)。《趣味》ドライブ。  
 E-mail : uemura@mol.f.u-tokyo.ac.jp



船津高志 (Takashi FUNATSU)  
 東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)。早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程単位取得退学。理学博士。《現在の研究テーマ》生体分子機能の1分子蛍光イメージング。《主な著書と出版社名》“生命科学を拓く新しい光技術”(共立出版)。  
 E-mail : funatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp