

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21121003

研究課題名(和文) 準安定な分子認識解明のためのテザー係留法の開発と細胞内仕分けシグナル識別への応用

研究課題名(英文) Development of experimental techniques for the investigation of transient molecular protein complexes

研究代表者

神田 大輔(Kohda, Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80186618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 117,700,000円、(間接経費) 35,310,000円

研究成果の概要(和文)：大きな運動性を残した相互作用をしている複合体から原子レベルの構造情報や動的情報を得るためには、解離平衡を適切な方法で会合側へシフトすることが必要である。平衡をシフトする技術として、共有結合を分子間に導入する方法(テザー係留技術)とリガンド内に共有結合を導入する方法(分子内架橋係留技術)の2つを開発した。また、結晶コンタクトがない空間をタンパク質を結晶格子内に創りだし、そこにタンパク質の一部やリガンドを意図的に配置して動的情報を得るための新しい結晶解析方法の開発を行った。ミトコンドリアプレ配列受容体Tom20-プレ配列複合体とオリゴ糖転移酵素-基質ペプチド複合体の2つの系に適用した。

研究成果の概要(英文)：Equilibrium shifting from the unbound states to the bound states is useful to obtain structural and dynamic information of transient protein complexes at atomic resolutions, in particular, the complexes with large amplitude motions inside. We developed two techniques, molecular tethering (via inter-molecular disulfide bonds) and molecular stiffening (via intra-molecular disulfide bonds), for this purpose. We also proposed intentional creation of space in protein crystal lattice, and place a target region in the space created. The key technique is the rigid connection to fix the relative orientation of the protein of interest and a tag protein. These new techniques were applied to analyze the dynamics of a mitochondrial presequence peptide as bound to the mitochondrial receptor Tom20, and the stabilization of oligosaccharyltransferase-peptide complexes for crystallization.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質 分子認識 プレ配列 Tom20 オリゴ糖転移酵素 X線結晶解析 NMR解析 複合体

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能的側面を捉えるには、タンパク質とリガンドの複合体の構造解析を行う必要がある。複合体の結晶構造が溶液中におけるリガンドの相互作用を正しく反映していることは、多くの複合体の結晶構造解析から確立されている。しかし、リガンドがタンパク質に結合した状態において“大きな”運動性を持つ場合^{注1}には、リガンドの構造は結晶中の分子間接触（結晶コンタクト）の影響を受けて、取りうる状態の1つに固定されると考えられる。これをスナップショットと呼ぶ。原理的な問題はスナップショットを多数集めても、リガンドの結合状態の運動性を正しく表現できないことにあり、これを「サンプリングの問題」と呼ぶ。

注1) 大きな運動性を大まかに定義すれば、平均位置からのRMSD値で表すと2 Å以上の振幅であり、結晶解析の温度因子では200 Å²以上、NMRを用いて操作的に定義すれば、NOEを距離に換算することが物理的に意味を持たなくなる程度である。

2. 研究の目的

この問題を実験的に解決するには、リガンドが結合状態で持っている大きな運動性を保持したまま解析することを可能にする実験的な工夫が必要となる。本研究では2つの方法を考案した。一番目の方法は、リガンドの会合・解離の平衡を会合側にシフトさせて、結合状態の割合を高める技術である。これには2つのリガンド係留技術がある。「適切なリンカー配列を介して受容体にリガンドを共有結合で繋ぎ止める」テザー係留技術(molecular tethering)と「共有結合導入でリガンドを硬くして複合体状態の割合を増やす」分子内架橋係留技術(molecular stiffening)である。この時、「結合状態のリガンドの動的平衡を妨げない」ことに留意してデザインする点が、従来の類似の方法と大きく異なる。リガンド係留技術で安定化した複合体に、結晶構造解析やNMRによる緩和時間解析を適用することで、安定な複合体と同等の詳細な構造・動的情報を得ることが可能になる。

二番目の方法はリガンドの周囲に“結晶コンタクトが無い隙間”(CCFS, crystal contact free space)をタンパク質結晶格子中につくる技術である。電子密度は線形の性質を持ち、重ね合わせができるので、リガンドの動きの振幅の大きさを正しく評価できる。溶液NMR法はタンパク質のダイナミクスを調べる方法として一般に認知されているが、NMR情報は距離に関して、大きな非線形性を持っているために^{注2}、動きが大きい場合には集団平均であるNMR構造は歪んでしまう。したがって、CCFSを結晶内に創り、リガンドをCCFS内に配置できるならば、結晶解析はNMRよりも動きの振幅を解析する手段として優れている^{注3}。

注2) 核オーバーハウザー効果(NOE)や常磁性緩和効果(PRE)は距離の6乗に反比例する。偽コンタクトシフト効果(PCs)は距離の3乗に反比例する。

注3) ここではリガンドの運動性を考えているが、タン

パク質の一部の運動性を考える場合でもCCFSは有効である。

新実験技術の対象として、Tom20タンパク質に結合した状態のプレ配列ペプチドの大きな運動性を定量的に解析することを設定した。ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は細胞質のリボソームで合成された後に、ミトコンドリアへと輸送される。ミトコンドリアのマトリクスへ輸送されるタンパク質はN末端に余分な配列(プレ配列)が付加された前駆体として合成される。ミトコンドリア外膜に存在するTom20はプレ配列を最初に認識する受容体タンパク質である。プレ配列は15から70残基の長さの多様なアミノ酸配列であり、Tom20との相互作用は弱い($K_d \sim$ 数十 μ M)。ゲノムに1つしかないTom20がどのような仕組みで500種以上存在する多様なプレ配列を同程度の親和性で認識・結合できるのか?という疑問に答えることを目的とする。

もう一つの実験対象は、オリゴ糖転移酵素(OST)と呼ばれる膜タンパク質酵素である。オリゴ糖転移酵素はコンセンサ配列Asn-X-Thr/Ser中のAsn残基への糖鎖の転移反応を触媒する。糖鎖転移反応は翻訳と共役して起こるので、反応複合体は必然的に過渡的となる。したがって、酵素タンパク質とコンセンサ配列を含むペプチドを単に混合しただけでは、複合体を得て結晶解析やNMR解析することは困難である。そこで、テザリング技術を適用して、OST酵素-基質ペプチド複合体を安定化して結晶構造解析を行う。

3. 研究の方法

Tom20にプレ配列をテザリングするために、プレ配列のC末端に適当なリンカーを介してシステイン残基を導入し、Tom20側のシステイン残基と分子間のジスルフィド結合導入によって繋ぎ止める(テザー係留技術)。また、プレ配列内にDシステインとLシステインのペアを $i, i+3$ の位置に導入して分子内ジスルフィド架橋を作らせることで、解離状態のエントロピーを小さくすることで、相対的に結合状態を安定化する(分子内架橋係留技術法)。OST酵素の立体構造を参照して、酵素タンパク質の適当な位置にシステイン残基を導入し、ペプチド基質に付加したシステイン残基との間にジスルフィド結合を形成させて、複合体を安定化する。

結晶コンタクトフリー空間を結晶中に創るための3つの技術要素は、タグタンパク質との融合タンパク質を用いる、タグタンパク質と対象タンパク質を一本の長いヘリックスを用いて硬く接続する、占有率を保障するために分子間ジスルフィド結合を用いて、リガンドを対象タンパク質にテザリングする。である。タグタンパク質としてマルトース結合タンパク質(MBP)を用いる。MBPのC末端部分はヘリックス構造をとっていて、Tom20のN末端ヘリックスと直接つなげるこ

とで一続きのヘリックスとなるようにデザインした。2つのタンパク質の間を硬く接続することで、2つのタンパク質の間に空間を確保できる。2つのヘリックスの間に挿入するアミノ酸残基数を変えることで、Tom20 と MBP の相対配置を変化させ、プレ配列が結晶コンタクトの影響を受けない隙間に位置するように調節できる。プレ配列をテザリングするのは占有率を 100%にするためである。親和性の弱い相互作用では、リガンドの占有率がしばしば 100%より小さくなり、結果の解釈を困難にすることが多いためである。

4. 研究成果

Tom20・プレ配列複合体状態をテザー係留技術と分子内架橋係留技術法を適用して安定化し、複合体の結晶構造解析と NMR 緩和時間解析を行った(論文 6)。6つの複合体の結晶構造を決定した。プレ配列はいずれも α ヘリックス構造をとって Tom20 に結合していたが、プレ配列と Tom20 との間で接触している原子の分布を調べると、プレ配列ペプチドと Tom20 との相互作用には異なる3つのポーズ(pose)があることが明らかとなった。また、NMR ^{15}N 緩和時間解析から3つのポーズの間に動的交換過程が存在することが示唆された。以上の結果を踏まえて、Tom20 によるプレ配列認識は「動的平衡認識メカニズム」であることを提唱した(図 1)。

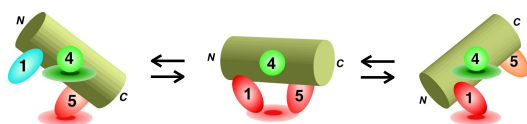


図1 Tom20 に結合したプレ配列は、複数の結合状態の間の動的平衡にある。Tom20 結合コンセンサスモチーフに存在する3つの疎水性残基を 1,4,5 の数字で表す。

そのキーワードは、複数の結合状態、それぞれの結合状態における部分的な特徴の認識、そして、複数の状態間の速い交換である。この新規な動的認識のユニークな点は、部分的な特徴認識にある。プレ配列に存在する3つの疎水性残基(φ)は $\varphi_1\varphi_4\varphi_5$ のパターンをもつが、Tom20 はある結合状態では一度に2つの疎水性残基しか認識していない。これらの部分認識状態の間の速い平衡 ($\varphi_1, \varphi_4 \rightleftharpoons (\varphi_1, \varphi_5) \rightleftharpoons (\varphi_4, \varphi_5)$)が存在することで、3残基の疎水性側鎖の同時認識が可能になる。この動的平衡認識メカニズムを用いることで、Tom20 はプレ配列に存在する大きさが異なる疎水性側鎖に対して柔軟に対応でき、その結果、疎水性アミノ酸の側鎖の大きさによらずに同程度の親和性を確保することができると考えられる。

複数の古細菌由来の OST 酵素について、大腸菌を用いた組み換え全長酵素の発現と精製、アミノ酸置換体のアッセイ、基質にペプチドライブラリを用いて X の位置でのアミノ酸の種類依存性を調べた(論文 4, 5)。ま

た、C末端可溶性ドメイン(論文 1, 7, 9, 10)、および膜タンパク質としての全長構造(論文 11)の結晶構造決定を行った。結晶構造を基にしたデザインを行い、酵素と基質ペプチドにそれぞれ1つずつシステイン残基を導入することで、ジスルフィド結合でテザリングされた OST 酵素-基質ペプチド複合体を得ることができた。この複合体に糖ドナー基質を加えると、糖鎖がドナーから基質ペプチドへ速やかに転移することが確認され、この複合体は productive な複合体であることがわかった。古細菌の一つでテザリング複合体の結晶を得て、結合状態のペプチドの構造を決定することができた。

MBP-Tom20-SS-presequence 融合タンパク質の結晶を得て回折測定を行った。MBP-Tom20 部分の構造をサーチモデルとして分子置換を用いて位相決定を行い、モデルバイアスを避けるためにプレ配列にはモデルを置かないで、差フーリエ電子密度マップを作った。予想通り、プレ配列結合サイトに電子密度を観察できなかった。これは運動性が高く電子密度が消えてしまったと解釈することができる。運動性が高くても電子密度を得る工夫として、測定 X 線波長を通常の 1.0 Å から 1.6 Å に変更し、また電子密度を計算するときに低角の回折データのみを使用してフーリエ変換(ローパスフィルタ)することを行った。これらの工夫により、差フーリエ電子密度マップの中に結合サイト付近に棒状の電子密度を得ることができた(図 2)。杉田博士(理研)との共同研究として分子動力学計算を行い、計算からシミュレーションした電子密度とプレ配列の電子密度がほぼ一致することを見いだした(論文 8)。したがって、図 2 の電子密度はプレ配列の運動を正しく反映していると考えられる。

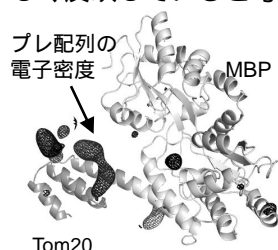


図2 CCFS においたプレ配列の電子密度は、結合状態においても大きな振幅の動きがあることを証明した

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 13 件)

- 1) Maita, N., Nyirenda, J., Igura, M., Kamishikiryo, J., Kohda, D. Comparative structural biology of eubacterial and archaeal oligosaccharyltransferases. J Biol Chem 285, 4941-4950 (2010)
- 2) Takano, A., Suetsugu, N., Wada, M.,

- Kohda, D. Crystallographic and functional analyses of J-domain of JAC1 essential for chloroplast photorelocation movement in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51, 1372-1376 (2010)
- 3) Suetsugu, N., Takano, A., Kohda, D., Wada, M. Structure and activity of JAC1 J-domain implicate the involvement of the cochaperone activity with HSC70 in chloroplast photorelocation movement. *Plant Signal Behav* 5, 1602-1606 (2010)
- 4) Igura, M., Kohda, D. Quantitative assessment of the preferences for the amino acid residues flanking archaeal N-linked glycosylation sites. *Glycobiology* 21, 575-583 (2011)
- 5) Igura, M., Kohda, D. Selective control of oligosaccharide transfer efficiency for the N-glycosylation sequon by a point mutation in oligosaccharyltransferase. *J Biol Chem* 286, 13255-13260 (2011)
- 6) Saitoh, T., Igura, M., Miyazaki, Y., Ose, T., Maita, N., Kohda, D. Crystallographic snapshots of Tom20-mitochondrial presequence interactions with disulfide-stabilized peptides. *Biochemistry* 50, 5487-5496 (2011)
- 7) Matsumoto, S., Igura, M., Nyirenda, J., Matsumoto, M., Yuzawa, S., Noda, N., Inagaki, F., Kohda, D. Crystal structure of the C-terminal globular domain of oligosaccharyltransferase from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.75 Å resolution. *Biochemistry* 51, 4157-4166 (2012)
- 8) Komuro, Y., Miyashita, N., Mori, T., Muneyuki, E., Saitoh, T., Kohda, D., Sugita, Y. Energetics of the presequence-binding poses in mitochondrial protein import through Tom20. *J Phys Chem B* 117, 2864-2871 (2013)
- 9) Nyirenda, J., Matsumoto, S., Saitoh, T., Maita, N., Noda, N., Inagaki, F., Kohda, D. Crystallographic and NMR evidence for flexibility in oligosaccharyltransferases and its catalytic significance. *Structure* 21, 32-41 (2013)
- 10) Matsumoto, S., Shimada, A., Kohda, D. Crystal structure of the C-terminal globular domain of the third paralog of the *Archaeoglobus fulgidus* oligosaccharyltransferases. *BMC Struct Biol* 13, 11 (2013)
- 11) Matsumoto, S., Shimada, A., Nyirenda, J., Igura, M., Kawano, Y., Kohda, D. Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17868-17873 (2013)
- 12) Fujinami, D., Matsumoto, M., Noguchi, T., Sonomoto, K., Kohda, D. Structural elucidation of an asparagine-linked oligosaccharide from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Carbohydr Res* 387C, 30-36 (2014)
- 日本語総説
- 13) 神田大輔, 齊藤貴土, 共有結合を用いた平衡シフトによる過渡的タンパク質複合体からの構造情報の取得. *生化学* 第83巻 第10号, 902-911 (2011)
- 〔学会発表〕(計9件)
- 1) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states – Complex stabilization with molecular tethering and stiffening –. The 3rd Asia-Pacific NMR Symposium, October, 25-28, 2009, Jeju Island, Korea
- 2) 準安定な分子複合体から構造情報を得るための戦略とその応用. 蛋白質セミナー:「蛋白質の機能-構造相関解明のための精密構造解析とその方法～水素原子から細胞まで～」, 2010年10月7日, 大阪
- 3) 共有結合を用いた平衡シフトによる過渡的タンパク質複合体の安定化とその応用 大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端的NMR拠点から生まれる新たな潮流:最新成果,役割,利用」, 2011年7月28日, 大阪
- 4) A combined NMR and crystallography approach for analyzing the promiscuous recognition of peptidic ligands by proteins. The 4th APNMR Symposium, Oct 16-19, 2011, Beijing, China

- 5) NMRと結晶構造解析を駆使して明らかにするタンパク質の新しい分子認識機構. 蛋白質立体構造解析 NEDO 特別講座, 2011年10月20日, 東京
- 6) 蛋白質結晶中に創り出した隙間を利用して分子の動きを観るための新しい X線結晶解析. 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 2012年10月4-5日, 大阪
- 7) Intentional creation of crystal-contact free space for monitoring large amplitude motions of proteins and ligands in protein crystals. 第85回日本生化学会年会 2012年12月14日, 福岡
- 8) Intentional creation of crystal-contact free space for monitoring large amplitude motions of ligands in protein crystals (workshop, “transient macromolecular complexes involved in multilevel biological phenomena”). 第51回日本生物物理学会, Oct 29, 2013, 京都
- 9) Intentional creation of crystal-contact free space for analyzing large amplitude motions in protein crystals. International Symposium between Kyushu U. Post Global COE and School of Biomedical Sciences, Monash U., Feb 7, 2014, Melbourne, Australia

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/vsb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 大輔 (KOHDA, Daisuke)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号: 80186618

(2) 連携研究者

嶋田 睦 (SHIMADA, Atsushi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 70391977

真柳 浩太 (MAYANAGI, Kouta)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 50418571

斉藤 貴士 (SAITOH, Takashi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号: 00432914

(平成21年度～平成23年度)

井倉 真由美 (IGURA, Mayumi)

九州大学・生体防御医学研究所・学術研究

院
研究者番号: 60529965
(平成21年度～平成23年度)