

# 研 究 報 告 書

## 「Secタンパク質膜透過装置の次世代構造生物学」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研 究 者: 塚崎 智也

### 1. 研究のねらい

本研究では、ダイナミックな相互作用の変化や構造変化を伴う「Sec トランスロコンを介したタンパク質の膜透過・膜組み込み過程」を可視化すべく、新たな研究手法を取り入れた構造生物学的解析を進める。本研究成果は、Sec タンパク質による膜を越えたタンパク質の輸送のみならず様々な物質輸送の理解の基盤となる。

リボソームによって新規に合成されるタンパク質の膜透過・膜組み込みは Sec トランスロコンを経由するが、Sec トランスロコンは単独では機能しない。実際にタンパク質が膜透過・膜組み込みするには SecA、SecDF、YidC、リボソーム等と過渡的な複合体を形成し、大きな構造変化を伴いながら機能する。Sec トランスロコンはタンパク質という巨大な分子を通過させる一方で、イオンなどの小分子の透過は厳密に抑制されている。この緻密な Sec トランスロコンマシーナリーは生命必須のシステムである為、その分子メカニズムの解明は重要課題とされ、国内外で構造生物学的解析を中心とした研究が精力的に進められている。この反応に関わる各因子の立体構造情報は得られつつあるが、未だ各 Sec タンパク質の機能的な量体数・トランスロコンを含む超分子複合体の形成状態・作動メカニズムなどについて不明な点が多く残されている。

本研究にて、各タンパク質の別状態(複合体を含む)のX線結晶構造解析を行い、それらがどのように機能しているのか動的メカニズムの解明を進めた。構造決定後、MD シミュレーションによる解析や各種変異体を用いた *in vivo*、*in vitro* 機能解析を進めるとともに、新たな膜タンパク質一分子観察の手法を開発し、タンパク質膜透過反応を観測を進めた。これらの結果を統合して、生命科学上重要な Sec トランスロコンマシーナリーの作動機構を、時間分解能を加味した構造生物学的解析によって可視化を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

タンパク質の膜透過に関わる各タンパク質のX線結晶構造解析と構造情報に基づく機能解析を進めるとともに、タンパク質膜透過反応の一分子動態観察に向けた準備を進めた。

Sec トランスロコンの構造解析は、これまでにいくつかの報告例があり、タンパク質の透過機構の様々なモデルが提唱されているものの、詳細に議論するには情報が不足している。本研究において、タンパク質膜透過チャネル SecYEG(細菌型 Sec トランスロコン)の高分解能の構造解析を世界で初めて達成した。この構造情報に基づき研究を進めた結果、タンパク質が透過していない状態(閉状態)のチャネルは、複合体を形成する膜タンパク質(SecE)の一部によって「キャップ(蓋)」がされており、タンパク質が透過する時(膜透過状態)には、その蓋が

外れるというモデルを提唱した。この高分解能構造は、最も信頼できる Sec トランスロコンの構造基盤となった。(論文発表1)

細胞膜には、Sec タンパク質膜透過チャネルと相互作用し、タンパク質を細胞膜に組み込む働きを担っている「膜組み込みタンパク質 YidC」が存在する。このタンパク質は生命の維持に不可欠な因子であるが、これまでの研究で YidC の立体構造は決定されておらず、YidC によってタンパク質がどのように細胞膜に組み込まれるのかについては不明であった。本研究で、世界で初めて YidC の立体構造を決定し、この詳細な構造情報に基づき研究を進めた結果、YidC は、疎水的な生体膜に親水的な凹みを形成するという、ユニークな構造体を形成することを発見した。さらに、細胞膜へと組み込まれるタンパク質が YidC の親水的な溝に結合することを確かめ、YidC によってタンパク質が細胞膜に組み込まれる分子メカニズムを提唱した。(論文発表2-5)

これらの構造解析と並行して、タンパク質膜透過をリアルタイムで捉えるために研究を進めた。タンパク質膜透過を一ユニットで駆動する最小単位を同定し、このサンプルを用いて、1分子動態観察へと展開させている。(その他の成果2)

本研究は、バクテリアから人まで共通した基本的な生命現象を明らかとし、生命科学分野の研究の発展に大きく貢献するものである。また、細菌においても YidC、Sec トランスロコンは生育に必須なタンパク質であることから、病原菌のこれらタンパク質を標的とする新規の抗生物質などの薬剤開発の基盤となる。

## (2) 詳細

「Sec トランスロコンの高分解能構造解析」(論文発表1)

タンパク質膜透過チャネル Sec トランスロコン構造がこれまでいくつか報告され、タンパク質膜透過機構のモデルが提唱されてきた。しかしながら、さらなる詳細な議論をするためには、これまで以上の解像度で Sec トランスロコン構造を決定することが必要であった。本研究において、*Thermus thermophilus* 由来の SecYEG 複合体の結晶構造をこれまで最も高い分解能(2.7 Å 分解能)で決定した。これまでの SecYEG の複合体の結晶構造は 4.5 Å 分解能が最高で、今回得られ

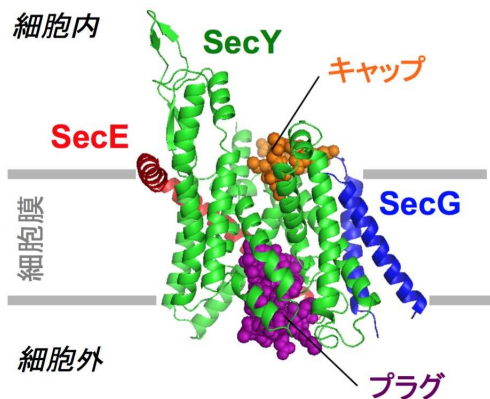


図 1 SecYEG の構造

た構造の分解能は 2.7 Å 分解能と約 2 Å 程度分解能が向上し、より詳細な議論を可能とした。特筆すべきことは、これまで不鮮明であったループなどの構造も明確に認識できたため、SecYEG を構成するほぼすべてのアミノ酸残基の位置を正確に配置したモデルを得ることができた(図 1)。その中でも、SecG のループについて新しい知見が得られた。今回の構造解析から、SecG のループが、SecY により形成されているタンパク質の透過孔を塞ぐように位置していることが判明した。そこで、SecG のループを SecY の細胞内側の表面に固定した変異体を作製したところ、タンパク質の膜透過が阻害され、その後固定を外すとタンパク質の膜透過が回復した。このような機能解析や、過去の構造との比較、分子動力学計算の結果から、閉

状態の SecYEG では、タンパク質の自発的な透過を防止するために SecG のループが透過孔に「キャップ」をし、膜透過状態ではその「キャップ」を透過孔の上から退けることで、タンパク質の膜透過を調節しているということが示唆された。また、図 1 中で紫色に表示されているプラグとよばれる部位が細胞外側から蓋をしているという過去の知見と組み合わせて、透過孔は細胞膜の両側から閉ざされ、タンパク質の輸送に応じて開くという新たなモデルを提唱した。同時に、基質をミミックしたと考えられるペプチドが結合した SecYEG の結晶構造も解明し、SecYEG と膜透過基質タンパク質との相互作用や、タンパク質の膜透過における SecYEG の初期の構造変化についても議論を行った。

#### 「膜タンパク質を膜組み込みする膜タンパク質 YidC の構造機能解析」(論文発表2-5)

本研究により細菌 *Bacillus halodurans* と *Escherichia coli* の YidC の結晶構造をそれぞれ、2.4 Å 分解能、3.2 Å 分解能で決定した(図2)。YidC の結晶構造から、どちらの構造も内部に大きな溝を持っていることが判明した。その溝は多くの親水的なアミノ酸によって構成されており、プラス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ことは、これまでの研究からは全く予測されていなかった新規の発

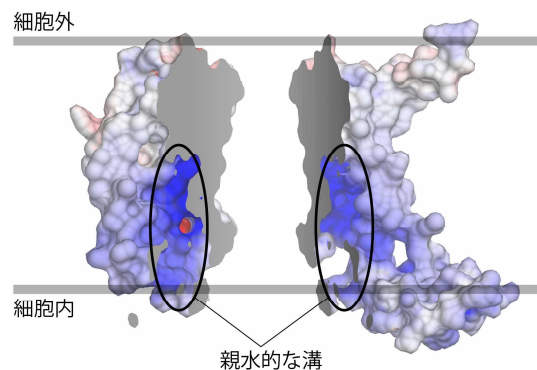


図 2 YidC の構造(断面図)

見であった。この YidC の構造情報に基づいて進めた *in vivo* クロスリンク実験や枯草菌や大腸菌を用いた遺伝学的解析によって、YidC は「親水的な溝」で細胞膜に組み込まれる膜タンパク質(基質タンパク質)と相互作用することが判明した。この溝を構成する親水的なアミノ酸のうち、溝の中心に位置するプラスの電荷を持ったアルギニン残基(BhYidC では 72 番目のアミノ酸残基)は生物間で広く保存されており、YidC の働きに極めて重要であることを見出した。これらの結果と過去の知見を組み合わせることで、「YidC が基質タンパク質と親水的な溝で相互作用することで、細胞膜の内部に引き込み基質膜タンパク質を生体膜へと組み込む」という新規の分子メカニズムを提唱し、タンパク質が細胞膜に組み込まれる生命現象の解明に大きな進展が見られた。

#### 「タンパク質膜透過反応の一ユニット動態観察にむけて」(その他の成果2)

Secトランスロコンを介した膜透過は、細胞質膜に局在する SecA ATPase の反復運動によって、段階的に行うとされている。現在は、各結晶構造情報に基づく機能解などが進められているものの、未だなおこれら Sec タンパク質が何量体で機能しているのか、また、どのような構造変化を伴ってタンパク質を膜透過させているのかの詳細な分子メカニズムについては不明である。本研究室では、タンパク質の膜透過を *in vitro* で再現し、一ユニットでのタンパク質膜透過反応を観察するための準備を進めた。本研究内容は、平成 26 年度蛋白質科学会シンポジウムにてその詳細を発表した。

Sec 関連タンパク質の X 線結晶構造解析については、着実に様々な状態の構造を明らかと

し、構造情報に基づく分子動力学計算や機能解析などを進めてきた。上記の SecYEG と YidC の構造機能解析だけでなく、いくつかの Sec 関連タンパク質の未発表の構造機能解析データも蓄積している。今後、これらをまとめ発表する予定である。本研究の大きな目標のひとつが、動的な Sec トランスロコンによる膜透過の解明である。本研究によって、*in vitro* において一ユニットで働く系を立ち上げた。この系を用いてタンパク質膜透過反応の測定へと進める。本研究では、達成目標に沿ったかたちで研究を進め、責任著者として論文を4報発表した。同時に一ユニット観察という極めて困難な課題にも果敢にチャレンジをして、足がかりを得た。今後の新しい研究の展開につながる研究内容である。研究内容については全般的に計画にそって、順調に進めることができた。

### 3. 今後の展開

Sec トランスロコンマシーナリは膜の透過障壁の機能を失わず、タンパク質という巨大な分子を膜透過・膜組み込みさせる緻密なシステムである。本研究における YidC と SecYEG の詳細構造の報告によって、細菌の Sec トランスロコン複合体を構成するすべての因子の詳細構造情報が揃ったことになる。今後、これらの構造情報を用いた機能解析が進展すると思われるが、各因子の特定状態の構造だけでは Sec トランスロコンを完全理解するには至らない。これらの複合体は過渡的であり、常に離合・集散を行っているため、オリゴマー状態の情報や動的な情報を得る必要がある。そのためには、X 線結晶構造解析を中心とした手法だけでなく、近年急速に発展してきた電子顕微鏡による単粒子解析や1ユニット動態解析などの手法を組み合わせる必要がある。Sec トランスロコンによるタンパク質の輸送については非常に基本的なメカニズムであり、今後も当該分野の研究が進展すると考えられる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

さががけ研究を含む研究内容が評価され、2013年4月に奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科に准教授として異動し、自身の研究室を立ち上げ、研究に集中できる環境を得た。独立後は、Gordon Research Conferences 国際学会を含む多くの招待講演なども増え、さががけ研究期間内で研究者としての飛躍につながった。

Sec 関連因子の構造機能解析を進め、責任著者として4報を発表した。うち、2015年に発表した Cell Rep. の論文は、奈良先端大で行ったデータが主となっている。研究目的の一つである困難な動的なタンパク質膜透過一ユニット観察については、目処がつきつつある。他にも未発表の構造機能解析のデータが蓄積しており、今後これらをまとめて論文発表を行う。これらの研究をスムーズに遂行するために、機器の導入、消耗品などに予算を執行した。さががけ研究をとおして、研究室を立ち上げ、研究期間内に自身の研究を軌道に乗せることができた。

本研究で進める基礎的な分野の研究には、予算を獲得することが困難であるがさががけ研究によるサポートによって、本研究を邁進することが可能となった。現在、私たちは Sec トランスロコンの構造生物学的な解析については世界トップレベルである。今後も我々が Sec トランスロコンの構造生物学的解析を先導していきたい。本研究の成果は科学の発展に大いに貢献する研究であった。本研究成果に基づき、当該分野でさらなる研究が進展することを期待し



ている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

助教までの研究室においてもタンパク質の膜透過研究を主宰し、3つの新規の膜透過装置の構造を解明し、Nature 誌に発表した。これらの論文は、引用件数も多く、世界中で注目されている。特に本さがけ期間中に構造解明した YidC に関しては、数多くの世界的な競争に打ち勝って、2生物種由来の構造と分子メカニズムを報告した。

奈良先端科学技術大学院大学で独立准教授になった後も、それまでの技術を駆使して、高分解能の SecYEG の構造を解明し、Cell Reports に責任著者の論文が受理されており、研究室主宰者としても、今後の成果が期待される。

これまでの研究のように、構造決定だけにこだわるのではなく、遺伝学、生化学、生物物理等様々な手法を用いて(共同研究も含めて)、多角的に機能に着目し、分子メカニズムを解明して欲しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. 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). [責任著者]
2. 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).
3. 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). [責任著者]
4. 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). [責任著者]
5. 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). [責任著者]

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1.(学会発表)「Structures of Membrane Protein Insertase YidC」*Gordon Research Conferences: Membrane Protein Folding*(アメリカ合衆国 ボストン・2015.6.21)
- 2.(学会発表)「Sec タンパク質膜透過装置の活写にむけて」日本蛋白質科学会年会 シンポジウム 構造生命科学をさがける先端的基盤技術(横浜・2014.6.5)
- 3.(著作物)塚崎智也.「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」*実験医学(増刊 構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか 田中啓二、若槻壮市 編)*, 32, 1571-1575 (2014).
- 4.(著作物)塚崎智也、濡木理.「タンパク質膜透過装置 Sec トランスロコン複合体」*膜タンパク質構造研究* 岩田 想 編、p44-52 (2013)
- 5.(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を開閉して制御 細胞内における基本的な生命現象の理解へ～ (2015.11.13)  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151113/index.html>
- 6.(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～バクテリアから人まで共通した基本的な生命現象の理解へ～ (2014.4.17)  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140417/index.html>