

称号及び氏名 博士（理学） 磯貝 純美

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 31 日

論文名 「Study on the reassembly mechanism of fluorescent protein
(蛍光タンパク質の再構成機構に関する研究)」

論文審査委員 主査 多田 俊治
副査 徳富 哲
副査 藤井 郁雄

論文要旨

【序論】

多くのタンパク質は単独で機能するのではなく、他のタンパク質と相互作用することで転写やシグナル伝達経路の調節のような重要な役割を担っている。タンパク質は独特の構造をもち、相手分子と互いに認識し合うことで厳密な制御機構を遂行し、細胞の恒常性を保っている。したがって、タンパク質間の相互作用解析はさまざまな生命現象の解明につながる。

近年、蛍光タンパク質を用いた細胞の動態解析が実用化され、細胞内の構造体の細かな動きや、形態変化の時期や順序を知ることができるようになった。蛍光タンパク質を用いた細胞内でのタンパク質間相互作用を解析する方法の一つに **Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)** 解析がある。それは、N 末端側と C 末端側に分割され蛍光を失った状態の蛍光タンパク質各断片が、互いに相補的に結合して蛍光を回復する現象を利用するものである。観察したいタンパク質を蛍光タンパク質断片に融合させて細胞内で共発現させ、目的タンパク質間の相互作用を通して蛍光タンパク質の再構成により回復した蛍光を観察する (Fig. 1)。このような BiFC 解析にも問題点がある。それは、使用する蛍光タンパク質や融合タンパク質の組み合わせによって結果が著しく左右されることである。特に、融合タンパク質に非依存的な蛍光タンパク質断片同士の相互作用は、正確な蛍光回復の検出を妨げる最大の問題である。

本研究課題は、有用な BiFC 解析系構築のための手がかりを得ることを目的としたものであり、蛍光タンパク質である Venus について、その再構成体の構造および形成機構の解明を、各種クロマトグラフィー、タンパク質結晶構造解析、質量分析、動的光散乱、円二色性測定などにより試みた。さらに、再構成体形成の鍵と考えられた部位に変異を導入し、再構成体形成能を示差走査熱量測定により評価を行った。

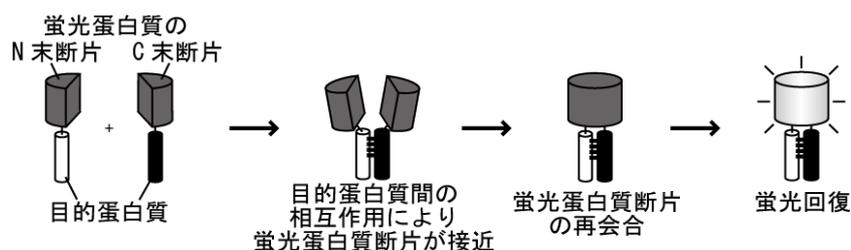


Fig. 1 BiFC の原理

【第一章 Venus 再構成体の発現および精製】

蛍光タンパク質 Venus のN末端側 (VN155: 1-154 残基) とC末端側 (VC155: 155-238 残基) を大腸菌で共発現させ、Ni アフィニティー、陰イオン交換カラムにより精製した。陰イオン交換クロマトグラフィーで Venus 再構成体が3本の成分に分離するという現象を示した (Fig. 2)。各成分と whole Venus の蛍光スペクトル特性に違いは見られなかったことから、これらの成分は Venus 再構成体に相当するものと考えられる。各成分をそれぞれゲルろ過クロマトグラフィーにより精製すると、peak 1 および peak 2 は単量体、peak 3 は多量体であることが示唆された。さらに、peak 3 のゲルろ過クロマトグラフィーでは多量体以外に単量体のピークが検出された。peak 3 を 37°C で3日間インキュベートしたところ、多量体が減少し、単量体が増加した。このことから、再構成 Venus は多量体から単量体へ転移することが示唆された。同様に発現し、精製した whole Venus ではこのような現象は見出されなかったことから、この成分分離は再構成 Venus 固有の問題である。

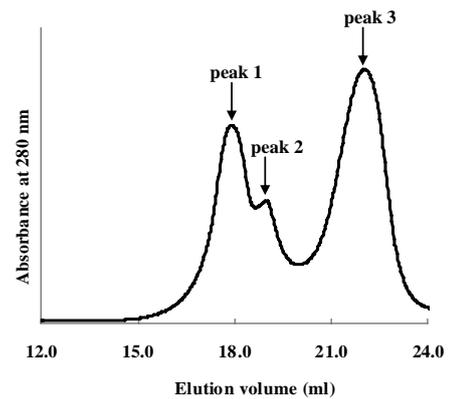


Fig. 2 陰イオン交換クロマトグラム

【第二章 Venus 再構成体の物理学的特性】

質量分析: peak 1 および peak 3 は VN155/VC155 再構成体を基本とした分子であることが明らかとなった。一方、peak 2 では、VN155 の分子量が peak 1 や 3 で得られた実測値や計算値に比べて約 180 程度大きいという結果になった。これは、アミノ酸残基の修飾によるものではないかと考えている。

動的光散乱: peak 3 は 8 量体であることが明らかとなった。対照として測定した peak 1 および whole Venus はそれぞれ単量体であることが確認された。これはゲルろ過カラムクロマトグラムの結果と一致する。

円二色性(CD)測定: peak 1 および peak 3 の CD スペクトルに有意な差は見られなかったことから、これら成分は類似のβバレル構造を持つものと推定した。また、多量体から経時あるいは加熱により産生した単量体においても同一のスペクトルを示したことから、多量体から得られた単量体も同様のβバレル構造を持つと結論した。一方、whole Venus と比較した結果、再構成体のαヘリックス含量は僅かに減少していることが示唆された。

X線結晶構造解析: 単量体と推定された精製成分についてシッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C 下で結晶化を行った。その結果、25%(w/v) PEG3350、0.1 M HEPES buffer pH 7.5、0.2 M Li₂SO₄ を含む沈殿剤を用いた条件下で、黄色の蛍光を発する結晶が得られた。大型放射光施設 KEK・Photon Factory において回折X線測定を行い、2.1 Å 分解能の良質なデータを得た (空間群 P2₁2₁2₁, a = 59.05, b = 116.05, c = 156.85 Å, Z = 4, completeness 99.9%, R_{merge} = 10.2%, I/σ = 23.9)。分子置換法により位相を決定し、Venus 再構成体の構造を明らかにした (PDB: 3AKO)。Venus 再構成体は非対称単位中に 4 分子存在しており、それぞれの構造は、11 本のストランドから成る β バレル構造を形成していた (Fig. 3)。再構成体は、既出の whole Venus の構造と極めて良く似ており、主鎖間の r.m.s.d 値は 0.54 Å であった。一方、両構造にわずかではあるが興味深い差が存在する。すなわち、再構成体の VN155 側の 7 番目のストランド (β7) が whole Venus と比較して短くなっていた。さらに、β7 は VC155 側の 8 番目と 10 番目のストランドに挟まれており、主鎖間の水素結合の数の減少や構造のゆらぎが観察された。

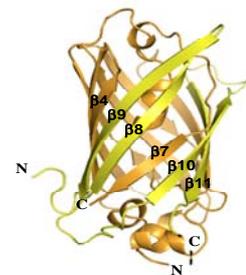


Fig. 3 Venus 再構成体の構造

【第三章 Venus 再構成体の変異体と熱安定性の比較】

構造解析の結果より、 $\beta 7$ 付近のアミノ酸残基に変異を入れることで VN155 と VC155 の相互作用を弱めることができると仮定した。その相互作用に関与していると考えられるアミノ酸を見出し、変異体を作製した (Y143F、Y145F、H148G) (Fig. 4)。

whole Venus、Venus 再構成体およびその変異体について、示差走査熱量 (DSC) 測定を行った結果を Fig. 5 に示す。whole Venus の T_m 値は 89.0°C と、耐熱性に富んだタンパク質であることが明らかとなった。一方、Venus 再構成体 peak 1 の T_m 値は 77.5°C と低下していた。変異体 Y143F、Y145F、H148G は、それぞれ 77.1°C 、 83.8°C 、 72.1°C でピークを示した。Tyr143 と Ser208 間の水素結合を切断したのにも関わらず (Fig. 4a)、Y143F は Venus 再構成体 peak1 とほぼ同じ T_m 値を示した。Y145F では、Venus 再構成体 peak1 と比較して、 T_m 値が大きく上昇した。これは、水分子を介した水素結合ネットワークの一部を切断したために (Fig. 4b)、周辺の疎水性残基によって疎水性コアが高まった、あるいはアミノ酸残基の再配列が生じ、構造全体のパッキングがより密になったため、耐熱性が増加したと考えられる。一方、H148G では、側鎖の占める割合が大幅に減少したこと、クロモフォアとの水素結合 (Fig. 4c) が切断されたことから β ストランド間に新たに空間が生じ、構造が不安定化したものと考えられる。

また、peak3 の DSC カーブは 2 つのピークを示した。1 つは 40°C から 65°C にかけての緩やかなピーク、もう 1 つは Venus 再構成体 peak 1 と同じ 77.6°C であった。低温側の緩やかなピークは、8 量体から単量体への転移に、また、 77.6°C の T_m 値を示すピークは、転移によって形成された単量体に由来するものと考えられる。しかし、高温側のピークの ΔH は期待されるものより小さく、このことから、多量体が解ける際、正確なフォールディングを持つ単量体を形成するのみならず、一部ミスフォールドしてしまう経路も存在するものと考えられる。この 8 量体は経時的に減少し単量体が同時に増加する。したがって、大腸菌で共発現した VenusN 末断片と C 末断片の再構成は、熱力学的に準安定な多量体の形成を経て安定な単量体へと転移して行く機構によっているものと推定した。

N 末断片と C 末断片の再構成における多量体の形成が他の蛍光タンパク質においても見出されるのか、Venus との一次構造の相同性が低いサンゴ由来の赤色蛍光タンパク質である mCherry について検証した。その結果、極めて興味深いことに、mCherry 再構成体においても単量体と同時に 8 量体と推定される多量体の形成が見出された。このことは、BiFC を目的として断片化された蛍光タンパク質は、再構成において多量体を経て単量体を形成する機構が一般的に存在する可能性を示唆するものと考えられる。 β ストランドが豊富なタンパク質では、しばしば β ストランドの乗り換え (スワップ) が起こる。ヒンジ領域にあるプロリンのシーストランス異性化が β ストランドのスワップに大きく関わるという報告も近年された。Venus では短い C 末断片側の 2 種のストランド間 ($\beta 9$ - $\beta 10$) のループ上にプロリン残基が 3 個、mCherry でも同様の部位に 2 個のプロリン残基が存在しており、これらの異性化により β ストランドのスワップが容易に可能であると思われる。これらのことより、蛍光タ

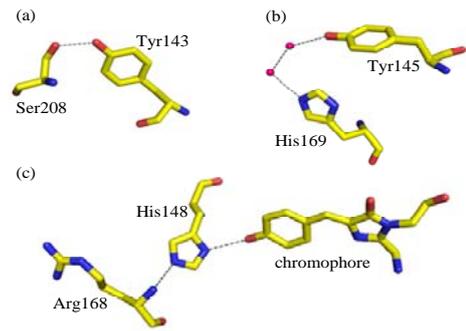


Fig. 4 $\beta 7$ 近傍のアミノ酸
(a) Tyr143 (b) Tyr145 (c) His148

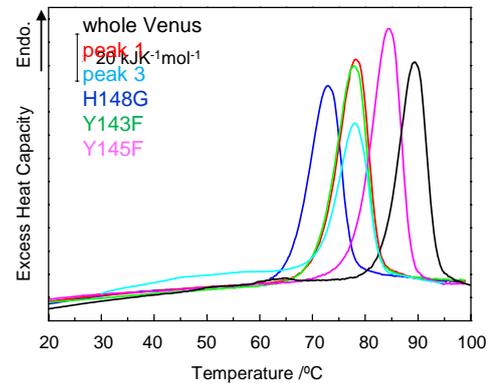


Fig. 5 DSC 曲線

ンパク質のN末断片とC末断片の再構成においては、 β ストランドのスワップを伴う多量体が容易に形成されるものと結論した。

【総括】

本研究により、Venus のN末断片とC末断片は、再構成する過程で β ストランドのスワップを伴う多量体を形成し、その後、より構造安定性の高い単量体へ移行する機構が存在することを明らかにした。さらに、N末断片およびC末断片の接触部位への変異の導入は、蛍光タンパク質再構成体の熱安定性に変化をもたらし、より有用な BiFC 解析の構築の可能性を示すことができた。

審査結果の要旨

タンパク質は互いに認識し合うことで厳密な制御機構を遂行し、細胞の恒常性を保っている。近年、蛍光タンパク質を用いた細胞の動態解析が実用化され、細胞内の構造体の形態変化や時期などを知ることができるようになった。その方法の一つに BiFC 解析と呼ばれるものがある。それは、N末端側とC末端側に分割され蛍光を失った状態の蛍光タンパク質各断片が、互いに相補的に結合して蛍光を回復する現象を利用するものである。しかし、本解析法には、融合タンパク質に非依存的な蛍光タンパク質断片同士の相互作用が生じ、正確な蛍光回復の検出を妨げる大きな問題が存在する。本学位論文は、その問題を解決し BiFC の有効利用を図ることを目的とし、未解明であった蛍光タンパク質再構成機構についてさまざまな物理化学的手法を用いて基礎的な検討を行った結果を取り纏めたものである。

第1章では、蛍光タンパク質 Venus のN末端側とC末端側の大腸菌を用いた共発現を行い、Venus の再構成体には単量体以外に多量体が存在すること、多量体は単量体へ転移するという新たな知見を見出した。

第2章では、Venus 再構成体の構造や物理学的特性につき検討している。単量体のX線結晶構造解析からは、再構成体も・バレル構造を形成していることを明らかにした。また、whole Venus の構造に比べて、繋ぎ目のストランドの構造にゆらぎが生じていることを見出し、部位特異的変異により再構成体の安定性が変わり得ると論じている。また、さまざまな物理化学的手法により、多量体は、単量体と同様にN末端側とC末端側の再構成体を基本とし、それが8個集まった分子であることを明らかにした。

第3章では、Venus 再構成体の変異体を含め示差走査熱量測定を行い、部位特異的変異により再構成体の安定性が変わることを明らかにし、このことから構成成分間の親和性を制御できる可能性を示した。さらに、同測定により昇温過程で8量体から単量体に転移することを明らかにした。また、同様の多量体が、サンゴ由来の赤色蛍光タンパク質である mCherry においても形成されることを見出し、断片化された蛍光タンパク質は、再構成において多量体を経て単量体を形成する機構、それも Pro 残基のシス・トランス異性化に伴う機構が一般的に存在する可能性を示唆した。

以上のように、本論文は、有用な BiFC 解析法構築の基盤研究として優れた成果を上げており、構造生物学および分子生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士（理学）の学位を授与するに相当すると結論した。