

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

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

神田大輔, 齊藤貴士

一つのタンパク質が多様なリガンドを広く認識 (promiscuous recognition) して相互作用することは生物にとって重要であるが、既存の方法論の限界のために研究が遅れている。このような「ゆるい相互作用」をしている過渡的な複合体から構造情報と動的情報を得るために、リガンドの解離会合平衡を会合側へシフトさせることが有効である。不安定な複合体を共有結合を用いて安定化する例は過去にもあるが、今回の方法は複合体状態における残存運動性を適切に残す配慮をする点が新しい。ジスルフィド結合を用いて実現した例を、Tom20-ミトコンドリアプレ配列とオリゴ糖転移酵素について示す。複数の結合状態とその間の速い交換が、広い特異性を可能にする重要な仕組みである。さらにTom20の研究から、それぞれの結合状態におけるリガンドの部分的な特徴の認識がもう一つの重要な仕掛けであることを提案する。

はじめに

過渡的複合体から原子レベルの構造情報を得る方法として、我々は共有結合を分子間に導入する方法と、リガンド内に共有結合を導入する方法を提唱し、ミトコンドリアプレ配列受容体 Tom20-プレ配列の系について適用してきた。広い特異性や過渡的複合体など一般には馴染みが少ないと思われる言葉を使わざるを得ないので、実験結果について具体的に解説する前に、まず一般論として話しを進める。

1. つよい相互作用とゆるい相互作用

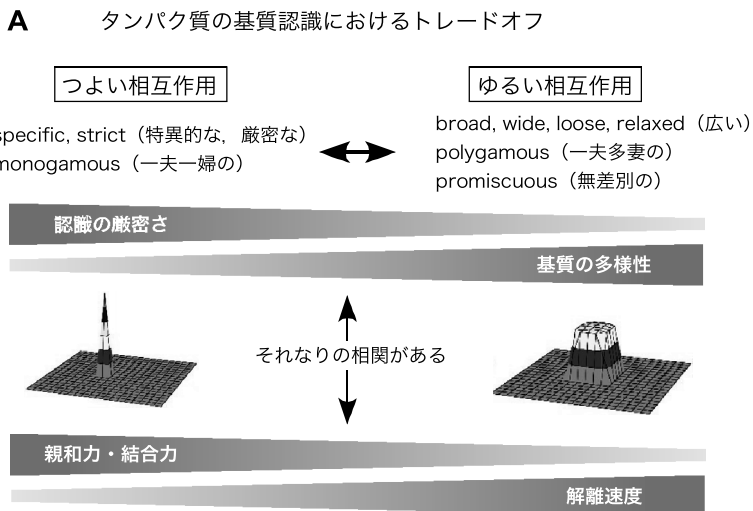
タンパク質によるリガンドの分子認識は一般的に言えば

九州大学生体防御医学研究所構造生物学分野 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

Equilibrium shifting of transient protein complexes to the bound states using a covalent bond for structural analysis at an atomic resolution

Daisuke Kohda and Takashi Saitoh (Division of Structural Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

厳密でかつ結合力が高い方がよいように思われる。実際、こうした「つよい相互作用」の集積により、生物は恒常性を保って生きている。一方、分子認識がそれほど厳密でなく、結合力も中程度であるようなタンパク質によるリガンドの分子認識も生物にとって等しく重要である。注意すべきは、基質特異性が厳密ではないと言っても、特異性が無い (nonspecific) のではなく、特異性が広い (broad, wide, loose, relaxed) のである (図 1A)。基質特異性が広いとは、人間が目で見たとときに、一見するとリガンドの化学構造に共通要素がないように見えるという意味である。しかし、タンパク質は多様なリガンドの中から何らかの共通した性質に着目することで広い特異性を実現している。広い特異性という言葉は、広いという形容詞に特異という狭さを表す言葉が繋がった矛盾する表現になっていて、居心地悪く感じる人がいるかもしれない。英語でも良い形容詞がなく、polygamous (一夫多妻の) とか promiscuous (無差別な) という単語が当てられている。後者は辞書で引くと俗語として品のない意味をもつ英単語でもある。それでも、最近では多くの科学論文において、promiscuous (activation, binding, enzyme, gene expression, or interaction) のよう



B タンパク質の基質認識のメカニズム

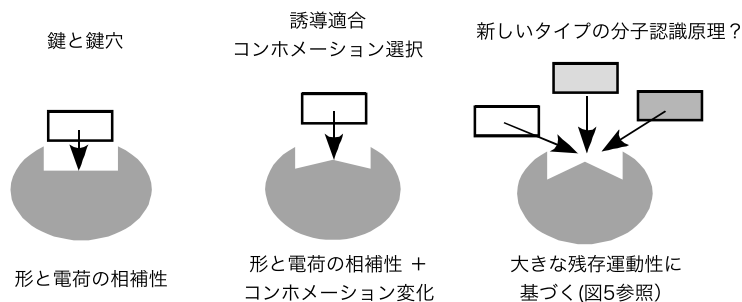


図1 タンパク質によるリガンド認識の分類

A リガンド認識における厳密さ, 多様性, 結合力, 解離速度の関係. 連続的なトレードオフ関係(一方を追求すれば他方を犠牲にせざるを得ないという状況)の両極端を「つよい相互作用」と「ゆるい相互作用」と呼ぶことにする. 挿入図はXY平面がリガンドの構造多様性を表し, Z軸が結合力を示す. つよい相互作用では高いリガンド特異性を示すのに対し, ゆるい相互作用では広いリガンド特異性を示す.

B いろいろな相互作用を可能にするタンパク質のリガンド認識機構の分類

に使われている.

基質特異性が広い相互作用は, 直感的に結合力は弱いだろうと考えられる(図1A). 同時に解離速度は大きく, 溶液中では解離状態と会合状態の間をすばやく交換している. 実際にはリガンド特異性, 結合力, 解離速度はそれぞれ物理化学的な根拠が異なるので, 必ずしも相関する必然性はないのだが, 多くの場合, つよい相互作用では厳密な特異性, 強い結合力, 遅い解離が見られる. つよい相互作用の対極として, リガンド特異性が広く, 結合力がそこで, 速い解離が起こる場合を想定することができる. これを「ゆるい相互作用」と呼ぶことにする. 残念ながら, ゆるい相互作用に相当する良い英単語は今のところ見あたらない.

2. ゆるい相互作用を実現する仕組みとは?

ゆるい相互作用を可能にする分子機構はどのようなモノであろうか?(図1B). つよい相互作用を明快に説明する鍵と鍵穴モデルや, コンホメーション変化を含む誘導適合やコンホメーション選択ではゆるい相互作用の実現は難しいと考える. 蛇足ながら, みかけ上, 一つのタンパク質がまったく異なるリガンドを結合するが, 実は多数のドメインからなるタンパク質であって, 複数の結合部位によるつよい相互作用の総和に過ぎない例もあるので, 当然ながらこのような場合は除外する. これに対して, 同一あるいはオーバーラップする結合部位を用いて, 多様な化学構造のリガンドとほぼ同程度の結合の強さで相互作用するには, まったく新しい分子メカニズムが必要かもしれない. 特殊

な興味であるように思う人も多いかもしれないが、実は、最近になって関連する話題の総説が散見されるようになってきている¹⁻³⁾。それなりの数の研究者が独立にそれぞれの興味でゆるい相互作用を実現する仕組みについて、関心を持ち始めているのが現状である。しかし、まだ統一的な見解がでるような段階にはないように思われる。ただし、今の段階でも一つ共通して考えられる特徴が、結合状態におけるリガンドの大きな残存運動性 (residual mobility) である。

タンパク質にリガンドが結合すると必然的にタンパク質分子は硬くなると思うのが自然である。すなわちリガンドの結合はエントロピー的に不利となる。ところが、低分子量のリガンドがタンパク質に結合すると、タンパク質分子全体の運動性が上昇する例がNMR緩和時間測定から明らかになっている⁴⁾。これがゆるい相互作用とどう関係するのはこれからの課題であるが、結合状態の残存運動性の理解の重要性を示している。

ゆるい相互作用における過渡的複合体とは、リガンドが結合状態において大きな運動性を残している複合体のことであると定義する。リガンドが結合ポケットのなかで‘ガタついている’ので、複合体の結晶化、NMR測定、電子顕微鏡観察はそれなりに困難になることは理解できよう。なお、結合が弱いことが構造解析を困難にする直接の原因ではない。それは K_d が3 mMと非常に弱い結合であっても、NMRによって構造情報が得られた例があることから明らかである⁵⁾。SH3ドメインとLIMドメインの相互作用は非常に弱いのだが、結合が飽和するまで濃度を上げればよい。SH3とLIMの場合は相互作用が鍵と鍵穴の性質をもち、接触表面積は小さくても複合体状態における残存運動性がほとんどないことが、分子間NOE(核オーバーハウザー効果)をきちんと測定できた理由であると推察する。

3. ゆるい相互作用から構造情報を得る方法

過渡的複合体から原子精度の構造情報を得るにはどうしたらよだろうか？ まず、結合状態の割合を増やすことである。上記のSH3とLIMの例のように、飽和濃度まで濃度を高めるのも一つの方法であるが、高すぎる濃度はタンパク質のアグリーゲーションを誘発し、大部分の実験が不可能になる。そこで、リガンドの解離会合の平衡を会合側へシフトさせる戦略が考えられる(図2)。ここでは共有結合を用いた二つの方法を提案する。共有結合を分子間に導入して架橋する「テザー係留技術」(molecular tethering)と、リガンド内に共有結合を導入してリガンドの自由度を制限し結合力を高める「分子内架橋硬化技術」(molecular stiffening)である。もちろん、共有結合で複合体を安定化することは新規ではなく、過去にも実施例は多い⁶⁻¹⁶⁾。しかし、従来ケースは複合体構造を安定化することが目的で、結合状態における残存運動性まで十分に考慮していない。つよい相互作用では多少無理した複合体安定化を行っても問題は少ないが、ゆるい相互作用では、“死んで歪んだ複合体”の構造が得られてしまう危険性がある。今回の提案では、結合状態におけるリガンドの運動性を大きく制限しないような注意深いデザインを前提としている点が新しい。すなわち作為的な歪みが導入されていないという何らかの実験的保証が要求されるのである。このような複合体を「平衡シフト複合体」と呼ぶことにする。安定化過渡的複合体と言ってもよいのだが、これでは死んで歪んだ複合体と同一視される危険がある。

平衡シフト複合体のデザインが適切にできたとする。しかし、原子精度の構造情報を得るには、まさに適切に残した運動性が邪魔をする。そこで二つの解析結果を組み合わせることで解決を目指す。一つ目は、平衡シフト複合体の

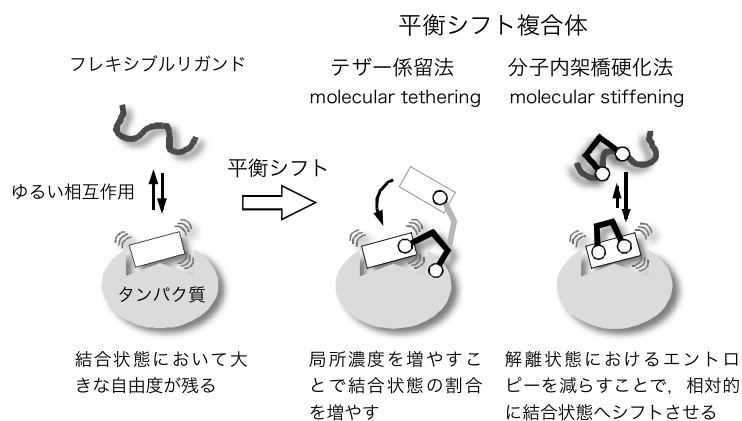


図2 ゆるい相互作用をしている過渡的な複合体から構造情報を得る方法

解離会合平衡を会合側へシフトするために、分子間あるいはリガンド分子内に共有結合を導入する。共有結合としてはジスルフィド結合が使いやすい。

結晶構造から“スナップショット”としての高分解能構造情報を得ること、二つ目は溶液状態における運動性の程度を評価する解析を行って動的な情報を得ることである。

結晶の中ではタンパク質分子は互いに接触して稠密に充填されている。結晶中のタンパク質分子同士の接触をクリスタルコンタクトという。クリスタルコンタクトには溶液状態でのタンパク質同士の自然な相互作用を反映しているものとそうではないものがある。いずれにせよ、クリスタルコンタクトのためにリガンドの残存運動が制限されて、結晶構造は多数の可能な状態の中から一つの状態に凍結された像に相当することになる。これを一言で表現して、スナップショットと呼んでいる。リガンドに直接関係するクリスタルコンタクトがなくても、リガンドの残存運動に共役したタンパク質側のコンホメーション変化を制限することで、リガンドのスナップショットが得られる場合もある。ここでポーズ (pose) という言葉を導入する。スナップショット構造が複合体全体の構造を指すのに対し、ポーズはリガンドのコンホメーションとタンパク質に対する相対位置関係を表している。たとえばリガンドが結合状態で α ヘリックス構造をとるなら、ポーズはこの α ヘリックスのタンパク質に対する相対角度と相対位置を表している。平衡化シフトデザインの方法の違いや、同じデザインであっても異なる結晶化条件で得られた結晶から異なるポーズが得られる可能性がある。幸運な場合には一つの結晶から複数のポーズが得られる場合もあるかもしれない。できるかぎり、たくさんのスナップショットを集めることで、リガンドの残存運動の全貌を原子精度で明らかにすることを期待できる。

しかしながらサンプリングの問題を忘れてはならない。すなわち、得られたポーズはリガンドの可能な運動状態のなかで必ずしも主要な状態 (major substate) に対応しているわけではなく、たとえ多数のスナップショットを集めても、ポーズの集合が運動状態の分布を適切に反映している保証がまったくないことである。この問題に関して、今のところ完全な解決策があるわけではない。結晶を得るためには平衡シフトを起こす必要があるが、一度結晶ができてしまえば平衡シフトのために導入した共有結合を切って、リガンドを結晶中でフリーにすることができる。このような実験が可能になったとすると、幾通りかの実験結果を予測することができる。リガンドは結晶中にあっても残存運動のために電子密度が薄くなり、温度因子が高くなるかもしれない。あるいは高分解能結晶であれば多形として精密化が可能になり、複数の結合状態が存在することを原子精度で示せるかもしれない。また、究極的には、リガンドがクリスタルコンタクトに関与していないような結晶をつくることができればよい。

4. ゆるい相互作用から動的情報を得る方法

平衡シフト複合体に残る運動性を評価するには、溶液 NMR の様々な手法を用いることができる。まず第一に、緩和時間測定を用いることができる。リガンドが結合ポケット内でマイクロ秒からサブミリ秒程度の周波数領域の比較的遅い運動性をもっていると、接触面に存在するアミド ^{15}N 窒素原子核の緩和時間という NMR パラメータに影響を与える。このとき複数の状態が存在していても、サブミリ秒程度の運動は化学シフト差でみると十分高い周波数、すなわち速い交換となり、シグナルは平均化されて一つしか観測されない。緩和時間解析の実験的な詳細を述べることは控えるが、簡単に言えば、 ^1H - ^{15}N 結合に対応する HSQC ピークについて、緩和時間解析を行うことで、接触面に運動性が残っていることを実験的に示すことができる。緩和時間解析にはモデルフリー解析を行って R_{ex} として測定する方法、transverse CSA/dipolar cross-relaxation rates, η_{xy} 測定から R_{ex} を推定する方法、緩和分散 (relaxation dispersion) 測定などがある。 ^{15}N 緩和時間測定は運動性に関し貴重な実験情報を与えることができるが、あくまで適当なタイムスケールの運動性がどの残基にどの程度存在するという記述に留まる。タンパク質分子は球状で等方的な回転をしているとか、運動状態には二つの状態しかないなどの仮定が結果の解釈の前提になっていることにも留意する必要がある。 ^1H - ^{13}C 結合に対しても同様な測定をすることができるが、 $\text{C}\alpha$ だけを ^{13}C 標識するなど特殊な標識をする必要がある。

もう一つの NMR 実験として ^1H - ^1H NOE を定量的に解釈することが考えられる。二つの水素原子核の距離が 5Å 程度より小さいときに NOE (核オーバーハウザー効果) を観測できる。物理的に言うと、二つの水素原子核が磁気双極子相互作用するとき、二つの核スピンのエネルギー状態が同時に変化する現象 (ゼロ量子遷移と二量子遷移) が起こる結果として NOE が観測できる。NOE には二つの核スピン間の距離の情報の他に運動の情報が含まれているが、運動の均一性を仮定し、さらに距離情報として保守的に解釈することでタンパク質の立体構造決定を可能にしていることは周知の事実である。もしも、リガンドが結合状態において相当量の運動性を残していると、分子間の NOE が他の NOE よりも有意に小さくなることが期待される。緩和行列を解く数値シミュレーションを行うことで、結合状態においてリガンドに運動性が残っていることを定量的に示すことができると期待する。緩和行列を解くために必要な座標は、結晶スナップショットを用いるか、後で述べる分子動力学計算から得られる構造アンサンブルを使う。ここで注意すべきは、通常の NMR 解析では、リガンドとタンパク質を安定同位体で区別する (片方を非標識で

残すか、異なる安定同位体で標識する)ことで分子間 NOE と分子内 NOE を区別するのが普通である。しかし、これでは分子間 NOE と分子内 NOE をそれぞれ別々に距離情報へ変換することになり、異なる変換パラメータが必要になってしまう。したがって、リガンドの運動性を統一的に解釈するには分子全体を一つの対象として扱う必要がある。たとえば複合体全体を安定同位体標識せずに 2D¹H-¹H NOESY 測定をして、¹H ネットワークとして定量的に解析することが考えられる。

NMR 以外の方法として、個人的に、測定が可能になることを期待したいのは X 線溶液小角散乱法である。現在はドメイン間の相対配置や相対運動を区別することに使われるが、もっと高角度散乱まで高感度に測定できるようになれば、一つのドメイン中のヘリックスの動きまで感知できるようになるはずである。もう一つの方法は計算シミュレーションとの組み合わせである。分子動力学計算を長時間行ってリガンドの動きのトラジェクトリーを得ることができる。平衡シフトのために導入した共有結合は入れないで、普通の複合体として計算する。このときに平衡シフト複合体から得たスナップショット構造を初期構造あるいは参照構造として使える。複数のスナップショットの間の遷移を首尾良く再現できれば上出来であるが、交換速度がサブミリ秒領域にある場合は長時間の計算が必要になる。スナップショットのサンプリングの問題を評価するために、特別な計算手法(たとえばアンブレラサンプリングやマルチカノニカルと呼ばれる手法がある)を駆使して、結合ポケット内のリガンドの自由エネルギーランドスケープを計算することが考えられる。計算シミュレーション自体は、緩和時間測定や NOESY スペクトルなどの実験値を再現できるかどうかで妥当性を評価できる。

5. Tom20 タンパク質によるプレ配列認識への適用

タンパク質生合成において、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。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、それを特異的に認識する受容体タンパク質が存在する。ミトコンドリアのマトリクスおよび内膜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細胞質で合成される(図 3)¹⁷⁾。プレ配列は長さが 15 から 50 残基程度のアミノ酸配列で、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が交互に並んだ両親媒性のヘリックス構造をとると予想されるという共通の特徴がある。プレ配列にはミトコンドリアへの仕分けと輸送のための情報がすべて含まれている。これはプレ配列を任意のタンパク質と融合した人工タンパク質をつくると、このタンパク質はミトコンドリアマトリクスへ正しく輸送され、輸送後にプレ配列が正しく除去されることからわかる。ミトコンド

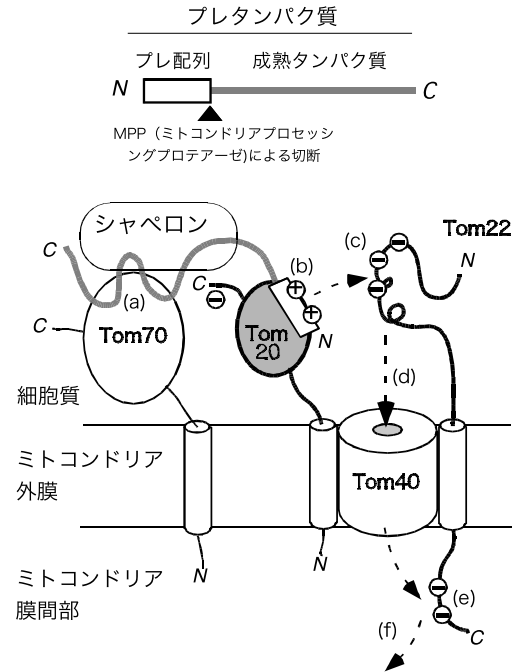


図 3 ミトコンドリア外膜に存在するタンパク質輸送システム
ミトコンドリアタンパク質は細胞質でプレタンパク質として合成される。N 末端にシグナル配列(プレ配列と呼ばれる)が付加されているが、二つのミトコンドリア膜を通過後にはプロテアーゼにより切断除去される。逆にこの位置でプレ配列を定義できる。ミトコンドリア外膜には複数の膜タンパク質から構成されるタンパク質輸送装置が存在し TOM 複合体と呼ばれる。その主要なメンバーは Tom70, Tom20, Tom22, Tom40 タンパク質である。プレタンパク質はシャペロンに結合した状態で Tom70 に相互作用する (a)。Tom20 はこの経路の最初のプレ配列レセプターとして働く (b)。ついでプレ配列は Tom22 の細胞質側部分に引き渡される (c)。このときは静電相互作用が働くと考えられる。ついで、Tom40 がつくるチャネルを通過し (d)、Tom22 の膜間部側と相互作用する (e)。その後、ミトコンドリア内膜のタンパク質輸送装置 (TIM 複合体) へ引き渡される (f)。

リアを構成するタンパク質の総数は 1,000 種(酵母)から 1,500 種(ヒト)と言われているので、プレ配列の種類は少なく見積もっても数百種類は存在する。プレ配列のアミノ酸配列は多様であり、一見するとアミノ酸組成の偏り以外に共通する特徴が見いだせず、“コンセンサス配列が存在しない”と言われるほどである。ミトコンドリアプレ配列の受容体タンパク質は複数存在すると想定されているが、その中でも Tom20 膜タンパク質はミトコンドリアの外膜に存在していて、general receptor と呼ばれ、すべてのプレ配列を最初に認識する受容体と考えられている(図 3)¹⁷⁾。ゲノムには Tom20 遺伝子は基本的に一種類しか存在しない。したがって、Tom20 は多様なプレ配列を広く認識する必要があり、ゆるい相互作用の典型とみなすことができる。

Tom20 によるプレ配列認識については、過去に「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」というタイトルで本誌に解説を行った¹⁸⁾。なお、この記事は日本生化学会のホームページからダウンロードできる。当時はゆるい相互作用という表現を使う代わりに、ソフトな相互作用と呼んでいた。その内容をまとめると、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) のプレ配列ペプチドのC末端側に3残基のスペーサー残基を挟んでシステイン残基を導入し、ラット Tom20 タンパク質の細胞質ドメインに唯一存在するシステイン残基と分子間ジスルフィド結合を形成させた (図4)¹⁹⁾。スペーサーの残基数はあらかじめペプチドライブラリを用いた方法で最適化した²⁰⁾。スペーサー部分のアミノ酸配列の違いで、二つの異なる結晶構造が得られた。Tom20 によるプレ配列認識には疎水性残基が $\phi\chi\chi\phi$ (ϕ は疎水性アミノ酸, χ は任意のアミノ酸) というパターンで3残基同時に存在することが必要である^{20,21)}。得られた二つのスナップショットは3残基の疎水性側鎖が三つの疎水性認識部位で認識されるという鍵と鍵穴の認識とは異なるものであった。すなわち、Tom20 側には二つの疎水性認識部位しかなく、数の不一致がある (図5)。NMR 緩和時間解析の実験から、溶液中においてこの二つのスナップショットに対応する結合状態あるいはそれ以上の数の結合状態は動的な速い交換をしている可能性が示唆された。次に分子内架橋硬化法を適用した (図4)。プレ配列内に $cxxC$ のパターンで二つのシステイン残基を導入する¹⁶⁾。小文字の c は D 型のシステイン、大文字の C は L 型のシステインである。二つのシステインの間にジスルフィド結合を架けるとプレ配列は硬くなり、フリー状態では自由度が制限されるために安定性が低下する。しかし結合状態ではジスルフィド結合は α ヘリックスコンホメーションに整合的なので安定性を変化させることはない。その結果相対的に結合状態が安定化する。実際に実験してみると結合力が100倍以上強くなることがわかった²²⁾。予想どおり Tom20 と混合すると共結晶が得られた。2008年の本誌の解説ではまだ解析が予備的な段階にあり、プレ配列の電子密度が見えずに、これは結晶内で運動しているためであるという希望的観測を述べた¹⁸⁾。

その後、3年の間にさらに実験を進めた。まず、 $cxxC$ を用いたプレ配列ペプチドの共結晶の構造解析を終了した²²⁾。それによると、得られた結晶構造のポーズは第3の結合状態と言えるものであった (図5)。プレ配列の三つの疎水性残基を $\phi_1\chi_2\chi_3\phi_4\phi_5$ と表せば、テザー係留法で得られた二つの構造は (ϕ_1, ϕ_4) と (ϕ_4, ϕ_5) の組み合わせの二つのロイシン残基が Tom20 と接触していたが、第3の結合状態では (ϕ_1, ϕ_5) の組み合わせであった。今後、異なるデザインの平衡シフト複合体や異なる結晶化条件を使うことで、第4のポーズが見つかる可能性がある。さらに、異なる結晶化条件下でもう一つ別の結晶が得られた。興味深いことに、この結晶のポーズは、すでにテザー係留

法で得られていたポーズの一つと瓜二つであった (図4)。ここに、テザー係留法と分子内架橋硬化法という異なる平衡シフトの方法を用いたのにもかかわらず、同一のポーズが得られたことになる²²⁾。したがって、このポーズがクリスタルコンタクトによるアーティファクトではなく、プレ配列と Tom20 間の適切な相互作用の結果であることを明快に示している。

次に、分子間テザーを用いて作った複合体結晶を DTT (ジチオスレイトール) に浸漬することで結晶内においてジスルフィド結合を切断する実験を行った²²⁾。ジスルフィド結合を含むシステイン残基が見えなくなっただけで、スペーサー部分を含めて結晶構造はほとんど変化しなかった。このことは、ジスルフィド結合は結晶形成には必要だが、結晶維持には不要であることを示している。また、プレ配列部分だけでなく、スペーサー部分もプレ配列の動きを止めることに役立っていることを示している。事前の予想では、プレ配列が結晶内で自由になり電子密度が消失あるいは薄くなることを期待したが、残念ながらそうはならなかった。しかし、ジスルフィド結合の結晶中切断は今後のいろいろな実験で有用な技術となると期待する。

6. 広い特異性を実現するための動的平衡認識メカニズムの提唱

以上の実験結果に基づいて、Tom20 によるプレ配列認識は「動的平衡認識メカニズム」に基づくことを提唱している (図5)。そのキーワードは、(1) 複数の結合状態、(2) それぞれの結合状態におけるリガンドの部分的な特徴の認識、そして、(3) 複数の状態の間の速い交換である。このゆるい分子認識機構により、Tom20 タンパク質は適度な親和性で多様なアミノ酸配列のプレ配列と広く相互作用することができる。

この分子機構の最大の特徴は“部分的な特徴の認識”である。この状況は結合部位の数が認識すべきリガンドの特徴の数よりも少ないときに起こる。Tom20 の場合は二つの結合部位に対し、三つの疎水性側鎖が必要である。ここで強調すべき点は、十分な強さの結合が起こるにはリガンドのすべての特徴がそろってはいなくてはならない点にある。実際、三つの疎水性側鎖のどれか一つを親水性側鎖に置換すると結合力は大幅に減ずる。リガンドの全特徴の認識を可能にするためには、必然的に複数の結合状態の間の速い動的平衡を仮定することになる。良く受ける質間に、「二つの疎水性残基しかないプレ配列を用いたら、対応する結合状態のスナップショットが得られるのでは？」があるが、実際は結合が弱くなって共結晶を得ることができない。やはり動的平衡が重要である。

興味深いことに、よく似た状況が、Sic1 タンパク質と Cdc4 タンパク質の相互作用に見られる。Sic1 タンパク質

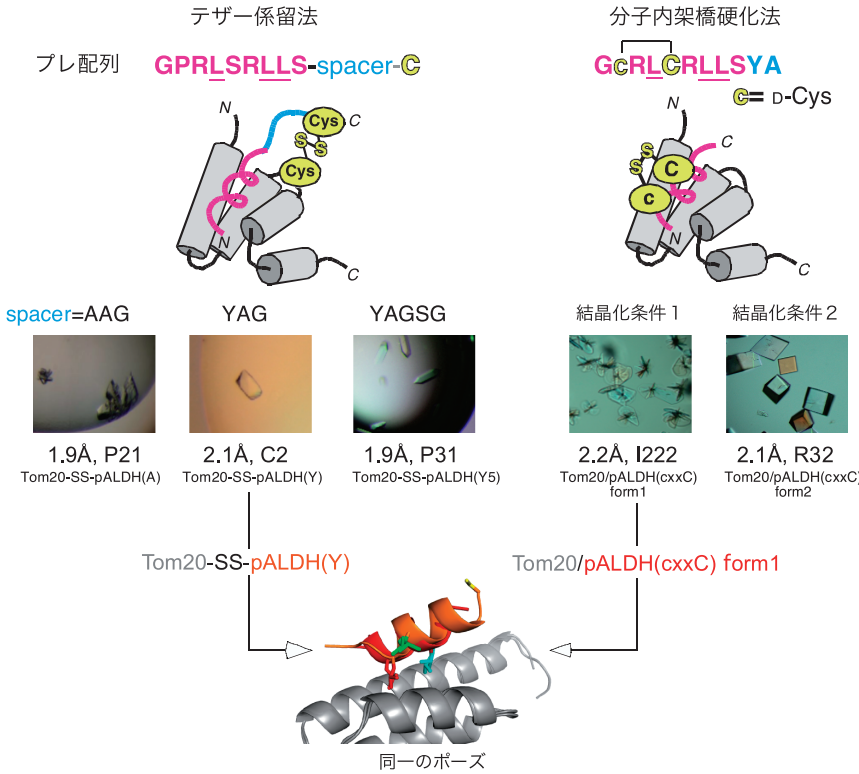


図4 Tom20-プレ配列の過渡的複合体に平衡シフト技法を適用した例

テザー係留法と分子内架橋硬化法を共有結合としてジスルフィド結合を用いて平衡シフトを実現した。異なる結晶化条件で異なる空間群（結晶の中での分子の詰まり方）の結晶がそれぞれ得られた。一方、分解能は1.9~2.2Åの範囲に収まっていて、側鎖の配向を十分に議論できる分解能である。最も重要な結果は、二つの異なる方法で得た平衡シフト複合体から、プレ配列の同一のポーズが得られたことにある。これは、このポーズが“死んで歪んだ”ものではなく、Tom20とプレ配列の自然な相互作用を反映していることを示す明確な実験的証拠である。

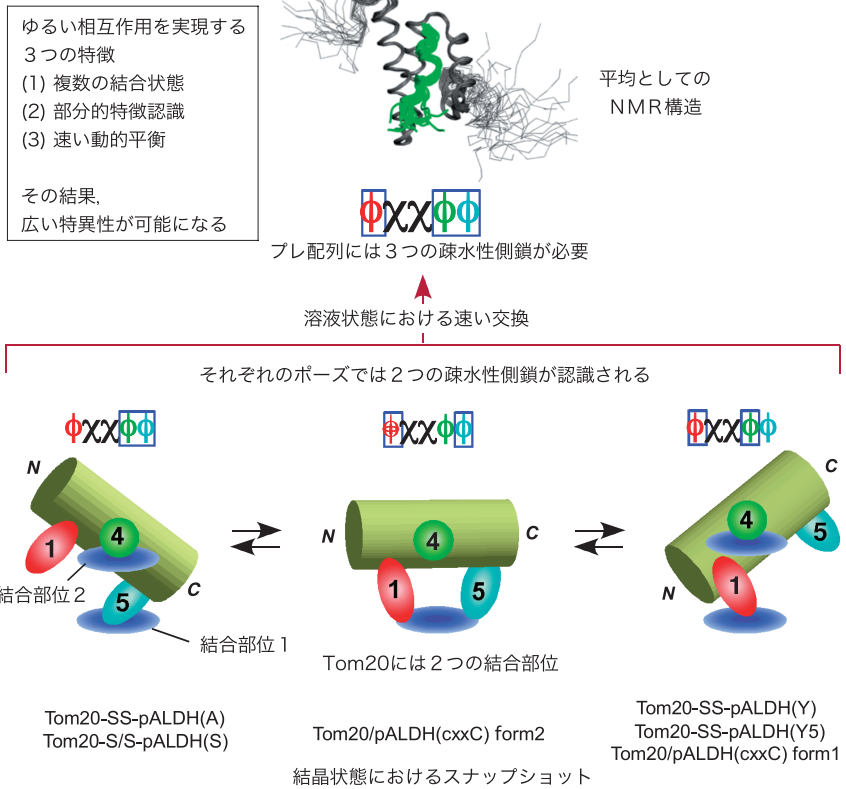


図5 プレ配列認識におけるTom20の広い特異性を実現する動的平衡メカニズム

Tom20には二つの疎水性ポケットしかないのに、プレ配列の三つの疎水性側鎖をすべて認識しているように振る舞うのは、三つ（あるいはそれ以上の数の）ポーズの間の速い平衡があるためである。動的平衡の結果、溶液状態では三つの疎水性側鎖が同時に必要であり、平均構造としてのNMR構造（PDBエントリー1OM2）が得られる。しかし、このNMR構造では、結合状態のプレ配列の大きな残存運動性を考慮せずに解析したため、分子間NOEが距離情報としての意味を失い、プレ配列のポーズは“歪んだ平均構造”にすぎなくなっている。そこで、運動性を考慮してNOESYスペクトルを定量的に再解釈する実験を進めている。

は天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein, IDP) であり, 複数のリン酸化部位をもつ. 5個以下のリン酸化修飾では Cdc4 との結合が弱い, 6個のリン酸化修飾されると Cdc4 に結合するようになる. しかし, Cdc4 にはリン酸化結合部位が一つしかないことが X線結晶解析によって示されている. Mittag らは NMR を用いて, リン酸化 Sic1 は Cdc4 と相互作用していても IDP 状態にあり, Cdc4 の一つのリン酸化結合部位が Sic1 の複数のリン酸化を動的平衡によって認識していることを示した²³⁾. この相互作用のユニークな特徴は, リン酸化 Sic1 全体がコンパクトな構造をもっていることにより, Cdc4 があるリン酸化を結合しているときに他の五つのリン酸化も必然的に Cdc4 の近くに存在することにある. 六つのリン酸化が全体として静電的な相互作用に寄与していると想定することで, Sic1 に存在するリン酸化の個数に対して, Sic1 と Cdc4 の結合がスイッチ様の挙動 (個数 n に対する結合割合のプロットがシグモイダルになる) をとることを理論的に示した²⁴⁾. 彼らはこの機構を “polyelectrostatic model” と呼んでいる. Tom20 によるプレ配列の認識と比較すると, プレ配列も IDP の一種であることや特徴と結合部位の個数の不一致という共通点がある一方, プレ配列は結合状態においてヘリックス構造をとることや疎水性相互作用による認識である点が異なっている. したがって, polyelectrostatic model をそのまま Tom20 に当てはめるわけにはいかない. 興味深いことに Tom20 側の疎水性ポケットには進化的に保存された酸性残基 (E78) が存在しているが, その理由は説明できていない²⁵⁾. この酸性残基とプレ配列の塩基性残基 (アルギニン) との静電相互作用が, Sic1-Cdc4 相互作用における直接 Cdc4 には結合していない状態のリン酸化と同じ働きをしているのかもしれない.

動的平衡認識メカニズムはどの程度普遍的なメカニズムなのだろうか? 広い特異性を示す相互作用において, 結合状態の残存運動性の重要性はいくつかの系で指摘されている. A キナーゼの制御サブユニット (PKA-R) と A キナーゼアンカリングタンパク質 (AKAPs) の相互作用において, A キナーゼアンカリングタンパク質由来のセグメントは α ヘリックス構造で PKA-R に結合する. 結合状態では多数のポーズの間の動的平衡状態にあることが計算シミュレーションで示唆されている²⁶⁾. これが結合状態のエントロピーを増大させることで高い親和性を実現させているとしている. 同時に異なる AKAP 由来のセグメントは多数あるポーズのうち, それぞれ適したポーズ (あるいは足場) の組み合わせを選択できるので, 広い選択性が実現できる. 指摘されている興味深い特徴は, 疎水性ポケットに柔らかい脂肪族側鎖 (Leu, Val, Thr) が使われていて, 硬い芳香族側鎖 (Trp, Phe, Tyr) が無いことである. この特徴は Tom20 でも見られるので²⁵⁾, ゆるい相互作用す

る疎水性ポケットに特徴的な性質なのかもしれない.

7. オリゴ糖転移酵素にテザー係留法を適用する

過渡的複合体から構造情報を得る方法論の開発と言いつつも Tom20 の例だけでは心苦しい. そこで, まったく異なる対象にテザー係留法を適用した例を簡単に紹介したい. タンパク質の N 型糖鎖修飾は Asn 残基への糖鎖の転移反応であり, オリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyltransferase, OST) と呼ばれる膜タンパク質酵素が触媒している (図 6). 糖鎖転移反応は真核生物ではリボゾームによる翻訳と共役して起こり, トランスロコンから連続的に出てくる新生ポリペプチド鎖をスキャンして, コンセンサス配列 Asn-X-Thr あるいは Asn-X-Ser (ただし X は Pro ではない) を見つけて, コンセンサス配列中のアスパラギン残基の側鎖に, 糖鎖供与体 (糖脂質) 上にあらかじめ組み立てられていた糖鎖をまるごと転移する. 翻訳と共役して起こることから, 基質ペプチドと安定な ES 複合体を形成しない可能性が高い. そこで, コンセンサス配列を OST 酵素タンパク質に共有結合で係留する試みを行った.

古細菌 *Pyrococcus furiosus* の OST 酵素について, C 末端可溶性ドメインの結晶構造決定, 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などを行ってきた^{27, 28)}. 分子間テザーを導入する位置を決めるにはリガンドとタンパク質の間の距離情報が必要である. これを得るために少々複雑な方法を用いた. 基質にライブラリ Asn-X-Thr を用いると酵素活性に対する X の位置でのアミノ酸の種類依存性を調べることができる²⁹⁾. これを酵素タンパク質のアミノ酸置換体を用いて行い, ワイルドタイプの酵素と比較する. この時, アミノ酸置換を行う残基には活性に必須な位置の残基はもちろん使うことはできない. また活性に全く影響を与えない位置の残基では可能性は低い. したがってアラニンへの置換で活性が低下するが完全には消失しないアミノ酸残基を使うことになる. もしも, あるアミノ酸置換が X の位置でのアミノ酸の好みを有意に変化させたとすれば, そのアミノ酸置換の位置と基質ペプチドの X の位置は, 少なくとも反応サイクルの一時期において近距離にあると考えられる²⁸⁾. この位置の残基をシステインに置換し, 基質ペプチドにもシステインを導入することで, ジスルフィド結合でテザー係留された OST 酵素-基質ペプチド複合体を得ることができた. この平衡シフト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, この複合体は生産的な (productive) 複合体であることがわかった. この複合体の結晶構造を決定することで, 酵素反応を共有結合を用いて凍結した状態で可視化することができる³⁰⁾と期待する.

この原稿の執筆中に, 真正細菌由来の OST 酵素の膜タ

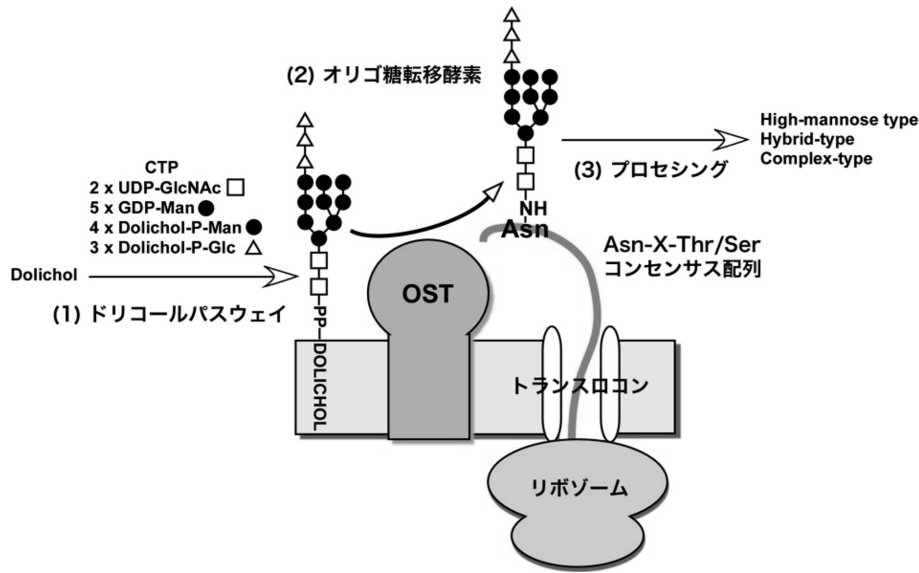


図6 オリゴ糖転移酵素の機能

N型糖鎖生成全体のプロセスは100種類近くの酵素が関与する複雑なタンパク質翻訳後修飾である。N型糖鎖修飾は真核細胞だけでなく、古細菌すべてと一部の真正細菌に存在する。全体のプロセスを大きく三つに分けることができ、(1)糖鎖供与体である脂質結合型糖鎖をつくるドリコール経路、(2)糖鎖供与体から新生ポリペプチド鎖への糖鎖のまるごと転移反応、(3)糖鎖構造のプロセッシングである。この中で最も大事なイベントは疑いもなく、オリゴ糖転移酵素によって触媒される糖鎖とタンパク質の間の共有結合形成反応である。N型糖鎖転移反応がなぜすべてのコンセンサス配列に起こらずに、糖鎖修飾が起こるコンセンサス配列と起こらないコンセンサス配列に分かれるのか？その区別には立体構造が鍵であると言われるが、具体的なルールは分かっていない。オリゴ糖転移酵素の構造生物学研究により、そのルールを明らかにすることを目指している。

ンパク質としての全長の結晶構造解析が発表された³⁰⁾。この構造解析には我々が過去に決定した真正細菌由来のOST酵素の可溶性ドメインの構造が分子置換の座標として使われている³¹⁾。この結晶構造はコンセンサス配列との共結晶であり、反応機構に関して従来の常識を覆す非常に興味深いものであるが、ここでは詳細は述べない。ポイントは共有結合なしで共結晶を得ている点にある。真正細菌のN型糖鎖転移反応はタンパク質の翻訳とは共役せず、コンセンサス配列はAsp/Glu-X-Asn-X-Ser/Thrであり、マイナス2の位置に酸性残基を要求する。酵素側にはこれを認識するアルギニン残基があり、基質ペプチドとの親和性を10倍程度強くしている。したがって、真正細菌の酵素とは異なり、翻訳共役型の古細菌や真核型のOST酵素の場合はコンセンサス配列ペプチドとの共結晶化には、すでに述べた分子間ジスルフィド結合が必須かもしれない。

おわりに

2008年の生化学誌の解説の内容を論文にまとめて発表したときの顛末はすでに同解説に記した¹⁸⁾。その後3年間の成果を次の論文としてまとめた²²⁾。Tom20のゆるい分子認識に関し、その実験結果には問題がないとしても、その解釈には議論の余地が大いにあることは皆が認めるところ

であろう。一般的に言って、動的な要素が含まれるアイデアを証明することは方法論の限界のためにコストパフォーマンスがよろしくない。しかし、一度始めた以上、Tom20とプレ配列をモデルケースとして今後も研究を続けていく決意である。現在、NOESYスペクトルの定量的解釈、第2世代のテザー係留デザイン(九州大学稲盛フロンティア研究センター、山東信介教授との共同研究)、計算シミュレーション(理化学研究所、杉田有治准主任研究員との共同研究)、パッキングフリーな結晶化法の開発などを行っている。

謝辞

ここで述べたTom20とオリゴ糖転移酵素の研究は長年にわたるたくさんの人との共同研究の成果です。遠藤斗志也教授(名古屋大学)、三原勝芳教授(元九州大学)、生物分子工学研究所の阿部義人博士(現所属:九州大学)、武藤隆則博士(中外製薬)、生体防御医学研究所の帯田孝之博士(富山大学)、尾瀬農之博士(北海道大学)、真板宣夫博士(徳島大学)、井倉真由美博士、および大学院生の上敷領淳君(福山大学)、Mr. James Nyirenda、宮崎佑介君、小島理恵子さん、松本俊介君、泉桂星君による継続的な実験と討論の成果です。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) Erijman, A., Aizner, Y., & Shifman, J.M. (2011) *Biochemistry*, **50**, 602–611.
 - 2) Schreiber, G. & Keating, A.E. (2011) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 50–61.
 - 3) Mittag, T., Kay, L.E., & Forman-Kay, J.D. (2010) *J. Mol. Recognit.*, **23**, 105–116.
 - 4) Diehl, C., Engstrom, O., Delaine, T., Hakansson, M., Genheden, S., Modig, K., Leffler, H., Ryde, U., Nilsson, U.J., & Akke, M. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 14577–14589.
 - 5) Vaynberg, J., Fukuda, T., Chen, K., Vinogradova, O., Velyvis, A., Tu, Y., Ng, L., Wu, C., & Qin, J. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 513–523.
 - 6) Meenan, N.A., Sharma, A., Fleishman, S.J., Macdonald, C.J., Morel, B., Boetzel, R., Moore, G.R., Baker, D., & Kleanthous, C. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10080–10085.
 - 7) Huang, H., Harrison, S.C., & Verdine, G.L. (2000) *Chem. Biol.*, **7**, 355–364.
 - 8) Fremont, D.H., Hendrickson, W.A., Marrack, P., & Kappler, J. (1996) *Science*, **272**, 1001–1004.
 - 9) Hennecke, J., Carfi, A., & Wiley, D.C. (2000) *Embo J.*, **19**, 5611–5624.
 - 10) Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., & Venkitaraman, A.R. (2002) *Nature*, **420**, 287–293.
 - 11) Freund, C., Kuhne, R., Park, S., Thiemke, K., Reinherz, E.L., & Wagner, G. (2003) *J. Biomol. NMR*, **27**, 143–149.
 - 12) Janda, C.Y., Li, J., Oubridge, C., Hernandez, H., Robinson, C. V., & Nagai, K. (2010) *Nature*, **465**, 507–510.
 - 13) Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Laffer, E.M., & Sousa, R. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 422–433.
 - 14) Guo, M., Bhaskar, B., Li, H., Barrows, T.P., & Poulos, T.L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5940–5945.
 - 15) Corn, J.E. & Berger, J.M. (2007) *Structure*, **15**, 773–780.
 - 16) Leduc, A.M., Trent, J.O., Wittliff, J.L., Bramlett, K.S., Briggs, S.L., Chirgadze, N.Y., Wang, Y., Burris, T.P., & Spatola, A.F. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11273–11278.
 - 17) Endo, T., Yamano, K., & Kawano, S. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 955–970.
 - 18) Kohda, D. (2005) *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **50**, 1303–1310.
 - 19) Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., & Kohda, D. (2007) *Embo J.*, **26**, 4777–4787.
 - 20) Obita, T., Muto, T., Endo, T., & Kohda, D. (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 495–504.
 - 21) Muto, T., Obita, T., Abe, Y., Shodai, T., Endo, T., & Kohda, D. (2001) *J. Mol. Biol.*, **306**, 137–143.
 - 22) Saitoh, T., Igura, M., Miyazaki, Y., Ose, T., Maita, N., & Kohda, D. (2011) *Biochemistry*, **50**, 5487–5496.
 - 23) Mittag, T., Orlicky, S., Choy, W.Y., Tang, X., Lin, H., Sicheri, F., Kay, L.E., Tyers, M., & Forman-Kay, J.D. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17772–17777.
 - 24) Borg, M., Mittag, T., Pawson, T., Tyers, M., Forman-Kay, J.D., & Chan, H.S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9650–9655.
 - 25) Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., & Kohda, D. (2000) *Cell*, **100**, 551–560.
 - 26) Chang, C.E., McLaughlin, W.A., Baron, R., Wang, W., & McCammon, J.A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7456–7461.
 - 27) Igura, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K., & Kohda, D. (2008) *Embo J.*, **27**, 234–243.
 - 28) Igura, M. & Kohda, D. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 13255–13260.
 - 29) Igura, M. & Kohda, D. (2011) *Glycobiology*, **21**, 575–583.
 - 30) Lizak, C., Gerber, S., Numao, S., Aebi, M., & Locher, K.P. (2011) *Nature*, **474**, 350–355.
 - 31) Maita, N., Nyirenda, J., Igura, M., Kamishikiryo, J., & Kohda, D. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 4941–4950.
-