

ミトコンドリアタンパク質輸送受容体のシグナル配 列認識

阿部, 義人
加州大学大学院医学系研究科臨床分子医学 : 助手

<https://doi.org/10.15017/7218255>

出版情報 : 福岡醫學雑誌. 92 (7), pp.266-271, 2001-07-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



ミトコンドリアタンパク質輸送受容体のシグナル配列認識

九州大学大学院医学系研究科臨床分子医学
阿 部 義 人

Structural Basis of Presequence Recognition by the Mitochondrial Protein Import Receptor Tom20

Cell 2000 ; 100 (5) : 551-560

はじめに

ミトコンドリアを構成する多くの蛋白質は核のDNAにコードされており、局在化シグナルをもった前駆体タンパク質として合成される。その後、前駆体タンパク質はミトコンドリア内におくりこまれタンパク質としての機能を発揮する。前駆体タンパク質の輸送を正しく行うため、ミトコンドリアには外膜に Tom (translocation outer membrane) 複合体、内膜に Tim (translocation inner membrane) 複合体とよばれる約 15 種類の膜蛋白質が膜透過装置を構成している (図 1)。Tom 複合体は、細胞質側にある前駆体の局在化シグナルを認識し、外膜から膜間スペースへの移行を行う役割を持っている³⁾。Tom 複合体のタンパク質サブユニットの一つである Tom20 は“局在化シグナル配列認識レセプター”としての機能を持っており、シグナル配列を認識し、ミトコンドリア内への輸送を開始する役割をもつと考えられている⁵⁾。ミトコンドリア局在化シグナルは 15~70 残基の長さのアミノ酸配列で、塩基性アミノ酸が疎水性アミノ酸のなかに周期的に現れるといった特徴を持つが、アミノ酸配列自体に明確なコンセンサスは見つかっておらず、どのようにシグナル配列がレセプターに認識されているのかは不明な点が多い。今回我々は、核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、Tom20 の細胞質ドメインとアルデヒドデヒドロゲナーゼのシグナル配列ペプチドとの複合体構造を決定した。

方 法

1) ラット Tom20 細胞外ドメインおよびミトコンドリア局在化シグナルペプチドの調製

ラット Tom20 は N 末の 24 残基を除いた $\Delta 24$ Tom20 を大腸菌で発現し、さらに N 末 25 残基を V8 プロテアーゼにより切断したもの ($\Delta 50$ Tom20) を精製し実験に用いた。ミトコンドリア局在化シグナルペプチドはペプチド合成したものおよび、大腸菌により gene10 融合タンパク質として発現し、gene10 部分を V8 プロテアーゼにより切断後、精製したものを実験に用いた。さらに大腸菌培養中、培地に ^{13}C -glucose および $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を加え、 ^{13}C もしくは ^{15}N ラベル化体を各調製した。

2) NMR 測定および構造計算

NMR 測定は、600 MHz および 750 MHz の NMR 分光計を用いて行った。 $\Delta 50$ Tom20 の NMR スペクトルは 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 6.8) 中で 0.5~1 mM の濃度に調製し測定を行った。測定したスペクトルから $\Delta 50$ Tom20 上のすべての ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 原子の化学シフトを帰属し、その帰属に基づき、NOE (核間相互作用) の帰属を行った。構造計算は 1012 個の NOE による距離情報、39 個の二面角情報、80 個の水素結合による距離制限情報を用いた。また、0.2 mM の $\Delta 50$ Tom20 に種々のペプチドを徐々に加え、 $\Delta 50$ Tom20 の主鎖のアミド結合の ^1H および ^{15}N の

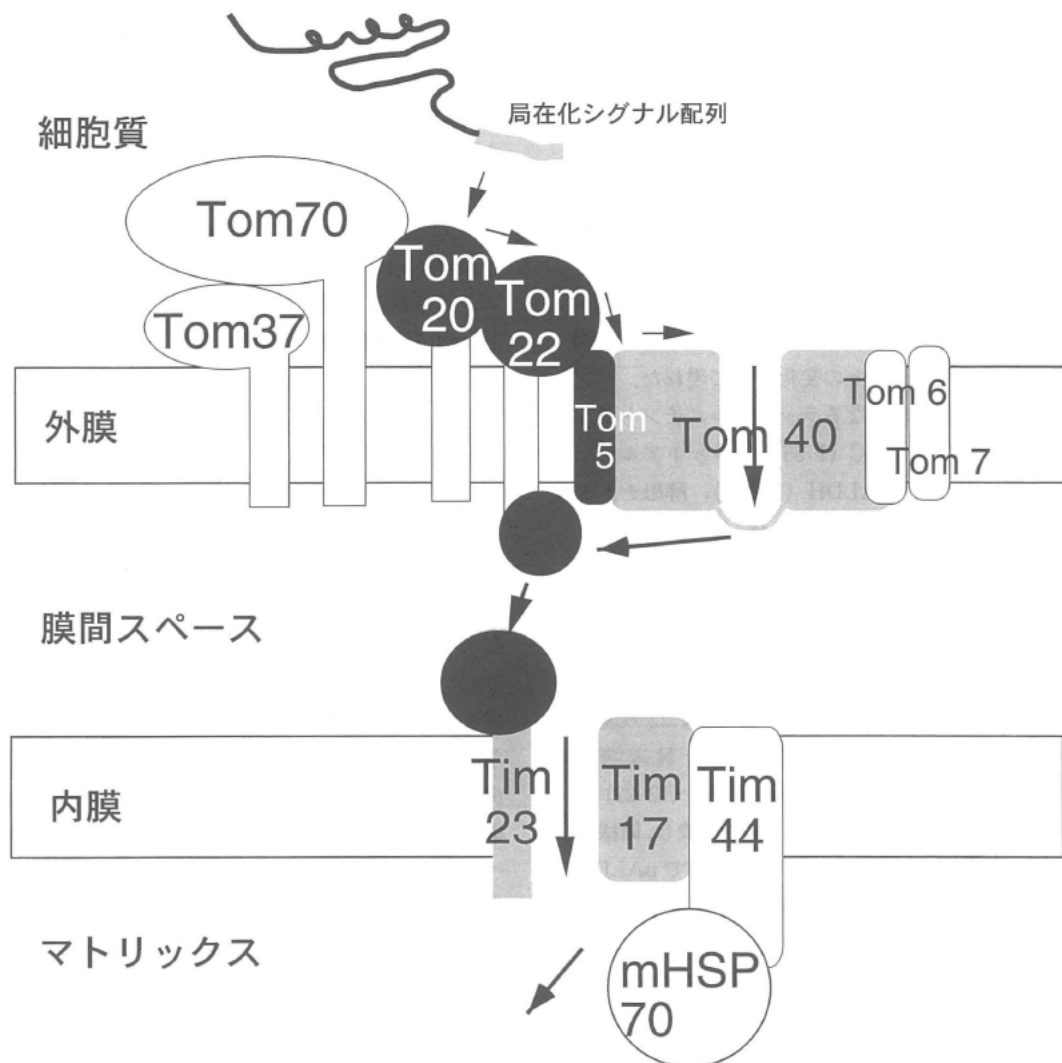


図1 ミトコンドリアのタンパク質輸入装置の模式図

黒い部分はシグナルシーケンスを認識すると想定されているタンパク質サブユニット、グレーの部分はチャンネルを形成すると考えられているタンパク質サブユニット

化学シフト変化量を調べ、シグナルペプチドの滴定実験を行った。

結 果

1) Tom20 の機能部位の同定

ラット Tom20 は N 末端に一回膜貫通領域を含むミトコンドリアの外膜上の膜タンパク質である。今回はこの膜貫通領域を除いた細胞質ドメイン

($\Delta 24$ Tom20) を大腸菌で発現精製した。さらに V8 プロテアーゼによる限定分解、および NMR 解析の結果から細胞質ドメインは 51 番目～145 番目の残基でコア構造 ($\Delta 50$ Tom20) を形成していることがわかった。また、 $\Delta 50$ Tom20 はシグナル配列をもった前駆体タンパク質のミトコンドリアへの移行を阻害し、シグナル配列ペプチドに対し特異的に結合する¹⁾。よって $\Delta 50$ Tom20 がミトコンドリア移行シグナルを認識す

る機能を持っていると考えられ、立体構造決定を行った。

2) $\Delta 50\text{Tom}20$ のシグナル配列ペプチドの認識

$\Delta 50\text{Tom}20$ は ^{15}N ラベルおよび ^{13}C ラベルを行い、すべての水素、炭素、窒素原子の化学シフトを同定帰属した。 $\text{Tom}20$ の各残基の主鎖のアミド結合の ^1H および ^{15}N の NMR 化学シフトをもとにして、各種シグナル配列ペプチドを滴定し、化学シフトの変化を調べた。今回ペプチドが結合することによる $\text{Tom}20$ の構造変化の影響が化学シフトの変化として現れた。ペプチドはアミノ酸配列の異なるラットオルニチントランスカルバミラーゼ (pOTC (1-38)), ラットアルデヒドデヒドロゲナーゼ (pALDH (1-22)), 酵母チトクロームオキシダーゼサブユニット IV (pCOX IV (1-25)) のシグナル配列を用いた。 $\text{Tom}20$ の各残基の滴定飽和後の化学シフト変化を図 2 に表す。化学シフトが変化している残基は各ペプチドにおいてよく似ており、 $\text{Tom}20$ のペプチド結合部位は 3 種類ともに同じではないかということが示唆された。さらに、22 残基のラットアルデヒドデヒドロゲナーゼを N 末端側 (pALDH (1-11)) と C 末端側 (pALDH (12-22)) の 11 残基ずつ半分に分けたペプチドを合成し、同様の実験を行ったところ pALDH (12-22) だけで pALDH (1-22) と同様の化学シフト変化を示した (図 2)。この結果はラットアルデヒドデヒドロゲナーゼにおいてはシグナル配列ペプチドの C 末端側半分のみで $\text{Tom}20$ との相互作用できることを示唆した。

3) $\Delta 50\text{Tom}20$ とシグナル配列ペプチドの複合体の立体構造

ラット $\text{Tom}20$ 細胞質ドメインのコア構造である $\Delta 50\text{Tom}20$ (95 残基) とシグナル配列ペプチド pALDH (12-22) (11 残基) との複合体の立体構造を NMR を用いて決定した (図 3 A)。決定された $\text{Tom}20$ の構造は 5 本の α ヘリックスから形成される。そのうち 1~4 番目の α ヘリックスはコンパクトな構造を形成しており、内部に疎水性のコアを持っている。5 本目のヘリックスの相対配置はそれほど決まっていない。 $\text{Tom}20$ の表面には疎水性残基からなる溝があり、そこに pALDH (12-22) が結合していた (図 3 B)。結

合しているシグナル配列ペプチドは 16 番目のセリンから 22 番目のアラニンまでが両親媒性の α ヘリックスを形成しており、ペプチド中の 3 つのロイシン側鎖 (Leu15, 18, 19) が α ヘリックスの片側に集まって疎水面を形成している。この複合体の立体構造は α ヘリカルなペプチドの疎水面が、 $\text{Tom}20$ の疎水性領域と接触していることを示している (図 3 B, C)。さらに 3 つのロイシンをグルタミンに置換した変異シグナルペプチドの滴定実験では $\text{Tom}20$ との結合力が低下し¹⁾、 $\text{Tom}20$ は疎水性相互作用によりシグナルペプチドと結合していることが明らかになった。

考 察

ミトコンドリア局在化シグナル配列は統計的な解析や変異ミュータントを用いた解析が行われているが、アミノ酸配列自体に明確なコンセンサスは見つかっていなかった⁶⁾。これはミトコンドリア膜透過装置に存在する各種のレセプターが多様なアミノ酸配列中に隠されたシグナルを認識していることを意味する。本研究において $\Delta 50\text{Tom}20$ はアミノ酸配列が全く異なったシグナルペプチドと結合することが示された。また決定された $\Delta 50\text{Tom}20$ と pALDH (12-22) の複合体構造はシグナルシーケンスの一部が両親媒性の α ヘリックス構造を形成し、その疎水面が $\text{Tom}20$ の疎水性領域と相互作用していることを示した。最近、NMR を用いて他のシグナル配列ペプチドの $\text{Tom}20$ との結合部分が同定され、ラットアルデヒドデヒドロゲナーゼのシグナル配列と同様、ペプチドの一部分が相互作用していることが明らかとなった²⁾。これらのペプチドの結合部位のアミノ酸配列を比較すると $\phi\chi\chi\phi\phi$ (ϕ は疎水性、および芳香族アミノ酸、 χ はすべてのアミノ酸) というコンセンサス配列が確認された。よって他のペプチドにおいても pALDH (12-22) と同様に α ヘリックス構造を形成した場合、疎水性残基が集まり疎水面を形成する可能性がある。これらのことから考えると $\text{Tom}20$ はシグナル配列の一部が形成した α ヘリカル構造の疎水面を認識し、多様なミトコンドリアシグナル配列に対応していることが予想される。シグナル配列ペプチドは $\text{Tom}20$ との結合により両親媒性の α ヘリックスを形成するとともに親水性のアミノ酸残基を水溶液側に向けることとなる (図

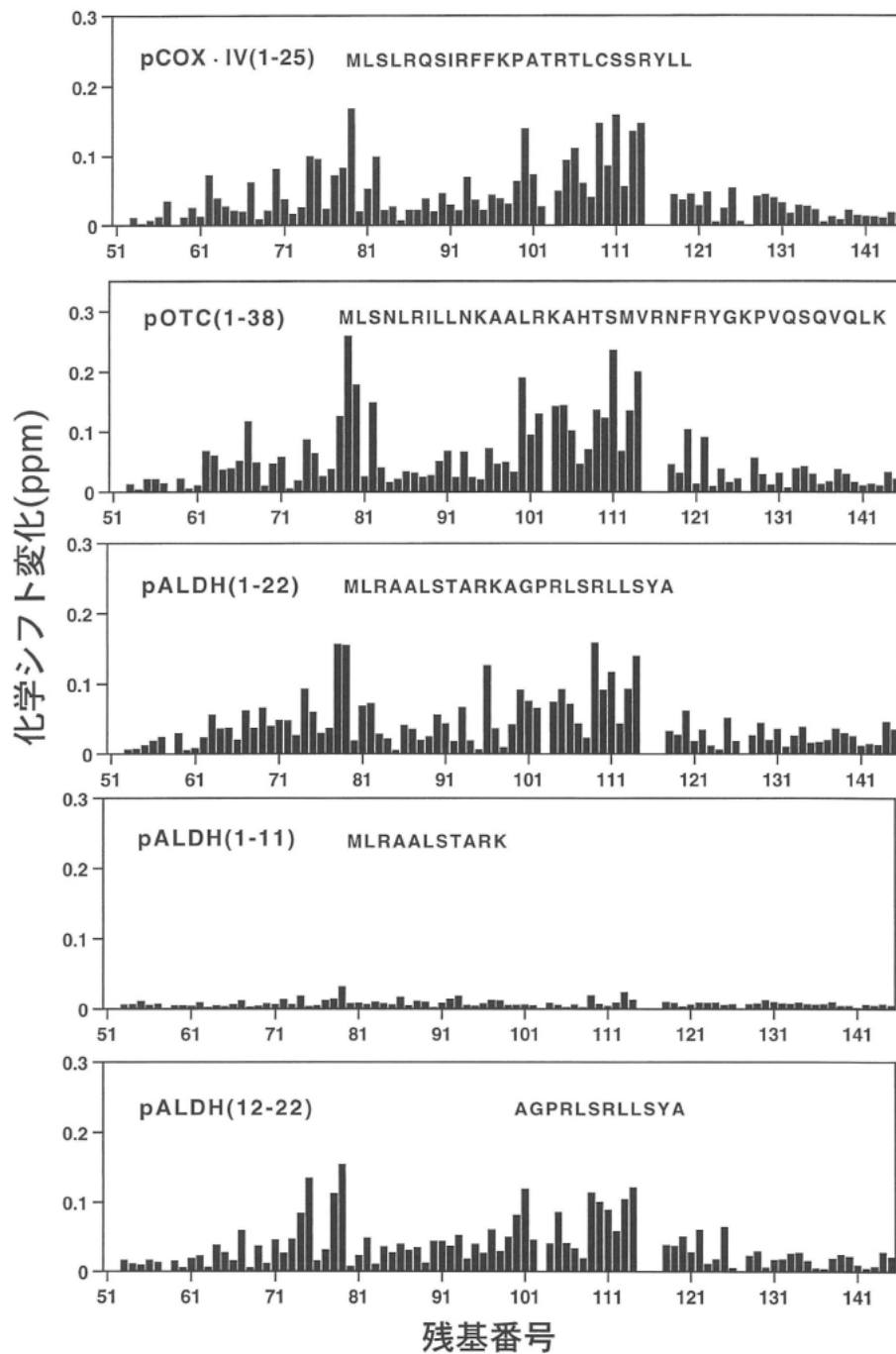


図2 シグナル配列が結合した時の $\Delta 50$ Tom20 の各残基の主鎖アミドの化学シフト変化
 OTC: ラットオルニチントランスカルバミラーゼ ALDH: ラットアルデヒドデヒドロゲナーゼ COX IV: 酵母チトクロームオキシダーゼサブユニットIV, グラフ内に各シグナル配列ペプチドのアミノ酸配列を示した。

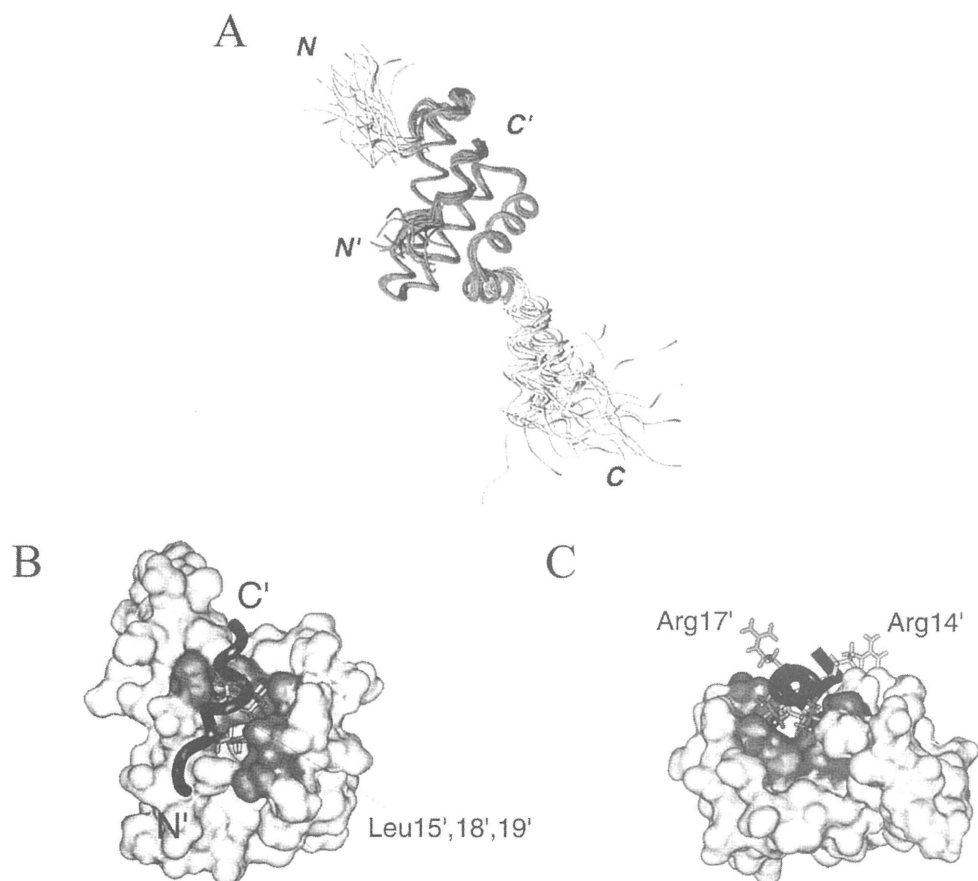


図3 $\Delta 50$ Tom20 とシグナル配列ペプチド pALDH (12-22) の複合体の立体構造
A. 構造計算から得られた 20 個の立体構造の重ね合わせ. B. $\Delta 50$ Tom20 の表面構造とペプチド. Tom20 のペプチド結合部位の疎水性残基を灰色で示した. ペプチドは黒, またはロイシン側鎖を灰色で示した. C. B をペプチドの C 末端側から見たもの. ペプチドにアルギニン側鎖を付け加えた.

3 C). またラットアルデヒドデヒドロゲナーゼのシグナル配列の場合には C 末端の一部のみが Tom20 との結合に使われている. 親水性残基は Tom20 との相互作用には必要ないが, 前駆体タンパク質のミトコンドリア内への移行には必須である⁴⁾. よって親水性残基や Tom20 と結合しないシグナル配列の一部は, Tom/Tim 複合体を構成する他のシグナル配列認識レセプターとの結合に利用されていると予想される. シグナルシーケンスが比較的長く多様なアミノ酸配列を有するのは, 多段階のレセプターによる認識機構をかいぐぐっていかねばならないためかもしれない. 今後他のシグナル配列認識レセプターとシグナル配列の

複合体の立体構造が解析され, シグナル配列認識機構の理解が深まることによって, ミトコンドリアへのタンパク質輸入のメカニズムの解析がさらに進むと期待している.

謝 辞

この研究を進めるにあたり, 直接御指導, および御鞭撻を賜りました生物分子工学研究所の神田大輔先生に感謝の意を表します. 共同研究者である名古屋大学大学院理学系研究科物質物理学の遠藤斗志也教授, および小代俊浩氏に感謝の意を表します. 実験に関して, 御指導および御援助いただきました生物分子工学研究所の皆様感謝いたします. また, 御指導, 御助言をくださいました九州大学大学院医学研

究院臨床分子医学の濱崎直孝教授に感謝の意を表します。
最後に、この論文を評価していただきました福岡医学会に深く感謝致します。

文 献

- 1) Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T and Kohda D: Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom 20. *Cell* 100: 551-560, 2000.
- 2) Muto T, Obita T, Abe Y, Shodai T, Endo T and Kohda D: NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. *J.*

Mol. Biol. Chem. 306: 137-143, 2001.

- 3) Pfanner N: Mitochondrial import: crossing the aqueous intermembrane space. *Curr. Biol.* 8: R262-265, 1998.

- 4) Roise D and Schatz G: Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* 263: 4509-4511, 1988.

- 5) Sollner T, Griffiths G, Pfaller R, Pfanner N and Neupert W: MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. *Cell* 59: 1061-1070, 1989.

- 6) von Heijne G: Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5: 1335-1342, 1986.

略歴

阿部 義人（あべ よしと）

九州大学大学院医学系研究科臨床分子医学 助手 薬学博士

平成8年3月 九州大学大学院薬学研究科卒業 平成8年4月～平成11年2月 生物分子工学研究所 博士研究員 平成11年3月 九州大学大学院医学系研究科臨床分子医学助手 現職にいたる。◇研究テーマ：ヒト赤血球膜タンパク質 Band3 の構造と機能 ◇趣味：テニス、釣り

