

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07334

研究課題名(和文)プロトン駆動力を用いたSecDFによるタンパク質膜透過促進機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of protein translocation stimulation by SecDF using proton motive force

研究代表者

森 博幸 (Mori, Hiroyuki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：10243271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質複合体SecDFは、プロトン駆動力を用いて細菌におけるタンパク質膜透過反応を促進するが、その分子機構の詳細は明らかではない。本研究では、SecDFと生細胞内で近接する因子の同定を通して、ペリプラズムシャペロンPpiDが、SecDFと共同的に働くことにより、ある種の基質タンパク質の膜透過に関与することを見出した。また、SecDFの別のコンフォメーション状態の高分解能の立体構造を明らかとした。これらの成果は、SecDFによるタンパク質膜透過促進機構の理解において重要な知見を与える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の膜透過反応は全ての生物に必須の現象であり、その分子機構の理解は細胞生物学の重要な研究課題の1つである。加えて、近年病原性細菌の多剤耐性化による院内感染の増加は大きな社会問題となっており、これまでとは作用機序の異なる薬の開発が待たれている。SecDFは細菌に特有の因子であるのに加え、大きな機能ドメインを細胞質外に持つことから、創薬の有用なターゲット候補として期待されている。効率良い創薬を進めるには、本研究による分子機構の理解は非常に意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The membrane protein complex SecDF promotes protein translocation in bacteria using proton-driven force, but the details of its molecular mechanism remain unclear. In this study, by identifying factors that are in close proximity to SecDF in living cells, we found that the periplasmic chaperone PpiD is involved in the protein translocation of a substrate by working together with SecDF. In addition, we determined high-resolution crystal structures of another conformational state of SecDF. These results provide important insights into the mechanism of SecDF-mediated stimulation of protein translocation.

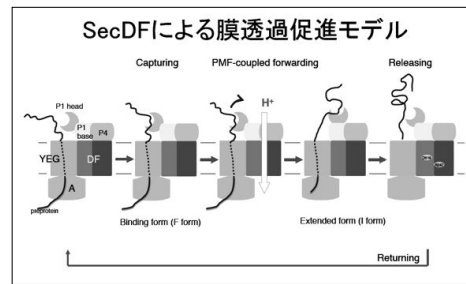
研究分野：生化学

キーワード：SecDF プロトン駆動力 タンパク質膜透過

1. 研究開始当初の背景

細胞質内で合成されるタンパク質の約 1/3 は、細胞膜を横切り細胞内外の適切な場所に運ばれて初めて生理的機能を発揮する。タンパク質の膜透過は、全ての生物に見られる普遍的な生命現象であり、その分子機構の解明は細胞生物学の最も基礎的かつ重要な研究課題の一つである。

細菌のタンパク質の膜透過には、進化的に高度に保存された膜透過チャネル SecYEG トランスロコンと駆動モーター SecA ATPase が必須の役割を果たす。これらの因子に加え、膜タンパク質複合体 SecDF は、タンパク質膜透過を亢進する機能を持つ。我々は、SecDF 複合体の高分解能の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、構造情報に基づいた生化学的解析を通して、「**SecDF によるタンパク質膜透過促進機構**」(右図)を提唱している¹⁾。このモデルに従えば、



SecDF はプロトン透過活性を持ち、プロトンの流入と共役した非細胞質ドメイン (以下 P1 domain と略す) のダイナミックな構造変化により膜透過途上の基質タンパク質を i) 補足し, ii) 引っ張り出し, iii) 手離す動きを繰り返すことで基質の一方向への移動を可能にしていると考えられる。この研究により細胞質膜を挟んで形成されるプロトン濃度勾配エネルギーが SecDF を介してタンパク質膜透過に利用されている事が初めて明らかになった。しかしながら、作業仮説の妥当性を含め残された問題も多く、本研究では以下に記す検討課題を解明することを目指し研究を進めた。

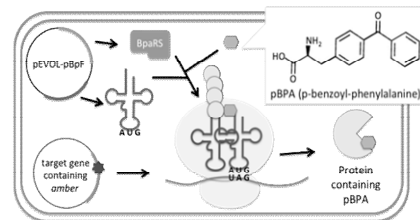
2. 研究の目的

上記モデルの提唱により、長年不明であったタンパク質膜透過反応の促進におけるプロトン駆動力 (PMF) の作用点の一端が明らかとなったものの、SecDF による膜透過促進の分子メカニズムの理解においては多くの不明な点が残されていた。具体的には、ア) P1 domain 内の基質タンパク質結合部位の同定、イ) PMF と共役した P1 domain の構造変化の実態とその駆動機構、ウ) SecDF と SecYEG トランスロコンやその他の膜透過関連因子との相互作用様式、エ) プロトン透過経路とその輸送機構などである。本研究課題ではこれらの問題点を解決することにより、作業仮説の妥当性を検証すると共に、SecDF によるタンパク質膜透過促進の分子メカニズムの詳細を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 部位特異的 *in vivo* 光架橋実験法を用いた SecD 分子に近接する因子の同定: 光反応性アミノ酸アナログ *p*-benzoyl-phenylalanine (*p*BPA) を効率良く

amber コドン部位に導入する大腸菌株 (右上図参照) を用いる事で、分子内の任意の部位に *p*BPA を取り込んだ SecD 変異体を発現する細胞が準備できる²⁾。この細胞に直接紫外線照射する事で、SecD 分子内の *p*BPA は近接する分子との間で共有結合を形成する。得られた架橋産物は SDS-PAGE 上の移動度の差として検出でき、架橋相手は候補因子の抗体を用いた immuno-blotting や、精製架橋産物の質量分析などから同定できる。



この研究手法を用いて、SecDF の立体構造情報に基づき、分子表面に存在するアミノ酸残基を対象に網羅的な *in vivo* 光架橋実験を進めた。(研究目的ウ)の解明に向けて)

(2) 部位特異的 *in vivo* 光架橋実験法を用いた膜透過途上の基質タンパク質に近接する因子の同定: (1)と同じ実験手法を用いて、膜透過基質 VemP タンパク質が、膜透過反応の際に相互作用する因子の同定を進めた。VemP は、自身の合成の際に翻訳が一時的に停止する性質を有している為、基質と膜透過装置との間の相互作用が安定化され相互作用因子の同定が容易であると考えられた。(研究目的ウ)の解明に向けて)

(3) 部位特異的 *in vitro* 光架橋実験法を用いた基質タンパク質結合ドメインの同定: 基質結合ドメインと想定される P1 domain 部位内に *p*BPA を持つ SecD を発現する株から反転膜小胞を調製し、この膜小胞を用いて膜透過基質タンパク質の *in vitro* 膜透過実験を行った。この際、C 末領域に di-sulfide 結合を導入した基質タンパク質を使用することにより、膜透過を途中で停止させ、基質タンパク質と SecD との相互作用を安定化させた。この状態で紫外線を照射し、基質タンパク質と SecD 内の *p*BPA 間の架橋を形成させ、基質結合部位の同定を進めた。(研究目的ア)の解明に向けて)

(4) *in vivo* 光架橋実験法を用いた P1 domain 構造変化の追跡: P1 domain 内部での分子内架橋形成を既に見出している。この架橋形成効率の変化を指標にして、P1 domain の構造変化を調べた。具体的にはプロトンイオノフォアである CCCP 処理により PMF を消失させた際の架橋形成効率の変化や、プロトン輸送に必須のアミノ酸残基を変異させた変異体を用いて調査した。

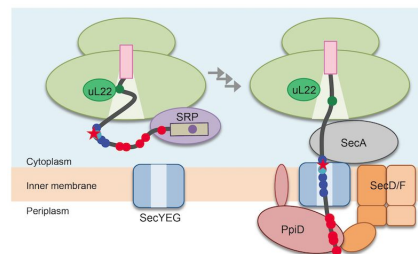
(研究目的イ)の解明に向けて)

(5)新たな SecDF 構造の決定と生化学的解析(共同研究):プロトンの透過経路とその機構を明らかにするために、NAISTの塚崎博士らと共同研究として別の構造状態を取る SecDF 結晶の構造解析を進めた。得られた構造に従って生化学的解析を進め新規構造の妥当性と検証した。(研究目的工)の解明に向けて)

4. 研究成果

(1)当初期待していた膜透過チャネルの中心因子 SecY との架橋形成部位は同定できなかったものの、ペリプラズムシャペロン PpiD と SecD の P1 domain 間の架橋を新たに見出した。SecD と PpiD の物理的な近接が初めて明らかになった³⁾。

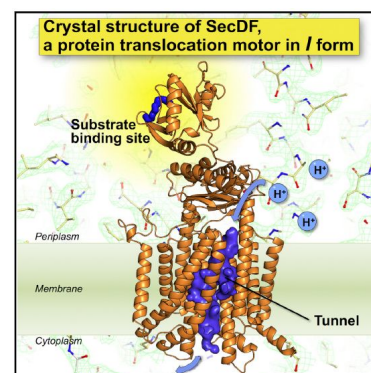
(2) VemP 分子全体を対象とした網羅的な光架橋解析の結果から、膜透過途上の VemP は膜透過チャネルの構成因子 SecY, SecG に加えて、SRP(シグナル認識粒子)、PpiD と近接していることが明らかになった。遺伝学的・生化学的解析から、VemP は SRP を介して SecYEG に標的化される事、VemP の膜透過の完了には、SecDF に加えて PpiD も重要な役割を持つ事が明らかになった。VemP の膜透過反応における PpiD の重要性を明確に示した最初の例となった³⁾。



(3) P1 domain の先端に存在する小さなクレバスの近傍に pBPA を持つ SecDF を発現する株から調製した反転膜小胞を用いて *in vitro* 膜透過実験を行った場合に限り、基質タンパク質 proOmpA と SecD との架橋が観察された⁴⁾。よって、このクレバスが基質を結合する部位と考えられた。新たに解明した SecDF の構造(後述)において、このクレバスの部位に沈殿剤として用いた PEG の電子密度が確認されており、上記結論と合致する。

(4) 細胞の脱共役剤の処理や、プロトン輸送に必須のアミノ酸残基の変異によって、SecD P1 ドメイン内の分子内架橋形成効率は劇的に低下した。この結果は、プロトンの流入により SecD P1 domain は構造変化を起こしていることを強く支持し、我々の作業仮説と矛盾しない。

(5) SecD の P1 domain の配向状態が異なる別の構造を決定した。このうちの1つの構造においては、上述のように P1 domain の溝の中に沈殿剤と思われる電子密度が確認され、基質結合をミミックしていると予想された⁴⁾。また、膜貫通領域の中に、水が通過可能なトンネル様の構造が観察され、微弱な水由来の電子密度も検出できた。分子動力学計算を用いた解析から、実際に水が通過できる様なトンネルが形成されている事も明らかになった⁴⁾。これらの結果から、SecDF は両分子のインターフェイスの位置に、水分子の通り道となるトンネル様の構造が形成され、この経路を介してプロトンが流れると予想される。Na⁺駆動型の SecDF が存在するとの我々の報告とも合致する⁵⁾。



以上の結果から、我々が提案した「SecDF による膜透過駆動モデル」において不明であった幾つかの問題点について解答を得ることに成功した。加えて、これまでその役割が明確でなかったペリプラズムシャペロン PpiD の膜透過における新たな役割が明らかになった。

<引用文献>

- 1) Tsukzaki, Mori *et al.* (2011) *Nature*, **474**, 235-238
- 2) Chin and Schultz (2002) *ChemBioChem*, **3**, 1135-1137
- 3) Miyazaki, Akiyama and Mori (2020) *eLife* **9**, e62623
- 4) Furukawa *et al.* (2017) *Cell Reports* **19**, 895-901
- 5) Ishii *et al.* (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E5513-E5522

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki Ryoji, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki	4. 巻 1864
2. 論文標題 A photo-cross-linking approach to monitor protein dynamics in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M Miyata, R C Robinson, T QP Uyeda, Y Fukumori, S Fukushima, S Haruta, M Homma, K Inaba, M Ito, C Kaito, K Kato, T Kenri, Y Kinoshita, S Kojima, T Minamino, H Mori, S Nakamura, D Nakane, K Nakayama, M Nishiyama, S Shibata, K Shimabukuro, M Tamakoshi, A Taoka, Y Tashiro, ITulum, HiWada, K Wakabayashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Tree of motility; A proposed history of motility systems in the tree of life	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 6-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yura Takashi, Miyazaki Ryoji, Fujiwara Keigo, Ito Koreaki, Chiba Shinobu, Mori Hiroyuki, Akiyama Yoshinori	4. 巻 93
2. 論文標題 Heat shock transcription factor ³² defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into genes encoding a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 229 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.18-00040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Koreaki, Mori Hiroyuki, Chiba Shinobu	4. 巻 365
2. 論文標題 Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fny109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Arata, Yoshikaie Kunihiro, Mori Takaharu, Mori Hiroyuki, Morimoto Yusuke V., Sugano Yasunori, Iwaki Shigehiro, Minamino Tohru, Sugita Yuji, Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 19
2. 論文標題 Tunnel Formation Inferred from the I -Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 895 ~ 901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daimon, Y., Masui, C., Tanaka, Y., Shiota, T., Suzuki, T., Miyazaki, R., Sakurada, H., Lithgow, T., Dohmae, N., Mori, H., Tsukazaki, T., Narita, S. and Akiyama, Y.	4. 巻 106
2. 論文標題 BepA mediates productive transfer of substrate proteins to the -barrel assembly machinery (BAM) complex.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 760-776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.13844.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki, R., Myogo, N., Mori, H. and Akiyama, Y.	4. 巻 293
2. 論文標題 A new photo-cross-linking approach for analysis of protein dynamics in vivo.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 677-686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.817270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama, Y.	4. 巻 293
2. 論文標題 Identification and characterization of arrest motif in VemP by systematic mutational analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 2915-2926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.816561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Ryoji, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Fine interaction profiling of VemP and mechanisms responsible for its translocation-coupled arrest-cancelation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e62623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 ビブリオ菌VemPの翻訳途上鎖を介したmRNA分解機構に関する研究
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 部位特異的in vivo光架橋法によるVemPの翻訳停止解除機構の解析
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊哲朗、宮崎亮次、森 博幸、秋山芳展
2. 発表標題 部位特異的in vivo光架橋法による大腸菌LptDの生合成過程の解析
3. 学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 改良型部位特異的in vivo光架橋法による生細胞内での翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用動態解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 Vibrio alginolyticusにおける新生ポリペプチド鎖依存的なmRNA分解機構
3. 学会等名 第53回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 英治、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 ヒブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した遺伝子発現制御機構について
3. 学会等名 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IF0がつなぐ京大微生物学のフロントライン」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊哲朗、宮崎亮次、森 博幸、秋山芳展
2. 発表標題 部位特異的in vivo光架橋法による大腸菌LptDの生合成過程の解析
3. 学会等名 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IF0がつなぐ京大微生物学のフロントライン」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 細菌の翻訳途上鎖による翻訳アレストを介したmRNA分解機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎亮次、渡邊哲朗、森 博幸、秋山芳展
2. 発表標題 部位特異的in vivo光架橋法による大腸菌外膜タンパク質LptDの成熟過程の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama Y.
2. 発表標題 Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis.
3. 学会等名 International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyazaki, R., Akiyama Y. and Mori, H.
2. 発表標題 Analysis of cis and trans factors involved in export and translation arrest of VemP by an in vivo photo cross-linking approach.
3. 学会等名 International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishii, E., Sakashita, S., Akiyama, Y. and Mori, H.
2. 発表標題 Roles of mRNA secondary structure of vemP-secD2 intergenic region in VemP translation arrest coupled SecD2 expression
3. 学会等名 International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸
2. 発表標題 SRP経路を介したVemPの膜透過装置への輸送と翻訳アレスト解除.
3. 学会等名 第5回ribosome meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori, H.
2. 発表標題 Structure and Physiological Function of SecDF That Enhances Protein Export.
3. 学会等名 International symposium 'Harmonized supermolecular motility machinery and its diversity' (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama, Y.
2. 発表標題 Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis.
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会 シンポジウム「実験と理論計算で明らかになってきた細胞環境での蛋白質間相互作用」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukazaki, T., Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, V. Y., Sugano, T., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y. and Tanaka, T
2. 発表標題 Protein translocation motor SecDF.
3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会 シンポジウム「構造生命科学の新しい潮流」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mori, H.
2. 発表標題 Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of a marine bacterium, <i>Vibrio alginolyticus</i> .
3. 学会等名 Commemorative symposium for 33rd international prize for biology 'Marine biology opens a frontier for the future'. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関