

平成22年 4月 9日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370085

研究課題名（和文） 高度好熱菌 SecA-SecYE 複合体の立体構造解析

研究課題名（英文） Structural analysis of SecA-SecYE complex from *Thermus thermophilus*

研究代表者

森 博幸 (MORI HIROYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10243271

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質複合体 Sec トランスロコンは、分泌タンパク質の膜透過を促進するためのチャネル（通り道）として働く。本研究において、モータ因子 SecA を持つ細菌型 SecYE 複合体の立体構造を決定した。古細菌の SecYEβ の構造とは異なり、チャネルの細胞質側に疎水性アミノ酸残基からなる溝が観察された。種々の実験から、この溝を持つ構造状態は、SecA と結合することにより誘導される事を明らかにした。このとき同時に、SecA の形も変化することが解った。これらの結果は、モータとチャネルが相互作用する時には、両者が協調的に形を変えていることを示している。この形の変化は、SecA からトランスロコンへの分泌タンパク質分子の受け渡しや、トランスロコンとの結合に伴う SecA ATPase の活性化において重要な役割を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Evolutionarily conserved membrane protein complex, the Sec translocon, functions as a protein-conducting channel to facilitate secretory protein export and membrane protein integration. In this project, we determined the first atomic resolution crystal structure of the SecYE translocon from a SecA (bacterial translocation motor)-containing organism, *Thermus thermophilus*, in complex with an anti-SecY Fab fragment. The structure has revealed a significant conformational change from the previously determined archaeal SecYEβ structure, in that several SecY transmembrane helices are shifted to create a hydrophobic crevasse open to the cytoplasm. Disulfide mapping indicate that this "pre-open" state of the bacterial SecYE complex was induced by the Fab fragment and SecA, which in common bind to SecY residues at the tip of the cytoplasmic domain. Our disulfide crosslinking experiments revealed that some of these SecY residues contact specific residues of SecA that are otherwise buried and unavailable in the isolated SecA molecule. These results suggest that the channel and the motor components of the Sec machinery undergo cooperative conformational changes upon their interaction, presumably as important steps for the entrance of the preprotein-SecA complex and enhancement of the ATPase activity of SecA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：生体膜

1. 研究開始当初の背景

細胞質中で合成されたタンパク質のおよそ 1/3 は、生体膜を透過し細胞内外の適切な場所に運ばれて初めて生理的機能を獲得する。タンパク質が膜を超える反応は、全ての生物で見られる一般的な生命現象であり、そのメカニズムの解明は、細胞生物学の最も基本的かつ、重要な研究課題の一つといえる。タンパク質膜透過反応は、膜透過「チャンネル」(トランスロコン)を介して起こる。全ての生物種で保存された膜内在性タンパク質複合体 SecYE/Sec61 が中心的役割を果たす。膜透過チャンネルは、膜の透過障壁としての機能をもちつつ、巨大なタンパク質分子を透過させる厳密なゲート制御の機構を持つ。と同時に、膜タンパク質の膜内への組み込み過程にも関わり、分泌タンパク質と膜タンパク質の正確な選別機能も持つ。膜透過チャンネルの主要な構成因子である SecY は 10 回の膜貫通領域を持つ疎水的な膜タンパク質であり、解析には多くの困難を伴う。そのため、チャンネルの実体は長い間不明のままであった。

2004 年になり、耐熱性古細菌由来の膜透過チャンネル SecYE β の高分解能の立体構造が X 線結晶構造解析により初めて報告され、大きなブレイクスルーとなった。チャンネル(基質タンパク質が膜を横切る縦向きの通り道)は、1 組の SecYE β 複合体により形成され、中央部が砂時計のように狭くくびれ、穴を塞ぐように栓(plug)が配置されており、静止状態の構造と考えられた。と同時に、脂質二重層側に開き得る横向きのゲートも併せ持っていた。この構造は、膜透過反応と膜組み込み反応の両方を上手く説明できる分子基盤を与えた点で高い評価を得たものの、「膜透過チャンネルは、複数の SecYE 複合体によって形成される。」との過去の多くの報告との食い違いから、1) 膜透過チャンネルの生理的機能単位は? 2) 機能状態でのチャンネルの構造は? という新たな問題を提起し、活発な議論の引き金となった。

真性細菌においては、SecA ATPase が駆動モーターとして働く。「SecA は ATP の結合に伴って分泌前駆体と共にチャンネル内に挿入し、ATP 加水分解により分泌前駆体を手放してチャンネルから脱挿入する。」という膜を越えたダイナミックな動きを繰り返すことにより膜透過を駆動するとの説が広く受け入れられてきた。魅力的な説ではあるが、その分子メカニズムは不明であり、仮説の域を出ない点も多い。

最近の構造生物学の進展により、SecA の高分解能の立体構造が種々の細菌を用いて次々に決定され、立体構造に基づいた SecA 機能の分子レベルでの議論が可能になってきた。しかしながら、

SecA 2 量体の結合様式は、構造決定された 6 つの分子で全て異なっていた。生化学的解析から、溶液中では結合様式の異なる複数の 2 量体が混在していることも明らかとなった。これらの知見は、「SecA は 2 量体で機能する。」との定説と合致しない。SecA 単量体の立体構造の報告と前後して、「膜透過チャンネル上では SecA は単量体で機能する。」との作業仮説も提案され、SecA の機能単位に関しても、現在活発な議論が続いている。

このように、SecA、SecYE 単独の立体構造情報だけから、タンパク質膜透過の分子機構を議論することは難しい。加えて、SecYE β の構造決定に用いられた古細菌は SecA を持たず、解かれた構造は、真核生物のチャンネルに類似していると考えられる。即ち、SecA 依存型チャンネルの構造は未だ明らかではない。SecA を利用するタンパク質膜透過メカニズムの理解には、1) バクテリア型膜透過チャンネルの構造を明らかにすると同時に、2) 膜透過反応中間体状態と考えられる SecA-SecYE 複合体の立体構造解析が最も重要かつ決定的なアプローチと言える。複合体の立体構造の解明により、チャンネルの機能単位、SecA の機能単位の問題に対して明確な解答を与えることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、2 つの研究目標を掲げた。1) SecA 依存型膜透過チャンネル SecYE の高分解能の立体構造の決定、2) SecA と SecYE の安定な複合体を調整・単離する方法を確立し、その複合体の立体構造の解明である。

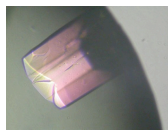
1) TSecYE-Fab 複合体の構造解析: 膜タンパク質の X 線結晶構造解析は、その疎水的性質のため、タンパク質の発現・精製・結晶化、全てにおいて困難であり、結晶を得たとしても高分解能のデータを得る事は容易ではない。本研究開始前、過去 6 年にわたり、SecYE の結晶構造解析に真摯に取り組み、①高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の SecYE (以下 TSecYE) タンパク質の大腸菌中における発現・精製系を確立した。②高度好熱菌由来の膜透過チャンネル TSecYE と好熱菌のモーター因子 TSecA だけからなる *in vitro* 膜透過完全再構成系による、機能評価実験系を構築した。③良質のタンパク質結晶を得る条件のスクリーニングや、additive factor の添加による結晶の良質化の検討を進めた。その結果、6Å 分解能のデータセットの取得が可能なたんぱく質結晶を安定に得る実験条件を確立していた。本研究では、結晶の質を更に高めるために、TSecY に対する特異的なモノクローナル抗体を用い、抗体から作製した Fab フラグメン

トとTSecYEの共結晶を作製し、その構造解析を目指した。抗体フラグメントを用いて可溶性領域を大きくすることで、分子間相互作用領域が大きくなり、結晶のパッケージング効率が高まることが期待された。

2) TSecA-TSecYE複合体の構造解析：膜透過反応の分子レベルでの真の理解の為には、最小必須因子からなるSecA-SecYE複合体の構造情報が必須である。代表者は、本研究開始時には、高度好熱菌由来のSecAの立体構造を明らかにしていた。同じ生物種由来の膜透過必須因子のタンパク質結晶を作製し、回折データの収集まで進めているのは、世界でも研究代表者のグループだけであった。その一方で、可溶性条件下で、TSecA-TSecYE複合体を安定に得ることは決して容易ではなく、研究方法の項で述べるように様々な工夫を試みた。

3. 研究の方法

X線結晶構造解析の手法を用い、1) バクテリア型SecYEチャンネルの立体構造を解明、2) SecA-SecYE複合体の立体構造解明を目指した。前者は、既に述べたように、TSecYに対するモノクローナル抗体を多数作製し、ゲル濾過法を用いて、可溶性TSecYEと安定な複合体が形成できる抗体を選別し、最終的に抗体56-1を得た。それより調製したFabフラグメントとTSecYEとの安定な複合体を精製、結晶化し、最終的に、右図1のような結晶を得た。この結晶をSpring-8 BL41で解析し、3.2Åのデータセットを得た。更に、Se-Met型TSecYEも調製、Fabとの複合体を結晶化させ、回折データを取得し、MAD法によりSeの位置を特定、位相の決定に成功した。得られた位相情報を基に、構造の精密化を進め、最終的に3.2Å分解能のバクテリア型SecYEの高分解能の立体構造の決定に成功した（詳細は成果の項参照）。



後者の目的の為には、安定な SecA-SecYE 複合体を形成させる事が必須であった。そこで、SecY分子をタンデムに繋いだ2量体型チャンネルを作製・精製し、SecAとの親和性を、SecA ATPase活性化の程度、ゲル濾過法により評価した。その結果、SecY₂量体は、可溶性条件下において、SecYEより明らかに相互作用能は向上していた。そこで、この複合体とSecAを混合して、結晶化を試みたが、現在の所、構造決定可能な結晶は得られていない。

SecA-SecYE複合体を安定化させる方法として、ジスルフィド結合形成実験も試みた。モータ、チャンネルの立体構造を基に、SecA, SecYに各1個だけCys残基を導入した変異型タンパク質を用いて、網羅的なジスルフィド結合形成実験を行い、SecAとSecYの近接部位をアミノ酸残基レベルで同定した。これらの情報を基に、SecA-SecYE複合体の結晶化の準備も進めている。更に、得られた情報を基に、in vivo, in vitroでの生化学的解析も平

行して進め、チャンネル結合に依存した SecA ATPase 活性化の分子メカニズムの一旦を明らかにすることができた（詳細は結果の項を参照）。

4. 研究成果

実験の項で既に述べたように、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の SecYE 複合体の立体構造を SecY に対する特異的なモノクローナル抗体 Fab との複合体として、X線結晶構造解析により 3.2Å分解能で決定した。SecA を利用するトランスロコンの立体構造としては、最初の報告例になった（下図2）。全体的に、既知のクローズド型構造と類似していたが、細胞質側の矢印で示した部位に、疎水性の凹みを持つという特徴があった（プレオープン型）。この凹みは、αヘリックス

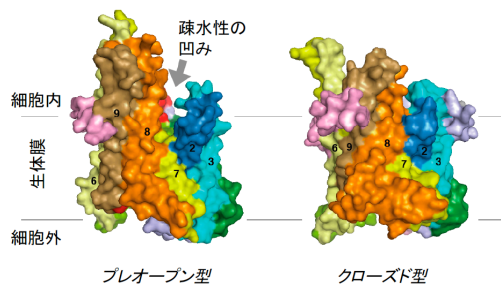


図2 Sec トランスロコンのプレオープン型とクローズド型を収納できる程度の大きさを持ち、高度に保存された疎水性アミノ酸で形成されていた。凹みの機能的な重要性を示唆する結果も得ている。この凹みは、膜透過初期過程における基質タンパク質との相互作用部位を形成している可能性が考えられる。更に、分子動力学計算、生化学実験等から、クローズド型がより安定な基底状態であり、SecA や Fab 分子の SecY 細胞質突起領域への結合により、プレオープン型に構造変化を起こすことを明らかにした。

SecY と SecA との特異的相互作用部位をジスルフィド結合形成実験により同定する実験から、SecA も SecY との相互作用によって大きな構造変化を起こすことを見いだした。トランスロコンとの相互作用により SecA の IRA1 (分子内 ATPase 活性抑制領域) と NBF1(ATPase ドメインの一部) という領域の間が広がり、結果として SecA 単体では分子内部に埋もれていた motifIV と呼ばれる保存領域が、SecY の細胞質突起領域と直接相互作用するようになる (図3)。この構造変化は、トランスロコンによる ATPase 活性の促進を上手く説明できる。ここに示した共同の構造変化によって SecYE, SecA が共に活性化状態となり、タンパク質の膜透過反応を開始するという新たな作業仮説を提唱した。

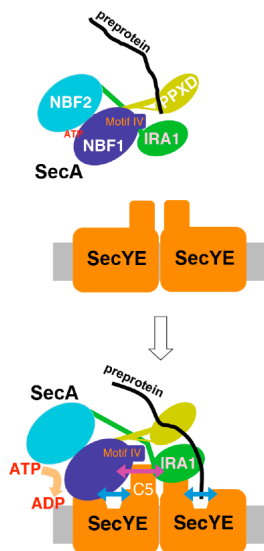


図3 SecYE と SecA 間の相互作用モデル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ①塚崎智也、森 博幸 (2009) 細菌型Secトランスロコンの構造から明らかとなった蛋白質膜透過装置の構造変化 生物物理 **49**, 288-289 査読無
- ②森 博幸、塚崎智也 (2009) 立体構造解析からみえてきた SecA による蛋白質膜透過の分子メカニズム 蛋白質核酸酵素 **54**, 685-695 査読無
- ③Tsukazaki, T.*, Mori, H.*, Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O. (2008) Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature* **455**, 988-991.
* These authors contributed equally to this work. 査読有

[学会発表] (計16件)

(招待講演のみ以下に記した)

- ①森 博幸 タンパク質膜透過補助因子 SecDF の構造と機能. 2009年度 国立遺伝学研究所共同研究会「ゲノム情報を活用した単細胞細胞増殖システムの研究」、三島、2010年3月30-31日
- ②Mori, H., Tsukazaki T., Echizen, Y., Nureki, O. and Ito, K. Structure and function of bacterial protein translocation machinery 第83回日本細菌学会総会 W5「細菌のタンパク質分泌系」、横浜、2010年3月26-27日
- ③森 博幸、塚崎智也、濡木理、伊藤維昭 Molecular mechanisms of SecA mediated

protein translocation. 第47回日本生物物理学会年会 シンポジウム「タンパク質の膜透過輸送の最前線」、徳島、2009年10月30日-11月1日

- ④森 博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭 バクテリアのタンパク質膜透過装置の構造と機能. 第82回日本生化学会大会 シンポジウム「タンパク質膜透過装置の構造とダイナミックな機能」、神戸、2009年10月21日-24日
- ⑤Tsukazaki T., Mori, H., Echizen, Y., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O. Structural analysis of bacterial Sec translocation machinery. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10, 2009
- ⑥Mori, H., Tsukazaki T., Echizen, Y., Ishitani, R., Nureki, O. and Ito, K.: Functional dissection of bacterial Sec translocation machinery. International Symposium 'Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins Working in Biomembranes', Kyoto, Japan, September 8-10, 2009
- ⑦Tsukazaki T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O. Crystal structure of *T. thermophilus* Sec translocon with an anti-SecY Fab fragment implies a translocation-initiating state of SecY 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム「タンパク質機能発現システム-シャペロンからトランスロケターまで」神戸、2008年12月9-12日
- ⑧Tsukazaki T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Ito, K. and Nureki, O. 細菌型Secトランスロコン複合体の結晶構造解析 第46回日本生物物理学会シンポジウム「膜を介した物質輸送・シグナル変換の構造基盤」、福岡、2008年12月3-5日
- ⑨森 博幸 タンパク質膜透過装置の構造と駆動メカニズム 国立遺伝学研究所研究会「細胞周期制御をめぐる単細胞システム分子生物学」三島、2008年3月27-28日
- ⑩Mori, H. How does SecA ATPase interact with translocon and drive protein translocation? G-COE in Chemistry "Frontier of Organelle Dynamics and Protein Functions" March 11-13, Nagoya, Japan, 2008
- ⑪森 博幸 SecA ATPaseはどのように translocon と相互作用し、タンパク質膜透過を駆動しているのか? 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム-その核心に迫る」大阪、2008年1月24-25日

⑫ Mori H. and Ito K. How does SecA ATPase drive protein translocation? The 14th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, November 14, Tokyo, 2007

⑬ 森 博幸 How does SecA ATPase drive protein translocation? 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡 2007 年 5 月 28-30 日

[図書] (計 1 件)

① Ito, K. and Mori, H. The Sec protein secretion system. pp. 3-22, in Bacterial Secreted Proteins, Ed. K. Wooldridge, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/akiyama/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 博幸 (MORI HIROYUKI)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10243271

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし