

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2003～2008

課題番号：15083205

研究課題名(和文) ミトコンドリア輸入装置と前駆体タンパク質の間のソフトな相互作用に基づく分子認識

研究課題名(英文) soft interaction for the recognition of mitochondrial targeting signal

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

研究成果の概要：

ミトコンドリア内部へ輸送されるタンパク質はN末端にプレ配列が付加されて生合成される。Tom20 タンパク質はミトコンドリア外膜にあって、プレ配列を最初に認識する受容体である。Tom20 とプレ配列の複合体を共有結合で安定化する技術を新規に考案して、結晶構造解析とNMR緩和時間解析を行った。複数の結合状態が存在するが、それぞれは認識としては不完全である。この複数の状態の間の速い動的平衡が、Tom20 が多様なプレ配列を認識するメカニズムであることを提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2003年度	36,800,000	0	36,800,000
2004年度	16,000,000	0	16,000,000
2005年度	31,700,000	0	31,700,000
2006年度	14,400,000	0	14,400,000
2007年度	16,000,000	0	16,000,000
2008年度	16,000,000	0	16,000,000
総計	130,900,000	0	130,900,000

研究分野：構造生物学

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，細胞内輸送，ミトコンドリア，プレ配列，標的シグナル，Tom20，リガンド係留技術

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ほとんどは核のDNAにコードされている。そのため、細胞質のリボソームで合成された後、前駆体タンパク質に含まれる標的シグナルに応じて、ミトコンドリアの外膜、外膜と内膜の間の空間、内膜、そして内部へと輸送される(図1)。ミトコンドリア内部へ輸送されるタンパク質では、標的シグナルはN末端に余分に付加されたプレ配列と呼ばれるア

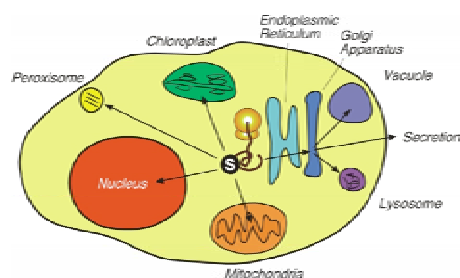


図1 細胞質内で合成されたタンパク質は標的シグナルの働きで、いろいろな細胞内区画へ運ばれる。は標的シグナルを表している。

ミノ酸配列中に含まれている。プレ配列中の標的シグナルはミトコンドリア外膜にある Tom20 受容体によって認識される。内膜を通過後に、役目を終えたプレ配列は切断・除去される。

ミトコンドリアへのタンパク質の輸送の仕組みは、酵母とアカパンカビを中心とした遺伝学と分子生物学的アプローチにより詳細に調べられてきたが、構造的な知見は非常に少なかった。我々は研究開始時点までに、ラット由来の Tom20 タンパク質から膜貫通ヘリックスを除いた可溶性ドメインとラット由来の ALDH と呼ばれるタンパク質のプレ配列との複合体の立体構造を NMR を用いて決定していた。それによれば、プレ配列は両親媒性ヘリックスをつくって、Tom20 の表面の溝にはまり込む。他のオルガネラも含めてシグナル配列（プレ配列）とその標的膜上の受容体の初めての構造決定例となり、現在までに 4 冊の英語教科書に図として引用される成果となっている。構造から明らかになったもうひとつの重要な事実は、相互作用が当初予想されていた静電的な相互作用ではなく、疎水的相互作用が支配的であったことである。しかし、水溶液中でのフリー状態との速い交換が起こっている状態での構造決定であったために、プレ配列と Tom20 の相互作用様式の詳細は良くわからなかった。

2. 研究の目的

ミトコンドリア・プレ配列は 15 残基から 70 残基程度の長さであるが、ここに 2 つのミトコンドリア膜を通過し、さらに切断されるためのすべて情報が埋め込まれている。プレ配列のアミノ酸配列はミトコンドリアのタンパク質の数に相当する 1,000 種類程度存在するが、共通なアミノ酸配列（モチーフ）は見つからないとされてきた。我々は NMR 相互作用実験とペプチドライブラリ実験から Tom20 の認識結合配列は、5 残基からなるコンセンサス $\phi\chi\chi\phi$ (ϕ は疎水性、 χ は任意のアミノ酸残基) であることを見いだしていた。3 つの位置は疎水性側鎖アミノ酸であれば結合できるので、Tom20 タンパク質が認識するアミノ酸配列は極めて多様になる。加えて、結合は適度に弱くなくてはならない。もし強すぎると、解離が抑制されて前駆体タンパク質の輸送が最初の段階で滞ってしまう。こうした相互作用を「ソフトな相互作用」と定義する。「広い特異性」と「適度に弱い相互作用」がその特徴である。本研究の目的は、Tom20 を例として、広い特異性を研究するための新規な方法論を確立することと、それを適用して Tom20 によるソフトなプレ配列認識機構を解明することである。

3. 研究の方法

プレ配列がフリー状態と結合状態で速い交換をしていることは、通常の構造生物学的手法の適用を著しく困難にする。これを克服するために、「適切なリンカー配列を介して受容体にプレ配列ペプチドを共有結合で繋ぎ止める方法を考案した。(図 2) ここで、「結合状態のモチーフ配列の自由な運動を妨げない」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。

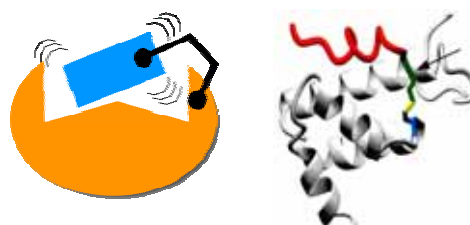


図 2 プレ配列を共有結合で Tom20 分子につなぎとめる。左は模式図で、右はモデル図。矢印はリンカーを指している。

こうして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。共有結合としては S-S 結合を用いる。S-S 結合は溶液の pH を弱アルカリ性に保つことで容易に形成される。プレ配列ペプチドの C 末端に適当な長さのリンカーを付加し、C 末端にシステインを導入する。Tom20 側には、偶然にも最適な位置にシステイン残基があるのでこれを利用する。リンカーの長さは先に述べたペプチドライブラリを用いた方法で最適化する。

4. 研究成果

リンカーの長さを最適化した後、分子間 S-S 複合体を形成させて複合体の結晶化を行った。2 つの異なるリンカーデザインから 2 つの異なる結晶が得られた。2 つの結晶構造から、プレ配列が結合状態でヘリックスコンホメーションをとることが確定した。2 つの結晶構造を詳細に調べると、大変興味深いことがわかった。プレ配列には疎水性残基であるロイシンが 3 つあり、この 3 残基の疎水性残基の存在は結合に必須である。ところが、2 つの結晶構造の Tom20 の構造には疎水性サイトがそれぞれ 2 つしかない。これを積極的に解釈すると、Tom20 は複数の結合状態（結晶構造に代表される 2 つの状態あるいはもっとたくさんあるかもしれない）の間の動的平衡（複数の状態間の速い平衡）を利用することにより、2 つの疎水性ポケットをうまく用いて、プレ配列の 3 つの疎水性残基を認識していると考えられる。(図 3)

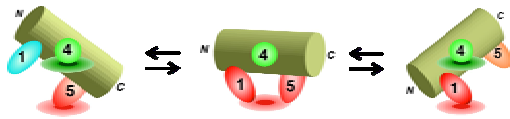


図3 Tom20のMultiple-mode recognition model. プレ配列(円筒で表す)は, Tom20の結合部位において複数の状態の速い動的平衡にある. これがTom20の広い特異性発現のメカニズムであることを提唱する. 数字のついた図形は3つの疎水性側鎖を, 水平な円盤はTom20の2つの疎水性部位を表している.

結晶構造は静止画像(スナップショット)である. したがって, 動的平衡が存在することを実験的に示す必要がある. そこで, NMR緩和時間解析を行った. ここでもリンカーを介してSS結合でつないだTom20複合体を用いた. その理由は, 局所濃度を上げることで, 解離状態にあるリガンドの割合を極力減らし, 複数の結合状態の交換反応に由来する化学シフトのゆらぎが緩和時間のパラメータに反映されるようにするためである. その結果, 複合体中において, プレ配列とTom20の接触部位に, サブミリ秒の時間範囲にあるような運動性があることがわかった. これは動的平衡状態に基づく運動を直接証明するものではないが, 非常に示唆的な結果である.

なぜ, このような複雑な認識をTom20はしなくてはならないのだろうか? それぞれの結合状態は単独ではコンセンサス配列を説明できない. すなわち, プレ配列は結合状態において, それぞれは不完全な結合状態の間を満遍なくたどることで, Tom20に認識されている. Tom20は広い特異性をもって, 多様なプレ配列を認識しなくてはならないが, 3つの位置での疎水性側鎖の大きさの差異を, 3つの結合サイトで同時にinduced fitのようなメカニズムで吸収することは難しいと考えられる. これに対し, 2つの位置の疎水性側鎖の大きさの差異を, 2つの結合サイトで同時に吸収する方が容易であろう. これを複数の状態のそれぞれで行い, それらの状態の間の速い平衡を使うことで, 3カ所の疎水性残基の位置にいかなる大きさの疎水性側鎖を持って来ても, 同時に適応できることを実現していると考えられる. これはTom20とは対照的な特異性の高い場合をみるとその違いがはっきりする. ヘリックスコンホメーションにあるLXXLLモチーフを厳密に認識する核内受容体タンパク質では3つの疎水性ポケットががっちり3つのロイシンを認識している. このような鍵と鍵穴による静的な認識は強い相互作用に典型的に見られる.

本研究により, 広い特異性と適度に弱い結合力の特徴づけられる「ソフトな相互作用」の発現メカニズムとして, リガンド(普通は

短いアミノ酸配列)は結合状態において, 通常想定されているよりも大きな運動の自由度が必要と考える(図4). ソフトな相互作用

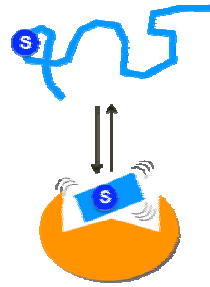


図4 広い特異性と適度に弱い結合力で特徴づけられる「ソフトな相互作用」は, 結合状態における複数の結合状態の間の動的平衡により実現されていることを提唱する. Sは標的シグナルを表している.

用のメカニズムとして, アミノ酸配列モチーフの部分的な特徴を認識する結合状態が複数あり, その間の速い平衡によりモチーフの全体の認識が達成されるという動的平衡認識を提唱する(図3). タンパク質合成において, タンパク質が正しい場所へ運ばれること(細胞内仕分け)が重要である(図1). 仕分けされるタンパク質には短いアミノ酸配列モチーフが含まれていて, それぞれを特異的に認識する受容体タンパク質が存在する. モチーフ配列に「コンセンサス配列が存在しない」と言われるほど, 受容体タンパク質の特異性が「広い」ことが多い. こうした仕分けシグナルの多くが, 今回提案した動的平衡認識メカニズムを用いていることが十分考えられる.

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)

[雑誌論文](計9件)

Igura M, Maita N, Kamishikiryo J, Yamada M, Obita T, Maenaka K, Kohda D (2008) Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J* 査読有り 27: 234-243

Sasaki K, Ose T, Okamoto N, Maenaka K, Tanaka T, Masai H, Saito M, Shirai T, Kohda D (2007) Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA. *EMBO J* 査読有り 26: 2584-2593

Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D (2007) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J* 査読有り 26: 4777-4787

Kohda D, Yamada M, Igura M, Kamishikiryo J, Maenaka K (2007) New oligosaccharyltransferase assay method. *Glycobiology* 査読有り 17: 1175-1182

Igura M, Maita N, Obita T, Kamishikiryo

J, Maenaka K, Kohda D (2007) Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble domain of the oligosaccharyltransferase STT3 subunit from the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 査読有り 63: 798-801

Sasaki K, Ose T, Tanaka T, Mizukoshi T, Ishigaki T, Maenaka K, Masai H, Kohda D (2006) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the N-terminal domain of PriA from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 査読有り 1764: 157-160

Igura M, Ose T, Obita T, Sato C, Maenaka K, Endo T, Kohda D (2005) Crystallization and preliminary X-ray analysis of mitochondrial presequence receptor Tom20 in complexes with a presequence from aldehyde dehydrogenase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 査読有り 61: 514-517

Obita, T, Muto, T, Endo, T, Kohda, D (2003) Peptide library approach with a disulfide tether to refine the Tom20 recognition motif in mitochondrial presequences. *J Mol Biol* 査読有り 328: 495-504.

神田大輔 (2008) 「ミトコンドリア行きシグナルを識別するためのソフトな分子認識」生化学 第80巻 日本語総説 (査読無し) 第10号, 888-896.

[学会発表] (計 23 件)

Daisuke Kohda "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states" (invited, oral) 蛋白質立体構造解析 NEDO 特別講座 国際シンポジウム 2009, 2009, 1/26, 東京

Daisuke Kohda "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states - Complex stabilization with a molecular tether - (invited, oral)" International Symposium on Molecular Soft Interactions in Biological Systems Organized by The Priority Area "Membrane Interface", 2009, 1/22-23, Osaka

Takashi Saitoh "Relaxation analysis of the Tom20-bound states of a mitochondrial presequence." International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (XXIII ICMRBS), 2008, 8/24-29, San

Diego, USA

斉藤貴士 「複数の結合様式を介したミトコンドリア Tom20 によるプレ配列の認識機構」(口頭発表, 若手奨励賞シンポジウム) 第8回日本蛋白質科学会年会, 2008, 6/11, 東京

Daisuke Kohda "Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase." Fukuoka Symposium on Molecular Soft Interactions at Biomembrane Interface, 2008, 1/25-1/26, Fukuoka

神田大輔 「アスパラギン結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の構造生化学」(シンポジウム口演) 第27回日本糖質学会年会, 2007, 8/2, 福岡

井倉真由美 Asn 結合型糖鎖修飾を決定するオリゴ糖転移酵素の構造生物学研究 (ワークショップ口演) 第7回日本蛋白質科学会年会, 2007, 5/24-5/26, 仙台

斉藤貴士 「ミトコンドリア Tom20 によるプレ配列の動的認識機構: 緩和解析からのアプローチ」(ワークショップ口演) 第7回日本蛋白質科学会年会, 2007, 5/24-5/26, 仙台

Daisuke Kohda "Relaxation study reveals a dual-mode interaction mechanism for mitochondrial presequence recognition by Tom20" (invited, oral) International Workshop on Perspectives on stable isotope aided NMR methods for protein structural analysis, 2007, 3/30-3/31, Osaka

Daisuke Kohda "Recognize not to discriminate: mechanism of nonselective base recognition of 3'-terminus of DNA by PriA protein." (invited, oral) The 2nd Sapporo Conference 2006; New Trend in Structural Biology, 2006, 10/30-10/31, Sapporo

Takashi Saitoh "Dynamic recognition of mitochondrial presequences by Tom20." The 2nd Sapporo Conference 2006; New Trend in Structural Biology, 2006, 10/30-31, Sapporo

Mayumi Igura "Tom20 receptor recognizes the mitochondrial presequence through dynamic equilibrium." 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, 6/18-6/23, Kyoto

神田大輔 「ゆるい相互作用をX線結晶解析とNMRで見る」(ワークショップ口演) 第6回日本蛋白質科学会, 2006, 4/24-4/26, 京都

Takayuki Obita "Crystal structures conformationally locked with a disulfide tether suggest a dual-mode interaction mechanism for mitochondrial presequence

recognition by Tom20" "International Symposium on Life of Proteins", 2005, 11/1-11/3, Hyogo,

神田大輔 「<ゆるい>相互作用に対する構造生物学アプローチ」 よこはまNMR構造生物学研究会 第27回ワークショップ「細胞シグナリングの構造生物学」, 2005, 9/21, 横浜

Daisuke Kohda "Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences" (invited, oral) XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, 2005, 8/23-8/31, Italy

Mayumi Igura "Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences." XX Congress of the International Union of Crystallography Florence, 2005, 8/23-8/31, Italy

神田大輔 「ミトコンドリアへの標的シグナルを構造の観点から解読する」 第26回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2004, 11/25, 東京

神田大輔 「ミトコンドリアへの標的シグナルを構造の観点から解読する」 2004 蛋白研セミナー「生体系 NMR における技術革新」, 2004, 11/19, 大阪

Daisuke Kohda "Disulfide bond tethering approach for the study of molecular interactions" 特定領域研究「膜インタフェイス」第2回公開シンポジウム Molecular Soft Interactions at Biomembrane Interface, 2004, 8/4, 大阪

Takayuki Obita "Structural basis of the decoding of the mitochondrial targeting signals by Tom20" The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, 2004, 4/14-18, Yokohama

Daisuke Kohda "Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences by NMR and crystallography" (invited, oral) UK-Japan Structural Genomics Conference UK/Japan Symposium, 2004, 3/23-25, Oxford UK

Daisuke Kohda "Cracking of the targeting signal embedded in mitochondrial presequences by NMR and crystallography" (invited, oral) CREST international symposium, Frontier of Biological NMR Spectroscopy, 2004, 1/26-27, OSAKA

〔その他〕

ホームページ

<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) 研究分担者

前仲 勝実 (MAENAKA KATSUMI)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 10322752

(3) 連携研究者

斉藤 貴士 (SAITOH TAKASHI)

九州大学・デジタルメディスンイニシアティブ・助教

研究者番号: 00432914