

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370070

研究課題名（和文）タンパク質膜透過における SecDF の機能とプロトン駆動力の役割

研究課題名（英文）SecDF function and roles of the proton motive force in protein translocation

研究代表者 森 博幸（MORI HIROYUKI）

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10243271

研究成果の概要（和文）：細菌におけるタンパク質膜透過は、膜タンパク質 SecDF により促進されるが、その分子機構は明らかではない。本研究において、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の SecDF の結晶構造を 3.3Å 分解能で明らかにすると共に、構造情報に基づいた詳細な生化学的解析を進めた。その結果、「SecDF は、ATP に依存しないタンパク質膜透過能力を発揮するために、PMF のエネルギーにより駆動される膜内在性モータとして機能する」との新たな作業仮説を提唱するに至った。

研究成果の概要（英文）：In bacteria, protein translocation across the membrane is stimulated by membrane-integrated components, SecDF. However, its molecular mechanisms remain unknown. In this study, we determined the crystal structure of *Thermus thermophilus* SecDF at 3.3 Å resolution and carried out a number of biochemical analysis based on the structural information. Finally, we propose a working hypothesis that SecDF functions as a membrane-integrated motor, powered by PMF, to achieve ATP-independent full protein translocation ability of the Sec machinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
23 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
24 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

細胞質中で合成されたタンパク質の約 1/3 は、生体膜を通過し、細胞内外の適切な場所に運ばれて初めて生理的機能を獲得する。タンパク質が膜を越える反応は、全ての生物で見られる普遍的な生命現象であり、そのメカニズムの解明は、細胞生物学の最も基礎的かつ、重要な研究課題の 1 つと言える。タンパク質膜透過反応は、「膜透過チャネル」(トランスロコン)を介して起こる。全ての生物種で保存された膜内在性タンパク複合体 SecYE/Sec61 が中心的役割を果たす。

(1) 膜透過駆動因子：トランスロコンは、passive なチャネルであり、真性細菌においては、SecA ATPase が必須の駆動モーターとして働く。SecA は ATP の結合加水分解に伴う構造変化により、基質タンパク質をチャネルの内部に押し込み膜透過を駆動すると考えられているが、その駆動機構の詳細は明らかではない。加えて、タンパク質膜透過を促進する働きを持つ膜タンパク質 SecDF の存在は古くから知られていたが、解析は大きく立ち後れており、立体構造情報も含めて、その役割に関しては不明な点が多く残されている。

(2) 膜透過駆動エネルギー：タンパク質膜透過には、ATP と細胞質膜をはさんで形成されるプロトン駆動力(PMF)の2つのエネルギーが用いられている。ATP はモーター因子 SecA ATPase により利用される必須のエネルギーであるのに対して、PMF は膜透過の効率を高めるものの必須ではない。しかしながら、PMF のエネルギーがどのように利用され、タンパク質膜透過を促進しているのかについては、これまで全く明らかではなかった。

2. 研究の目的

前述のように、真性細菌において、タンパク質の膜透過には、ATP と PMF の2つのエネルギーが用いられる。ATP は、モーター因子 SecA ATPase により利用されるが、PMF の膜透過促進の作用機序については殆ど解っていない。SecYE 膜透過チャネルと複合体を形成し、補助的に働く膜タンパク質 SecDF は、タンパク質膜透過を促進することが知られているが、その分子機構は不明なままである。本研究では、SecDF の立体構造解析と生化学的解析を通して、SecDF のタンパク質膜透過促進の分子メカニズムを明らかにする。加えて、「SecDF は PMF のエネルギーを利用してタンパク質膜透過能を促進している。」との仮説に立ち、生化学的解析を通して、これを実証し、その機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の SecDF タンパク質の高分解能の立体構造を X 線結晶構造解析の手法により明らかにする。

得られた構造情報に基づいた詳細な生化学的解析を進めることにより、SecDF によるタンパク質膜透過促進の分子メカニズムを明らかにする。

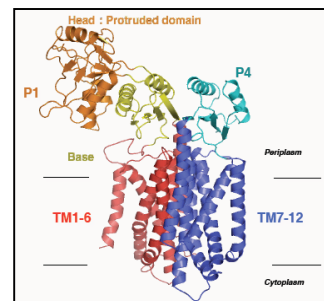
(2) 膜透過反応の後期過程を測定する新たな *in vitro* のタンパク質膜透過実験を構築し、実験を遂行することにより、タンパク質膜透過反応において PMF が関与するステップを明らかにすると同時に、PMF の役割と SecDF の関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 分子内ジスルフィド結合を持つ proOmpA 分子を基質タンパク質に用いることにより、*in vitro* で膜透過を一時的に停止させ、ATP を枯渇させた条件下で、PMF のエネルギーだけを用いて膜透過を完了させる実験系を構築した。その結果、PMF による膜透過の完了には、SecDF は必須であることは明らかとなった。よって、PMF のターゲットの 1 つは、SecDF であると言える。

(2) 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の SecDF タンパク質の立体構造を、塚崎智也博士との共同研究により、3.3Å 分解能で決定した。高度好熱菌においては、SecDF は、12 回の膜貫通領域と2つの大きなペリプラズムドメイン(P1, P4)を持つ。別途決定した単離 P1 ドメインの立体構造、並びに構造情報に基づいた生化学的解析結果から、SecD の P1 領域は少なくとも2つの構造状態を取り得ることが明らかとなった。更なる解析から、P1 ドメインの可動性が、SecDF によるタンパク質膜透過機能に重要であることを見いだした。加えて、単離 P1 ドメインが基質タンパク質を直接結合する能力を持ち、基質の結合・解離には、このドメイン内の構造変化が重要であることを示唆する結果を得た。

(3) SecDF の膜貫通領域の配置は、同じ RND スーパーファミリーに属する薬剤プロトンアンチポーター



AcryB のそれと類似していることを見いだした。AcryB においては、プロトンの移動に直接関わると考えられる保存された荷電アミノ酸残基の存在が知られている。これらのアミノ酸残基の幾つかは、SecDF においても保存されており、

その部位への変異導入により、SecDF の機能は完全に失われた。これらの結果は、SecDF は、プロトンの濃度勾配エネルギーを利用して、膜透過を昂進する因子として働く可能性を示唆する。

(4) ビブリオ菌由来の SecDF が、水素イオン濃度勾配の代わりに、Na⁺濃度勾配を利用してタンパク質膜透過を促進させることも見いだした。

以上の結果から、SecDF は、膜間で形成される一価の陽イオン濃度勾配エネルギーを利用し、イオンを細胞質に取り込む際に生じる膜貫通領域内の構造変化を引き金に、P1 領域の構造変化を誘起し、この構造変化と共役して基質タンパク質を引っ張ることによる膜透過を促進する、イオン駆動型の膜透過促進因子と結論した。

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 10 件)

代表的な物のみ記載

- ① 森 博幸, 塚崎智也 細菌のタンパク質分泌を促進する膜タンパク質 SecDF の構造と機能、化学と生物、査読有、51 巻、2013、28-35
- ② Tsukazaki, T.*, Mori, H.*, Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassylyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K. & Nureki O. (2011) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* **474**, 235-238., doi: 10.1038/nature09980. 査読有 *同等貢献
- ③ Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E.-i., Chiba, S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K., and Akiyama, Y. (2011) Post liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the S2P protease in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13740-13745., doi: 10.1073/pnas.1108376108. 査読有、

[学会発表] (計 34 件)

代表者が発表した招待講演のみ記載

- ① 森 博幸, 塚崎智也, 町田裕紀子、三登一八、濡木理, 伊藤維昭, 秋山芳展, Structure and function of SecDF, a membrane integrated protein translocation enhancing factor. 第 86 回日本細菌学会ワークショップ「細胞構造研究の新展開」2013 年 3 月 19 日、千葉
- ② 森 博幸, 橋本成祐、小嶋誠司、本間道夫、秋山芳展, ビブリオ菌のタンパク質分泌マ

シナリー: SecDF パラログの発現制御機構
第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「運動超分子マシナリーの機能メカニズム」

2012 年 12 月 15 日、福岡

- ③ 森 博幸, 細菌の蛋白質膜透過装置の構造・機能・病原性との関わり、第 48 回細菌学会中部支部会 (特別講演) 名古屋 2011 年 10 月 21 日-22 日、名古屋
- ④ 森 博幸, 塚崎智也, 越前友香, 秋山芳展, 濡木理, 伊藤維昭: 蛋白質膜透過を促進する膜内在性因子 SecDF の構造と機能 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「生体膜エネルギー変換装置の超分子科学」2011 年 9 月 21 日-24 日、京都
- ⑤ 森 博幸, 塚崎智也, 越前友香, 濡木理, 伊藤維昭: プロトン駆動力を用いた SecDF による蛋白質膜透過の昂進機構 第 11 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「細胞膜ダイナミクス: *In vitro* 再構成系によるアプローチ」2011 年 6 月 7-9 日大阪
- ⑥ Mori H., Tsukazaki, T., Akiyama Y., Nureki O. and Ito K.: Structure, function and evolution of bacterial protein translocation machinery. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ「進化からみたタンパク質社会」、2010 年 12 月 7 日-10 日、神戸
- ⑦ 森 博幸: 細菌のタンパク質膜透過装置の構造と機能。 (特別講演) 第 4 回細菌学若手コロッセウム、2010 年 8 月 26 日-28 日、修善寺

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/akiyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 博幸 (MORI HIROYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10243271

(2) 研究分担者

秋山芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：1092460

(3) 連携研究者

塚崎智也 (TSUKAZAKI TOMOYA)

東京大学・理学系研究科・助教

研究者番号：80436716

(4) 連携研究者

南野徹 (MINAMINO TOHRU)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：20402993