

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KK0197

研究課題名（和文）病原性大腸菌等の細菌における膜環境の変化と連動した膜タンパク質形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the process of membrane protein insertion and folding.

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） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、病原性細菌の多くが薬剤耐性菌となってきた。大腸菌などの細菌では内膜・外膜2つの構造体を持っているが、これらの成り立ちを研究することは、学術基盤研究としても将来の新しい薬剤開発にも重要である。そのため、我々は、膜蛋白質の局在化を含む膜環境の形成過程の理解を行うために、関連因子の生化学解析を進めた。中性子反射率法による膜界面の環境変化の解析では、国際共同研究としてオーストラリア Monash 大学の Shen 博士と行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性大腸菌などグラム陰性菌は、2つの生体膜（内膜・外膜）を持つ。膜には、感染や毒素分泌等に関わる膜蛋白質が局在化しており、防御と攻撃を両立させた環境を形成する。「膜環境形成の分子メカニズムを詳細に理解」するため、生化学的・構造生物学的解析と並行して、新たな国際共同研究として中性子反射率法による膜界面の環境変化の解析を行った。本研究は生命活動の根幹を明らかにするため学術的に意義深いだけでなく、病原性細菌の膜環境形成を阻害する新規抗菌薬開発の基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, many pathogenic bacteria gain drug resistance. Bacteria such as Escherichia coli have two membranes, the inner and outer membranes. It is important to study the formation of these membranes both for basic academic research and for the development of new type drugs. We conducted several biochemical analyses of membrane-related factors to uncover the detailed membrane protein biogenesis. In the analysis of environmental changes at the membrane interface by neutron reflectometry, we collaborated with Dr. Shen at Monash University, Australia.

研究分野：構造生命科学

キーワード：膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌が G7 等でも取り上げられるほど重大な問題となっており、WHO によると警戒すべき薬剤耐性菌 12 種類のうち 9 種類がグラム陰性菌である。グラム陰性菌には内膜・外膜の 2 枚の生体膜があり、その間にペリプラズム領域がある。内膜には、リン脂質二重膜に α ヘリックス型の膜蛋白質を含む。一方、外膜には、脂質と結合するリポ蛋白質や β バレル型膜蛋白質を含む。細胞質から内膜外膜をこえて分泌される感染に関わる多くの毒素は、これらの膜に存在する分泌装置を経由する。また、宿主と病原菌間の相互作用に関わる蛋白質は膜へと局在化してその能力を発揮する。その結果、膜は抗生物質などの異物に対する防御能(耐性)と、攻撃能を得る。グラム陰性菌の攻撃能を無効化する次世代抗菌薬開発には、膜蛋白質の局在化を含む膜環境の形成過程の理解が欠かせない。そこで、我々の得意とする生化学的・構造生物学的解析と並行して、新たな国際共同研究として中性子反射率法による膜界面の環境変化の解析をオーストラリア Monash 大学の Shen 博士と進める必要があった。

2. 研究の目的

内膜蛋白質形成過程において、内膜蛋白質は細胞質でリボソームによって合成された後、膜蛋白質 Sec トランスロコン (SecYEG 複合体) や YidC や糖と脂質からなる酵素 MPIase (注: 蛋白質ではない) を介して膜へと組み込まれる (図 1)。研究代表者らを含むいくつかのグループは、Sec トランスロコンや YidC の X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析に基づく機能解析を進めてきた。それぞれの構造は反応のスナップショットを示していると考えられるが、未だ時間に依存してどのように内膜蛋白質がこれら因子と相互作用しながら、脂質領域へと組み込まれフォールディングしているのかについては不明であり、統一見解が得られていない。膜組込時には MPIase が膜蛋白質の膜組込に重要であることが示され、SecYEG や YidC と直接相互作用する可能性も示唆されているが、これら因子の協調性についても不明である。

外膜の β バレル型膜蛋白質形成では、はじめに Sec トランスロコンを介して蛋白質が細胞質からペリプラズム空間へと運ばれる。その後、外膜蛋白質の組込は BAM 複合体 (β -Barrel Assembly Machinery) によって行われる。大腸菌の BAM 複合体は、 β バレル型膜蛋白質の BamA と、4 つのリポ蛋白質 BamB, C, D, E から構成される。近年、複数のグループによる X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析から、異なる状態の BAM 複合体の立体構造が報告され、その作動メカニズムが提唱されている。しかしながら、構造情報のみからでは、各 Bam サブユニットの役割や連携機構等が明らかにされておらず、報告された構造がどの段階の状態に該当するのか不明である。さらに、外膜の組込には、ペリプラズムに存在する一連のシャペロン蛋白質 (SurA, Skp, BepA など) が関わっており、いくつかは BAM 複合体と相互作用する。また、外膜にも、上述の内膜への組込時に重要とされる MPIase のような蛋白質でない重要な因子が存在する可能性がある。内膜を透過した蛋白質がどのようにシャペロン群と BAM 複合体を経由して外膜へと組み込まれているのかを明らかにするためには、関わる因子がすべて存在している状況での新しい手法による解析で詳細な分子メカニズムの解明が必須である。

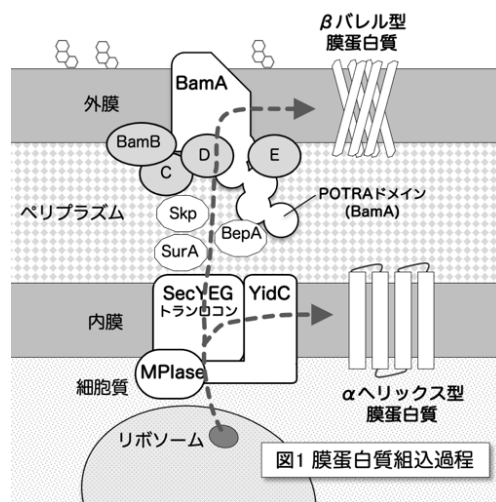


図1 膜蛋白質組込過程

3. 研究の方法

内膜蛋白質形成に関わる MPIase の構造と機能に関しては、研究分担者 (西山) を中心として遺伝学的・生化学的な手法により、解析を進めた。ペリプラズムのシャペロン兼プロテアーゼ BepA に関しては、研究代表者 (塚崎) を中心として、X 線結晶構造解析によって構造解析を進め、その分子メカニズムを明らかとすべく機能解析を進めた。外膜蛋白質の形成に中心的な役割を果たす BAM 複合体の解析では、研究分担者 (塩田) を中心として、輸送される β バレル型膜蛋白質 (基質) との相互作用および、作動時の分子形態に着目して、独自に開発した生化学的手法である EMM アセンブリーアッセイを応用した研究を実施した。国際共同研究として、Shen 博士 (オーストラリア) との国際共同研究では、生物物理学的手法の一つである中性子反射率法を用いて、BAM 複合体の解析を進めた。

4. 研究成果

MPIase 生合成の第一段階に関わる因子を突き止めた。その欠損株を用いた *in vivo* 解析にて、MPIase が蛋白質膜挿入・膜透過に関与し、生育に必須であることを示した。(Sawasato *et al.*, *Sci.*

Rep., 2019; Sato *et al.*, *BBRC*, 2019; Kamemoto *et al.*, *JGAM*, 2020)。また、低温下における解析によって、MPIase の発現量が増加し、蛋白質膜挿入・膜透過の低温感受性を抑制していることを見出した (Sawasato *et al.*, *JBC*, 2019)。その低温感受性の抑制には、*cdsA* 遺伝子の 2 種の異なるプロモーター P1 と P2 の作用が必要であることを明らかにした。P1 は低温移行後ただちに一過的に誘導され、P2 は低温移行後徐々に誘導される。その結果、MPIase は低温移行後ただちに、しかも持続的に発現量が増加する (Sawasato *et al.*, *FEBS Lett.*, 2019)。YidC と MPIase との関連について再構成系で解析を行い、MPIase は膜挿入反応初期過程に (図 2A)、また YidC は後期過程に作用することを示し (図 2B)、MPIase と YidC との機能的相互作用の存在が明らかとなった (Sasaki *et al.*, *JBC*, 2019, Nishikawa *et al.*, *FEBS Lett.*, 2021)。YidC には C2 ループが存在しており、膜透過にも関わることが示唆されているが、その構造体は確認されていなかったため、YidC の高分解能構造解析を行い C2 ループの位置を正確に明らかにした (Tanaka *et al.*, *BBRC*, 2018)。*in vivo* で MPIase の役割を詳細に調べるため、MPIase の誘導体をいくつか化学合成した。MPIase の糖鎖が膜挿入反応に必須であること、糖鎖が膜蛋白質と相互作用して可溶化すること、この相互作用にはアセチル基が重要であることなどを示した (Fujikawa *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 2018, Nomura *et al.*, *Biophys. J.*, 2019)。

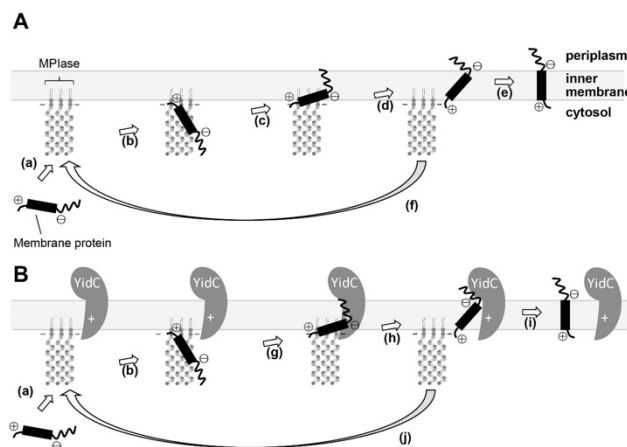


図 2 内膜蛋白質の膜挿入

BepA は、シャペロン機能とプロテアーゼ機能をもつが、どのように連携しているのかが不明であった。X 線結晶構造解析によって、BepA の詳細構造を明らかにしたことで、BepA の緻密な制御機構が明らかとなった (図 3) (Shahrizal *et al.*, *JMB*, 2019)。亜鉛イオンが活性中心となるが、その領域は蛋白質内部に埋もれており、一部の構造体 ($\alpha 9$) が活性中心から遠ざかることで活性化することが考えられた。これらを生化学的解析で証明した。BepA は、ある一定期間基質と相互作用することによって、活性部位に取り込まれると考えられる。ATP などのエネルギーが存在しないペリプラスム空間において、基質の作用から活性化までの時間差を、その構造体で生み出していることが明らかとなった (Daimon *et al.*, *PNAS*, 2020)。

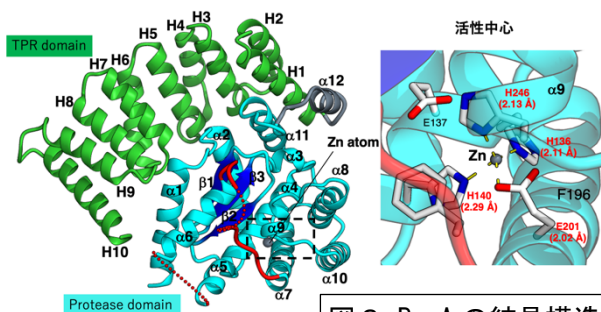


図 3 BepA の結晶構造

中性子反射率法を実施するには、高純度 Si からなる基盤 (Si-Wafer) に生体膜を再構築する必要があった。本研究では、Si-Wafer 上に Ni-NTA を結合させ、蛋白質に付加したヒスチジンタグとの相互作用を用いて生体膜の再構築を試みた。BAM 複合体の主要サブユニットであり、膜

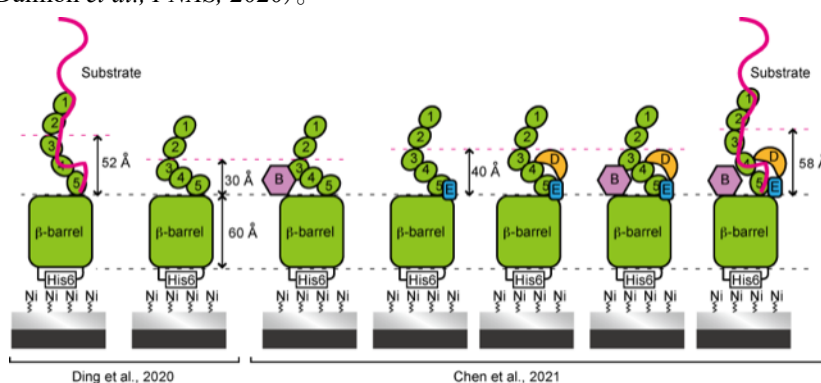


図 4 中性子反射率法による BAM 複合体の解析

蛋白質である BamA の機能に影響せずかつ、効果的な位置へのヒスチジンタグ付加の条件を固定した。Shen 博士は、それを用いた生体膜の再構築法を確立した。これは、蛋白質の向きを厳密に揃えた状態で中性子反射率測定が行える、世界で初めての再構築法である。さらに、この BamA が存在する再構築膜に、基質として Pet と呼ばれる蛋白質を加えたところ BamA が伸長するという構造変化が確認できた (図 4 左側) (Ding *et al.*, *BBA Biomembr.*, 2020)。BamA を含んだ再構築系が完成したため、BAM 複合体の他のサブユニット (BamB, BamD, BamE) を添加し中性子反射率法による解析を行った (図 4 右側)。その結果、BamB や BamD の結合は BamA の構造変化を誘発しないが、BamE は BamD を介して BamA に結合し、BamA 全体の構造変化を誘発することが明らかになった (Chen *et al.*, *BBA Biomembr.*, 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計41件（うち査読付論文 39件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 38件）

1. 著者名 Tanaka Yoshiki, 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 Yoshiki, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori	4. 巻 117
2. 論文標題 Reversible autoinhibitory regulation of Escherichia coli metalloprotease 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 Ding Yue, Shiota Takuya, Le Brun Anton P., Dunstan Rhys A., Wang Bo, Hsu Hsien-Yi, Lithgow Trevor, Shen Hsin-Hui	4. 巻 1862
2. 論文標題 Characterization of BamA reconstituted into a solid-supported lipid bilayer as a platform for measuring dynamics during substrate protein assembly into the membrane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183317 ~ 183317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183317	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 Chen Xiaoyu, Ding Yue, Bamert Rebecca S., Le Brun Anton P., Duff Anthony P., Wu Chun-Ming, Hsu Hsien-Yi, Shiota Takuya, Lithgow Trevor, Shen Hsin-Hui	4. 巻 -
2. 論文標題 Substrate-dependent arrangements of the subunits of the BAM complex determined by neutron reflectometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2021.183587	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 Kamemoto Yuki, Funaba Nanaka, Kawakami Mayu, Sawasato Katsuhiko, Kanno Kotoka, Suzuki Sonomi, Nishikawa Hanako, Sato Ryo, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 66
2. 論文標題 Biosynthesis of glycolipid MPLase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.05.001	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 Nishikawa Hanako, Sasaki Masaru, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 In vitro Assay for Bacterial Membrane Protein Integration into Proteoliposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3626	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 Nishikawa Hanako, Kanno Kotoka, Endo Yuta, Nishiyama Ken ichi	4. 巻 595
2. 論文標題 Ring assembly of c subunits of FOF1 ATP synthase in Propionigenium modestum requires YidC and UncI following MPLase dependent membrane insertion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 647 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14036	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 Araiso Yuhei, Tsutsumi Akihisa, Qiu Jian, Imai Kenichiro, Shiota Takuya, Song Jiyao, Lindau Caroline, Wenz Lena-Sophie, Sakaue Haruka, Yunoki Kaori, Kawano Shin, Suzuki Junko, Wischnewski Marilena, Schutze Conny, Ariyama Hirota, Ando Toshio, Becker Thomas, Lithgow Trevor, Wiedemann Nils, Pfanner Nikolaus, 他2人	4. 巻 575
2. 論文標題 Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 395 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1680-7	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Inoue Michio, Sakuta Nanami, Watanabe Satoshi, Zhang Yuxia, Yoshikaie Kunihiro, Tanaka Yoshiki, 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 -

1. 著者名 沢里克宏, 藤川紘樹, 島本啓子, 西山賢一	4. 巻 58
2. 論文標題 大腸菌におけるタンパク質膜輸送に関与する糖脂質MPlase の発現制御機構~酵素様機能をもつ糖脂質MPlase~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 223 ~ 230
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 有
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 Kamemoto Yuki, Funaba Nanaka, Kawakami Mayu, Sawasato Katsuhiro, Kanno Kotoka, Suzuki Sonomi, Nishikawa Hanako, Sato Ryo, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Biosynthesis of glycolipid MPlase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.05.001	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 Fujikawa Kohki, Nomura Kaoru, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 77
2. 論文標題 Novel Glycolipid Involved in Membrane Protein Integration: Structure and Mode of Action	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1096	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 Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 31
2. 論文標題 Enzyme-like Glycolipids MPlase Involved in Membrane Protein Integration of E. coli	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E151 ~ E158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1705.1E	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 藤川 紘樹、西山 賢一、島本 啓子	4. 巻 31
2. 論文標題 大腸菌膜タンパク質の膜挿入に関する酵素様糖脂質MPlase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 J149 ~ J155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1705.1J	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 Saito Hiroaki, Morishita Tetsuya, Mizukami Taku, Nishiyama Ken-ichi, Kawaguchi Kazutomo, Nagao Hidemi	4. 巻 1290
2. 論文標題 Free energy profiles of lipid translocation across pure POPC and POPC/CHOL bilayer: all-atom molecular dynamics study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 012020 ~ 012020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1290/1/012020	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 Nomura Kaoru, Yamaguchi Toshiyuki, Mori Shoko, Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimanouchi Toshinori, Tanimoto Yasushi, Morigaki Kenichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 117
2. 論文標題 Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 99 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.05.014	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 Sawasato Katsuhiko, Sekiya Yusei, Nishiyama Ken ichi	4. 巻 593
2. 論文標題 Two step induction of cdsA promoters leads to upregulation of the glycolipid MPLase at cold temperature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13460	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 Matsumura Kenji, Yamada Miwa, Yamashita Takeshi, Muto Hitomi, Nishiyama Ken-ichi, Shimoi Hitoshi, Isobe Kimiyasu	4. 巻 128
2. 論文標題 Expression of alcohol oxidase gene from Ochrobactrum sp. AIU 033 in recombinant Escherichia coli through the twin-arginine translocation pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 13 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.12.012	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 Sawasato Katsuhiko, Suzuki Sonomi, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 294
2. 論文標題 Increased expression of the bacterial glycolipid MPLase is required for efficient protein translocation across membranes in cold conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8403 ~ 8411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008457	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 Sato Ryo, Sawasato Katsuhiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 510
2. 論文標題 YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPLase involved in membrane protein integration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 636 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.145	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 Sawasato Katsuhiko, Sato Ryo, Nishikawa Hanako, Imura Naoki, Kamemoto Yuki, Fujikawa Kohki, Yamaguchi Toshiyuki, Kuruma Yutetsu, Tamura Yasushi, Endo Toshiya, Ueda Takuya, Shimamoto Keiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37809-8	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 Tsukazaki Tomoya	4. 巻 -
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 -
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 Shahrizal Mohammad, Daimon Yasushi, Tanaka Yoshiki, Hayashi Yugo, Nakayama Shintaro, Iwaki Shigehiro, Narita Shin-ichiro, Kamikubo Hironari, Akiyama Yoshinori, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 431
2. 論文標題 Structural Basis for the Function of the α -Barrel Assembly-Enhancing Protease BepA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 625 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.11.024	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 Haruyama Takamitsu, Sugano Yasunori, Kodera Noriyuki, Uchihashi Takayuki, Ando Toshio, Tanaka Yoshiki, Konno Hiroki, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 27
2. 論文標題 Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 152 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2018.09.005	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, Izumioka Akiya, Abdul Hamid Aisyah, Fujii Akira, Haruyama Takamitsu, Furukawa Arata, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 505
2. 論文標題 2.8-A crystal structure of Escherichia coli YidC revealing all core regions, including flexible C2 loop	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 141 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.09.043	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 Tsukazaki Tomoya	4. 巻 365
2. 論文標題 Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fny112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fny112	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 Furukawa Arata, Nakayama Shintaro, Yoshikaie Kunihiro, Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya	4. 巻 26
2. 論文標題 Remote Coupled Drastic α -Barrel to β -Sheet Transition of the Protein Translocation Motor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 485 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2018.01.002	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 Sakaue Haruka, Shiota Takuya, Ishizaka Naoya, Kawano Shin, Tamura Yasushi, Tan Kher Shing, Imai Kenichiro, Motono Chie, Hirokawa Takatsugu, Taki Kentaro, Miyata Non, Kuge Osamu, Lithgow Trevor, Endo Toshiya	4. 巻 73
2. 論文標題 Porin Associates with Tom22 to Regulate the Mitochondrial Protein Gate Assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.01.003	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 Nakamura Shota, Suzuki Sonomi, Saito Hiroaki, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 163
2. 論文標題 Cholesterol blocks spontaneous insertion of membrane proteins into liposomes of phosphatidylcholine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 313 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvx083	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 Saito Hiroaki, Morishita Tetsuya, Mizukami Taku, Nishiyama Ken-ichi, Kawaguchi Kazutomo, Nagao Hidemi	4. 巻 1136
2. 論文標題 Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 012022 ~ 012022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1136/1/012022	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 Fujikawa Kohki, Suzuki Sonomi, Nagase Ryohei, Ikeda Shiori, Mori Shoko, Nomura Kaoru, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Syntheses and Activities of the Functional Structures of a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2719 ~ 2727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.8b00654	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 Sawasato Katsuhiko, Sato Ryo, Nishikawa Hanako, Imura Naoki, Kamemoto Yuki, Fujikawa Kohki, Yamaguchi Toshiyuki, Kuruma Yutetsu, Tamura Yasushi, Endo Toshiya, Ueda Takuya, Shimamoto Keiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37809-8	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 Sato Ryo, Sawasato Katsuhiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 510
2. 論文標題 YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPLase involved in membrane protein integration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 636 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.145	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 Sawasato Katsuhiko, Suzuki Sonomi, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Increased expression of the bacterial glycolipid MPLase is required for efficient protein translocation across membranes in cold conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008457	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 Matsumura Kenji, Yamada Miwa, Yamashita Takeshi, Muto Hitomi, Nishiyama Ken-ichi, Shimoi Hitoshi, Isobe Kimiyasu	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression of alcohol oxidase gene from Ochrobactrum sp. AIU 033 in recombinant Escherichia coli through the twin-arginine translocation pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.12.012	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 Saito Hiroaki, Morishita Tetsuya, Mizukami Taku, Nishiyama Ken-ichi, Kawaguchi Kazutomo, Nagao Hidemi	4. 巻 -
2. 論文標題 Free energy profiles of lipid translocation across pure POPC and POPC/CHOL bilayer : all - atom molecular dynamics study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 8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 西山賢一
2. 発表標題 タンパク質膜挿入・膜透過に必須の糖脂質MPlaseの構造と機能
3. 学会等名 2020年度東北支部シンポジウム「いまホットな脂質研究」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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ンネルSecトランスロコンを経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 塩田拓也
2. 発表標題 大腸菌外膜 バレル型膜タンパク質輸送阻害ペプチドの探索
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 塩田拓也
2. 発表標題 バクテリア外膜タンパク質アセンブリー解析の手法「EMMアセンブリーアッセイ」
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 タンパク質膜挿入・膜透過反応に関する「糖脂質酵素(Glycolipozyme)」MPaseの構造と機能
3. 学会等名 新潟薬科大学学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 大腸菌のタンパク質膜挿入・膜透過にかかわる糖脂質MPaseの構造と機能
3. 学会等名 遺伝研研究会「単細胞システムにおける細胞内装置の動的相互作用」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs by High-Speed Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 EMBO Workshop: CURRENT ADVANCES IN PROTEIN TRANSLOCATION ACROSS MEMBRANES (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 Working model of SecDF inferred from structural studies
3. 学会等名 Joint Symposium ~ The 10th symposium on International Collaborative Laboratories ~ BioTechnology Institute, U. Minnesota & Grad School BioScience, NAIST (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 Drastic conformational changes of SecDF
3. 学会等名 BACTERIAL PROTEIN EXPORT 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 High-speed AFM imaging of membrane protein embedded in Nanodisc
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚崎智也
2. 発表標題 結晶構造解析から明らかとなってきたタンパク質膜透過モーター SecDF の劇的な構造変化
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 Cell cycle-dependent dynamic association of the mitochondrial protein entry gate, TOM complex
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 EMM アセンブリーアッセイを用いた外膜タンパク質アセンブリーの分子メカニズム解析
3. 学会等名 2018年度遺伝研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩田拓也
2. 発表標題 Analysis of the molecular mechanism of E. coli BAM complex by new method "EMM assembly assay"
3. 学会等名 EMBO Workshop Current advances in protein translocation across membranes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 Increase in the expression level of Glycolipozyme MPLase is required for the efficient protein translocation in the cold
3. 学会等名 Bacterial Protein Export 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 Structure and function of MPlase involved in membrane protein integration and preprotein translocation
3. 学会等名 BMB Seminar (Freiburg University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 タンパク質膜挿入・膜透過に関する糖脂質MPlaseの構造と機能
3. 学会等名 理学部講演会(山形大学) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山賢一
2. 発表標題 タンパク質膜挿入・膜透過に関する糖脂質MPlase の構造と機能
3. 学会等名 第1回細胞形成研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修 津本浩平・浜窪隆雄	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〕

ミトコンドリアへのタンパク質搬入口TOM複合体の精密構造と働く仕組みを解明
https://www.kyoto-su.ac.jp/news/20191015_345_ki01.html
 タンパク質膜挿入反応に必要な糖脂質 MPLase の生合成遺伝子を発見
<https://www.iwate-u.ac.jp/upload/images/0204pressrelease.pdf>
 岩手大学農学部応用生物化学科分子生物学研究室
<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~sec/>

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
研究分担者	塩田 拓也 (Shiota Takuya) (20819304)	宮崎大学・テニュアトラック推進機構・准教授 (17601)	
研究分担者	西山 賢一 (Nishiyama Ken-ichi) (80291334)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	

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		
オーストラリア	モナシュ大学 Shen研究室	モナシュ大学 Lithgow研究室	