

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24687016

研究課題名(和文) 膜タンパク質の膜組み込み過程の解明

研究課題名(英文) Structural basis of membrane protein insertion

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) 21,500,000円、(間接経費) 6,450,000円

研究成果の概要(和文)：細胞におけるタンパク質の膜組み込み過程は、すべての生物に共通した必須の機構である。本研究では膜タンパク質の機能発現システムを詳細に理解する為に、真正細菌のタンパク質の膜組み込みに関わる膜タンパク質YidC(内膜の膜組み込みに関与)の構造を2.4オングストローム分解能で決定し、構造情報に基づく機能解析を進めた。最終的に、YidCは電気的な相互作用で基質タンパク質を一旦親水的な凹みにキャプチャーした後、膜へと組み込む新しいモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Protein integration is an essential process in all living cells. In this study, we determined the crystal structure of YidC, an membrane protein insertase, at 2.4 Å resolution and showed by structural-based functional analyses that YidC provides a hydrophilic cavity for membrane protein insertion. Finally, we proposed a new model of the molecular mechanism of YidC-mediated protein insertion into the cytoplasmic membrane.

研究分野：生物学

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 トランスロコン 膜組み込み 膜透過 YidC Sec 膜タンパク質 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

すべての生物は、細胞膜で囲まれた細胞を生命の基本単位としている。細胞膜の成り立ちや働きについて理解を深めることは、細菌からヒトまで共通した基本的な生命現象を理解する上では、欠かせない。細胞膜には、タンパク質を細胞膜に組み込む働きを担っている膜タンパク質 YidC が存在している。この膜タンパク質は生命の維持に不可欠な因子である。しかしながら、これまでの研究において YidC の立体構造は(ホモログも含め)決定されておらず、YidC によってタンパク質が細胞膜へと組み込まれる分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

細胞におけるタンパク質の膜組み込み過程は、すべての生物に共通した必須の機構である。本研究では膜タンパク質の機能発現システムを詳細に理解する為に、真正細菌のタンパク質の膜組み込みに関わる膜タンパク質 YidC の立体構造を決定し、その構造に基づく機能解析を進める。結果を統合して YidC によるタンパク質の膜組み込みの分子メカニズムの可視化を目指す。

3. 研究の方法

膜タンパク質の膜組み込みの分子メカニズムを解明するために、膜タンパク質の膜組み込みに関与する YidC の構造を大型放射光施設 SPring-8(兵庫県佐用郡)を利用した X線結晶構造解析により決定し、構造を基にした遺伝学的・生化学的解析を進めた。

4. 研究成果

本研究において、細菌 *Bacillus halodurans* 由来の YidC の結晶構造を 2.4 Å 分解能で決定した(図1)。YidC の結晶化は脂質キュービック相(LCP)法を用いて、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。

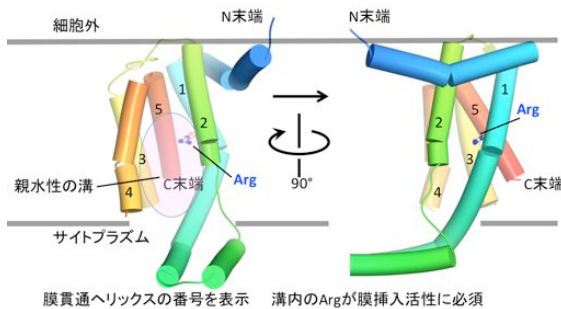


図1: *Bacillus halodurans* YidC の結晶構造

YidC は主に5本の膜貫通ヘリックスから構成されており、そのほとんどが膜に埋もれた構造だった。YidC の内部には大きな溝が存在していた。その溝はいくつかの親水的なアミノ酸残基から構成され、正の電荷を帯びていた。YidC の「親水的な溝」が、疎水的

である細胞膜の中に存在しているというユニークな構造体(図2)であったが、この状態で生体膜に存在しうることを分子動力学シミュレーションや生化学的解析で示した。

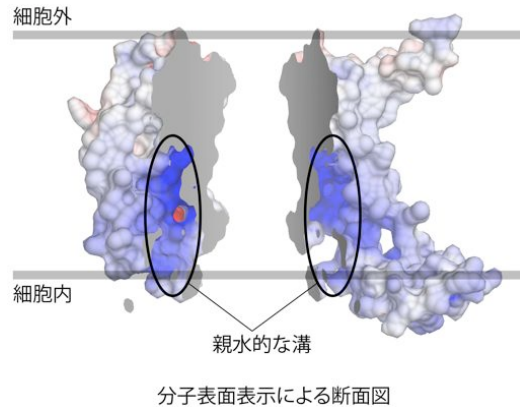


図2: YidC の親水的な溝

次に、YidC の構造情報に基づいて、枯草菌の YidC を用いた遺伝学的解析や、*in vivo* クロスリンク実験によって、YidC は親水的な溝と基質膜タンパク質とが静電的な相互作用で一時的に結合し、その後基質膜タンパク質が膜に組み込まれるという新規のモデルを提唱した(図3)。

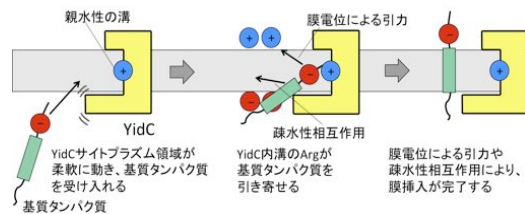


図3: YidC によるタンパク質膜組み込み

本研究は、細菌からヒトまで、共通した生命現象のひとつである「YidC によるタンパク質膜組み込み過程」の詳細を、YidC の結晶構造とその構造に基づく機能解析によって、初めて解明した。図3に示したモデルは、単純な基質タンパク質の膜組み込み過程の提唱であるが、今後は多くの研究者が本研究で決定した YidC の構造情報を基に、より複雑な膜タンパク質の組み込み過程について解析を進めるだろう。本成果は、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 は細菌の生育に必須の膜タンパク質であるため、病原菌の YidC 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 5 件) 5 件とも査読有り

- ① 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
- ② 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* in press.
- ③ Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H and Nureki O. Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* 496, 247-251(2013). DOI:10.1038/nature12014
- ④ Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, Newstead S, Ishitani R and Nureki O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 11343-11348 (2013). DOI: 10.1073/pnas.1301079110
- ⑤ Kato HE, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana AD, 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

[学会発表] (計 12 件)

- ① 塚崎智也, 「Sec 蛋白質によらない 1 回膜貫通型膜蛋白質の膜組み込み」 **遺伝研究会：単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究**, 2014 年 3 月 25 日～26 日, 国立遺伝学研究所 (三島市)
- ② Furukawa A, Kumazaki K, Mori H, Nureki O and Tsukazaki T. 「Site-directed in vivo photo-cross-linking analysis for identification of interaction sites in *E.coli* YidC」 **Gordon Research Conference : Protein Transport Across Cell Membranes** 2014 年 3 月 9 日～14 日, ホテルガルベス (アメリカ合衆国ガルベストン)
- ③ Kumazaki K, Chiba S, Takemoto M, Furukawa A, Sugano Y, Mori T, Tanaka Y, Sugita Y, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T and Nureki O. 「Crystal structure of YidC and a

mechanism of membrane protein insertion」 **Gordon Research Conference : Protein Transport Across Cell Membranes** 2014 年 3 月 9 日～14 日, ホテルガルベス (アメリカ合衆国ガルベストン)

- ④ 塚崎智也, 「Sec 膜タンパク質複合体の結晶構造解析」 **SPRUC 拡大研究会・SPring-8 利用ワークショップ-SPring-8 とユーザーのさらなる連携を目指して-**, 2014 年 2 月 1 日～2 日, SPRing-8 (兵庫県佐用町)
- ⑤ 古川新, 熊崎薫, 濡木理, 塚崎智也. 「Interaction analysis of periplasmic domain of *E.coli* YidC by site directed in vivo photo-cross-linking」 **第 36 回日本分子生物学会年会**, 2013 年 12 月 3 日～6 日, 神戸ポートピア (神戸市)
- ⑥ 森博幸, 三登一八, 町田裕紀子, 塚崎智也, 伊藤維昭, 秋山芳展 「タンパク質膜透過促進因子 SecDF の構造と機能」 **第 51 回生物物理学会年会**, 2013 年 9 月 25 日～27 日, 京都国際会館 (京都市)
- ⑦ 塚崎智也, 「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコンの構造生物学」 **第 7 回 構造生物学に関する先端技術講演会**, 2013 年 9 月 4 日, 九州大学 (福岡市)
- ⑧ 塚崎智也, 「蛋白質の膜透過を駆動する膜蛋白質 SecDF の構造と機能」 **分子モーター討論会**, 2013 年 7 月 19 日～20 日, 東京大学 (東京都文京区)
- ⑨ 塚崎智也, 「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコンの構造生物学」 **理工研究城公開セミナー**, 2013 年 2 月 20 日金沢大学 (金沢市)
- ⑩ 塚崎智也, 「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコンの構造生物学」 **バイオサイエンス研究科セミナー**, 2013 年 2 月 13 日, 奈良先端科学技術大学院大学 (生駒市)
- ⑪ Takemoto M, Kusakizako T, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R and Nureki O. 「LCP crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of SecYEG translocon」 **Nagoya Symposium : Frontiers in Structural Physiology**, 2013 年 1 月 22 日～24 日, 名古屋大学 (名古屋市)
- ⑫ 塚崎智也, 草木迫司, 熊崎薫, 石谷隆一郎, 濡木理. 「LCP 法によるタンパク質膜透過装置 SecYEG の結晶化」 **第 12 回日本蛋白質科学会年会**, 2012 年 6 月 20 日

[図書] (計 2 件)

- ① 塚崎智也, 濡木理. **[化学同人] 膜タンパク質構造研究** 岩田想 編 「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコン複合体」 (2013) p44-52
- ② 森博幸, 塚崎智也. **[国際文献社] 化学と生物** 「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」 (2013), 51(1), p28-35

[その他]

ホームページ等

- ・奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 膜分子複合機能学(塚崎研究室) <http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>
- ・さきがけ ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術 研究者紹介
<http://www.jst.go.jp/presto/struct-lifesci/researchers/10403tsukazaki/index.html>
- ・プレスリリース：タンパク質を細胞膜に組み込むメカニズムを解明
http://www.naist.jp/pressrelease/detail_j/topics/1752/
- ・ライフサイエンス新着論文レビュー：膜組み込み酵素 YidC によるタンパク質の細胞膜への組み込みの分子機構
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8680>

報道関連

- ・化学工業日報 (2014年4月23日) 6面に掲載, 「たん白質を細胞膜に組み込む仕組み解明 働き担う YidC の立体構造決定 新規薬剤開発の基盤へ」

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(PI)
研究者番号：80436716

(2)主な研究協力者

濡木 理
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：10272460

熊崎 薫
東京大学・大学院理学系研究科・大学院生

千葉 志信
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号：20523517