

令和元年5月31日現在

機関番号：14603

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26119007

研究課題名(和文) タンパク質分泌システムの活写

研究課題名(英文) Dynamics of protein secretion

研究代表者

塚崎 智也(Tomoya, Tsukazaki)

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) 102,200,000円

研究成果の概要(和文)：細菌におけるタンパク質分泌は生命必須の仕組みである。この反応には一連のSecタンパク質群が関与するが、どのようにタンパク質を輸送しているのかについて詳細な分子メカニズムは不明のままである。本研究では、X線結晶構造解析や高速原子間力顕微鏡によりSecタンパク質の働きを明らかとすべく研究を進めた。その結果、様々な状態のSecタンパク質の構造を明らかとすると同時にリアルタイムユニット解析でタンパク質分泌反応を観察できる系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の分泌反応は、生命が生きていく上で欠かせない機構の一つである。しかし、その分子メカニズムは未だなお不明な点が多い。タンパク質の分泌反応に関わるタンパク質はSecタンパク質群であり、これらの働きを明らかとすることは生命を理解する情報を与えるため、本研究は基盤科学として意義深い。そこで、生物物理学的な手法を用いて研究をすすめ、研究の成果となる17報の英語論文を世界に向けて発表した。

研究成果の概要(英文)：Protein secretion in bacteria is an essential mechanism, which is mediated by Sec proteins. However, the detailed molecular mechanism of how Sec proteins are transported still remains unclear. In this study, we performed X-ray crystallographic analysis and observation of Sec proteins using high-speed atomic force microscope to elucidate the mechanism. As the result, the system which could observe the protein secretion reaction by real-time single unit analysis was established, while the structures of Sec proteins in various forms was solved.

研究分野：構造生命科学

キーワード：トランスロコン SecYEG SecDF SecA 蛋白質 分泌 膜透過 構造生物学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真正細菌において、細胞質でリボソームにより合成されたタンパク質が膜を越えて輸送される分泌過程は、すべての生物に保存されており、真核細胞における細胞質から小胞体内腔への輸送に相当する。Sec トランスロコン (SecYEG 複合体) はそれ自体、受動的な「タンパク質膜透過チャネル」であり、単独では機能しない。翻訳語の分泌過程において、前駆体タンパク質は N 末端側にシグナル配列が付加された状態で合成された後、フォールディングがおさえられた状態で SecA へと受け渡される。SecA は基質を伴った状態で SecYEG チャネルと会合し、ATP の加水分解に伴う大きな構造変化を繰り返すことで、前駆体タンパク質を Sec トランスロコン内へと、段階的に押し込む。一方、ペリプラズム側では、プロトン駆動型の SecDF が基質タンパク質を引っ張り出す構造変化を繰り返し、膜透過を駆動する。翻訳と共役した膜透過においては、N 末端側のシグナル配列が翻訳され、リボソームから出てきた翻訳途上の段階で、SRP (signal recognition particle) によって膜へとターゲットングされる。その後、翻訳と共役した (co-translational) 膜透過が起こる。この系は、タンパク質の分泌だけでなくタンパク質の膜への組み込みにも利用される。タンパク質という巨大な分子を膜透過させる為には、複雑に各因子が絡み合い過渡的な準安定状態の複合体を形成し、ダイナミックな構造変化を伴いながら機能しているとされている。タンパク質の膜透過反応については、1970 年頃から数多くの研究成果が報告され、Sec タンパク質群の機能と重要性が示されてきたが、タンパク質分泌反応の詳細なメカニズムの解明の為には、これらの立体構造情報が必要であった。2002 年に SecA の初めての X 線構造解析が達成されて以降、研究代表者らをはじめいくつかのグループが次々と Sec タンパク質の結晶構造を報告した。これら構造情報に基づき、Sec タンパク質の機能解析が多く進められ、原子レベルでタンパク質分泌機構について議論が可能となりつつある (Review: Rapoport, *Nature* 2007; Park and Rapoport, *Annu. Rev. Biophys.* 2012; 塚崎&瀧木, 膜タンパク質構造研究 (岩田想 編) 2013)。しかし、実際にどのような構造変化をとらながら機能しているのかについては不明である。

2. 研究の目的

生物の基本的な細胞内機能の一つである「Sec トランスロコンを介したタンパク質分泌過程」を動画として理解すべく研究を進める。タンパク質分泌過程は 1975 年にシグナル仮説 (1999 年ノーベル医学生理学賞) の提唱がされるなど、古くから数多くの研究が進められてきた。近年、各 Sec 因子の詳細構造の決定がなされ、タンパク質分泌過程の新たなモデルが提唱されるなど活発な議論が続いているが、未だどのようにタンパク質を輸送しているのかの詳細は不明である。タンパク質分泌システムの完全理解には、基質タンパク質との複合体のような「準安定状態の構造情報」と「時間依存的な 1 ユニットの動態解析」を組み合わせることが必要である。本研究では、準安定状態を X 線結晶構造解析で決定することで構造的な基盤を固めつつ、ナノディスクと呼ばれる膜タンパク質を膜へと組み込んだナノ粒子を用いた新しい一分子動的計測によりタンパク質分泌過程のダイナミックな構造変化を可視化する。

3. 研究の方法

本研究の主要な業績として、(1) タンパク質駆動モーター SecDF の動態解析、(2) ナノディスクを用いた膜タンパク質一分子動態観察があり、それらについて報告を行う。

(1) タンパク質駆動モーター SecDF の動態解析

Sec トランスロコンを介した細菌のタンパク質分泌過程において、タンパク質駆動モーターとして働く SecDF 膜タンパク質がある。X 線結晶構造解析により SecDF の F 型とよばれる構造体が明らかとなり、続く機能解析から SecDF はプロトン駆動力を利用し、ダイナミックな構造変化をすることが示唆された (Tsukazaki *et al.*, *Nature* 2011)。しかしながら、SecDF の一つの構造解析から SecDF の分子メカニズムの理解には至らないため、本研究では SecDF の別状態の構造体を明らかとすべく、X 線結晶構造解析を進めた。X 線結晶構造解析後は SecDF の *in vivo*, *in vitro* の機能解析を進めた。

(2) ナノディスクを用いた膜タンパク質一分子動態観察

Sec トランスロコンを介したタンパク質反応を可視化するためには、一ユニットのタンパク質複合体を用いたリアルタイム動態探査が必要である。本研究では、膜タンパク質と脂質と膜骨格タンパク質を用いて、膜タンパク質含有ナノディスクを作成し、Sec トランスロコンの動態探査にむけて、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) による条件検討ならびに観察を進めた。

4. 研究成果

(1) タンパク質駆動モーター SecDF の動態解析 (Tsukazaki, *FEMS Microbiol. Lett.* 2018 ; Furukawa *et al.*, *Structure* 2018; Furukawa *et al.*, *Cell Rep.* 2017)

SecDF の別状態の構造解析をすべく、結晶化条件を変更させたり、変異体を用いたりするなどして多くの結晶化を試みた。最終的に、新たに SecDF の I 型構造 (膜貫通領域にトンネルあり、なしの 2 構造)、超 F 型構造を見出した。SecDF は 12 本のアルファヘリックスから構成される膜貫通領域と、それと同サイズの親水性のペリプラズム領域から構成される。そのペリプラズム領域は、P1-base, P1-head, P4 3 つのドメインからなる。以前報告された F 型構造では、P1-base, と P4 領域が相互作用し 8 本の β 構造から構成される β シート構造が確認されており、

P1-head 領域は膜方向に突出していた。一方 I 型構造では P1-head 領域が膜から離れ P1-base 領域からペリプラズム側へ突出していた。超 F 型構造では F 型構造で確認された β シート構造が、 β バレル構造に変化しているというドラスティックな構造変化を起こしており、P1-head 領域は F 型構造よりもさらに膜方向に近づいた構造体となっていた。一連の研究にて SecDF のペリプラズム領域はドメインの位置が変化するだけでなく、 β 構造からなる構造体のフォールディング変化も起こることが示唆された。これらの構造体が実際に、生体内で存在することを、部位特異的クロスリンク実験により確認をした。また、クロスリンクにより SecDF の構造体を固定した場合は、SecDF によるタンパク質分泌活性が損なわれるため、SecDF が構造解析によって示されたように構造変化を繰り返すことが必要であることが示唆された。さらに、膜貫通領域に存在する保存されたアスパラギン酸残基は SecDF の活性に必要であり、分子動力学計算によって膜貫通領域のトンネル形成に重要な役割を果たすことを示した。さらに、このアスパラギン酸残基が、超 F 型構造を形成するために必須であることも示した。これらの結果は、プロトン透過によるエネルギーが膜貫通領域から離れたペリプラズム側に伝播し SecDF が機能していることを示唆する。これらの情報を統合し、SecDF が駆動する詳細なタンパク質分泌反応モデルを提唱した。

(2) ナノディスクを用いた膜タンパク質一分子動態観察 (Haruyama *et al.*, *Structure* 2019)

細菌のタンパク質膜透過チャネルである膜タンパク質複合体 SecYEG と膜透過駆動モータータンパク質である SecA ATPase のフュージョン複合体をビオチン標識した後、ナノディスクに再構成した。これで、最低限のタンパク質膜透過活性を示す 1 ユニットとなる。フュージョンタンパク質 SecYAEG 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。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。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、選択的に膜タンパク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。現在、タンパク質膜透過反応の追跡を行なっている。

次に、この手法は新たなものであり他の膜タンパク質にも適応させた。マグネシウムトランスポーター MgtE は 2 量体で機能する膜タンパク質で、膜貫通領域と同程度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されている。本研究では MgtE を上記の Sec タンパク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盤上で高速 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ことを示した。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 つの典型的な膜タンパク質で示されたため、本手法は他の膜タンパク質の分子メカニズムの解明に有用な手段の一つとなる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件) すべて査読あり

- ① *Tsukazaki T. Structural Basis of the Sec Translocon and YidC Revealed Through X-ray Crystallography. *The Protein Journal* (2019) in press.
DOI: 10.1007/s10930-019-09830-x
- ② Inoue M, Sakuta N, Watanabe A, Zhang Y, Yoshikaie K, Tanaka Y, Ushioda R, Kato Y, Takagi J, Tsukazaki T, Nagata K, and *Inaba K. Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay. *Cell Rep.* 27, 1221-1230 (2019)
DOI: 10.1016/j.celrep.2019.03.106
- ③ Shahrizal M, Daimon Y, Tanaka Y, Hayashi Y, Nakayama S, Iwaki S, Narita S, Kamikubo H, *Akiyama Y, and *Tsukazaki T. Structural Basis for the Function of the β -Barrel Assembly-Enhancing Protease BepA. *J. Mol. Biol.* 431, 625-635 (2019)
DOI: 10.1016/j.jmb.2018.11.024
- ④ 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. *Structure* 27, 152-160 (2019)
DOI: 10.1016/j.str.2018.09.005
- ⑤ Tanaka Y, Izumioka A, Abdul HA, Fujii A, Haruyama T, Furukawa A and *Tsukazaki T. 2.8-Å crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 141-145 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.043
- ⑥ *Tsukazaki T. Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial

- protein translocation factor. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, fny112 (2018)
DOI: 10.1093/femsle/fny112
- ⑦ Furukawa A, Nakayama S, Yoshikaie K, Tanaka Y, and *Tsukazaki T. Remote Coupled Drastic β -Barrel to β -Sheet Transition of the Protein Translocation Motor. *Structure* 26, 485-489 (2018)
DOI: 10.1016/j.str.2018.01.002
- ⑧ Daimon Y, Iwama-Masui C, Tanaka Y, Shiota T, Suzuki T, Miyazaki R, Sakurada H, Lithgow T, Dohmae N, Mori H, *Tsukazaki T, *Narita S, and *Akiyama Y. The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the β -barrel assembly machinery complex. *Mol. Microbiol.* 106, 760-776 (2017)
DOI: 10.1111/mmi.13844
- ⑨ Tanaka Y, Iwaki S, and *Tsukazaki T. Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein. *Structure* 25, 1455-1460 (2017)
DOI: 10.1016/j.str.2017.07.009
- ⑩ Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, and *Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLOS ONE* 12, e0183434 (2017)
DOI: 10.1371/journal.pone.0183434
- ⑪ 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
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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
- ⑮ 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
- ⑯ 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
- ⑰ 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9件)

- ① Tomoya Tsukazaki 「Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs by High-Speed Atomic Force Microscopy」EMBO Workshop: CURRENT ADVANCES IN PROTEIN TRANSLOCATION ACROSS MEMBRANES (スペイン Sant Feliu de Guixols, 2019)
- ② Tomoya Tsukazaki 「Working model of SecDF inferred from structural studies」Joint Symposium ~ The 10th symposium on International Collaborative Laboratories ~ BioTechnology Institute, U. Minnesota & Grad School BioScience (奈良, 2018)
- ③ Tomoya Tsukazaki 「Drastic conformational changes of SecDF」BACTERIAL PROTEIN EXPORT (ベルギー Leuven, 2018)
- ④ Tomoya Tsukazaki 「Structure-based working model of SecDF, a bacterial protein translocation motor」Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes (アメリカ合衆国 ガルベストン, 2018)
- ⑤ Tomoya Tsukazaki 「Protein translocation motor SecDF」国際シンポジウム International

Symposium on Protein Quality Control (奈良, 2017)

- ⑥ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Snapshots of the proton-driven protein translocation motor」 EMBO Conference: Protein Translocation and cellular Homeostasis (クロアチア ドゥブロヴニク, 2017)
- ⑦ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Snapshots of a proton-driven protein translocation motor」 Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference (アメリカ合衆国 タンパ, 2016)
- ⑧ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Structure of YidC reveals a mechanism of Sec-independent membrane protein insertion」 The 2nd CU-NAIST SYMPOSIUM 2015 (タイ チュラロンコン大, 2015)
- ⑨ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Crystal structure of SecDF, a Sec translocon-associated membrane protein」 国際シンポジウム The 25th Hot Spring Harbor International Symposium (福岡, 2015)
- ⑩ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Structures of Membrane Protein Insertase YidC」 Gordon Research Conferences: Membrane Protein Folding (アメリカ合衆国 ボストン, 2015)
- ⑪ [Tomoya Tsukazaki](#) 「Structure of YidC reveals a mechanism of Sec-independent membrane protein insertion」 2014 Joint Symposium, Integrative Microbiology (アメリカ合衆国 ミネソタ大, 2014)

〔図書〕 (計 8 件)

- ① [塚崎智也](#) [中西印刷] 生物物理 Vol. 58 No. 2 「タンパク質膜透過装置の構造生物学」 p67-122 (p78-82) (2018)
- ② [塚崎智也](#) [医歯薬出版] 医学のあゆみ Vol. 262 No. 5 「タンパク質膜透過駆動モーターSecDFの分子機構」 p333-580 (p367-372) (2017)
- ③ [塚崎智也](#) [国際文献社] 生化学 Vol. 88 No. 1 「タンパク質を膜透過させる分子装置の活写」 p153 (p114-118) (2016)
- ④ [塚崎智也](#) [羊土社] 実験医学 Vol. 32 No. 10 (増刊 構造生命科学で何がわかるのか, 何がわかるのか 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」 p230 (p113-117) (2014)

〔その他〕

ホームページ等

- ① 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス領域・構造生命科学研究室
<http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>
- ② プレスリリース「ヒト由来カルシウムポンプの高分解能構造と活性制御機構を解明」
<http://www.naist.jp/news/2019/04/005740.html>
- ③ 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>
- ④ 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～」
<http://www.naist.jp/pressrelease/2015/11/000626.html>
- ⑤ 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>
- ⑥ 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) 研究協力者

研究協力者氏名： 田中 良樹

ローマ字氏名： (TANAKA, Yoshiki)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。