

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370065

研究課題名（和文） タンパク質の翻訳と熟成を担う生体分子機械の1分子機能解析

研究課題名（英文） Single-molecule analysis of functions of biomolecular machines that synthesize or assist folding of proteins.

研究代表者

船津 高志 (FUNATSU TAKASHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

研究成果の概要（和文）：

1分子のリボソームと mRNA からなる翻訳の初期過程にある複合体の破断力を光ピンセットにより測定した。その結果、IF2 は最終的に形成される 70S 翻訳開始複合体を安定化することで、効率的な翻訳開始に寄与していることが明らかになった。次に、シャペロニン反応サイクルを解析した。GroEL は2つのリングを交互に利用しながら反応サイクルを進行させていると考えられていた。しかし、高濃度の変性タンパク質が存在する場合、GroEL の両側のリングに GroES が2個同時に結合した複合体が形成されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Rapture force of single ribosome and mRNA was measured by optical tweezers. We found that IF2 helped to lock the 70S ribosome over the start codon during initiation, thus maintaining reading frame. Next, we studied chaperonin reaction cycle. It is widely believed that an asymmetric GroEL-GroES complex (termed a bullet-shaped complex) is the only form of the GroEL-GroES complex, and a symmetric GroEL-(GroES)₂ complex (termed a football-shaped complex) is not formed during the reaction cycle. However, we found that football-shaped complex was formed in the presence of sufficient amount of denatured proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測、ナノバイオ、分子機械

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は mRNA 上に書かれた遺伝暗号に従いリボソームによって合成される。リボ

ソームは分子量約 2.7 MDa の巨大な分子機械であり、その大部分はリボソーム RNA で構成され、コドンとして記述された mRNA 上の遺

伝情報に従ってアミノアシル tRNA を次々と正確に結合し、ペプチド結合を形成し続けながら目的のタンパク質を合成する機能を持っている。リボソーム機能の大きな特徴の1つとして50Sサブユニットの大部分を占めている23SrRNAにはペプチジルトランスフェラーゼと呼ばれるペプチド結合を触媒するRNA酵素(リボザイム)としての機能を持っていることが挙げられる。一方、30Sサブユニットの16SrRNAにはmRNAと相互作用し、mRNA上のコドンとtRNA上のアンチコドン結合を保護する機能を持っている。mRNA上の遺伝情報を正確にタンパク質へと翻訳するためにはこれらの重要な2つの機能が独立に働くのではなく、互いに協同的に働かなければならず、そこには30S-50Sサブユニット間に機能する巧妙な共役メカニズムが存在するはずである。しかし、これらの現象を明らかにするためには従来までの生化学的手法や構造解析によるアプローチでは限界がある。生化学的手法を用いた多分子系によるアプローチではデータが平均化されてしまうために個々の分子の特性を直接捉えることは難しい。さらに、構造生物学的手法では試料を結晶化させることがほとんどのため、相互作用が時間的にどのように変化するかを捉えるのは非常に難しい。そこで、申請者は、1分子蛍光イメージング法を駆使してリボソーム内のtRNAの動きを検出することによりタンパク質合成のメカニズムを明らかにすることを試みた。

また、本研究課題ではリボソームによるタンパク質の誕生に引き続いて起こるタンパク質の折りたたみにシャペロニンがどのように関与しているかを1分子解析により明らかにする。研究代表者は、吉田賢右氏らのグループと協力して、GroEL、GroESの結合・解離を1分子イメージングすることに成功している(Taguchi et al., Nature Biotech. 2001)。これはタンパク質分子間相互作用を光学顕微鏡でイメージングした最初の報告である。さらに、GroEL内部でのGFPの折りたたみを1分子イメージングすることにより、シャペロニンの反応サイクルには2つの律速過程が存在し、それぞれが、変性タンパク質のGroEL内部への落とし込みと、内部での折りたたみに使われていることを明らかにした(Ueno et al., Mol. Cell 2004)。また、従来、GroELは交互に2つのリングを使用して反応サイクルを進行させていると考えられており、生化学の教科書にはtwo-strokeモデルとして掲載されている。しかし、2つのリングに同時にGroESが結合した複合体(football型複合体)を形成していることを示すデータを我々は多分子系の実験で得ており(Sameshima et al., J. Biol. Chem. 2008)、1分子計測を用いた詳細なメカ

ニズムの検討を必要としている。Zero-mode wave guides (Levene et al., Science 2003)を使って高濃度のGroES存在下で1分子蛍光イメージングすることにより、従来考えられていたGroELの反応サイクルが大きく修正を受けることになるだろう。

2. 研究の目的

リボソームによるタンパク質の合成と、シャペロニンによるタンパク質の折りたたみについて、以下の点を中心に研究を行う。

(1) 翻訳開始複合体におけるリボソーム-mRNA間相互作用

細菌のリボソームは30Sと50Sの2つのサブユニットで構成されるタンパク質-RNA複合体であり、mRNA上の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳する役割を担っている。リボソームによる翻訳は、開始過程、伸長過程、終止過程の3つの過程に大別される。開始過程は、3つの翻訳開始因子(IF1、IF2、IF3)の30Sサブユニットに対する結合や開始tRNA(fMet-tRNA^{fMet})の開始コドンへの結合、そして50Sサブユニットの結合に伴って起こるGTPの加水分解によって70S翻訳開始複合体を形成する複雑な過程であり、様々な様式で翻訳制御が起こっていることが知られている。近年、生化学的手法や構造学的手法などを用いた先行研究により、IFの機能や翻訳開始の各素過程における構造情報が明らかになってきた。しかし、リボソームはmRNAに結合した状態を維持しないと翻訳を開始することができないことを考えると、翻訳開始の効率に対する寄与が大きいのは30S-mRNA間相互作用の安定性であり、これに関する知見は乏しい。先行研究により、高開口数を持つ対物レンズで赤外レーザーを集光させることで極小物体を非接触で捕捉することができる光ピンセット技術を用いて、リボソーム30S-mRNA間の結合力(破断力)を1分子レベルで測定する実験系が開発された。本研究では、この破断力測定系を用いて翻訳開始の各素過程において30S-mRNA間の結合力を調べ、各因子の結合やGTP加水分解が30S-mRNA間相互作用の変化にどのように寄与しているのかを検討することを目的とする。

(2) シャペロニン反応サイクル中のGroEL-GroES複合体の解析

従来の定説によると、GroELは交互に2つのリングを利用して反応サイクルを進行させていると考えられていた。すなわち、反応サイクル中においてGroELはGroESと1:1で結合した複合体(bullet型複合体)のみを形成し、2つのリングに同時にGroESが結合した複合体(football型複合体)を形成しないと考えられていた。しかし、我々が蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して反応サイ

クル中の GroEL と GroES の結合状態を解析した結果、約半数の GroEL は反応サイクル中において football 型複合体を形成している結果を得た (Sameshima et al., J. Biol. Chem. 2008)。反応サイクル中の、どのような状態で football 型複合体が形成され、またどのような状態で bullet 型複合体になるのかを 1 分子蛍光イメージング法を用いて明らかにする。具体的には蛍光標識した GroEL を Zero-mode wave guides の底に固定し、溶液中に別の蛍光色素で標識した GroES を加えることにより FRET を利用して football 型複合体と bullet 型複合体を区別する。これによりシャペロニンの反応サイクルを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 翻訳開始複合体におけるリボソーム-mRNA 間相互作用

本研究では、C68 変異型リボソームを用いた。C68 リボソームは、16S rRNA の helix44 に付加配列が遺伝子工学的に導入された変異体であり、この付加配列はループ構造を取っている。まず C68 リボソーム複合体を 5'-biotin 化 mRNA を介してガラス基板上 (biotin 化 BSA, streptavidin によりコート) に固定した。次に C68 リボソームの変異ループに相補的な配列を持つ oligonucleotide を介して、ビーズをリボソームに結合させた。破断力測定を行う際には、ビーズを光ピンセットにより捕捉し、ステージを一定速度で一方向に動かした。これにより、ビーズ-リボソーム複合体に一定の割合で負荷が加わっていく。この負荷が一定の大きさに達すると、リボソーム-mRNA 間の破断現象が起こり、ビーズは捕捉中心に戻る。結合が破断する瞬間のビーズの変位と光ピンセットの弾性率から破断力を算出した。

(2) シャペロニン反応サイクル中の GroEL-GroES 複合体の解析

① 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたフットボール型複合体の検出

蛍光分光光度計を用いて、特定のアミノ酸残基に蛍光色素を導入した GroEL と GroES の分子間 FRET を測定することで、定常状態におけるフットボール型複合体の存在を確認する実験を行った。先行研究により明らかにされているフットボール型複合体形成条件 (ATP+BeFx) と弾丸形複合体形成条件 (ADP+BeFx)、および GroEL の反応サイクル中 (ATP) の FRET 効率を比較した。さらに ATP 加水分解能が低下した GroEL の変異体 (D398A) を用いて両側に ATP が結合した状態でフットボール型複合体が形成されるか検討した。

② 変性タンパク質がフットボール型複合体形成に与える影響の解析

変性タンパク質は GroEL の ATPase 活性を増加させるなど、GroEL の反応サイクルに影響を与えることが知られている。そこで、変性タンパク質がフットボール型複合体の形成に与える影響を調べるため、変性タンパク質濃度を変化させて、GroEL-GroES の分子間 FRET を測定した。次に、ADP によるフットボール型複合体形成阻害効果に対し、変性タンパク質がどのように影響しているのかについて調べた。20 μ M ADP 存在下において変性タンパク質濃度を変化させ、ADP-BeFx で形成させた弾丸型複合体に対する GroES の結合速度の変化を FRET により測定した。

③ フットボール型複合体の 1 分子蛍光イメージング

GroEL がどのようにフットボール型複合体を経由した反応サイクルを進行させているのか調べた。フットボール型複合体を含む反応経路は GroEL1 分子に対し GroES が 2 分子相互作用するという 3 分子が関与した複雑な反応である。このような、複雑な反応を解析する場合、個々の反応の素過程を解析することができる 1 分子蛍光イメージング法の利用が有効である。そこで、フットボール型複合体を経由した GroEL の反応経路を 1 分子蛍光イメージングにより解析した。フットボール型複合体を飽和量形成させるためには高濃度の蛍光標識 GroES を必要とするため、zero-mode waveguides (ZMWs) 基板を利用した 1 分子蛍光イメージング法を利用した。ビオチン及び Alexa488 で標識した GroES をビオチン化 BSA とストレプトアビジンを介して ZMWs 基板底面に固定し、50 nM Cy5 標識 GroEL (Cy5-GroEL)、300 nM Cy3 標識 GroES (Cy3-GroES)、および変性タンパク質である還元型ラクトアルブミンを溶液中に存在させ、Cy3-GroES 及び Cy5-GroEL の蛍光を同時計測した。

4. 研究成果

(1) 翻訳開始複合体におけるリボソーム-mRNA 間相互作用

最初に、IF2 を結合していない 3 種類のリボソーム複合体を作製し、破断力測定を行うことで、開始 tRNA や 50S の結合が 30S-mRNA 間相互作用に与える影響を調べた。30S-mRNA 複合体、30S-mRNA-tRNA^{Met} 複合体、70S-mRNA-tRNA^{Met} 複合体の破断力分布は全て 1 つのピークを持つ山型分布となった。ガウス分布で fitting したところ、ピーク値は順に 5.7、15.2、16.5 pN となった。また、先行研究から、70S-mRNA 複合体の破断力分布のピーク値は 10.2 pN であることが知られている。これらの結果から、30S-mRNA 複合体に開始 tRNA が結合すると、30S-mRNA 間相互作用が大きく安定化されることがわかった。一方

で、30S-mRNA-tRNA^{Met} 複合体に対する 50S の結合は大きな変化を引き起こさなかった。また、30S-mRNA-tRNA^{Met} 複合体と 70S-mRNA 複合体を比べても前者の方が安定であることから、IF2 非存在下においては、50S よりも開始 tRNA の結合が 30S-mRNA 間相互作用の安定化に大きく寄与していることがわかった。

次に、IF2 を結合した 4 種類のリボソーム複合体を作製して破断力測定を行うことで、IF2 の結合や 50S の結合、そして 50S の結合に伴う IF2 による GTP の加水分解が 30S-mRNA 間相互作用に与える影響を調べた。

30S-mRNA-fMet-tRNA^{Met}-IF2(GTP) 複合体、70S-mRNA-fMet-tRNA^{Met}-IF2(GDPNP) 複合体、70S-mRNA-fMet-tRNA^{Met}-IF2(GDP) 複合体、70S-mRNA-fMet-tRNA^{Met}-IF2(GTP) 複合体の破断力分布は、それぞれ 16.1、22.1、20.7、21.8 pN を頂点とする山型分布となった。IF2 は 50S の結合後即座に GTP を加水分解し、GDP + Pi 状態となるが、リン酸の放出は加水分解と比べて顕著に遅いことが知られている。すなわち、70S リボソーム中においては IF2 が GTP を結合している状態は存在しないと考えられる。よって GDPNP 状態は「加水分解後のリン酸放出前の状態」を、GDP 状態は「加水分解後のリン酸放出後の状態」を模していると考えられる。これを踏まえて考えると、本項の結果は、IF2 の結合そのものは 30S-mRNA 間相互作用に影響を与えないが、50S 結合後の IF2 による GTP 加水分解に伴って、30S-mRNA 間相互作用が安定化されたことを示している。一方、リン酸の放出は 30S-mRNA 間相互作用には大きな影響を及ぼさないことがわかった。

本研究により、翻訳の開始過程において、開始 tRNA の結合と、50S の結合後に起こる GTP の加水分解に伴って 30S-mRNA 間相互作用が段階的に安定化されることがわかった。先行研究により、開始 tRNA の結合に伴って mRNA のコンフォメーションが変化すること、また 50S の結合と GTP の加水分解に伴ってリボソームの構造や IF2 の結合位置などが変化することが知られており、このようなリボソーム複合体のダイナミックな変化の結果として 30S-mRNA 間相互作用が安定化され、効率的な翻訳開始を可能にしていると考えられる。

(2) シャペロニン反応サイクル中の GroEL-GroES 複合体の解析

① 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いたフットボール型複合体の検出

フットボール型複合体形成条件 (ATP+BeFx) と弾丸形複合体形成条件 (ADP+BeFx)、および GroEL の反応サイクル中 (ATP) の FRET 効率を比較した。その結果、フットボール型複合体と弾丸型複合体が反応サイクル中で共存していることが確認された (図 1)。さらに ATP 加水分解能が低下

した GroEL の変異体 (D398A) を用いることで、フットボール型複合体は両側に ATP が結合した状態で形成されることを見出した。

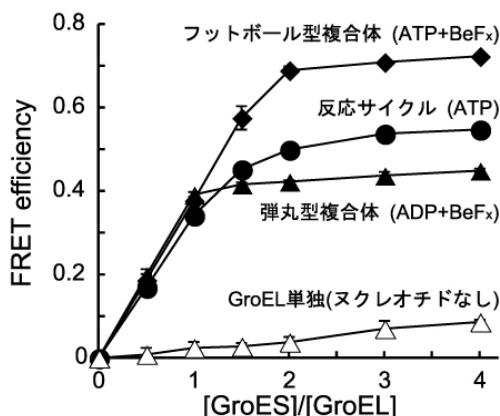


図 1. FRET を用いたフットボール型複合体の検出 (n=3, 平均±標準誤差)

② 変性タンパク質がフットボール型複合体形成に与える影響の解析

フットボール型複合体の形成は変性タンパク質濃度依存的に促進され、また、変性タンパク質による GroEL の ATPase 活性化と良好な相関を示した。次に、ADP によるフットボール型複合体形成阻害効果に対し、変性タンパク質がどのように影響しているのかについて調べた。20 μM ADP 存在下において変性タンパク質濃度を変化させ、ADP-BeFx で形成させた弾丸型複合体に対する GroES の結合速度の変化を FRET により測定した。その結果、弾丸型複合体に対する GroES の結合速度が変性タンパク質濃度依存的に加速することが分かった。すなわち、変性タンパク質は ADP による 2 個目の GroES の結合阻害効果を低下させ、その結果、フットボール型複合体の形成を促進する働きがあることが明らかとなった。

③ フットボール型複合体の 1 分子蛍光イメージング

フットボール型複合体を経由した GroEL の反応経路を 1 分子蛍光イメージングにより解析した。フットボール型複合体を飽和量形成させるためには、高濃度の蛍光標識 GroES を必要とするため zero-mode waveguides (ZMWs) 基板を利用した 1 分子蛍光イメージング法を利用した。ビオチン及び Alexa488 で標識した GroES をビオチン化 BSA とストレプトアビジンを介して ZMWs 基板底面に固定し、50 nM Cy5 標識 GroEL (Cy5-GroEL)、300 nM Cy3 標識 GroES (Cy3-GroES)、および変性タンパク質である還元型ラクトアルブミンを溶液中に存在させ、Cy3-GroES 及び Cy5-GroEL の蛍光を同時計測した。その結果、Alexa488-ビオチン化 GroES が存在する位置に Cy3-GroES、Cy5-GroEL の輝点が共局在す

の様子を確認できた。さらに共局在の様式は Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同時に結合して同時に解離する様式(タイプ 1)、Cy3-GroES と Cy5-GroEL が同時に結合して、先に Cy3-GroES が解離する様式(タイプ 2)に分類され、タイプ 1 が 30%、タイプ 2 が 48%、その他の結合様式が 22%であった。すなわち、フットボール型複合体の 2 つの GroES は先に結合したものが先に解離する場合(タイプ 2)が若干多いものの、後から結合した GroES が先に解離すること(タイプ 1)もかなりの割合で起こることが明らかとなった。また、Cy3-GroES と Cy5-GroEL が共局在した時間を解析したところ、フットボール型複合体から弾丸型複合体へ移行する時間は約 3 秒、弾丸型複合体から GroEL 単体へと移行する時間は約 5 秒であった。

本研究の結果から、GroEL の反応機構は図 2 のようにまとめられる。まず、GroEL の反応サイクルにはフットボール型複合体を経由する経路と経由しない経路が存在する。フットボール型複合体は両側のリングが ATP の状態で形成され、そして、先に ATP が加水分解した側のリングから GroES が解離する。変性タンパク質濃度が低いときは、フットボール型複合体から GroES が解離した後も GroEL のリングに ADP が残存する。その結果、フットボール型複合体の形成が阻害され、GroEL はフットボールを経由しない経路を利用して ATP の消費を抑えながら機能する。一方、変性タンパク質濃度が高くなると、GroES が解離した後のリングから ADP が解離しやすくなる。その結果、フットボール型複合体が形成されやすくなり、両側のリングを同時並行で利用しながら効率のよい折れたたみ反応を進行させると考えられる。このように、GroEL は変性タンパク質濃度など細胞内の環境を察知しながら 2 つの経路を使い分けることが出来る巧妙に設計された分子機械であることが分かった。本研究結果は GroEL の反応サイクル中にフットボール型複合体を経由する反応経路が存在し、また、どのような条件で現れるのかについて明確に示した初めての例である。

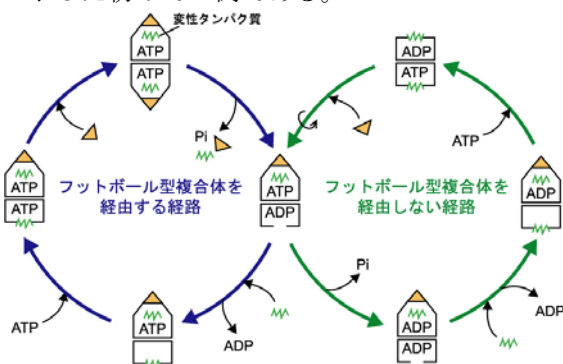


図 2. 本研究により明らかにされた GroEL の反応モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Tomoaki Masuda, Alexyey N. Petrov, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu, Joseph D. Puglisi, and Sotaro Uemura. Initiation factor 2 and 50S cooperate to lock mRNAs on the ribosome during initiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 (13): 4881-4885 (2012) 査読有 DOI:10.1073/pnas.1118452109

②Ryo Iizuka, Taro Ueno, Nobuhiro Morone, and Takashi Funatsu. Single-molecule fluorescence polarization study of conformational change in archaeal group II chaperonin. PLoS ONE. 6: e22253 (2011) 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0022253

③Ryo Iizuka, Mai Yamagishi-Shirasaki, and Takashi Funatsu. Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. Anal. Biochem. 414:173-178 (2011) 査読有 DOI:10.1016/j.ab.2011.03.036

④Tomoya Sameshima, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Junichi Wada, Mutsuko Aoki, Naonobu Shimamoto, Iwao Ohdomari, Takashi Tanii and Takashi Funatsu. Single-molecule study on the decay process of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides. J. Biol. Chem. 285: 23159-23164 (2010) 査読有 DOI:10.1074/jbc.M110.122101

⑤Tomoya Sameshima, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Takashi Funatsu. Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex. Biochem. J. 427: 247-254 (2010) 査読有 DOI:10.1042/BJ20091845

[学会発表] (計 2 4 件)

①Ryo Iizuka, Takashi Funatsu “Kinetic analysis of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins” 日本生物物理学会第 49 回年会 2011 年 9 月 16 日～18 日 兵庫県立大学・姫路書写キャンパス 赤穂郡、兵庫県

②Tomoya Sameshima, Ryo Iizuka, Taro Ueno, and Takashi Funatsu “Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex” May

4-May 8, 2010 Meeting on Molecular Chaperones and Stress Response, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

③Ryo Iizuka, Tomoya Sameshima, Taro Ueno, Junichi Wada, Mutsuko Aoki, Naonobu Shimamoto, Iwao Ohdomari, Takashi Funatsu
“Single-molecule characterization of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides” May 4-May 8, 2010 Meeting on Molecular Chaperones and Stress Response, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船津 高志 (FUNATSU TAKASHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし