

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22395

研究課題名(和文)新しい膜蛋白質含有ナノ粒子の構築と蛋白質膜組過程の精密探査

研究課題名(英文)Preparation of membrane protein-containing nanoparticles and precise observation of membrane protein dynamics

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)：膜蛋白質の分子メカニズムを詳細に理解するためには1ユニットの膜蛋白質を測定できる新しい測定手法が必要であった。本研究では膜蛋白質含有ナノ粒子に着目し、2種類の膜蛋白質を組み込んだナノディスクを調製した。どちらも条件を最適化することで膜蛋白質を特定の2方向から高速原子間力顕微鏡で観察できた。さらに、1ユニットの膜タンパク質の動態を観測すべく、研究を進めた。本手法は今後の膜蛋白質の動態観察への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜蛋白質の分子メカニズムを理解するには、膜に埋め込まれた状態で1分子観察する必要がある。本研究の2つの膜蛋白質の測定の成功例から、本手法はさまざまな膜タンパク質に適応可能な手法である。たとえば、次のような膜蛋白質の動態観察に有用であると考えられる。膜を隔ててシグナルを伝達する膜タンパク質では、本手法を用いることで膜の両側の構造変化を一度に確認することができ、リアルタイムでシグナル伝達の詳細を構造生物学的に理解できる。また、大きな構造変化を伴って物質を輸送するABCトランスポーターの脂質中での動態解析に適切な手法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism of membrane proteins in detail, a new method for monitoring a single unit of membrane protein complex was needed. In this study, we focused on membrane protein-containing nanoparticles and prepared nanodiscs containing two types of membrane proteins. In both cases, by optimizing the conditions, the membrane proteins could be observed by high-speed atomic force microscopy from two specific directions. Further studies were carried out to observe the dynamics of a single unit of membrane protein. This technique is expected to be applied to the observation of membrane protein dynamics in the future.

研究分野：構造生命科学

キーワード：膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛋白質には、水溶液中で働く蛋白質（可溶性蛋白質）と、膜に埋め込まれた状態で働く蛋白質（膜蛋白質）がある。研究代表者は「細胞内で合成された蛋白質の膜を越えた輸送や膜への組み込み過程」に興味をもち研究を進めている。これらの反応には特定の膜蛋白質が関わっているが、これらの動態を探るためには1ユニット（反応最小単位）での解析が必要な段階となっている。可溶性蛋白質は水溶液中で安定に存在するものが多く、溶液状態のまま相互作用解析や分光計を用いた解析など多彩な手法で研究を進めることが可能である。しかしながら、多くの膜蛋白質は、生体内と同様に脂質二重層に埋め込まれている状態で機能する。その場合、膜蛋白質の解析では、細胞膜の状態をそのまま用いたり、リポソームや平面膜に再構成したりして解析を行うが、これらの方法では、膜の占める領域が広く、膜の流動性なども問題となり、詳細な解析の妨げとなっている。

2. 研究の目的

上記の制約を打破するため、脂質と膜蛋白質とポリマーで形成される膜蛋白質含有ナノ粒子を用いた1ユニット解析を計画した。ある特定のポリマーを用いれば、ポリマーで囲まれた脂質と膜蛋白質含有粒子を作成する事ができる。これは、膜蛋白質の解析法の一つとして注目されている技術である、たとえば、脂質と膜蛋白質と膜骨格蛋白質で形成されるナノディスクを用いた研究の報告がある。また、新しいタイプのナノディスクとしてポリマーを利用する試みがある。本研究では、このナノディスクや新しいタイプのナノ粒子系を利用して、膜蛋白質の動的なメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

これまでの高速 AFM による解析にて、膜蛋白質の動態観察には生体から抽出した膜や、膜蛋白質を再構成したリポソームが用いられてきた。しかしながら、これらは膜の流動性が詳細な解析の妨げになったり、膜の片側からしか測定できなかつたりするなど問題点があった。そこで本研究では、MSP ナノディスクと呼ばれる粒子を用いた。このナノディスクは脂質と膜骨格蛋白質 (MSP: membrane scaffold protein) から構成されるナノ粒子である。ナノディスク構成時に膜蛋白質が存在している場合に、膜蛋白質がナノディスク内に取り込まれ、膜蛋白質含有ナノディスクが構築される (図1)。これを用いることで膜の流動性を最小限に膜の両側を一度に観察することができる。MSP のサイズを変更することで、ナノディスクのサイズは直径約 70 Å から 500 Å まで変化し、さまざまな大きさの膜蛋白質の測定に利用できる。本研究ではモデル膜蛋白質として、蛋白質膜透過チャネルとなる SecYEG 複合体とマグネシウムイオントランスポーター MgtE を利用した。

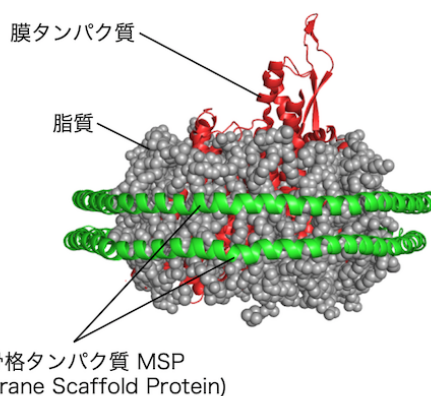


図1 膜蛋白質含有ナノディスク。
膜蛋白質、膜骨格蛋白質 (MSP)、脂質 (灰色) から構成されるナノ粒子である。

4. 研究成果

(1) 蛋白質膜透過の観察の試み

はじめに蛋白質膜透過チャネルである膜蛋白質複合体 SecYEG と膜透過駆動モーター蛋白質である SecA ATPase の研究成果を紹介する。細胞質で合成された特定の新生ポリペプチド鎖はシャペロンなどによりアンフォールドの構造を保ったまま、SecYEG-SecA 複合体へと受け渡される。その後、ATP の加水分解のエネルギーを利用して SecA が大きな構造変化を繰り返すことで、この新生ポリペプチドを SecYEG チャネルへと押し込み、膜透過を達成する。しかしながら、この反応をリアルタイムで追跡した例はない。これを達成すべく研究を進めた。SecYEG と SecA の複合体を安定に形成させるため、融合蛋白質を用い、ナノディスクに再構成させた。SecYEG を含むナノディスクを2種類の特定基盤 (ストレプトアビジン 2 次元結晶表面とマイカ表面) 上で高速 AFM 観察を行った。ストレプトアビジン 2 次元結晶上では、ナノディスクの膜表面が測定基盤に対して水平な上向きで固定されていた。高速 AFM 観察により、高さ約 11 nm の球状の粒子が確認された (図 2A)。対照的に、マイカ表面上ではナノディスクの膜表面が測定基盤に対して垂直な横向きで固定されていた。雲母基板上への吸着は非特異的に起こるため、ランダムな配向になる可能性もあったが、バッファの条件を検討した結果、均一な雪だるま状の粒子が確認できた。この粒子はナノディスクの膜表面が基板に対して垂直となり SecYEG が「横

向き」であると考えられた (図 2B)。さらに、ストレプトアビジン溶液を添加して調製したナノディスクを同様に観察したところ、雪だるま状の粒子に2つのタンパク質が結合していることが認識できた。ストレプトアビジンが結合している領域がペリプラズム側に相当するので、間違いなくナノディスクを「横向き」に固定できたと考えられる (図 2B)。これらの観察結果は測定基盤を変更するなど観測条件を整えば、選択的に膜蛋白質を含むナノディスクを真上からと横向きからの2方向から高速 AFM で観測できることを実証したものである。さらに基質を加えて、高速 AFM で測定を行なったところ、蛋白質の膜透過中間体のような構造が確認された。高速 AFM の像は、針先の質によって解像度が大きく変わってしまう。蛋白質の膜透過を世界で初めて可視化すべく、さらなる測定条件や基質の最適化を進めている。アイデアの一つとしては、基質のC末端側に大きなドメインを付加して基質を見やすくさせることである。また、基質の変異体を用いることで、基板へ基質をやや強く相互作用させることで基質の動きを制限し、より見やすくする方法も模索している。本研究により、蛋白質膜透過反応のリアルタイム観察への準備がほぼ整った。

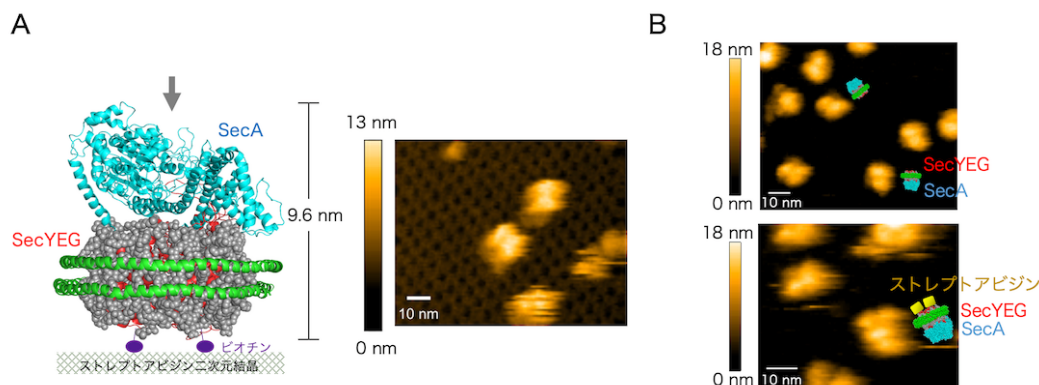


図 2 高速 AFM による SecYEG 含有ナノディスクの解析. A、ストレプトアビジン二次元結晶基板上での SecYEG-SecA 含有ナノディスクの観察. SecYEG-SecA 含有ナノディスクを「上向き」に固定し(左)、高速 AFM で観察した(右). B、雲母基板上での SecYEG-SecA 含有ナノディスクの観察. SecYEG-SecA 含有ナノディスクを「横向き」に固定し高速 AFM で観察した。

(2) マグネシウムトランスポーターの観察

次に、この測定手法を他の膜蛋白質にも適応させた。マグネシウムトランスポーター MgtE は 2 量体で機能する膜蛋白質で、モノマーあたり 5 本の膜貫通領域と同程度の大きさの可溶性ドメインを持っている。過去の報告から MgtE の可溶性ドメインは、マグネシウムイオン存在下では硬い構造、非存在下では緩んだ構造をとることが示唆されている。MgtE を上記の Sec 蛋白質の系と同様にナノディスクに再構成させ、ストレプトアビジン 2 次元結晶ならびにマイカ基板上で高速 AFM を用いて観察を行った。Sec の場合と同様に MgtE を含むナノディスクも、真上からと横向きからの 2 方向から観察することができた。マグネシウムイオン存在下での高速 AFM の画像から、可溶性ドメインが密にパックしたコンパクトな構造体をとることを示した。一方、マグネシウムイオン非存在下では、断続的に可溶性ドメインが揺らいでおりフレキシブルに動く

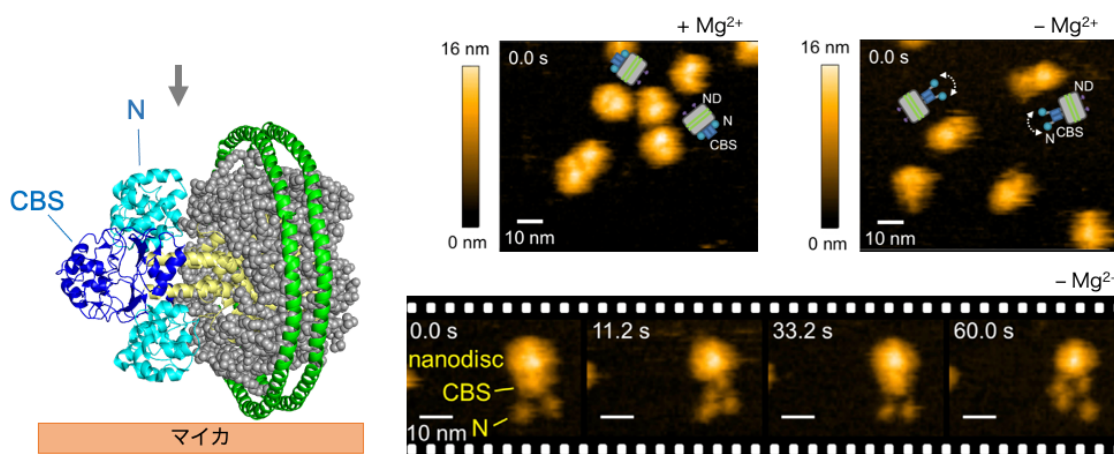


図 3 「横向き」に固定した MgtE 含有ナノディスクの解析. MgtE 含有ナノディスクを雲母基板上に固定し(左)、高速 AFM によってマグネシウムイオン存在下(中上)と非存在下(右上)の条件で観察した。マグネシウムイオン非存在下での観察ではリアルタイムで N ドメインと CBS ドメインの揺らぎが観測できた(右下)。

ことを示した (図 3)。本研究の高速 AFM の観察では、リアルタイムで MgtE のドメイン構造の変化を見出した最初の報告例となった。この手法が有効であることが 2 つの典型的な膜蛋白質で示されたため、本手法は他の膜蛋白質の分子メカニズムの解明に有用な手段の一つとなる。また、本件研究では、本技術を他の膜蛋白質の解析に応用させる準備を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tanaka Yoshiaki, Yoshikaie Kunihiro, Takeuchi Azusa, Ichikawa Muneyoshi, Mori Tomoyuki, Uchino Sayaka, Sugano Yasunori, Hakoshima Toshio, Takagi Hiroshi, Nonaka Gen, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 6
2. 論文標題 Crystal structure of a YeeE/YedE family protein engaged in thiosulfate uptake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaba7637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aba7637	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 Daimon Yasushi, Narita Shin-ichiro, Miyazaki Ryoji, Hizukuri Yohei, Mori Hiroyuki, Tanaka Yoshiaki, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori	4. 巻 117
2. 論文標題 Reversible autoinhibitory regulation of Escherichia coli metalloproteinase BepA for selective barrel protein degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 27989 ~ 27996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2010301117	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 塚崎 智也	4. 巻 92
2. 論文標題 構造解析からみえてきたタンパク質膜透過駆動モーター膜タンパク質SecDFの仕組み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 717 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920717	査読の有無 無
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 Inoue Michio, Sakuta Nanami, Watanabe Satoshi, Zhang Yuxia, Yoshikaie Kunihiro, Tanaka Yoshiaki, Ushioda Ryo, Kato Yukinari, Takagi Junichi, Tsukazaki Tomoya, Nagata Kazuhiro, Inaba Kenji	4. 巻 27
2. 論文標題 Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.03.106	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 Tsukazaki Tomoya	4. 巻 38
2. 論文標題 Structural Basis of the Sec Translocon and YidC Revealed Through X-ray Crystallography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Protein Journal	6. 最初と最後の頁 249 ~ 261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10930-019-09830-x	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 Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 20
2. 論文標題 A snapshot of membrane protein insertion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e49034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201949034	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 Sasaki Masaru, Nishikawa Hanako, Suzuki Sonomi, Moser Michael, Huber Maria, Sawasato Katsuhiro, Matsubayashi Hideaki T., Kumazaki Kaoru, Tsukazaki Tomoya, Kuruma Yutetsu, Nureki Osamu, Ueda Takuya, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 294
2. 論文標題 The bacterial protein YidC accelerates MPlase-dependent integration of membrane proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18898 ~ 18908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011248	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 Takamitsu Haruyama, Tomoya Tsukazaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Real-time observation of membrane protein-embedded nanodiscs by high-speed atomic force microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 野口研究所時報	6. 最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長池航, 板家成良, 春山隆充, 塚崎智也, 内橋貴之
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるタンパク質膜輸送装置Secの動態観察
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第46回討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長池航, 板家成良, 春山隆充, 塚崎智也, 内橋貴之
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜輸送装置Secの動態観察
3. 学会等名 令和2年度中部支部講演会および 総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長池航, 春山隆充, 塚崎智也, 内橋貴之
2. 発表標題 Observation of Substrate Binding Sec Translocon and Structural Change of SecA with HS-AFM
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the BSJ (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中良樹, 吉海江国仁, 内野清香, 塚崎智也
2. 発表標題 硫黄トランスポーターの結晶構造解析
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 塚崎智也
2. 発表標題 タンパク質膜透過チャネルSecトランスロコンを經由するタンパク質輸送のメカニズム
3. 学会等名 岩手大学放射光利用セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内梓， 田中良樹， 吉海江 国仁， 内野清香， 高木博史， 塚崎智也
2. 発表標題 新奇硫黄系トランスポーターの構造と機能
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 浜窪隆雄， 津本浩平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 538(307-315)
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良先端大 構造生命科学 研究業績 https://bsw3.naist.jp/tsukazaki/publication.html
--

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			
ロシア連邦	味の素 - ジェネチカ・リサーチ・インスティテュート社			