

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25年5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770104

研究課題名（和文）多様なプレ配列に対しミトコンドリア Tom20 が獲得した認識機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the interaction mechanism for multiple presequences by mitochondrial Tom20

研究代表者

齊藤 貴士（SAITOH TAKASHI）

北海道大学・大学院薬学研究院・技術職員

研究者番号：00432914

研究成果の概要（和文）：以前の研究で、ミトコンドリア膜透過装置の一部である Tom20 がミトコンドリア前駆蛋白質の多様なプレ配列を認識できるメカニズムとして、「複数のコンホメーションの動的平衡を使っている」という新しい認識様式（動的認識モデル）を X 線結晶構造解析と NMR スペクトル解析により提唱した。本研究では、Tom20 とプレ配列ペプチドの新たな複合体をエンタルピーの効果を利用して安定化する試みを行った。この結果、新たな相互作用様式の複合体構造を得ることに成功した。これらの研究は、Tom20 の可溶性ドメインのみをサンプルとして使用してきたが、今回、膜貫通領域を含む Tom20 タンパク質全長の発現も試みた。

研究成果の概要（英文）：In previous study, we proposed that a dynamic equilibrium between the multiple bound states is the molecular mechanism of the broadly selective specificity of the Tom20 receptor towards the divergent mitochondrial presequences. In this study, we carried out X-ray crystal structure analysis and NMR spectroscopy experiments using new complexes between Tom20 and presequences. We attempted to express of full length Tom20 protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物学

キーワード：分子認識及び相互作用

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は核ゲノム DNA にコードされている。ミトコンドリア内部へと運ばれるタンパク質は細胞質のリボソーム上で、プレ配列が付加された前駆体タンパク質として合成さ

れる。その後、ミトコンドリアの二つの膜に存在する膜透過装置（タンパク質からなる超分子複合体）によってミトコンドリア内部へと輸送される。このうちミトコンドリア外膜の膜透過装置が Tom20 複合体である。この膜輸送過程については、多くの生化学的な

研究が報告されている。また近年、構造生物学的な研究もX線結晶構造解析やcryo電子顕微鏡を用い盛んに行われてきている。しかし、鍵となるプレ配列との複合体についての構造報告は、非常に少ない。

本研究で研究対象としたTom20タンパク質はこの輸送過程の主要な経路で、プレ配列を最初に認識する受容体である。プレ配列は15から70残基程度の長さであるが、アミノ酸配列は多様であり、共通のアミノ酸配列は見いだせないとされている。そして、Tom20とプレ配列の間の相互作用は比較的弱く(解離定数: K_d で μM オーダー)、構造生物学的な研究を難しくしている理由の一つである。これまでにTom20とALDH (Aldehyde dehydrogenase)プレ配列の複合体構造がNMRを用いて決定された。その結果、プレ配列が複合体形成時に両親媒性ヘリックス構造をとり、疎水的相互作用で複合体を形成することが明らかになった。さらに申請者らは、各アミノ酸レベルでの構造情報を得るため、Tom20とプレ配列ペプチドの間に分子間SS結合を形成させ、複合体の安定化する工夫を行った。この複合体安定化技術により、X線結晶構造解析とNMR緩和時間解析による残存運動性の解析に成功した。この解析から、Tom20が「複数のコンホメーションの動的平衡を使って多様なプレ配列を認識している」という新しい分子認識メカニズム(動的平衡認識)を提唱した。その後、プレ配列中で分子内SS結合を形成し、二次構造を維持させることで複合体を安定化する技術を採用した。この新しい複合体安定化手法を利用しX線結晶構造解析を試みた。その結果、これまで得られていた様式と異なる相互作用様式の複合体構造が得られた。この結果は、これまで予想していたよりも遙かに多いコンホメーションがプレ配列の認識に用いられていることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では分子間SS結合でALDHプレ配列をTom20に架橋した複合体を作成し、Tom20によるプレ配列の「動的平衡認識」を提唱した。この複合体では3残基からなるリンカーとシステイン残基をプレ配列のC末端に付加した。さらにその後の研究では、プレ配列中にD型システインとL型システインを導入したプレ配列を用意し、分子内のSS結合を形成させることで複合体の安定化を試みた。これらの工夫により、これまで4つの異なる結晶系で複合体のX線結晶構造解析に成功した。驚いたことに、これらの複合体構造を比較すると、Tom20とプレ配列の相対的な位置関係は一致してい

るものの、その側鎖レベルでの相互作用はすべて異なっていた。すなわち、これまで考えていた以上に多数のコンホメーションがプレ配列の認識に用いられている可能性が示された。この結果はTom20が多様なプレ配列を認識し、さらに膜透過の次のステップへと、ミトコンドリアタンパク質を受け渡すために獲得した認識様式であると考えている。そこで、本申請では「分子運動を伴う相互作用様式」と、「プレ配列のアミノ酸配列の多様性」との相関についての解明を目指し、(1)複合体安定化技術により異なる結晶系でのX線結晶構造解析を試みる。(2)今後の研究の進展を目指し、膜貫通領域を含むTom20全体の大量発現を試みる。

3. 研究の方法

(1)これまでの研究ではALDHプレ配列のコンセンサス ($\phi\chi\chi\phi\phi$, ϕ は疎水性アミノ酸残基, χ は任意のアミノ酸残基) 上で、重要度の低いアミノ酸の位置にD-システイン、さらにその3残基先にL-システインを導入し、この2種類のシステインの間で分子内ジスルフィド結合を形成させるペプチド

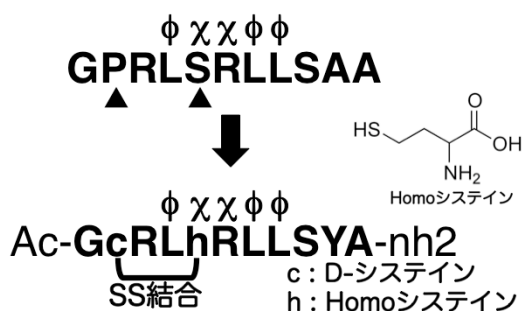


図1. プレ配列ペプチドのアミノ酸配列とHomo-Cysの構造。配列のコンセンサスとしてさほど重要でない位置に、D型システインとHomoシステインを導入した。

をデザインした。しかし、D-システインでは側鎖が短すぎるためにプレ配列ペプチドの構造に歪みが生じてしまう可能性がある。そこで、本課題ではD-システインよりも側鎖がメチレン基一つ分長いHomoシステインを実験に用いた(図1)。

ペプチドの合成を依頼し、0.1 M 炭酸水素アンモニウム溶液中で攪拌することで、分子内ジスルフィド結合を形成させた。HPLCによる逆相カラムクロマトグラフィーで精製し、分子内ジスルフィド結合の形成をMALDI-TOF MSで確認した。このペプチドが野生型のプレ配列と比べTom20可溶性ドメインと強く相互作用することを¹⁵NラベルTom20に対するNMR滴定実験により確認した(図2)。

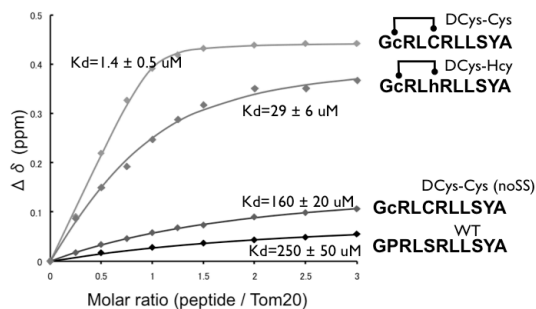


図2. ^{15}N ラベル Tom20 に対する各プレ配列ペプチドの NMR 滴定曲線。D-型システインを導入した分子内 SS 結合ペプチドは、野生型プレ配列ペプチドの約 10 倍、Homo-システインを導入したペプチドでは約 6 倍アフィニティーが上昇した。

約 300 種類の条件で自動結晶化スクリーニング装置により結晶化スクリーニングを行ったところ、複合体での結晶が得られた。放射光施設で X 線結晶構造解析実験を行った結果、高分解能での複合体構造の決定に成功した。その結果、これまで報告した複合体構造と比較して Tom20 とプレ配列の相対的な位置関係はほぼ一致していたが、側鎖レベルでは異なる相互作用様式が用いられていた (図3)。

(2) 上記の研究では Tom20 のうち、細胞質側の可溶性ドメインのみを大腸菌で発現し、実験に用いてきた。しかし近年、膜貫通領域の重要性が示唆される実験データも得られてきた。そこで、今後の Tom20 全長の構造生物学的研究を目指し、大腸菌による大量発現系の構築を試みた。タンパク質は可溶性を考慮し GST 融合タンパク質として発現を試みた。また、今後の構造生物学的アプローチを考慮し GST と Tom20 の間には 3C プロテアーゼの切断サイトを導入した。発現には、大腸菌 BL21-DE3 および ARCTIC EXPRESS を用いた。

4. 研究成果

これまでに Tom20 とプレ配列ペプチドとの複合体の複数個の結晶構造を得ることができたが、側鎖レベルでの結合様式はどれも異なっていた。結晶構造はスナップショットと考えられ、得られた 4 つの結合様式が動的平衡状態にあると考えられる。Tom20 認識様式の新しい点は、個々の結合様式が不完全であり、プレ配列の部分的な特徴 (すなわち 2 つの疎水性側鎖) しか認識していないことにある。すなわち、不完全ではあるが多数の結合様式の間には速い動的平衡があって、総体としてはじめて、Tom20 は 3 つの疎水性側鎖の認識を達成していると考えられる。何故このような複雑な認識様式が必要かという疑問が生じるが、これは Tom20 が 1

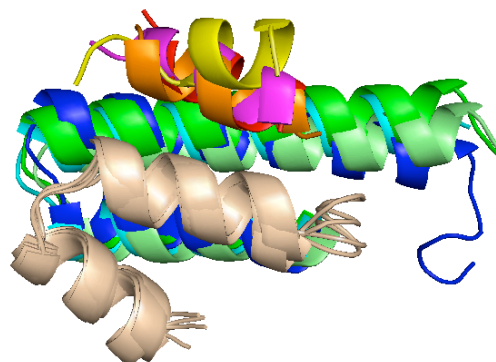


図3. X 線結晶構造解析により得られた複合体構造の重ね書き。ピンク、オレンジ、黄色がプレ配列ペプチドになる。Tom20 とプレ配列の相対的な位置関係は、ほぼ同じであるが、側鎖レベルでの認識様式は異なる。

000 種類以上ものプレ配列を認識することに関連していると考えられる。非常に広い認識特異性を達成するために、動的平衡認識メカニズムを用いているのである。この認識様式は Tom20 だけが持っている特殊なものとは思えないので、今後はミトコンドリアのプレ配列認識以外にも似た認識機構が細胞中の様々な場面で見つかることを期待している。

また、膜貫通領域を含む Tom20 蛋白質全長での発現では、大腸菌 BL21-DE3 を用いたが、発現誘導後も SDS PAGE 上で目的のバンドを観察することができなかった。そこでタンパク質の安定したフォールディングに優れた ARCTIC EXPRESS を用いた発現を試みた結果、目的の蛋白質のバンドが観察された。この研究成果は、今後の構造生物学的アプローチによる研究を進める上で、大変貴重な結果である。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 泉桂星、齊藤貴士、寺沢宏明、神田大輔
共有結合を用いた Tom20 タンパク質複合体におけるプレ配列動的認識の考察
2011 年日本生物物理学会九州支部例会
2011 年 12 月 4 日 (福岡 のがみプレジデントホテル)
- ② 齊藤貴士、神田大輔
ミトコンドリア Tom20 とプレ配列の相互作用解析におけるジスルフィド結合の利用
第 11 回日本蛋白質科学会年会
2011 年 6 月 7 日 (大阪 ホテル阪急エキスポパーク)

③齊藤貴士、神田大輔

ミトコンドリア Tom20 とプレ配列ペプチドの複合体の安定化と結晶化
第10回日本蛋白質科学会年会
2010年6月17日(札幌 札幌コンベンションセンター)

[その他]

ホームページ

- ①齊藤貴士、黒木喜美子、福原秀雄、前仲勝実
相互作用解析の王道 応用編
細胞表面受容体の弱く速い認識を解析する。

http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/biacore/road/road_app02.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 貴士 (SAITOH TAKASHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・技術職員
研究者番号：00432914

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし