

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19226

研究課題名（和文）タンパク質膜透過駆動モーター SecA ATPase の駆動力を測定する

研究課題名（英文）Measurement of protein translocation by SecA ATPase

研究代表者

塚崎 智也（Tsukazaki, Tomoya）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：80436716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：真正細菌では、Sec トランスロコンが、細胞質からペリプラズムへのタンパク質輸送のチャンネルとして機能する。モーター SecA ATPase は、基質タンパク質を Sec トランスロコンに押し込むが、その構造変化の詳細は不明である。この研究では、タンパク質の膜透過における Sec トランスロコン-SecA 複合体の構造ダイナミクスを視覚化しようとした。その結果、基質タンパク質の輸送をリアルタイムで観察することができた。さらに、SecA ATPase のドメインのヌクレオチド依存性の構造変化が可視化された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未だ可視化されていない Sec タンパク質によるタンパク質の膜透過のダイナミクスを明らかとすべく研究を進めた。世界で初めてタンパク質輸送をリアルタイムで捉えることができた。今後は、この結果をまとめて原著論文として発表する。本解析は、機能解析が進んでいない他の膜タンパク質にも利用できるため、新しいことを発見した学術的意義だけでなく、膜タンパク質の解析法の一つとして技術的な貢献がある。

研究成果の概要（英文）：In eubacteria, the Sec translocon complex consisting of membrane proteins SecY, SecE, and SecG (SecYEG) functions as a passive channel for membrane protein translocation from the cytoplasm to the periplasm. A motor SecA ATPase for the protein translocation pushes pre-proteins into the SecYEG. The detailed dynamics of how the conformational change of SecA ATPase functions in concert with protein translocation is unclear. In this study, we attempted to visualize the structural dynamics of the SecYEG-SecA complex in protein translocation using high-speed atomic force microscopy. We were able to observe the binding of unfolded substrate proteins to the SecYAE complex reconstituted into nanodiscs and the transport of the substrate proteins in real-time. In addition, nucleotide-dependent conformational changes of a domain of the SecA ATPase were visualized.

研究分野：Structural Life Science

キーワード：膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の合成は細胞質でリボソームによって行われ、多くのタンパク質は膜を超えて輸送される。このタンパク質の膜透過は普遍的な生命現象の一つである。Sec パスウェイと呼ばれるしくみは、バクテリアからヒトまで保存されている。タンパク質の通り道となるのが膜タンパク質複合体 Sec トランスロコンであり、タンパク質膜透過チャネルを形成する。バクテリアでは Sec トランスロコンは SecY, SecE, SecG からなる複合体 (SecYEG) である。真核細胞においては、Sec61 複合体とよばれる。SecA ATPase は、輸送されるタンパク質 (基質タンパク質) をアンフォールドの状態を保ったまま SecYEG にリクルートし、ATP の加水分解のエネルギーを利用して Sec トランスロコンの中に基質タンパク質を繰り返し押し込むことで、細胞内から基質タンパク質を段階的に膜透過させている (図 1)。この反応機構を理解するためには生化学的な解析だけでなく、高分解能の 3 次元構造情報が必要であり、2000 年代から Sec タンパク質の X 線結晶構造解析や電子顕微鏡単粒子解析が進められた。しかしながら、未だ、時間に依存したダイナミックな構造変化ともなうタンパク質の膜透過反応を測定するところまでは至っていない。SecA はいくつかのドメインから構成されており、そのうちのひとつで基質タンパク質と相互作用するとされている PXXD ドメインの配置が変化することによって、SecA は少なくとも Open 型と Closed 型とよばれる 2 つの状態をとるとされている。しかしながら、どのタイミングで、この構造遷移が起こっているのかについては不明のままである。

研究を困難としている要因として、SecA がモノマーとダイマーのオリゴマー状態の変化を起こすことがあげられる。さらに、基質タンパク質がアンフォールドした不安定な状態であることに加え、SecY と SecA が結合解離することなども提唱されており、未だ、これら複合体の状態すら解明されていない。そのため、過去の解析例や解釈にも問題点が多い状況にある。具体的には SecA のモノマーとダイマーの平衡状態や SecYEG との結合乖離が制御されていないことが起因して、精緻な解析が阻まれて誤った解釈となっていると思われる例も少なくないため、Sec のタンパク質膜透過の理解を大きく妨げているのが現状である。これらを解決するために、海外のグループがタンパク質膜透過反応のダイナミクスを可視化させるために原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた解析を進めている。タンパク質の膜透過の時空間分解能を考えると実際に膜透過を活写するには、高速 AFM でモニターできるはずである。しかしながら、必須因子の SecYEG と SecA を含んだ状況のものでは、ヌクレオチドや基質によってオリゴマー状態の変化などが示されているが、リアルタイムでのドメインの構造変化を追うまでには至っておらずさらなる高分解能解析が待たれている。SecYEG と SecA の複合体の測定も行われたが、上記の通り SecA のオリゴマー状態の制御が困難であること、また分解能の問題から決定的な画像を得られていない状況にある。詳細に解析するには、系の純化をし高分解能で観測することが極めて重要である。すなわち、厳密に SecA-SecYEG のストイキオメトリーを合わせるとこと、タンパク質膜透過に必要な膜環境が与えられていること、1 ユニットを完全に単離することが必要である。

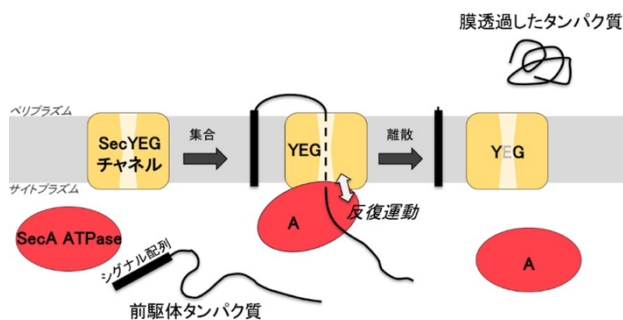


図 1 バクテリアのタンパク質の膜透過

2. 研究の目的

従来の 1 分子観察で、1 ユニットの SecYEG が基質タンパク質を透過させることが示されたが、SecA のオリゴマー状態については制御ができていなかった。私たちは、安定な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のタンパク質に着目して Sec タンパク質の解析を進めてきた。系の純化のため SecY と SecA をペプチドリンカーで繋いだ融合タンパク質を構築した。これにより間違いなく SecYEG-SecA のストイキオメトリーが 1 : 1 となる。この融合タンパク質 (SecYAEG) を精製した再構成リボソームはタンパク質膜透過活性を示した¹。この状況下において、活性化するときリボソーム上で SecY、SecA がオリゴマー状態をとるということを排除できていないという懸念事項があった。膜環境かつ 1 ユニットを同時に達成させる方法として、ナノディスクがある。ナノディスクは、膜骨格タンパク質と脂質から構成されるディスク状のナノ粒子である。脂質は 2 重層構造となっている。この脂質層の中に膜タンパク質を埋め込むことができるため、近年さまざまな膜タンパク質の解析に用いられている。ナノディスクに埋め込むことで、界面活性剤を使わなくても膜タンパク質が安定に存在でき、膜環境を維持しているといことが利点である。SecYEG の電子顕微鏡構造解析にも、1 ユニット解析にもナノディスクは用いられた実績がある。

これまでに、純化した均一な 1 ユニットのシステム構築のため、SecYAEG を大腸菌のリン脂質と一緒に、ナノディスクに再構成し、SecYAEG-ナノディスク (SecYAEG-ND) を作成し、これを、高

速 AFM で観察することにより、均一な粒子であることを確認した。さらに、SecY をラベルして検証することで、可溶性の SecA の領域と膜タンパク質である SecYEG ナノディスクの領域が、高速 AFM で明確に区別できることを示した²。本研究では、SecYAEG ナノディスクと基質タンパク質を加えた条件に、さらに ATP を加えて 1 ユニットの SecYAEG でタンパク質の膜透過反応を開始させ、タンパク質膜透過の動態観察を進め、タンパク質輸送のリアルタイム動的探査を行い SecA の駆動力、駆動メカニズムを解明することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、タンパク質の膜透過のダイナミクスを解明すべく研究を進めているが、高速 AFM でその詳細を可視化するためには、上述の 1 ユニットの観察だけでは、詳細な議論が不可能であった。なぜなら、粒子が雪だるま状に見えており、どの領域で基盤に結合しているのが不明であったからである (図 2)。詳細な解析のためには、SecYAEG-ND がどの向きで基盤に結合しているのかを決定する必要があった。そこで、SecA に特徴的な独立した一つのドメインを欠失させた YAEG 複合体 (SecYA Δ EG) を作製し、はじめに SecYAEG-ND の基盤への結合する向きを決定すべく観察を進めた。

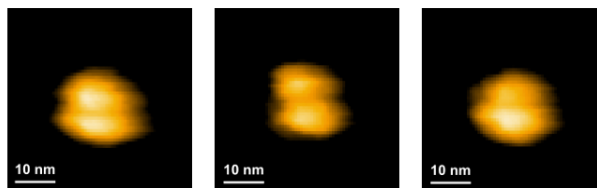


図 2 SecYAEG-ND の高速 AFM 画像

SecYAEG-ND の高速 AFM 画像では SecA の領域は楕円状に観察された一方で、SecYA Δ EG-ND の観察像では、SecA の部分の一部が三日月のように欠けたような形で、観察できた。観察されるどの粒子においても、同じ部分が欠けていたため、SecYAEG-ND は同一面で基盤に結合していると考えられる。さらに精緻な解析を行うためには、次に具体的に SecA のどの領域が結合しているのかを明らかとする必要があった。そこで、近年急激に精度の上昇した AI によるタンパク質の構造予測プログラム AlphaFold2 を用いて SecYAEG と、SecYA Δ EG の構造予測を行い、それらをナノディスクに再構成した構造モデルを準備した。その構造をもとに、高速 AFM による観測される像の推定モデルを作成することができる。構造モデルを 360 度回転させながら、各角度における推定モデルを作成した。これら推定モデルと実際の高速度 AFM の SecYAEG と SecYA Δ EG の観察像とを比較し、各角度における類似相関を調べたところ、ある特定の角度において類似相関が高くなることとが判明した。ここまでの準備実験で、SecYAEG-ND の基盤への結合配向が明らかとなった。この手法を用いて解析を進めた。

4. 研究成果

SecYAEG-ND 溶液に、変性状態のアンフォールドした基質タンパク質と ATP を混合することでタンパク質の膜透過反応を開始させ、高速 AFM で観察を進めた。測定された多くの粒子で、SecYAEG-ND の単独粒子では観察できなかった、紐状の物体が SecYAEG-ND から生えているような像が確認された。基質は 3 種類準備して観測を行ったが、どれも同じ傾向が見られた。これらは、タンパク質輸送過程途中の基質タンパク質であると考えられる。一方、基質タンパク質のシグナル配列に、その機能を失う変異を導入したところ、SecYAEG-ND の粒子から見られる紐状の像が確認されなかった。また、SecYA Δ EG-ND を用いたときにも、紐状の像が確認されなかったため、欠失させた SecA の領域は機能に必須であることが判明した。

SecYAEG-ND が起こすタンパク質膜透過反応の像を精査しているときに周期的に SecA の高さが変化することを確認した。この構造変化は、基質タンパク質が存在していないときには観察できなかったため、タンパク質膜透過反応と連動していることが強く示唆される。上記の準備実験で SecYAEG-ND の配向も決定できているため、SecA の構造変化をシミュレーションし高速 AFM 画像と比較検討したところ、SecA は open 状態と closed 状態を繰り返していると考えられた。現在は、タンパク質膜透過反応が進む ATP の条件だけではなく、ATP の代わりに ADP や AMP-PNP などを使用した条件で、SecA の構造変化がどのように変化するのかを統計的に調査し、原著論文の準備を進めた。

本研究により、SecYEG-SecA の 1 ユニット系による測定が安定にできる状況となった。今後、さまざまな Sec タンパク質の精緻な生物物理学解析を行うことができる。

<引用文献>

1. Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, and Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLoS One*, 18, e0183434, (2017).
2. Haruyama T, Sugano Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, Konno H, and Tsukazaki T. Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Structure*, 27, 152-160, (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kohga Hidetaka, Mori Takaharu, Tanaka Yoshiki, Yoshikaie Kunihito, Taniguchi Katsuhide, Fujimoto Kei, Fritz Lisa, Schneider Tanja, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 30
2. 論文標題 Crystal structure of the lipid flippase MurJ in a “squeezed” form distinct from its inward- and outward-facing forms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1088 ~ 1097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2022.05.008	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 Inaba Hiroshi, Sueki Yurina, Ichikawa Muneyoshi, Kabir Arif Md. Rashedul, Iwasaki Takashi, Shigematsu Hideki, Kakugo Akira, Sada Kazuki, Tsukazaki Tomoya, Matsuura Kazunori	4. 巻 8
2. 論文標題 Generation of stable microtubule superstructures by binding of peptide-fused tetrameric proteins to inside and outside	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 abq3817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq3817	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 Miyazaki Ryoji, Ai Mengting, Tanaka Natsuko, Suzuki Takehiro, Dhomae Naoshi, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki	4. 巻 298
2. 論文標題 Inner membrane YfgM-PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102572 ~ 102572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102572	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 Tanaka Yoshiki, Iwaki Shigehiro, Sasaki Akira, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 595
2. 論文標題 Crystal structures of a nicotine MATE transporter provide insight into its mechanism of substrate transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1902 ~ 1913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14136	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6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚崎智也、長池航、板家成良、春山隆充、菅野泰功、宮崎亮次、市川宗蔵、内橋貴之
2. 発表標題 Sec 複合体によるタンパク質膜透過の1ユニット動態観察
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎亮次、鈴木健裕、堂前直、塚崎智也
2. 発表標題 タンパク質膜透過・輸送に関わるPpiD/YfgM複合体のin vivo光架橋解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 メガダルトン生命機能深化ダイナミクス
3. 学会等名 BioneX 生命科学の変革 公開シンポジウム 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 Secの動的探査など進捗状況報告
3. 学会等名 第3回構造生命科学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 タンパク質の膜透過に関わるプロトン駆動型モーターSecDFの構造生命科学
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 板家成良, 長池航, 春山隆充, 市川宗厳, 菅野泰功, 宮崎 亮次, 内橋貴之, 塚崎智也
2. 発表標題 高速AFMによるタンパク質膜透過装置Sec複合体の動的構造解析
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良先端大・構造生命科学 https://bsw3.naist.jp/tsukazaki/

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			
中国	復旦大学			