

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月13日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770135

研究課題名（和文）Sec トランスロコンマシーナリーの解明

研究課題名（英文）Structural and biochemical analysis of Sec translocon machinery

研究代表者

塚崎 智也（TSUKAZAKI TOMOYA）

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：80436716

研究成果の概要（和文）：細胞内でリボソームにより合成されたタンパク質が生体膜を超えて輸送される際に重要な役割を果たす膜タンパク質 SecDF の詳細構造を、世界で初めて解明した。その構造から「生体膜を隔てた陽イオンの濃度差を利用して SecDF が大きな構造変化を繰り返し、膜を超えたタンパク質輸送に関与する」という新たな仮説を提唱し、いくつかの生化学と生物物理学の手法を駆使してこの仮説を立証した。生命体に欠くことのできない基本的な生命現象の一つであるタンパク質の輸送を原子レベルで解析した本研究成果は、当該分野のみならず、膜を超えた細胞内外へのイオンや薬剤等の輸送の研究にも大きな影響を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Transport of proteins across membranes is one of the fundamental and essential cellular activities in all organisms. We solved the first 3D structure of a membrane component SecDF, which plays an important role in efficient translocation of newly synthesized proteins across the membrane in bacteria. From the structural features and functional analyses, we proposed that SecDF functions as a membrane-integrated chaperone, which drives movement of proteins without using a major currency, ATP, of energy, but with remarkable cycles of conformational changes, powered by a proton (H⁺ ion) gradient across the membrane. Our model of the SecDF function has been verified by a series of biochemical and biophysical approaches. This research uncovers a new, atomic-level principle that underlies the cellular protein delivery systems in particular and biological mechanisms of active transport in general, by which cells acquire or dispose not only macromolecules but also ions, drugs and nutrients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：タンパク質、膜透過、膜タンパク質、膜組込、トランスロコン、Sec、構造解析、構造生物学

1. 研究開始当初の背景

Sec トランスロコン複合体を介したタンパク質の膜透過は、すべての生物に保存された基本的な細胞機構の一つである。SecDFはSec トランスロコン複合体の一部を構成する膜タンパク質である(図1)。通常、イオンすら透過させない生体膜をこえて巨大なタンパク質が膜透過できるのは、このような専用のチャンネル(トランスロコン)が存在しているからである。細菌においてタンパク質の膜透過はSec トランスロコンと膜透過駆動モータータンパク質であるSecA ATPaseが中心的な役割を果たしている。主たるタンパク質の膜透過の駆動力はATPの加水分解のエネルギーであるが、この膜透過反応がSecDFとプロトン駆動力(PMF:proton motive force)によって促進されることが長い間不明であった。

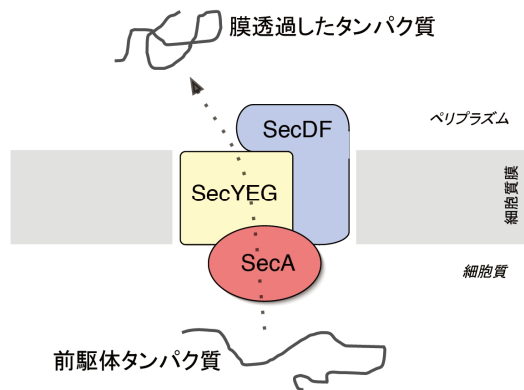


図1 細菌におけるSecタンパク質によるタンパク質の膜透過。SecYEG:Secトランスロコン(タンパク質膜透過チャンネル), SecA ATPase:駆動モータータンパク質, SecDF:膜透過促進因子。

2. 研究の目的

本研究では、真正細菌や古細菌でタンパク質の分泌に関わることが知られていたSecDFという膜タンパク質に着目した。SecDFはSecYEGと複合体を形成しタンパク質の膜透過を高効率化していると考えられていたが、実際にどのような働きをしているのかはほとんど解明されていなかった。SecDFの機能を明らかとすべく研究を進めた。

3. 研究の方法

大型放射光施設SPring-8(兵庫県佐用郡)を利用したX線結晶構造解析によってSecDFの構造を高分解能で決定し、得られた立体構造から予測されるSecDFの機能部位を改変した変異体SecDFを用いた一連の機能解析

を進めた。

4. 研究成果

SecDFの結晶構造から、SecDFは疑似2回対象に配置した12本の α -ヘリックスからなる膜貫通領域と2つの細胞外(ペリプラズム)領域(以下P1, P4と略す)から構成されることが明らかとなった(図2a)。P1領域は2つのドメイン(ヘッド領域とベース領域)から構成されていた。SecDFのP1領域はダイナミックな構造変化を起こし、ヘッド領域の配向が異なったF型とI型の2つの形をとることが示された(図2)。

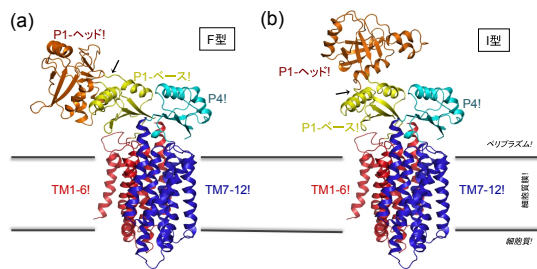


図2 SecDFの構造。(a)F型, (b)I型。

また、SecDFの膜貫通領域はPMFを利用した薬剤排出トランスポーターAcrBの膜貫通領域と類似の構造をとることがわかり、SecDFもまた水素イオンを利用することが予測された。*in vitro*におけるタンパク質の膜透過反応を調べることで、ATPとSecAが必要とされる膜透過を開始するステップと、その後ATPがなくても進行するタンパク質膜透過の後期・完了ステップとに分けて解析することが可能です。この実験によりSecDFとPMFはこのATPに依存しない後期ステップに必要であることを突きとめた。海洋性細菌由来のSecDFは、水素イオンの代わりにナトリウムイオンを利用してタンパク質膜透過を促進していることも明らかとした。

パッチクランプ法による電気生理学的解析とSecDFの変異体解析によって、SecDFの膜貫通領域にはプロトンの通り道が存在することがわかり、この膜貫通領域の中心部に存在する進化的に保存されたアスパラギン酸残基、アルギニン残基(図3)が、プロトンの透過とSecDFの働きの両方に必須であることが証明された。

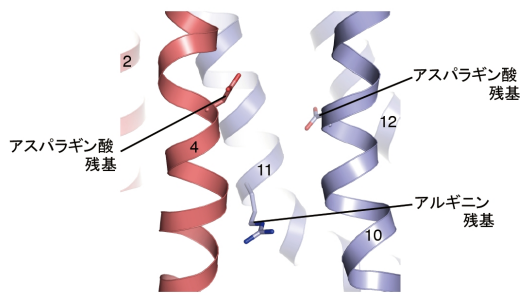


図 3 : SecDF の機能に重要なアミノ酸残基。膜貫通領域の中心部の膜貫通領域の拡大図。数字は膜貫通領域の番号を表している。

一方、膜から突出した P1 領域は、膜透過途上にある分泌タンパク質など安定な構造をとっていないタンパク質と結合する性質があることが判明した。P1 領域の変異体解析から図 2 に示した P1 領域の構造変化が実際に生体内で起こり、この構造変化がタンパク質の膜透過反応に重要であることを示した。以上の結果から、図 4 に示したように「SecDF は水素（陽）イオンの細胞内への流入を利用して大きな構造変化を繰り返しながら、ペリプラズム側で膜透過基質タンパク質と相互作用し、膜透過の高効率化に寄与する膜内在性シャペロンである」との結論を得た。

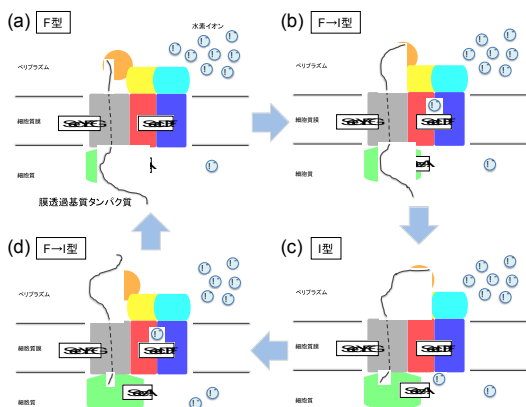


図 4 PMF を利用した SecDF の機能モデル。SecDF は SecYEG と複合体を形成する。SecA ATPase によって SecYEG を介して運搬された前駆体タンパク質は細胞外で SecDF の細胞外領域と相互作用する(A)。その後 SecDF は F 型から I 型へと前駆体タンパク質を保持したまま構造変化を起こし、タンパク質を透過させる(B)。最終的にプロトンの透過により、SecDF はタンパク質を手放し、I 型から F 型へと構造変化をする(C)。このような過程を繰り返すことにより SecDF はタンパク質の膜透過に関与するとのモデルを提唱した。

本研究では、タンパク質の膜透過に関わる

Sec タンパク質群のなかで唯一構造の報告がされていなかった SecDF の構造を明らかとし、その機能の詳細を解明した。今後、本研究成果によって図 1 に示した Sec トランスロコン複合体の立体構造と機能解析の研究が大きく進展することが期待される。そして、膜を隔てた物質輸送の研究分野一般にも大きな影響を与えることが期待される。また近年多剤耐性遺伝子を持つ病原菌が問題となっているが、これらの菌体は SecDF を持つため、SecDF の細胞外領域を標的とする新しいタイプの抗生物質の発見につながるなど、基礎科学だけでなく医学への応用も期待される。

5. 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 12 件)

- ① Kato, H.E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A.D., Ishitani, R., Deisseroth, K., and Nureki O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482, 369-374 (2012). DOI:10.1038/nature10870
- ② Tsukazaki, T., Mori, H, Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina A., Vassilyev, D.G., Kohno, T., Maturana, A.D., Ito, K., and Nureki, O. Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474, 235-238 (2011). DOI:10.1038/nature09980
- ③ Tsukazaki, T. and Nureki, O. The mechanism of protein export enhancement by the SecDF membrane component. *BIOPHYSICS*, 7 129-133 (2011). https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/7/0/7_0_129/_article
- ④ Echizen, Y., Tsukazaki, T., Dohmae, N., Ishitani, R. and Nureki, O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the first periplasmic domain of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1367-1370 (2011). <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309111031885>
- ⑤ 塚崎智也. Sec トランスロコンと共に機能する SecDF 膜タンパク質の構造. *生物物理* 51, 236-237 (2011) http://www.biophys.jp/journal/journal_vollist.php

- ⑥ 塚崎智也, 濡木理. タンパク質を膜透過させる分子装置. *化学工業* 62, 474-477 (2011)
<http://www.kako-sha.co.jp/>
- ⑦ Mori, T., Ishitani, R., Tsukazaki, T., Nureki, O. and Sugita, Y. Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec translocon. *Biochemistry* 49, 945-950 (2010).
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi901594w>
- ⑧ 塚崎智也. 結晶化用蛋白質の精製法 - SecDF 膜蛋白質をモデルとして - *蛋白質科学会アーカイブ* 3, e056 (2010).
http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Purification/cryst_03/cryst_03_01.html
- ⑨ Hattori, M., Iwase, N., Furuya, N., Tanaka, Y., Tsukazaki, T., Ishitani, R., Maguire, M.E., Ito, K. and Nureki, O. Mg²⁺-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg²⁺ homeostasis. *EMBO J.* 28, 3602-3611 (2009).
<http://www.nature.com/emboj/journal/v28/n22/abs/emboj2009288a.html>
- ⑩ 塚崎智也, 森博幸. 細菌型 Sec トランスロコンの構造から明らかとなったタンパク質膜透過装置の構造変化 *生物物理* 49, 288-289 (2009)
http://www.biophys.jp/journal/journal_vollist.php
- ⑪ 森博幸, 塚崎智也. 立体構造解析からみえてきた SecA による蛋白質の膜透過の駆動機構 *蛋白質核酸酵素* 54, 685-695 (2009).
<http://lifesciencedb.jp/pne/?phrase=立体構造解析からみえてきた SecA による蛋白質の膜透過の駆動機構&attr12=&attr13=2&max=50>

[学会発表] (計 13 件)

- ① 塚崎智也 「Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export」 Gordon Conference on Protein Transport Across Cell Membranes. 2012 年 3 月 12 日, ホテルガルベス(テキサス州アメリカ合衆国)
- ② 塚崎智也 「タンパク質の膜透過を促進する膜タンパク質 SecDF の構造と機能」 過渡的複合体 公開シンポジウム. 2011 年 7 月 21 日, 東京大学薬学部(東京都)
- ③ 塚崎智也 「Sec トランスロコンと共に機能する SecDF 膜タンパク質の構造」 第 48 回日本生物物理学会年会. 2010 年 9 月 20 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県)
- ④ 塚崎智也 「Crystal structure of SecDF, a Sec translocon-associated membrane protein」 The 3rd International

Symposium on Protein Community. 2010 年 9 月 14 日, ホテル日航奈良(奈良県)

- ⑤ 塚崎智也 「Structural Analysis of Bacterial Sec Translocon Machinery」 International Symposium : Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University. 2010 年 3 月 14 日, 名古屋大学(愛知県)
- ⑥ 塚崎智也 「Structural analysis of bacterial Sec translocon machinery」 Gordon Research Conferences: Protein Transport Across Cell Membranes. 2010 年 3 月 11 日, ホテルガルベス(テキサス州アメリカ合衆国)
- ⑦ 塚崎智也 「Structural Analysis of Bacterial Sec Translocon machinery」 International Symposium : Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes. 2009 年 9 月 8 日, 京都大学(京都府)
- ⑧ 塚崎智也 「細菌型 Sec トランスロコンの構造から明らかとなったタンパク質膜透過装置の構造変化」 第 9 回日本蛋白質科学会年会. 2009 年 5 月 21 日, 全日空ホテルニュースカイ(熊本県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2011/10.html>

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/2915>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚崎 智也 (TSUKAZAKI TOMOYA)
 東京大学・大学院理学系研究科・助教
 研究者番号：80436716

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし