

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14490

研究課題名(和文) ナノディスクを用いた新しい再構成系の構築と蛋白質分泌マシーナリーの動的精密探査

研究課題名(英文) Construction of a new reconstruction system and analysis of dynamic protein secretion machinery

研究代表者

吉海江 国仁 (Yoshikane, Kunihiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：20467616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質分泌マシーナリーは生体内でダイナミックな構造変化を伴って、基質蛋白質を膜をこえて輸送させている。エックス線結晶構造解析などにより、各因子の詳細構造については理解が深まったが、実際にどのような構造変化を起こし機能しているのかについては未だ不明な点が多い。本萌芽研究ではそのダイナミズムにせまるため、ナノディスクを用いた新しい再構成系の構築を行い動的探査のための基盤を築いた。今後の詳細な解析を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Protein secretion machinery transports precursor proteins across membranes with dynamic structural changes. Although the detailed structures of each factor have been reported by X-ray crystallography, it is still unknown how the factors undergo conformational transitions. In this study, we established a new reconstruction system using nanodiscs and observed the nanodiscs by high speed AFM. It is time to analyze the protein secretion using this tool.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

細菌において、細胞質でリボソームにより合成された蛋白質が膜を越えて分泌(図1)する過程は、すべての生物に保存されている。Sec トランスロコン(膜蛋白質複合体 SecYEG チャンネル)は蛋白質の透過穴を形成し、モーター蛋白質 SecA ATPase が蛋白質の分泌を駆動する。蛋白質の分泌反応については、ノーベル賞の受賞にもつながった「シグナル仮説」(1975年)をはじめ数多くの研究成果が報告され、Sec 蛋白質群の機能と重要性が示されてきたが、蛋白質分泌反応の詳細なメカニズムの解明の為に、これらの立体構造情報が必要不可欠であった。2000年頃から、筆者らのグループをはじめいくつかのグループが次々と Sec 蛋白質群の結晶構造を報告した。これら構造情報に基づき、Sec 蛋白質の機能解析が進められ、原子レベルで蛋白質分泌機構について議論が可能となりつつある。しかし、X線結晶構造解析では詳細な「静止像(スナップショット)」は得られるものの、「動的な情報」は得られない。そのため、実際にどのような構造変化で蛋白質を分泌させるのか、未だ謎が多いことから本萌芽研究を計画した。

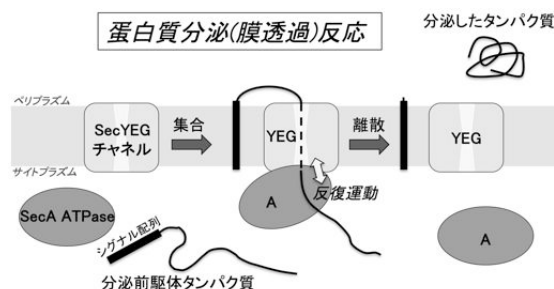


図1 蛋白質分泌(膜透過)反応

### 2. 研究の目的

本研究では、生命必須の現象である蛋白質の分泌に着目する。蛋白質の分泌過程では、大きな構造変化を伴う集合離散が起こる(図1)。SecYEG 複合体(蛋白質膜透過チャンネル)と SecA ATPase(モーター蛋白質)と基質蛋白質(前駆体蛋白質)と膜構造が存在すれば、*in vitro* で人工的に分泌反応を再現することができる(図1)。この *in vitro* 系を応用することで様々な測定方法に適応できる可能性がある。近年、各因子単独の結晶構造が報告され、構造情報に基づく機能解析が多く進められているが、未だどのような相互作用で集合し、どのような構造変化を伴って機能しているのかの詳細は不明である。そこで、本研究では膜蛋白質再構成系の一つである「ナノディスク」を用いて、蛋白質分泌システムの新しい *in vitro* 再構成系を構築し、高速原子間力顕微鏡などを用いた1ユニット解析を行うことで、時間に依存したダイナミックな構造変化を見いだす。

### 3. 研究の方法

本研究では、ナノディスクを用いた蛋白質分泌システム再構成系を用いて、高速原子間力顕微鏡を用いた1ユニット観察などを行うことで、世界で初めて時間に依存した構造変化を見いだす。はじめに、高速原子間力顕微鏡の基板上での蛋白質分泌の再現系を組み、次に本格的なデータ収集、解析、考察を行う。1ユニット再構成による蛋白質分泌反応が確認できれば、次に蛍光一分子観察を用いた研究を展開させる。サンプルの調整は申請者が所属する奈良先端大で行い、データの収集は共同研究者と協力して進める。

SecYEG 複合体と SecA の精製は、SecYE 複合体の構造機能解析で用いた手法を改良し、既に安定に SecYEG 複合体ならびに変異体の SecA を精製する系を利用する。ナノディスク作製の為に必要な膜骨格蛋白質 Membrane Scaffold protein (MSP) の精製は確立されており、所属研究室で精製できる系を組んでいる。基質となる蛋白質には、外膜蛋白質 OmpA の前駆体(シグナル配列切断前)proOmpA を用いる。proOmpA は大腸菌内で過剰発現させ、インクルージョンボディから変性剤である尿素を用いて可溶化させ unfold の状態を保ったまま精製する。この状態で proOmpA は紐状のポリペプチド鎖になっている。高速原子間力顕微鏡観察において、unfold した紐状のポリペプチド鎖は分解能の問題から認識しにくいので、proOmpA には尿素中でも変性しない安定なタンパク質 GFP のタグを付加させて精製する。proOmpA のC末端側に GFP を結合させた基質は、予備的な高速原子間力顕微鏡観察の結果、丸いドメインと紐状の構造体が確認できる。さらに、視覚性を向上させるため、GFP をいくつか連結した proOmpA-(GFP)<sub>x</sub> の作製を進める。実際の動態観察において、蛋白質分泌中間体を作製する為に、特別な基質も必要である。proOmpA は基質内部にシステインによる S-S 結合を形成させるループ構造を形成させることで、その部分が立体障害で分泌できない中間体をとることが知られている。S-S 結合を DTT で還元してやれば膜透過反応は再開するため、膜透過中間体を作製し、その後の構造変化を追跡することが可能である。S-S 結合の位置をかえたいくつかの変異体の作製を行う。

ナノディスクへの蛋白質の再構成には、脂質・膜蛋白質・MSP を混合した後、膜蛋白質と脂質を可溶化させている界面活性剤を取り除く。界面活性剤の除去と同時に、膜蛋白質が組み込まれたナノディスクが形成される。本研究では界面活性剤としてドデシルマルチドを使用し、SM2 ビーズで界面活性剤を除去する。この手順で作製したサンプル中には、ナノディスクとして再構成されなかった粒子もある程度含まれるが、これらはゲル濾過クロマトグラフィーによって除去する。さらに効率よくサンプルを調製できる条件を探索し、図2に示すように安定にナノディ

スクを測定基盤へ固定化させるため、様々なタグの使用を試みる。図2の系では「ナノディスクと測定基盤との間に空間」ができるため、膜を越えた基質蛋白質を物理的に阻害することなく反応を達成できる利点がある。本解析においては、SecYとSecAをクロスリンクで連結した融合蛋白質を利用することも計画している。人工的に連結した融合蛋白質であるが、活性を保った状態でSecY/A/E/G融合蛋白質複合体の精製に成功している。また、この融合蛋白質もナノディスクに再構成できることを確認している。

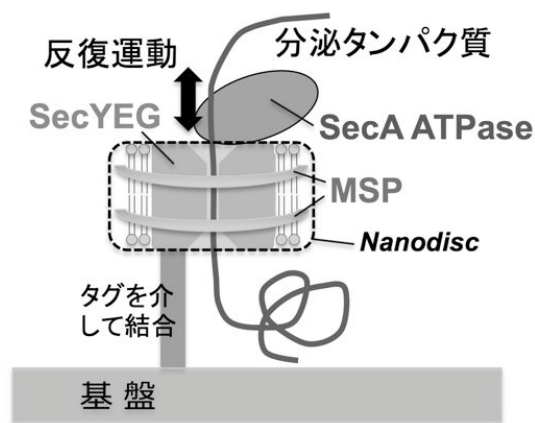


図2 蛋白質分泌反応のイメージ

測定基盤にナノディスク-SecYEGを結合させた後、前駆体蛋白質、SecA ATPase、ATPなど必要な因子を加えることによって、蛋白質の透過反応を開始させ、高速原子間力顕微鏡でその動態を観察する(図2)。高速原子間力顕微鏡での観察は100ミリ秒程度の分解能で測定可能である。蛋白質の透過反応は、数分で完了する反応であり、十分測定可能な時間である。高速原子間力顕微鏡解析では、バッファの状態により蛋白質の挙動が異なる。イオンの種類やイオンの濃度は、反応とは関係のない蛋白質のゆらぎに大きく影響する。明瞭に蛋白質の透過反応を観察する為に、様々な条件で観察を進める。

近年 *in vitro* で蛋白質の分泌過程を可視化する試みが進められている。たとえば、高速でない原子間力顕微鏡やFRETを用いた実験によりSecトランスロコンの1ユニットの観察等が報告されているが、動的なところは未だ憶測の域を出ない。本研究で、1ユニットにおける動的構造解析を行いSecトランスロコン複合体が生きて働く姿を世界に先駆けてとらえる。

#### 4. 研究成果

図3は基盤の特異的な固定は行わずに、蛋白質膜透過反応中間体を作製する操作を行った後、観測した結果である。この像からではその配向の決定はできないが、ナノディスクから紐状の物体と、GFPと思われる物体が多数確認できた。今後は、これが本当に膜透

過中間体であるのかの検証も行いつつ、上記基盤への固定化条件をつめる必要がある。

時間依存的な高速原子間力顕微鏡の観察ができれば次にその詳細な考察を進めることができる。図3の分泌反応で用いる高度好熱菌由来のSec蛋白質はすべて詳細な結晶構造を解き明かしているため、得られた高速原子間力顕微鏡の観察データに既知構造情報をフィットさせることができる。Sec蛋白質は10Å以上の構造変化が予測されているため、高速原子間力顕微鏡の分解能レベル(約1nm分解能以上)のデータから、どのドメインがどのように構造変化を起こしているのかが明らかとなる。予備的ではあるがSecAのドメイン変化が確認できた。結晶構造が判明していることから、同様の手法を適応させることにより、アミノ酸残基レベルでの解釈も可能であり、各因子の詳細な相互作用が明らかとなるだろう。今後は必要に応じて、大腸菌Sec蛋白質の変異体を用いての*in vivo*, *in vitro*の系を用いた機能解析を進め、蛋白質分泌機構を動画として理解する予定である。

高速原子間力顕微鏡では「外部(表面)」の構造変化を見いだすことができるが、内部の構造変化の情報は得られない。次に、蛍光分子を用いた観察により、高速原子間力顕微鏡では得られない情報を得る予定である。高速原子間力顕微鏡で蛋白質分泌反応が起こっていることが担保できれば、更なる動的な理解のため、蛍光1分子イメージングの観察へと展開させる。蛍光観察では高速原子間力顕微鏡とはことなりSec蛋白質の「内部」の構造変化を観測することを可能とする。

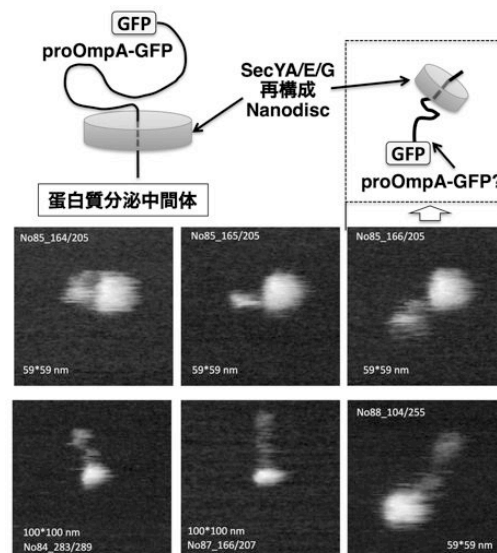


図3 高速原子間力顕微鏡を用いた蛋白質分泌中間体の観察

近年、世界的にも *in vitro* で蛋白質の分泌過程を可視化する試みが進められている。たとえば、高速でない原子間力顕微鏡やFRETを用いた実験によりSecトランスロコンの

1ユニットの観察等が報告されているが、動的なところは未だ憶測の域を出ない。本研究を進展させることで、1ユニットにおける動的構造解析を行いSecトランスロコン複合体が生きて働く姿を世界に先駆けてとらえることを可能とする。本萌芽研究において蛋白質分泌反応の解析にむけた基盤実験を進めることができた。今後さらなる解析を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1件)

- 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

[学会発表] (計 7件)

- ① Arata Furukawa, Kunihito Yoshikaie, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka, 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, ドブロブニク (クロアチア)
- ② 古川新, 吉海江国仁, 森貴治, 森博幸, 森本雄祐, 菅野泰功, 岩木薫大, 南野徹, 杉田有治, 田中良樹, 塚崎智也. 「タンパク質膜透過を駆動するモータータンパク質のスナップショット」 *2017年生体運動研究合同班会議*, 2017年1月7日, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ③ 古川新, 吉海江国仁, 森貴治, 森博幸, 森本雄祐, 菅野泰功, 岩木薫大, 南野徹, 杉田有治, 田中良樹, 塚崎智也. 「Snapshots of a protein translocation motor」 *第54回日本生物物理学会年会*, 2016年11月25日~27日, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ④ Arata Furukawa, Kunihito Yoshikaie, Yasunori, Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki. 「Snapshots of the proton-driven protein translocation motor」 *Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference 2016*, 2016年11月9日~12日, タンパ (アメリカ合衆国)
- ⑤ Tomoya Tsukazaki, Kunihito Yoshikaie, Arata Furukawa, Yasunori Sugano, Yoshiki Tanaka. 「Snapshots of a

proton-driven protein translocation motor」 *The 42nd Naito Conference on In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences*. 2016年10月4日~7日, シヤトレーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)

- ⑥ 田中良樹, 菅野泰功, 武本瑞貴, 森貴治, 古川新, 吉海江国仁, 草木迫司, 熊崎薫, 鹿島絢子, 石谷隆一郎, 杉田有治, 瀧木理, 塚崎智也. 「新生鎖を膜透過させる Sec蛋白質のX線結晶構造解析」 *第16回日本蛋白質科学会年会*. 2016年6月6日~9日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ⑦ 吉海江国仁, 菅野泰功, 田中良樹, 塚崎智也. 「SecDFの構造変化」 *第13回21世紀大腸菌研究会*, 2016年6月2日~3日, グリーンピア南阿蘇 (熊本県・南阿蘇村)

[図書] (計 1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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉海江 国仁 (YOSHIKAIIE Kunihito)  
奈良先端科学技術大学院大学・  
バイオサイエンス研究科・研究員  
研究者番号: 20467616

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

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

紺野 宏紀 (KONNO, Hiroki)  
金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・  
准教授  
研究者番号: 80419267