

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

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

神田 大輔

ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は、プレ配列がN末端に付加された前駆体タンパク質として細胞質で合成され、ミトコンドリアに輸送される。プレ配列を輸送過程の最初に認識するのが、ミトコンドリア外膜に存在する Tom20 タンパク質である。Tom20 が認識するプレ配列中のモチーフは、多様なアミノ酸配列を許容できるので、「広い選択性」ということができる。こうした広い選択性を示す相互作用について構造情報を得ようとする、複合体が不安定であることが問題となる。そこで、共有結合を導入することによる複合体安定化技術を適用することで、Tom20-プレ配列複合体の詳細な構造情報と動的情報を得ることができた。この結果に基づいて、Tom20 は「複数の結合状態の間の速い平衡を利用してプレ配列を認識している」という動的認識モデルを提唱する。

1. はじめに

タンパク質によるリガンドの分子認識は、一般に厳密かつ親和性が高い方が役立つと思われる。しかし、実際の生物現象には、必要とされる親和性がそこそこであり、特異性もそれほど厳密でない方が好ましい例がたくさんある。ミトコンドリア行きを指定する標的シグナルの受容体タンパク質による認識はその典型的な例である。解離定数が数十 μM と適度な親和性に設定され、特異性も“互いに配列類似性が見つけられないような”多様なアミノ酸配列と結合するように設定されている。配列類似性が見つからないというのは、単に人間あるいはコンピュータープログラムが見つかることができないという意味であり、受容体タンパク質は何らかの仕組みをつかって、多様なリガンドからの共通点を見出しているはずである。こうした広い特異性を支える分子認識については、今後の研究分野として多くの課題が残されている。弱い結合力と広い特異性に特徴づけられる「ソフトな相互作用」は、タンパク質と

リガンドとの複合体の安定性が低いために、相互作用に関する構造情報を得ることが困難である。そこで、なんらかの工夫で複合体を安定化させる技術が必要となる(図1)。本稿ではミトコンドリアのプレ配列受容体である Tom20 タンパク質とプレ配列との相互作用について、複合体安定化技術を適用した例を紹介し、そこから得られた新しい分子認識メカニズムについて解説する。

2. ソフトな相互作用とは

厳密で高親和性の相互作用を「強い相互作用」と呼ぶことにする。強い相互作用の場合は複合体をゲル濾過などで単離することができ、その構造決定から詳細な構造情報が得られる。強い相互作用研究とはこの構造情報を得ることが目的であると言っても過言ではない。しかし、強い相互作用の反対語である「ソフトな相互作用」の定義は対象とする生物現象ごとに、あるいは個人的な見解で少しずつ異なるものになるだろう。本稿ではリガンドがフリーの状態ランダム構造をとるようなフレキシブルなリガンドであることを想定する。ペプチドはその典型的な例である。

ソフトな相互作用 = 弱い結合 + 広い特異性 + フレキシブルなリガンド

と定義する(図1上)。

フレキシブルなリガンドとは解離状態で“ランダム”構造をとることを意味する。弱い結合なので解離状態の存在

九州大学生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1)

Soft interaction for the recognition of mitochondrial target-signal

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

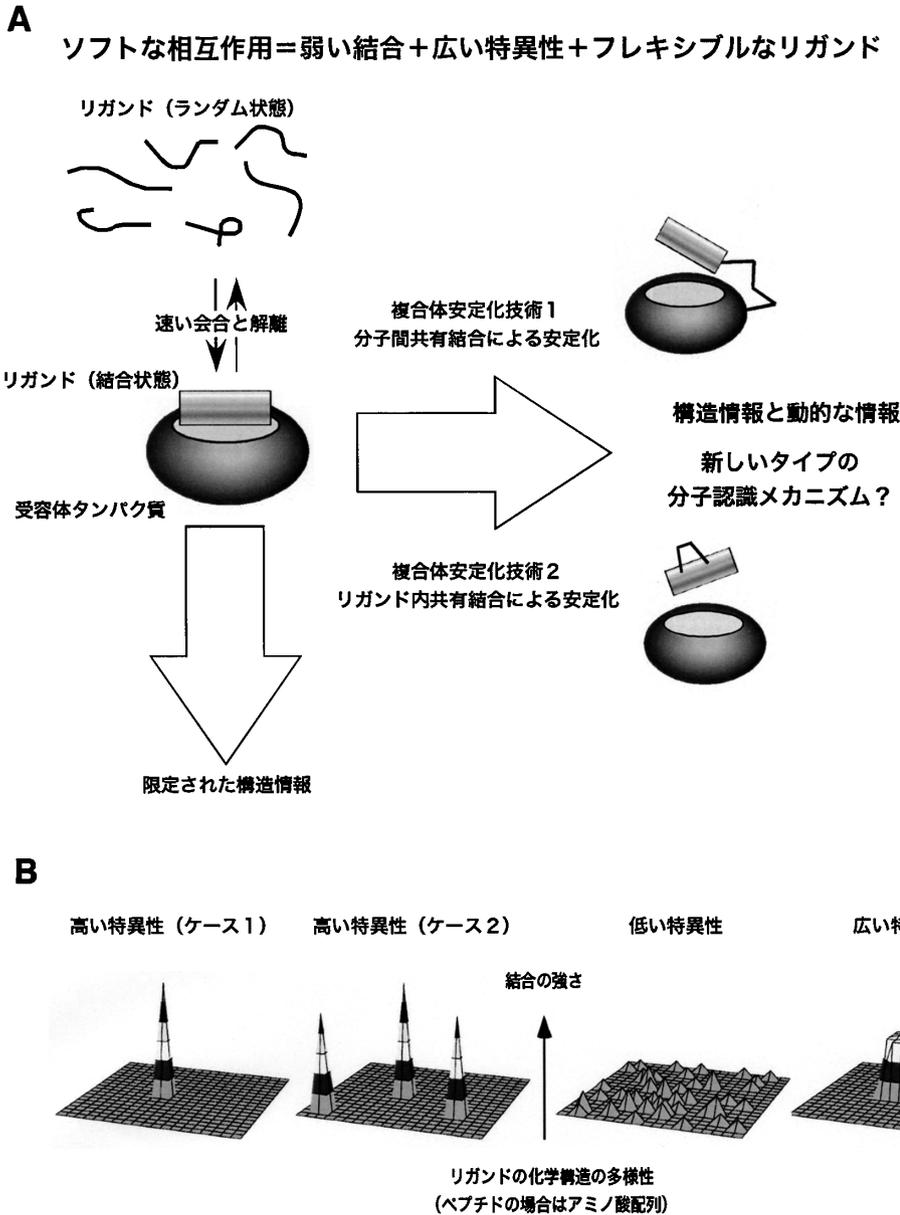


図1 ソフトな相互作用の定義

(A) ソフトな相互作用とは、フレキシブルなリガンドが広い特異性でかつ弱く結合するような相互作用である。リガンドの解離状態の存在を無視することができない。リガンドは解離状態（線で表示）で結合状態（円筒で表示）とは異なった状態（ランダム状態）をとる。単純に混合しただけでは、限定された構造情報しか得られない。共有結合導入による複合体の安定化技術を適用することによって、安定化された複合体の構造解析が可能になり、詳細な構造情報と動的情報を得ることができるようになる。

(B) 相互作用の特異性の分類。水平面はリガンドの化学構造の多様性を模式的に表している。垂直軸は結合の強さを表している。高い特異性とは単一の（ケース1）あるいは複数の（ケース2）リガンドを選択的に結合する。低い特異性ではいろいろなリガンドを弱く結合する。広い特異性とは多様な構造の一群のリガンドを選択的に結合できる特異性を意味する。

を無視できず、解離会合過程を常に考慮しなくてはならない。またリガンドの構造多様性という意味での広い特異性を示す。ここで少し、特異性の分類について説明する（図1下）。特異性が高いとは特定の構造のリガンドのみと結

合することを指す。特別な例（ケース2）として、複数の構造に対して独立した高い特異性を示す場合がある。SH3ドメインがプロリンリッチペプチドを逆方向に同程度の親和性で結合できることはその典型と考えられる。一方、低

い特異性とは、いろいろなリガンドに見境なくぺたぺたと低い親和性で結合することを意味するが、生物学的には重要性が低いだろう。最後に広い特異性であるが、構造多様性を示す一群のリガンドに選択的に結合できる能力を指す。グループ特異性と言ってもよい。

3. ソフト複合体の安定化技術

一時的で不安定な状態を安定化する技術として、共有結合を導入することが考えられる。いくつか例を挙げる。リガンドがペプチドの場合に、リガンドのアミノ酸配列をタンパク質のN末端あるいはC末端に適切な長さのリンカー配列を介してつなぐことができる。1本のポリペプチド鎖としてそれに対応するDNA配列を使って発現させる。量比が決まることが利点である。たとえば、主要組織適合性抗原(MHC)と抗原ペプチドの例がある¹⁾。

似た状況としてサブユニット構造をもつ複数のポリペプチド鎖を1本に融合したタンパク質を作らせる場合がある。抗体のFabフラグメントの代わりとして一本鎖Fvとする例が代表である。この手法を非常に巧妙に使った例として、繊維状の多量体をつくるために構造研究が困難であったRecAタンパク質の場合がある。四つから六つのサブユニットを連結して融合タンパク質をつくり、長い繊維状構造体の短いバージョンとしてデザインすることで構造解析を成功させた²⁾。両端の二つのサブユニットには繊維として伸びて行かないようなアミノ酸置換を施している工夫がエレガントである。

タンパク質分子間にS-S結合を導入して、複合体を安定化させる例も散見される。Jドメイン・Hsp70複合体³⁾やcytochrome c peroxidase-cytochrome c複合体で使われている⁴⁾。

構造が事前にわかっていない状況でどうやってリンカーやS-S結合の導入位置をデザインするのか?という疑問が当然出てくる。そのためには、既にわかっている化学修飾などの生化学的なデータを駆使することや、ある程度たくさん候補をつくって、その中から最適なものを選択するような戦略が必要となる。安定化した複合体から得た構造情報に基づいて、さらに新しい安定化複合体をデザインするような段階的最適化の戦略も考えられる。

4. ミトコンドリア内部への標的シグナルと膜透過装置

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。ミトコンドリア内部(マトリックス)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タンパク質として合成され、二つの膜を通過した後にプレ配列は切断されて除去される。切断位置を調

べることで、プレ配列の定義、すなわちN末端からどこまでの残基かという問題に明確に答えることができる。プレ配列が膜透過の過程に必要な情報をすべて含んでいることは、プレ配列を無関係なタンパク質のN末端に付加しておく、このタンパク質がミトコンドリア内部へ輸送されることからわかる。日本語による総説を紹介しておく^{5,6)}。

輸送過程において、プレ配列はプレ配列受容体であるTom20タンパク質によって最初に認識される(図2)。500種類を超えるミトコンドリアタンパク質のN末端にあるプレ配列は多様なアミノ酸配列からなり、いわゆるコンセンサス配列が見つからないとされている。しかし、Tom20がプレ配列を選択的に結合するというからには、プレ配列に存在する共通な性質で、かつミトコンドリアに行かないタンパク質のN末端部分にはないような性質を見抜いているはずである。Tom20タンパク質はこうした広い特異性をもつと同時に、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。Tom20タンパク質がソフトな相互作用を用いてミトコンドリアプレ配列を認識結合することが、ミトコンドリア膜を介してタンパク質輸送がつつがなく起こるための鍵となっている。

5. Tom (translocase of outer membrane) 20 構造研究の始まり

ミトコンドリアタンパク質輸送装置の研究は酵母やアカパンカビの遺伝的あるいは生化学的な研究が先行していた。多くのタンパク質にいろいろな名前がつけられて混乱していたが、1996年に名前が統一されて一挙に見晴らしがよくなった。Tom20は外膜にあるサブユニットで分子量が20kDaであることから命名された。その後、再び新メンバーの同定が相次いで、名前が増えているのが現状である。意外なことに1998年頃にはどのサブユニットがプレ配列に実際に結合するのかがよくわかっていなかった。プレ配列に塩基性アミノ酸が多い傾向があることから、酸性残基に富んだサブユニットであるTom22が有力候補であった。そのような状況の中で、酵母のTom22の細胞質ドメインを大腸菌内で発現させてみたが、立体構造をとっていなかった。そこで対象を変えて、酵母のTom20の細胞質ドメインを発現させたところ、立体構造をとっていたが、NMRスペクトルの質はよくなかった。そこで、ラットのTom20の細胞質ドメインの発現系を試し、さらに限定分解を行ってN末端のフレキシブルな部分を除くことで、きれいなNMRスペクトルが得られた。同時にラットALDH(aldehyde dehydrogenase)由来のプレ配列を必要最小限の長さに縮める実験を行った。プレ配列結合の K_d は数十 μ Mのオーダーであった。このような相互作用実験か

ら Tom20 がプレ配列受容体であることが確立されていった。プレ配列を飽和濃度まで加えたが、Tom20 とプレ配列の間の分子間核オーバーハウザー効果 (NOE) の数は大変少なかった。三つのロイシン残基を区別するために、二つのロイシンを選択的に重水素化したペプチドを3種類合成して分子間 NOE の帰属を行った。こうした緻密な実験のお陰で、複合体の構造決定に成功した⁷⁾。プレ配列がタンパク質に結合したときにヘリックス構造をとることは予想されていたことではあったが、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、現在までに四つの英語の教科書に絵として採用されている (図2下)。構造から明らかになったもう一つ重要な事実は、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。

ラット ALDH プレ配列以外のプレ配列との相互作用を NMR で調べる実験から Tom20 の認識結合配列として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) を明らかにした⁸⁾。その後、Tom20 に結合するアミノ酸配列を競争的な条件下で選択する新規なペプチドライブラリー実験から、 $\sigma\phi\chi\beta\phi$ (ϕ は疎水性, β は塩基性アミノ酸, σ は親水性残基, χ は任意のアミノ酸残基) であることを示した⁹⁾。

6. 分子間 S-S 結合による複合体安定化技術の適用

NMR によって決定した Tom20・プレ配列複合体を眺めていると、Tom20 に存在する唯一のシステイン残基の位置が側鎖の向きを含めてまったく偶然にプレ配列の C 末端近くにあることに気づいた。プレ配列の C 末端にシステインを導入して分子間 S-S 結合を作らせるにはまさに最適な位置にあった。問題はリンカーの長さの最適化である。コンピューターモデリングを試みたが、なかなか難しい。そこでリンカーの残基数を一つずつ増やしたペプチドを合成して等モル混合物とし、競争的条件下で Tom20 と空気酸化によって分子間 S-S 結合を作らせた。生成した S-S 複合体の混合物を逆相カラムによって1本のピークとしてまとめて精製し、質量分析による相対量の見積もりから、Tom20 に優先的に結合するペプチドの種類を決定した⁹⁾。これにより最適なリンカーの長さを決定できた。

リンカーの長さが最適化されたので、この分子間 S-S 複合体を使って結晶化を試みた¹⁰⁾。まず、最初の結晶構造が得られた¹¹⁾。当初の予想とは異なり、この結晶構造中ではプレ配列は S-S 結合している Tom20 分子ではなく、隣の Tom20 分子と相互作用していた。もともとプレ配列は Tom20 ではないタンパク質の N 末端に存在するので、こうした絡みあった二量体であっても、相互作用を調べるという意味では問題がない。しかし、リンカー配列中のチロ

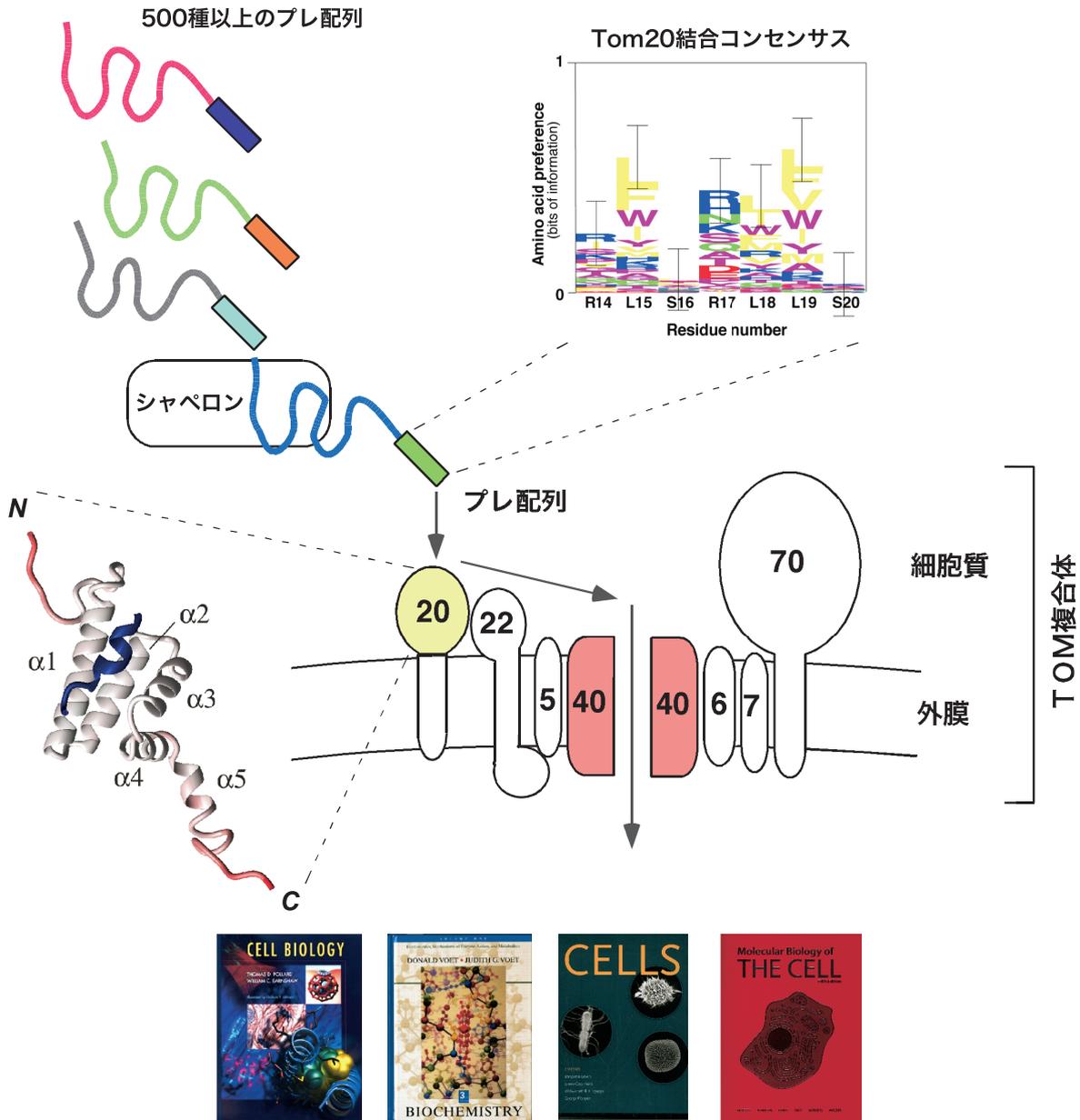
シンがこのインターツインドダイマー形成に関与していることが推定されたので、これをアラニンに置換して新たな S-S 複合体をデザインして結晶構造を決定したところ、自分自身の Tom20 と相互作用している結晶構造が得られた¹¹⁾。これら二つの結晶構造から、プレ配列が結合状態で α -ヘリックスコンホメーションをとることが確定した。

7. 動的平衡認識モデル

二つの結晶構造を詳細に調べると、大変困ったことがわかった (図3)。プレ配列には疎水性残基であるロイシンが三つあり、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、二つの結晶構造の Tom20 の構造には疎水性サイトがそれぞれ二つしかない! ¹¹⁾ これはリンカーを介して結合を無理にさせたためのアーティファクトであると考えてもよいが、もっと建設的に考えると、大変興味深い仮説に行き着く。すなわち、Tom20 は複数の結合状態 (結晶構造に代表される二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) を利用して、二つの疎水性ポケットをうまく用いて、プレ配列の三つの疎水性残基を認識していると考えられる¹¹⁾。これは分子シーソーモデルと言ってもよい (図4)。

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¹¹⁾。ここでもリンカーを介して S-S 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。これは分子シーソー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、三つの位置での疎水性側鎖の大きさの差異を、三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、二つの位置の疎水性側鎖の大きさの差異を、二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箇所の疎水性残基の位置にいかなる大きさの疎水性



Tom20・プレ配列複合体のNMR構造が掲載されている英語教科書

図2 Tom20 タンパク質の構造と機能

ミトコンドリア内部へ輸送されるタンパク質のN末端にはプレ配列と呼ばれるアミノ酸配列が余分に付加されている。プレ配列はミトコンドリア外膜に存在するTom20受容体タンパク質に結合する。Tom20に結合するアミノ酸配列の傾向をシーケンスログで表現した⁹⁾。積み上がった文字セット全体の高さは、その位置における特定のアミノ酸に対する好みの偏りを表している。また個々の文字の大きさはそれぞれの出現頻度を表す。色分けはアミノ酸の性質を表している。例えば、黄色は疎水性アミノ酸、マゼンタは芳香族アミノ酸、青は塩基性アミノ酸である。500種以上のミトコンドリアタンパク質のプレ配列がもつアミノ酸配列の多様性を反映して、Tom20が許容するアミノ酸配列はかなり広範囲にわたる。Tom20タンパク質はTOM複合体と呼ばれる膜タンパク質複合体の一員である。ミトコンドリアタンパク質はアンフォールド状態のまま、Tom40がつくるチャンネルの中を通過して外膜を横断する。

NMRを用いて決定したTom20・プレ配列複合体構造⁷⁾は、現在までに四つの英語教科書に絵として採用されている。青いリボンがプレ配列ペプチドである。

(1) “CELL BIOLOGY”, 1st edition (2002), W.B. Saunders, Philadelphia, Figure 19-1, (2) “BIOCHEMISTRY” Volume 1, 3rd edition (2003), John Wiley & Sons, Figure 12-69, (3) “CELLS”, 1st edition (2007), Jones and Bartlett, Massachusetts, Figure 3.50, (4) “Molecular Biology of the Cell”, 5th edition (2008), Garland Science, Figure 12-22. 最後の教科書内の図の脚注のなかで alcohol dehydrogenase とあるのは誤りで、aldehyde dehydrogenase が正しい。

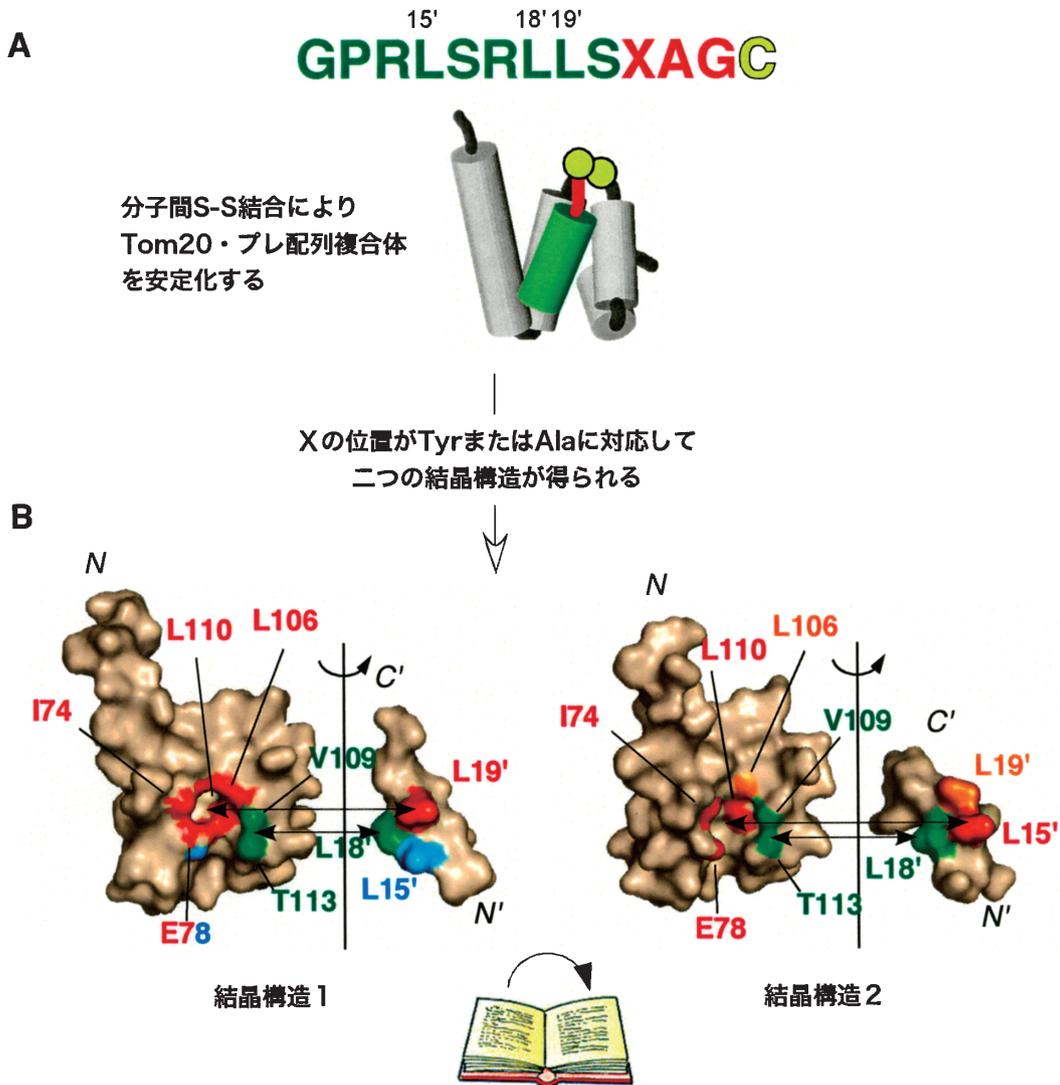


図3 Tom20・プレ配列複合体の結晶化用コンストラクトのデザインと実際に得られた結晶構造

(A) ALDHタンパク質由来のプレ配列の一部のアミノ酸配列(緑色)。C末端側に3残基のリンカー(赤色)を介してシステイン残基(黄色)を付加した。Tom20のシステイン残基と分子間S-S結合を形成させた。リンカーのXの位置がチロシンの場合とアラニンの場合のそれぞれの結晶構造を決定した。

(B) 二つの結晶構造のオープンブックビューを示す。プレ配列の三つの疎水性残基(Leu15', Leu18', Leu19')とTom20側の二つの疎水性サイトとの間の相互作用を \leftrightarrow で表している。

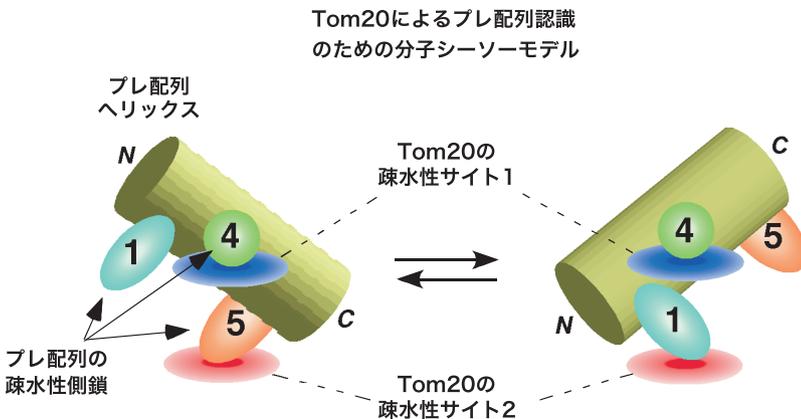


図4 Tom20タンパク質がプレ配列と相互作用するときは、二つ(以上)の結合状態が速い交換をしていることを表す模式図

この仮説を“分子シーソーモデル”と呼ぶことにする。プレ配列は α ヘリックス構造をとっているの、円筒形で表現している。プレ配列に存在する三つの疎水性残基をTom20にある二つの疎水性サイトで認識している。この動的認識メカニズムがTom20のプレ配列に対する広い特異性を説明できることを提唱する。

側鎖を持ってきても、同時に適応できることを実現していると考えられる。Tom20とは対照的な特異性の高い場合を見てみよう。 α 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三つの疎水性ポケットががっちり三つのロイシンを認識している¹²⁾。この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。

8. もう一つの複合体安定化技術の適用

とは言え、リンカーを介して二つの分子を共有結合で連結するのは気になる人もいるかもしれない。そこで、プレ配列に工夫をして高い親和性を実現する方法を検討した。この実験はまだ進行中であるが、興味深い予備的結果が得られているので説明する。このアイディアは先に述べた核内受容体タンパク質に対する高親和性ペプチドの設計論文の結果を借用したものである^{13,14)}。それによると*i*, *i*+3残基間あるいは*i*, *i*+4残基間の側鎖同士にS-S結合やアミド結合を使って共有結合を作ると、結合したときに α ヘリックス構造をとるようなペプチドの親和性を向上させることができる。D-Cys(*i*), L-Cys(*i*+3)の組み合わせがベストであるという結果であった¹⁴⁾。そこで、この設計を見習って、ALDHプレ配列のうちTom20の認識に無関係な位置にあるProとSerの位置にそれぞれD型とL型のシステインを導入し、

DCYSpep :

Ac-Gly-cyclo(D-Cys-Arg-Leu-Cys)-Arg-Leu-Leu-Ser-Tyr-Ala-NH₂を合成した。下線はTom20に必須な三つの疎水性残基である。NMR滴定実験を行ったところ、予想通りオリジナル配列のペプチド($K_d=250\mu\text{M}$)やS-S結合をかけていないDCYSpep($K_d=160\mu\text{M}$)に比べて、DCYSpepは100倍以上の親和性($K_d=1.4\mu\text{M}$)で結合できることがわかった。さらにTom20のシグナルのうち、結合によって影響を受けた残基を立体構造上にマップすることで、DCYSpepはTom20のプレ配列ペプチド結合部位と同じ位置で相互作用していることを確認できた。このDCYSpepとTom20を混合して、複合体の結晶化を試みたところ、幸運なことに結晶が得られた。まだ、予備的な段階ではあるが、分解能2.5ÅにおいてTom20タンパク質部分の電子密度は見えるものの、ペプチドがあるはずのところにははっきりとした電子密度が見られないという興味深い結果を得ている。実際に結晶中にペプチドが存在していることは、結晶を洗ったあとに、逆相HPLCで分析すると、Tom20とペプチドが結晶中にモル比1:1で存在していることで確認した。したがって、結晶中でTom20に結合した状態であっても、プレ配列ペプチドは運動している、あるいは多型が存在することが示唆される。これは我々が提案している「Tom20はプレ配列を動的平衡によって認識して

いる」というモデルを強く支持する結果である。参考までにDCYSpepにおいて、ロイシン残基をアラニンやセリンに置換したペプチドを結晶化に使った場合には結晶が得られていない。

9. 結晶条件と溶液条件の比較

今までの結果をまとめてみよう(図5)。複合体安定化技術を用いないと、溶液中では結合状態におけるプレ配列の運動性が残るために、NMRによる構造決定では、タンパク質部分についてはきっちり構造決定できるが、プレ配列部分はNMR情報の数が少なくなる原因となる。そのため、らせん構造であることは言えるが、 α ヘリックスであると断言はできなかった。一方、プレ配列ペプチドとTom20を単純に混合しても結晶は得られなかった。プレ配列ペプチドの解離会合過程やペプチドが結合していない状態でのTom20タンパク質自身のフレキシビリティが結晶形成を邪魔していると考えられる。

分子間S-S結合によるリンカーを用いた複合体安定化技術を用いると、溶液条件ではリンカーでつなぎ止めているにも関わらず、妥当なコンセンサス配列が得られるので⁹⁾、リンカーは分子シーソー運動を阻害していない。これはNMR緩和時間解析において、プレ配列の運動性がリンカーによって安定化された結合状態において観測されていることから言える。一方、結晶においては、二つの結合状態が得られた。結晶のパッキングをみると、リンカーの一部はタンパク質部分と接触がある。すなわち、リンカーの関与により、分子シーソー運動がピン留めされる結果、複数の結合状態のうち、一つの結合状態がスナップショットとして得られたと考えられる。今後、リンカーの種類を増やして行ったときに、今までみられた二つの状態が再現されるのか、あるいは第3の結合状態が新たに出てくるのかは大変興味深い。最近の実験で、リンカーの第1番目のアラニンの代わりにセリンに置換した場合はアラニンリンカーと同じ構造が得られることがわかった。

リンカーの一部の残基がクリスタルコンタクトに関与することで、複数の状態のうち一つが安定化されて結晶が得られた訳だが、一旦、結晶に組み込まれるとリンカーを介して共有結合していることは必要なくなると予想される。実際にシンクロトロン測定中において、強いX線照射のためにS-S結合の切断が起こる。切断が起こっても、結晶構造は保たれていることが確認できている。

第2の複合体安定化技術として、プレ配列ペプチド内に分子内S-S結合を導入した。溶液中では親和性が100倍向上することがわかった。今後、分子間NOEの収集や緩和時間解析をすることで、リガンド内S-S結合の系でも、結合状態において分子シーソー運動に由来するような大きな運動性があることを確認する予定である。結晶中ではプレ

	溶液状態	結晶状態
そのままの場合		結晶は得られない
複合体安定化技術1 分子間S-S結合		
複合体安定化技術2 リガンド内S-S結合		

図5 Tom20・プレ配列ペプチド複合体の実験のまとめ

Tom20 とプレ配列ペプチドを混合した場合、分子間 S-S 結合を導入した場合、プレ配列ペプチド内に S-S 結合を導入した場合の三つの複合体を用いて、溶液状態における実験 (NMR 化学シフト変化, NMR 構造決定, NMR 緩和時間解析, ペプチドライブラリー結合実験) の結果と、結晶状態における実験 (X 線結晶解析) による結果をまとめた。溶液状態ではプレ配列ペプチドは Tom20 結合状態にあっても、3 種すべての複合体中において、分子シーソーと表現できるような運動性を保持している。複合体安定化技術を使うと、解離状態の存在を無視できる程度に減らすことができる。結晶状態では、単純に混合しただけでは結晶は得られないが、リンカーが関与するパッキング相互作用 (星印) によって、プレ配列はある一つの状態にピン留めされる効果のためにスナップショット状態の結晶が得られる。一方、分子内共有結合導入でプレ配列の結合力を増大させ、リンカーがない状態で結晶化すると、結晶内でもプレ配列の運動性が残るために、プレ配列の電子密度が見えてこない。

配列は電子密度が見えない。すなわち、大きな運動性のために位置が確定していないのか (dynamic disorder)、複数の構造が存在する (static disorder) ことを示唆している。リンカーがないために、プレ配列を一つの結合状態にピン留めするようなパッキング効果が欠如していることが、電子密度が観測されない原因であると推察される。

現在までに得られているすべての結晶構造、NMR 構造、NMR 動的情報は、プレ配列が Tom20 に結合している状態でも、無視できない運動性がプレ配列に残っていることを示唆している。我々は Tom20 によるプレ配列認識の広い特異性の起源は、分子シーソーモデルで表現できるようなダイナミックな認識であることを提案する。

10. 複合体安定化技術のまとめ

共有結合を分子間あるいはリガンド分子内にうまく導入することで、不安定で一時的な複合体を安定化することができ、結晶解析や NMR 解析から構造情報を得ることができる (図1と図5)。S-S 結合の利用は、マイルドなアルカ

リ性 pH 条件下 (pH>8.5) で空気酸化により容易かつ定量的に共有結合を導入できる利点がある。

いくつかの留意点を述べる。リンカーを介したリガンドの共有結合トラップの場合は、リガンドを結合サイトの近傍にトラップすることで、有効リガンド濃度を大きくすることが目的である。トラップ位置とリンカーの最適化が決めとなる。リンカーが短いなら届かないことはすぐわかるが、不用意に考えると、長くて少し余るだけで深刻な問題を生じないように思えるかもしれない。しかし、実際はリンカーといえども体積をもった構造体であるので、ランダム構造をとるとすると、その両末端は一定の距離をとって離れる傾向をもつ。すなわち、長すぎるリンカーはリガンドの結合を妨害するように働く。これはリガンドの親和性が低い場合は憂慮すべき事態である。したがって、リンカーの最適設計は重要な問題である。

一方、分子内に適当な共有結合を導入することで親和性を向上させる場合、その安定化の理由を α ヘリックスをエネルギー的に安定化させるからと考えることは正しくな

い。そもそも導入した共有結合は結合状態のコンホメーションを邪魔しないように設計されているので、結合状態のエネルギーは変化しない。本当の理由は、分子内共有結合の導入は、リガンドの遊離状態のコンホメーションの自由度を制限することになるので、エントロピーを減少させる、すなわち不安定化させることによる。その結果、相対的に結合状態が安定化されると解釈すべきである。

一度、安定化された複合体が得られれば、詳細な構造情報を得ることができる。結晶解析ではスナップショットが得られるのに対し、NMR構造は平均構造となる。ただし、結合状態の運動性が大きければ、「平均」という言葉は意味をもたない。なぜなら、NMR情報の一つであるNOEが距離の6乗に反比例するという性質から、ゆらぎが大きい場合の構造は単純な空間平均にはならない。ここで、教科書に掲載された最初のNMR構造は何だったのか？という疑問に答えることができる。プレ配列が結合状態においても想定外の大きな運動性をもっているために、最初のNMR構造はプレ配列部分に関しては、それを一つの構造に当てはめるという仮定のもとに無理に構造計算した結果であった。したがって、単にヘリカルな構造という以上の意味のある情報が得られなかったのは当然の帰結であった。

11. おわりに

分子シーソーモデルはたくさんの実験結果を統一的に説明する唯一のモデルとして出てきたことはよくわかっていただけたと思う。しかし、こうした奇抜なアイデアを学会発表で聞く分には、その場で「面白いですね」で終わりであるが、実際に文章にまとめて論文としてアクセプトされるまでには遠い道のりが待っていることは想像に難くない¹¹⁾。第一は豊富な実験データを揃えることである。特に溶液中における動的情報を与えるNMR緩和時間解析のデータが必須であった。第2はレフリーの選択である。このときに斬新なアイデアであるからこそ、それぞれの分野の一流の人に審査をお願いしたいと思った。しかし、初めて聞いた人にとってはその奇抜性から第一印象が悪くなる可能性が高い。そこで、国際学会などでその道の権威(ミトコンドリア輸送系、結晶解析、NMR緩和時間解析)の人に講演やポスターを聞いてもらう地道な“布教活動”を展開した。これらの人が本当にレフリーになったのかどうかはエディターのみが知るであるが、3人ともそろって好意的なコメントであったのには感激した。

分子シーソーモデルを直接証明することはきわめて難しいと思われる。そこで今後もいろいろな状況証拠を積み上げていく必要がある。すでに得られている二つの結晶構造

に基づいて、新たな場所での共有結合導入による安定化複合体をデザインすることができる。二つの結合状態と両立すると同時に、リンカーの長さが最小であるような究極のデザインを考案して実験中である。

アイデアは一度公になると、いろいろな対象に適用される可能性がある。近い将来に動的平衡・分子シーソーモデルがソフトな相互作用に基づく広い選択性を説明する一般原理になればと期待するのは高望みなのだろうか？

謝辞

本稿で紹介したTom20によるプレ配列認識の研究は、遠藤斗志也教授(名古屋大学)と三原勝芳教授(九州大学)との共同研究である。研究成果は、生物分子工学研究所構造解析部門NMRグループの阿部義人博士(現、九州大学)、武藤隆則博士(現、中外製薬)、九州大学生体防御医学研究所ワクチン開発構造生物学研究室の帯田孝之博士(現、イギリスMRC)、尾瀬農之博士(現、北海道大学)、斎藤貴士博士、井倉真由美博士による長期間にわたる継続的な実験と討論の成果である。また、同研究室のメンバーの援助をいただいた。心から感謝いたします。

文 献

- 1) Hennecke, J., Carfi, A., & Wiley, D.C. (2000) *EMBO J.*, **19**, 5611–5624.
- 2) Chen, Z., Yang, H., & Pavletich, N.P. (2008) *Nature*, **453**, 489–494.
- 3) Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Laffer, E.M., & Sousa, R. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 422–433.
- 4) Guo, M., Bhaskar, B., Li, H., Barrows, T.P., & Poulos, T.L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 5940–5945.
- 5) 神田大輔 (2005) 蛋白質核酸酵素, **50**, 1303–1310.
- 6) 遠藤斗志也 (2008) 生物物理, **48**, 004–010.
- 7) Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., & Kohda, D. (2000) *Cell*, **100**, 551–560.
- 8) Muto, T., Obita, T., Abe, Y., Shodai, T., Endo, T., & Kohda, D. (2001) *J. Mol. Biol.*, **306**, 137–143.
- 9) Obita, T., Muto, T., Endo, T., & Kohda, D. (2003) *J. Mol. Biol.*, **328**, 495–504.
- 10) Igura, M., Ose, T., Obita, T., Sato, C., Maenaka, K., Endo, T., & Kohda, D. (2005) *Acta Crystallogr. F*, **61**, 514–517.
- 11) Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., & Kohda, D. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4777–4787.
- 12) Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., & Greene, G.L. (1998) *Cell*, **95**, 927–937.
- 13) Pellegrini, M., Royo, M., Chorev, M., & Mierke, D.F. (1997) *J. Pept. Res.*, **49**, 404–414.
- 14) 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. U.S.A.*, **100**, 11273–11278.