

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770087

研究課題名 動的平衡を利用したミトコンドリア Tom20 による前駆蛋白質プレ配列の認識機構

研究課題名（英文）Recognition of presequences of mitochondrial precursor proteins using dynamic equilibrium

研究代表者

齊藤 貴士（SAITOH TAKASHI）

九州大学 デザイン・イン・イニシアティブ・助教

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作成し、X線結晶構造解析とNMRスペクトル測定によるアプローチを展開した。この結果、動的認識モデルを支持する新たな実験データが得られた。

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 obtained further information supporting the dynamic recognition model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

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。この膜輸送過程については、多くの分子生物学的な先行研究により、かなり明らかになっている。しかし、この分野にお

ける構造生物学的な研究はまだ十分とは言えない。この輸送過程において、Tom20は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。最初に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、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。さらにその6残基程度からなるコンセンサスの同定が行われた。その後、Tim9/Tim10複合体、Tim44、Tom70、Tim21の構造が立て続けに報告されるなど、非常に激しい競争が繰り返されている。こうした輸送関連タンパク質の構造決定は重要な課題であるが、タンパク質輸送の分子メカニズムを解明するには、種々のタンパク質因子とプレ配列との結合様式を明らかにすることが必要である。我々はこれまでの研究で、相互作用様式の異なる2つのX線結晶構造と、NMR緩和時間解析による残存運動性の解析を組み合わせることで、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。

2. 研究の目的

これまでの研究では分子間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。この複合体では適度な長さのリンカーとシステインがプレ配列に付加されている。そこで本研究では、リンカーを用いない複合体の安定化と構造解析を目的とし、リンカーのアミノ酸配列の違いが、複合体構造にどのような影響を与えているのかについて調べる。そこでプレ配列のコンセンサスで重要ではないアミノ酸にD型システインを、その3残基先にL型システインを導入し、分子内SS結合を形成させる。これによりペプチドが α ヘリックス構造を取りやすくなり、複合体状態を安定化することができる。すなわち、リンカーが無い複合体で構造を基盤とした解析が可能になる。この複合体安定化技術を用いることで、リンカーの無い結合状態でもプレ配列が複数の結合様式を取り、これらの結合様式の間には速い平衡があることを明らかにする。

Tom20によるプレ配列の認識は結合が弱く(K_d で μM オーダー)、また認識されるアミノ酸配列の特異性はかなり広い。こうした「ソフト」な相互作用では、通常のX線結晶構造解析やNMR解析には技術的な困難が伴う。したがって、詳細なメカニズムを

解明するためには弱い相互作用を克服するための新たな工夫が必要となる。研究代表者の所属研究室では、システイン残基を持つリンカーをプレ配列に付加し、Tom20のシステイン残基と分子間SS結合を形成させることで複合体状態を安定化する工夫を用いてきた。さらに本研究ではリンカーを用いない新しい方法として、プレ配列内にD-システインを導入し、分子内SS結合を形成させることで複合体を安定化する手法を採用する。こうした複合体の安定化技術は、「ソフト」な相互作用をする他のタンパク質複合体の研究にも応用が期待できる。

そして、本研究で解明を目指すTom20によるプレ配列の動的認識メカニズムは、広い特異性を実現するための普遍的な相互作用様式であると予想しており、細胞機能の生化学的ネットワーク（分子間相互作用）の様々な場面で利用されていると考えている。

3. 研究の方法

(1) 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SS結合を形成させるペプチドをデザインした (図1)。

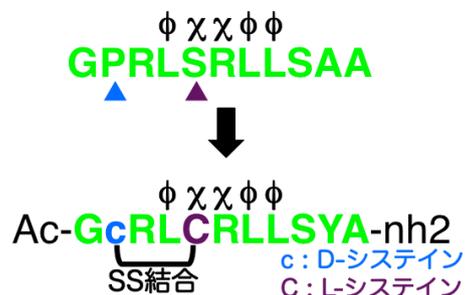


図1. α ヘリックス構造安定化デザイン: 2つ離れたシステイン残基間に分子内SS結合を導入する。小文字のcはD型、大文字のCはL型システインである。

この配列のペプチドの合成を依頼し、0.1M炭酸水素アンモニウム溶液中で攪拌することで、分子内SS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で精製し、分子内SS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 ^{15}N ラベルTom20に対するNMR滴定実験により確認した (図2)。このペプチドとTom20可溶性ドメインとの複合体の結晶化条件の検討を研究室に設置されている自動結晶化スクリーニング装置を利用し行った結

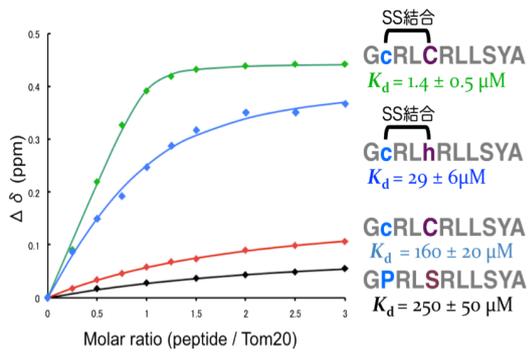


図2. 各ペプチドのNMR滴定実験における、化学シフト変化量。D-システインを導入したペプチドでは約100倍、さらにHomoシステインを導入したペプチドでは約10倍Tom20との相互作用が強くなっていた。

果、塩化マグネシウムとPEGの条件で結晶が得られた。この結晶中にTom20とペプチドの両方が含まれていることをUPLCにより確認した。X線結晶構造解析実験をつくばの放射光施設（高エネルギー加速器研究機構）で行った結果、当初は高分解能での反射データを収集することができなかったが、実験を繰り返すことで最終的に2.1Åまでの回折データが得られた。この実験結果を利用し、新たな複合体の構造解析に成功した。得られた構造を、以前に報告したリンカーを用いた複合体と比較したところ、Tom20とプレ配列の相対的な位置関係は一致していたが、側鎖レベルでの相互作用様式は異なっていた。

(2) (1)で成功したDシステインを導入したプレ配列とTom20の複合体のX線結晶構造解析結果から、D-システインとL-システインの距離が短すぎるため、プレ配列のヘリックス構造に歪みが生じることが解った。そこで、次のアイデアとしてL-システインの側鎖をメチレン1つ分長くしたHomoシステインを導入したペプチドを新たにデザインした(図3)。

このペプチドを ^{15}N ラベルTom20に対しNMR滴定実験を行った結果、野生型に比べ10倍程度相互作用が強くなっていることが明らかになった(図2)。自動結晶化スクリーニング装置を利用し約300種類の条件で結晶化を試みた結果、0.1M Tris-HCl、pH 8.5、70% MPDの条件で結晶が得られた。つくばの高エネルギー加速器研究機構でX線結晶構造解析実験を行った結果、1.9Å分解能までの反射データが得られた。この反射データを使用し構造解析を行った結果、複合体の結晶構造が得られた。新たに得られた構造ではTom20とプレ配列

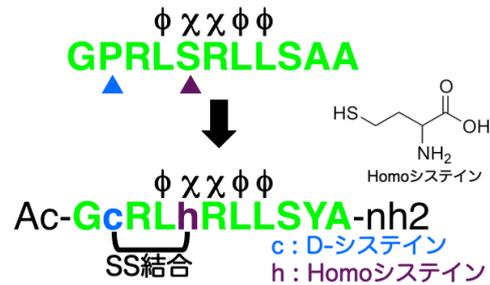


図3. α ヘリックス構造安定化デザイン 2: 2つ離れたシステイン残基間に分子内SS結合を導入する。小文字のcはD型システイン、小文字のhはHomoシステインである。

の相対的な位置関係は上記のDシステイン、また、リンカーを用いた複合体とほぼ一致していたが、側鎖レベルでの相互作用はやはり異なっていた。

(3) 以前報告したリンカーを用いた分子間SS複合体について、リンカーのアミノ酸残基がさらに2分子長い(GPRLSRLLSXAGSGC, XはAlaもしくはTyr)、すなわちプレ配列ペプチドにより自由度を与えたプレ配列ペプチドとTom20の分子間SS複合体を作成した。結晶化スクリーニングを行ったところ、Xの位置にTyrを導入した複合体について、蛋白質結晶が得られた。今後、この複合体の構造解析によりTom20によるプレ配列の動的認識機構について、より詳細な知見が得られると期待できる。

4. 研究成果

これまでにTom20とプレ配列ペプチ

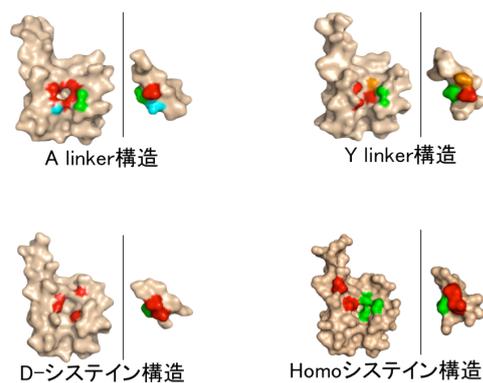


図4. 得られた4つの複合体構造の相互作用様式比較。左側の分子がTom20可溶性ドメイン、右側の分子がプレ配列ペプチドの表面構造。Tom20が持つ2つの疎水性ポケットと、認識するロイシンを緑と赤で示した。

ドとの複合体の4種類の結晶構造を得ることができたが(図4)、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(図5)。忍者の分身の術(複数の状態をすばやく動きまわることによって達成する)のようなものと考えれば、想像しやすいかもしれない。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1000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。

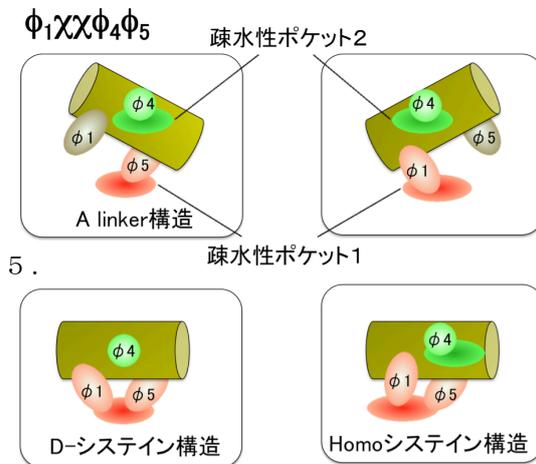


図5. 4つの複合体構造の相互作用様式の模式図。緑色の筒がプレ配列に対応する。Tom20はこれらの相互作用の動的平衡を利用してプレ配列を認識していると考えられる。

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1件)

① 齊藤貴士, 尾瀬農之, 神田大輔, ミトコンドリアのプレ配列は動的平衡メカニズムに

より認識される, 生物物理, vol. 49 (2009), No. 5, 2009.10 (査読あり)

[学会発表] (計3件)

① 齊藤貴士, 宮崎佑介, 尾瀬農之, 神田大輔 構造生物学から見たミトコンドリアTom20による前駆蛋白質のプレ配列認識, 第9回日本蛋白質科学会年会, 2009.05.21 熊本

② Takashi Saitoh, Daisuke Kohda, Relaxation Analysis of the Tom20-Bound states of a Mitochondrial Presequence., XXIIrd ICMRBS, 2008.08.25. USA

③ 齊藤貴士, 井倉真由美, 尾瀬農之, 前中勝実, 神田大輔, 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, 第8回日本蛋白質科学会年会, 2008.06.11. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 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