

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291023

研究課題名(和文) すべての生物に共通する膜タンパク質形成過程の構造生命科学

研究課題名(英文) Structural basis for membrane protein integration

研究代表者

塚崎 智也 (Tsukazaki, Tomoya)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80436716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細菌からヒトまで、共通した生命現象のタンパク質の膜組込み過程の解明のために、YidCならびにSecYEGの結晶構造とその構造に基づく機能解析を進めた。その結果、タンパク質膜組込み過程の新たなモデルを提唱することができた。本結晶構造解析によりアミノ酸残基レベルでの議論が可能となったため、生体内のタンパク質の成り立ちやタンパク質輸送の基礎研究の発展に大きく貢献する。また、YidC、SecYEG複合体ともに、細菌の生育に必須の膜タンパク質である。そのため、病原菌のYidCやSecタンパク質を標的とした新規の抗生物質の開発等の基盤情報として利用されることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Crystal structures of full-length and peptide-bound SecYEG were determined. The cytoplasmic loop of SecG covers the protein-conducting channel. The cytoplasmic loop of SecG blocks protein translocation. Crystal structures of SecDF in I forms are described. The structures provide insight into an energy-coupling mechanism for Sec machinery. The structures suggest a substrate binding site and a pathway for protons.

研究分野：構造生命科学

キーワード：蛋白質 Sec 膜タンパク質 タンパク輸送 SecYEG X線結晶構造解析 膜組込み 構造生命科学

1. 研究開始当初の背景

生体内で新規にリボソームで合成されたタンパク質の膜組込み過程は、すべての生物に保存された基本的な細胞内機構の一つである。膜の透過障壁能を維持しつつ、タンパク質という巨大な分子を膜へと組込むためには専用の仕組みが必要である。この機構を理解するためには、反応に関わる膜タンパク質の立体構造の情報が必要不可欠である。モデル生物の大腸菌においては、膜タンパク質 YidC, SecYEG 複合体(SecY, SecE, SecG からなる複合体)が膜組込みに関わる。YidC, SecYEG 複合体は、それぞれは哺乳類の Oxa1, Sec61 複合体に相当し、進化的に保存された必須のタンパク質である。これらのタンパク質の 3 Å 分解能を超える分解能での報告はされておらず、膜組込みの分子メカニズムの詳細を議論することが不可能であった。

2. 研究の目的

膜タンパク質の機能発現システムを詳細に理解するために、真正細菌のタンパク質の膜組込みに関わる膜タンパク質 YidC ならびに SecYEG 複合体の立体構造を高い分解能で決定し、その構造情報に基づき機能解析を進める。

3. 研究の方法

結晶化に適した安定な膜タンパク質 YidC または SecYEG 複合体をスクリーニングした。次に結晶構造解析に必要なタンパク質が得られる精製系を確立し、3次元結晶化を進めた。得られた結晶から大型放射光施設 SPring-8 (兵庫県佐用町) を利用した X 線回折実験により、データを収集し、YidC, SecYEG の構造決定を進めた。構造情報に基づいた遺伝学的・生化学的な解析を行い、最終的にこれらを統合して、タンパク質の膜組込のモデルを提唱した。

4. 研究成果

(1) *Bacillus halodurans* YidC, *Escherichia coli* YidC の結晶化は、脂質キュービック相 (LCP) 法を用いて、結晶化に成功した。脂質との結晶化であるこの方法は、自然な状態に近い環境での結晶化である。大型放射光施設 SPring-8 BL32XU (ビームライン) にて X 線回折データの収集を行い、最終的に *Bacillus halodurans* YidC の結晶構造を 2.4 Å 分解能で、また *Escherichia coli* YidC の結晶構造を 3.2 Å 分解能で達成した。どちらの YidC も保存された 5 本の膜貫通領域の配置は一致しており、その 5 本の膜貫通領域には、正電荷をおびた親水的な溝が存在していた。この構造体は YidC だけでなく YidC ファミリータンパク質である哺乳類の Oxa1 や植物の Alb3 と共通する構造体であると考えられる。図 1 に *Bacillus halodurans* YidC の親水的な溝を示した。この親水的な溝には、いくつかの親水性アミノ酸が存在し、そのな

かの一つは高度に保存されたアルギニン残基である。疎水的な環境である膜貫通領域に親水的な溝が存在しているという YidC の構造はこれまでの報告にない極めてユニークな構造体であった。まず始めに、このユニークな構造体が膜内で安定に存在できるかどうかについては、分子動力学シミュレーションによって明らかとした。次に、溝に存在するアルギニン残基が、YidC によるタンパク質膜組込み活性に重要であることを、枯草菌と大腸菌を用いた *in vivo* の解析により明らかとした。その結果、YidC の溝と基質タンパク質の静電相互作用が重要であるという知見が得られた。さらに、YidC の溝が実際に、基質タンパク質の結合サイトとなっていることを *in vivo* クロスリンク実験によって見出した。これらの結果を統合することによって、図 2 に示したモデルを提唱した。

そのモデルを紹介する。はじめに、基質タンパク質の負電荷と YidC の溝に存在する正電荷が相互作用し近接する。このとき、YidC のサイトプラズム側の突出した領域が基質認識に関与するのかもしれない。基質は一時的に YidC の溝と結合する。その後、基質タンパク質の疎水的な領域と、膜の疎水的な領域が相互作用することにより、膜へと基質タンパク質が移行する。基質によっては、膜に存在する膜電位の影響による負電荷をもつ領域が膜の外側に引っ張られる効果もこの膜組込み反応に重要な働きをする。

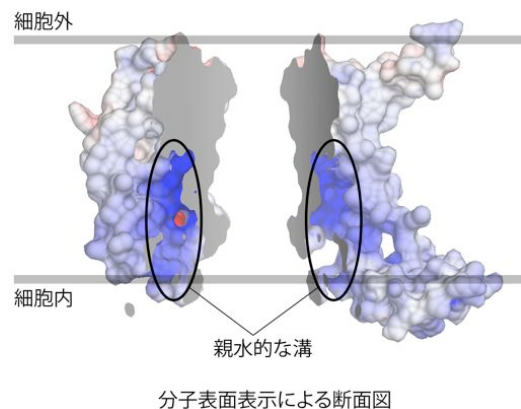


図 1 : YidC の親水的な溝

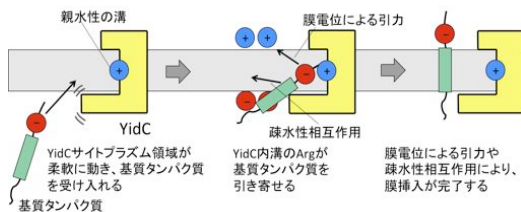


図 2 : YidC によるタンパク質の膜組込み過程のモデル

(2) 高度好熱菌サーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) 由来の SecYEG 複合体の結晶構造をこれまで達成されていない高い分解能 (2.7 Å 分解能) で決定することに成功した。SecYEG を測定試料とするための結晶化は、YidC のときと同様に脂質キュービック相 (LCP) 法で行ない、大型放射光施設 SPring-8 BL32XU (ビームライン) において X 線回折データを収集した。これまで報告された SecYEG の複合体の結晶構造は 4.5 Å 分解能が最高であり、今回得られた構造の分解能は 2.7 Å 分解能と約 2 Å 程度分解能が向上した。その結果、より詳細な議論を可能となった。本構造解析で、特筆すべきことは、これまで不鮮明であったループ (タンパク質複合体中で領域を連結する部分) などの構造が明確となり、SecYEG を構成するほぼすべてのアミノ酸残基の位置を正確に配置した構造モデルを得ることができたことである (図 3)。この結果は、より詳細な SecYEG の議論を可能とする。SecY, SecE の構造体の外観はこれまでの報告と大きな変化はなかったが、特に SecG のループについて新しい知見が得られた。今回の構造解析から、SecG のループが、SecY により形成されているタンパク質の輸送経路を細胞内側から塞ぐように位置していることが判明した。そこで、SecG のループを SecY の細胞内側の表面に固定するために、システインを導入した変異体を作製したところ、ほぼ定量的に SecG と SecY との間にジスルフィド結合が形成した。このジスルフィド結合が形成している間は、SecYEG によるタンパク質輸送の活性が阻害された。一方、還元剤によりジスルフィド結合を切断し、SecG の固定を外すことによって、SecYEG によるタンパク質輸送の活性が復帰した。さらに分子動力学シミュレーションの結果から、今回の結晶構造は SecYEG が閉状態であり、このとき SecG のループが SecYEG の基質と結合する領域を常にカバーしていることが示された。SecG のループが SecYEG の細胞質側をカバーするキャップの役割をしていると考えられる。SecYEG のタンパク質輸送活性を示す時には SecYEG がリボソームと直接相互作用し、SecG のループによるキャップが外れ、タンパク質を輸送していると考えられる。また、図 3 の紫色に表示されているプラグとよばれる部位が細胞外側から蓋をしているという過去の知見と組み合わせて、SecYEG に存在するタンパク質の輸送経路は、細胞膜の両側から閉ざされ、タンパク質の輸送時に開くという新たなモデルを提唱した。さらに、本研究では、基質タンパク質の断片と相互作用している状態の SecYEG の結晶構造も解き明かすことができた。本構造は SecYEG と基質タンパク質との相互作用や、タンパク質の輸送過程における SecYEG の初期の構造変化を議論するのに必要な構造体となった。

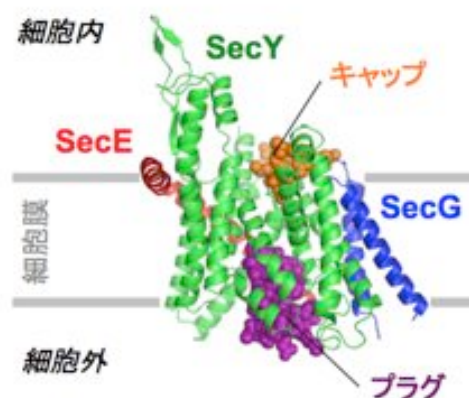


図 3 SecYEG 複合体の立体構造

本研究は、細菌からヒトまで、共通した生命現象のタンパク質の膜組込み過程の解明のために、YidC ならびに SecYEG の結晶構造とその構造に基づく機能解析を進めた。その結果、タンパク質膜組込み過程の新たなモデルを提唱することができた。本結晶構造解析によりアミノ酸残基レベルでの議論が可能となったため、生体内のタンパク質の成り立ちやタンパク質輸送の基礎研究の発展に大きく貢献する。また、YidC, SecYEG 複合体ともに、細菌の生育に必須の膜タンパク質である。そのため、病原菌の YidC や Sec タンパク質を標的とした新規の抗生物質の開発等の基盤情報として利用されることも期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) すべて査読有り

- ① Furukawa A, Yoshikaie K, Mori T, Mori H, Morimoto VY, Sugano Y, Iwaki S, Minamino T, Sugita Y, Tanaka Y and Tsukazaki T. Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF. *Cell Rep.* 19, 895-901 (2017).
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.030
- ② Nishima W, Mizukami W, Tanaka Y, Ishitani R, Nureki O and Sugita Y. Mechanisms for Two-Step Proton Transfer Reactions in the Outward-Facing Form of MATE Transporter. *Biophys J.* 110, 1346-1354 (2016).
DOI: 10.1016/j.bpj.2016.01.027
- ③ Kusakizako T, Tanaka Y, Hipolito CJ, Kuroda T, Ishitani R, Suga H and Nureki O. LCP crystallization and X-ray diffraction analysis of VcmN, a MATE transporter from *Vibrio cholerae*. *Acta Crystallogr. F* 72, 552-557 (2015).
DOI: 10.1107/S2053230X16008931
- ④ Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O and Tsukazaki T. Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a

Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell Rep.* 13, 1561-1568 (2015).

DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.025

- ⑤ Shimokawa-Chiba N, Kumazaki K, Tsukazaki T, Nureki O, Ito K and Chiba S. Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 5063-5068 (2015).

DOI: 10.1073/pnas.1423817112

- ⑥ Kumazaki K, Chiba S, Takemoto M, Furukawa A, Nishiyama K, Sugano Y, Mori T, Dohmae N, Hirata K, Nakada-Nakura Y, Maturana AD, Tanaka Y, Mori H, Sugita Y, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T and Nureki O. Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509, 516-520 (2014).

DOI: 10.1038/nature13167

- ⑦ Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A, Mori H, Tanaka Y, Dohmae N, Ishitani R, Tsukazaki T and Nureki O. Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci. Rep.* 4, 7299 (2014).

DOI: 10.1038/srep07299

- ⑧ Kumazaki K, Tsukazaki T, Nishizawa T, Tanaka Y, Kato HE, Nakada-Nakura Y, Hirata K, Mori Y, Suga H, Dohmae N, Ishitani R and Nureki O. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from *Bacillus halodurans*. *Acta Crystallogr. F* 70, 1056-1060 (2014).

DOI: 10.1107/S2053230X14012540

- ⑨ Mio K, Tsukazaki T, Mori H, Kawata M, Moriya T, Sasaki Y, Ishitani R, Ito K, Nureki O and Sato C. Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. *J. Struct. Funct. Genomics* 15, 107-115 (2014).

DOI: 10.1007/s10969-013-9168-4

[学会発表] (計 5 7 件)

- ① Tomoya Tsukazaki 「Snapshots of the proton-driven protein translocation motor」 *EMBO Conference / Protein Translocation and cellular Homeostasis*, 2017年3月18日～22日, ドブプロニク (クロアチア)

- ② Tomoya Tsukazaki 「Structure of YidC reveals a mechanism of Sec-independent membrane protein insertion」 *The 2nd CU-NAIST SYMPOSIUM 2015*, 2015年12月16日, チュラロンコン (タイ)

- ③ Tomoya Tsukazaki 「Structures of Membrane Protein Insertase YidC」 *Gordon Research Conferences: Membrane Protein Folding*, 2015年6月21日, ボストン(アメリカ合衆国)

- ④ 「Structure of YidC reveals a mechanism of Sec-independent membrane protein insertion」 *2014 Joint Symposium, Integrative Microbiology*, 2014年10月6日 ミネソタ(アメリカ合衆国)

[図書] (計 6 件)

- ① 塚崎智也 [国際文献社] 生化学「タンパク質を膜透過させる分子装置の活写」(2016) 153, p114-118

- ② 塚崎智也 [羊土社] 実験医学(増刊) 構造生命科学で何がわかるのか, 何ができるのか 田中啓二, 若槻壮市編「2つの Sec モータータンパク質による蛋白質膜透過のしくみ」(2014) 32, p1571-1575

[その他]

ホームページ等

- ① 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・塚崎研

<http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>

- ② プレスリリース「細胞膜を越えてタンパク質を輸送するモータータンパク質の詳細な作動原理を解明～新たな抗生物質の開発に期待～」

<http://www.naist.jp/pressrelease/2017/05/003760.html>

- ③ プレスリリース「細胞膜を越えるたんぱく質輸送の新たな機構を解明 ～通り道を塞ぐキャップ開閉して制御 細胞内における基本的な生命現象の理解へ～」

<http://www.naist.jp/pressrelease/2015/11/000626.html>

- ④ プレスリリース「タンパク質膜組込装置 YidC の機能に重要な性質を発見 ～細胞の基本的なしくみの解明に向けて～」

<http://www.naist.jp/pressrelease/2015/04/000640.html>

- ⑤ プレスリリース「バイオサイエンス研究科膜分子複合機能学研究室の塚崎智也准教授らの研究グループが、タンパク質を細胞膜に組み込むメカニズムを解明しました」

<http://www.naist.jp/news/2014/04/001102.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚崎 智也 (TSUKAZAKI, Tomoya)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号： 8 0 4 3 6 7 1 6

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

田中 良樹 (TANAKA, Yoshiki)

奈良先端科学技術大学院大学・

バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号： 1 0 6 3 2 3 3 3