

博士論文番号：1561007

タンパク質膜透過チャネル Sec トランスロコンの
静的動的構造基盤

菅野 泰功

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 膜分子複合機能学

(塚崎 智也 准教授)

平成 30 年 1 月 22 日提出

所属 (主指導教員)	膜分子複合機能学 (塚崎智也 准教授)		
氏名	菅野 泰功	提出	平成 29年 12月 12日
題目	タンパク質膜透過チャネル Sec トランスロコンの 静的動的構造基盤		
<p>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細胞膜を越えて輸送される過程は、すべての生物に保存されている必須の仕組みであり、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 (膜タンパク質複合体SecYEG チャネル) はそれ自体、受動的なprotein conducting channelであり、タンパク質が膜透過する際には駆動力が必要となる。真正細菌では、モータータンパク質SecA ATPaseがSecYEG と離合集散し、ATPの加水分解に伴うダイナミックな構造変化を繰り返すことで、タンパク質の膜透過を駆動する。タンパク質の膜透過反応についてはノーベル賞の受賞にもつながったブローベルらの「シグナル仮説」をはじめ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た。2002年にSecAのX線結晶構造解析が達成されて以降、次々とSecタンパク質の結晶構造が報告され、構造情報に基づき、Secタンパク質の機能解析が進められている。しかしながら、Sec トランスロコンのすべてのコンポーネント (SecY, SecE, SecG) が含まれた状態での構造解析は最高で4.5 Åであったため、アミノ酸残基レベル以上の詳細な相互作用の検討は困難であった。さらに動的構造情報が不足しており、いったいどのようにして細胞膜の透過障壁を保ったままタンパク質という巨大な分子を透過させているのかについては不明な点が多い。したがって、タンパク質の膜透過マシーナリーを明らかにするには、特にリアルタイムの動的な解析が欠かせないが、膜透過反応においては、それぞれのトランスロコンが同時に同じ構造変化を起こすのではなく、それぞれ独立にタンパク質を膜透過させるため、動的メカニズムの解析には平均値をだすような測定方法ではなく、「1ユニットの動態解析」が必要である。そこで本研究では、SecYEG複合体の高分解能構造解析を行ない、さらに1ユニット膜タンパク質再構成系である「Nanodisc」とナノメートルオーダーでの空間分解能・100ミリ秒程度の時間分解能で観測が可能である「高速原子間力顕微鏡 (高速AFM)」を用いて、実際にタンパク質が膜透過するところを動画として捉えることを最終目標とした。タンパク質の膜透過反応におけるSecタンパク質は1 nm以上の構造変化が予測されており、本研究で用いる高度好熱菌由来のSecYEGとSecAを用いたタンパク質の膜透過が完了するまでも分単位の時間を要することから、高速AFMでの観察が適していると考えた。</p>			

まず始めに、我々は SecYEG 複合体の高分解能構造解析を進めた。近年膜タンパク質の結晶化法として主流となっている脂質との共結晶化法 (LCP 法) によって 2.7 Å 分解能で構造を決定した。これにより詳細な SecYEG 複合体の構造が明らかとなった。特筆すべきことは、これまでの解析ではディスオーダーしていた SecG のループ構造が明らかとなり、SecY にある基質タンパク質が透過する孔を塞ぐように位置していた。そこで、SecG の役割を明らかとするために、変異体を用いてタンパク質膜透過の活性測定を行なった。その活性測定の結果と共同研究による MD シミュレーションの結果から、閉状態の SecY チャンネルは、細胞外からはプラグと呼ばれるドメインにより栓がされ、また細胞内からはキャップとして SecG のループにより蓋がされている二重の閉じた構造を持つことを初めて明らかにした。また、シグナル配列が結合した状態を模倣した別状態の構造情報も得られ、基質タンパク質が認識されるラテラルゲートの細胞質側の SecY の構造変化についても考察した。

Sec によるタンパク質膜透過の動的精密探査を達成するためには、Sec 複合体の離合集散を必要最小限にする必要があった。そこで、SecA と SecY をアミノ酸リンカーで繋いだ融合タンパク質 SecY-SecA/SecE/SecG 複合体 (SecYAEG) の安定発現系を構築し、高純度で精製することに成功した。精製した SecYAEG は、リポソームを用いた *in vitro* でのタンパク質の膜透過解析により活性を保持していた。次に脂質・SecYAEG・膜骨格タンパク質 (MSP) からなるナノ粒子「Nanodisc」への再構成を進めた。Nanodisc への再構成には、界面活性剤の除去方法・再構成時の比率 (脂質：膜タンパク質：MSP) などの条件の最適化を行ない、SecYAEG 複合体の再構成 Nanodisc を安定して作成できる条件を見出した。SecYAEG が再構成された Nanodisc と基質タンパク質の相互作用解析を進めた結果、特にシグナル配列と SecA が強固に相互作用していることが確認できた。

続いて高速 AFM で観察を進めるにあたりまず基板への固定化方法を検討し、ストレプトアビジン二次元結晶基板を用いて、非特異的な相互作用を排除しつつ Nanodisc の配向性を制御することに成功した。この手法を用いて、SecYAEG 複合体の観察を進めるうちに、細胞質内外の配向といった縦の制御だけでなく、Nanodisc を横向きに固定できる条件を見出した。この手法の開発により SecYAEG の構造変化を細胞質側からだけでなく、脂質膜と平行な側からの解析も可能となった。特に基質タンパク質の透過を観察するにあたり非常に有効な系となる。また基質タンパク質の変異体の作成を進め、前駆体タンパク質 proOmpA の C 末端に super folder GFP を融合させた基質を用いた場合にのみ見られる膜透過中間体らしき観察像の取得に成功した。本研究によってこれまで困難であった膜タンパク質の動的構造情報を得ることができる Nanodisc と高速 AFM を用いた測定系の確立ができた。

論文目録

所属 (主指導教員)	膜分子複合機能学研究室 (塚崎 智也 准教授)		
氏名	菅野 泰功	提出	平成 29年 12月 12日
学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			
Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. Tanaka Y [†] , Sugano Y [†] , Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O, Tsukazaki T. ([†] Co-firstauthor). 2015. Cell Rep. 13. 1561-8			
SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. Sugano Y , Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, Tsukazaki T. 2017. PLoS One. 12. e0183434.			
参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)			

略語一覽

略語	正式名称
ADP	Adenosine diphosphate
AFM	Atomic Force Microscope
ATP	Adenosine triphosphate
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DDM	n-dodecyl- β -D-maltopyranoside
DM	n-decyl- β -D-maltopyranoside
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GFP	Green Fluorescent Protein
sfGFP	superfolder Green Fluorescent Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Bertani
MSP	Membrane Scaffold Protein
Nd	Nanodisc
Pefabloc	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonylfluoride hydrochloride
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SRP	Signal Recognition Particle
SDS-PAGE	Sodium laurylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

第 1 章 序論	8
1.1 タンパク質膜透過・膜組込み	8
1.2 Sec トランスロコンを介したタンパク質膜透過	9
1.3 タンパク質膜透過を担う中心的因子の構造生物学的知見	10
1.3.1 SecA ATPase	10
1.3.2 SecY, SecE, SecG	12
1.4 ダイナミックなタンパク質膜透過モデル	15
1.5 1 ユニット動態観察の技術	17
1.5.1 Nanodisc	17
1.5.2 高速 AFM(高速原子間力顕微鏡).....	18
1.6 本研究の目的	19
第 2 章 材料・方法	20
2.1 TtSecYEG 複合体の構造機能解析.....	20
2.1.1 TtSecYEG 複合体の発現・精製	20
2.1.2 TtSecYEG 複合体の結晶化.....	21
2.1.3 X 線回折実験およびデータ処理.....	21
2.1.4 位相決定および精密化.....	21
2.1.5 分子動力学(MD)シミュレーション	22
2.1.6 SecYEG 変異体の作製.....	22
2.1.7 proOmpA-His6 の精製.....	22
2.1.8 リポソームへの再構成.....	23
2.1.9 タンパク質膜透過活性測定	23
2.2 TtSecY-SecA/SecE/SecG 複合体(SecYAEG)の機能解析	24
2.2.1 TtSecYAEG 複合体の精製	24
2.2.2 proOmpA(L59), proOmpA(L59)-sfGFP 変異体発現プラスミド作製 ...	25
2.2.3 proOmpA(L59), proOmpA(L59)-sfGFP 変異体の精製	25
2.2.4 Nanodisc への再構成	26
2.2.5 Nanodisc-SecYAEG と基質との相互作用	26

2.2.6	再構成リポソームを用いたタンパク質膜透過中間体の検出	26
2.3	高速 AFM を用いたタンパク質膜透過反応の観察	27
2.3.1	TtSecYAEG 複合体発現用プラスミドベクター	27
2.3.2	TtSecYAEG 複合体の精製・ビオチン化	27
2.3.3	ストレプトアビジンの二次元結晶基板の作成・観察	28
2.3.4	Nanodisc-SecYEG(Nd-SecYEG)の観察	29
2.3.5	Nanodisc-SecYAEG(Nd-SecYAEG)の観察	29
2.3.6	Nd-SecYAEG と基質の複合体の観察	29
2.3.7	Nd-SecYAEG の高速 AFM 画像のシミュレーション	29
表 1	使用したプラスミド一覧	31

第 3 章 結果と考察 32

3.1	TtSecYEG 複合体の構造機能解析	32
3.1.1	SecYEG 複合体の結晶化	33
3.1.2	X 線回折実験	33
3.1.3	位相決定と精密化	33
3.1.4	resting-state SecYEG(閉状態, I222 構造)	36
3.1.4.1	構造の概要	36
3.1.4.2	pre-open state SecYE との構造比較	38
3.1.4.3	SecA 結合状態の SecYEG との構造比較	39
3.1.5	分子動力学シミュレーション(MD シミュレーション)	41
3.1.6	SecY と SecG のループの架橋実験	42
3.1.7	SecY-SecG 架橋産物のタンパク質膜透過活性測定	43
3.1.8	peptide-bound SecYEG	45
3.1.8.1	構造の概要	45
3.1.8.2	分子動力学シミュレーション(MD シミュレーション)	47
3.1.9	SecG の役割を含めたタンパク質膜透過のモデル	48
3.1.10	まとめ	49
3.2	TtSecY-SecA/SecE/SecG 複合体(SecYAEG)の機能解析	50
3.2.1	SecYAEG 複合体のタンパク質膜透過活性測定	51
3.2.2	1 ユニット再構成系である Nanodisc への再構成	53
3.2.3	Nd-SecYAEG と基質との相互作用	55

3.2.4	再構成リポソームを用いたタンパク質膜透過中間体の検出.....	57
3.2.5	SecYEG と SecA の化学量論.....	59
3.2.6	まとめ.....	59
3.3	高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質膜透過反応の観察.....	60
3.3.1	ストレプトアビジンの二次元結晶基板.....	61
3.3.2	SecYEG 再構成 Nanodisc の観察.....	62
3.3.3	SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察.....	64
3.3.4	SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察結果の解析.....	66
3.3.5	別角度からの SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察.....	68
3.3.6	Nd-SecYAEG と基質の複合体の観察.....	70
3.3.7	過去の Sec トランスロコンの AFM 解析との比較.....	73
3.3.8	まとめ.....	74
第 4 章	参考文献.....	76
	謝辞.....	82

第1章 序論

1.1 タンパク質の膜透過・膜組込み

細胞質でリボソームにより合成されたタンパク質がその機能を発揮するには、膜を越えて輸送される必要がある(タンパク質膜透過)。そのタンパク質膜透過過程は、すべての生物に保存されている必須の仕組みであり、細菌では細胞質からペリプラズムへ、真核生物においては細胞質から小胞体内腔への輸送に相当する。細胞膜は細胞の内側と外側を隔てており、イオンや小分子などの分子量の小さな物質のほとんどが専用の輸送機関によって運ばれる。細胞膜には、細胞膜内外の物質輸送を可能にするためのチャネルやトランスポーターなどの膜タンパク質がある。大腸菌においてタンパク質膜透過の主な経路は、フォールディングした状態でタンパク質を輸送する Tat pathway, アンフォールディングした状態でタンパク質を輸送する Sec pathway がある(図 1-1)。Sec pathway においてタンパク質の通り道となるチャネルを構成している膜タンパク質は、原核生物では SecYEG 複合体(真核生物の Sec61 $\alpha\gamma\beta$)である(Ling Lin *et al.*, 2007; Kudva *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014; Tsirigotaki *et al.*, 2017)。

SecYEG 複合体(Sec トランスロコン)を介したタンパク質膜透過において、細胞質で合成された前駆体タンパク質は SecYEG 複合体のチャネルだけでは膜を越えてペリプラズム側へ膜透過されない。前駆体タンパク質の膜透過を行なうには駆動力が必要である。そのタンパク質膜透過を担うモータータンパク質として SecA ATPase, プロトン駆動型モーターSecD/SecF 複合体(Tsukazaki *et al.*, 2011)が存在する。また Sec トランスロコンには、新規に合成された膜タンパク質を膜に組込む働きもあり、YidC と呼ばれる膜タンパク質も膜組込みに関わっている(du Plessis *et al.*, 2011; Kumazaki *et al.*, 2014; Denks *et al.*, 2014)。

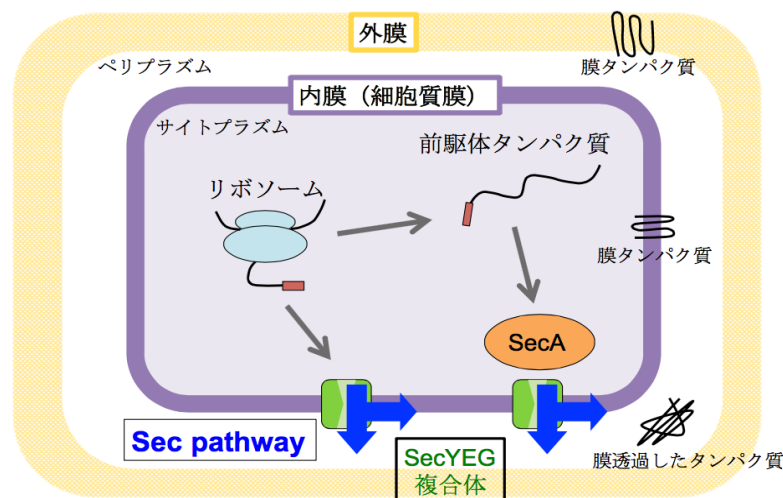


図 1-1. 原核生物の Sec pathway におけるタンパク質膜透過・膜組込み

1.2 Sec トランスロコンを介したタンパク質膜透過

Sec トランスロコン(SecYEG 複合体)を経由するタンパク質膜透過には、Co-translational translocation と、Post-translational translocation と呼ばれる駆動力の異なる二種類の方法がある(Koch *et al.*, 1999; Mitra *et al.*, 2006)。Co-translational translocation は、リボソームにより合成された翻訳途中のタンパク質の N 末端のシグナル配列が SRP(Signal Recognition Particle)により、SRP receptor である FtsY を経由し、Sec トランスロコンへと運ばれ、翻訳と共役することでタンパク質の膜透過が行なわれる(Saraogi *et al.*, 2014)(図 1-2A)。一方、Post-translational translocation は、リボソームにより細胞質で合成が完了した前駆体タンパク質が、シャペロン SecB などによりアンフォールディングの状態を保ったままモータータンパク質 SecA ATPase へと運ばれる。その後 SecA が SecYEG と結合し、シグナル配列が SecYEG へと受け渡され、SecA が ATP 加水分解エネルギーを利用してタンパク質を押し出す動作を繰り返すことにより膜透過される。さらにペリプラズム側から膜タンパク質 SecDF 複合体が膜透過してきたタンパク質と相互作用し、SecYEG から出てきた分泌タンパク質を牽引する働きをする(Tsukazaki *et al.*, 2011; Lycklam and Driessen, 2012; Furukawa *et al.*, 2017)(図 1-2B)。

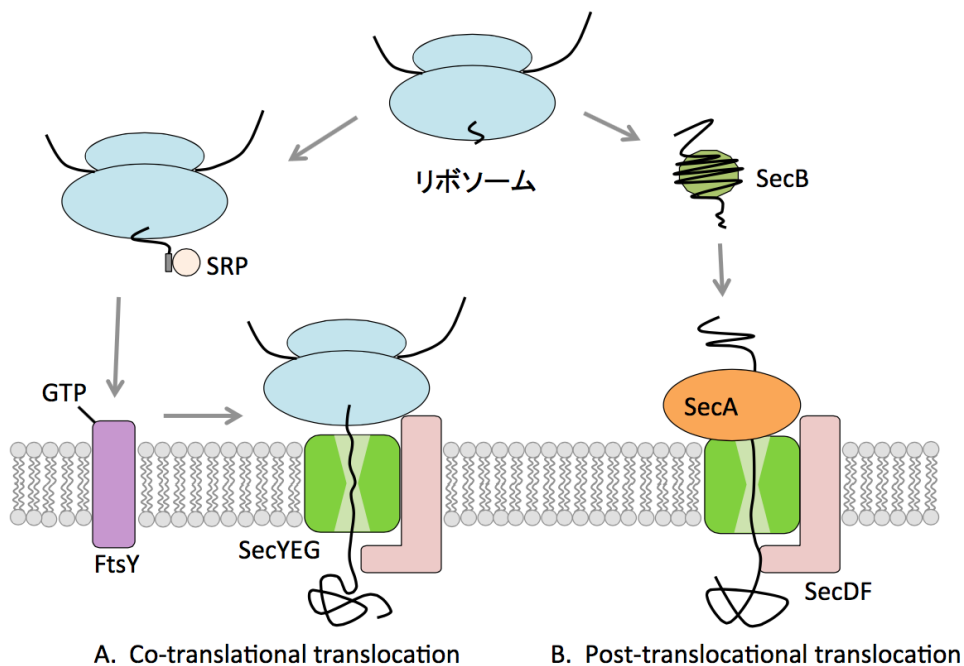


図 1-2. 原核生物の Sec トランスロコンを介したタンパク質の膜透過

- A. Co-translational translocation の経路
- B. Post-translational translocation の経路

1.3 タンパク質膜透過を担う中心的因子の構造生物学的知見

1.3.1 SecA ATPase

SecA ATPase は ATP 加水分解のエネルギーを利用し、翻訳後前駆体タンパク質の膜透過駆動因子として機能する。SecA の構造は 2002 年に *Bacillus subtilis* (Bs) 由来 SecA の構造が初めて報告されて以降、これまでに複数の X 線結晶構造解析の報告がある(Hunt *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2004; Vassylyev *et al.*, 2006; Zimmer *et al.*, 2006; Papanikolaou *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016)。Hunt らが報告した BsSecA 二量体の構造では、SecA は機能と構造により分類された複数のドメインから構成されている。そのドメインは、2 つのヌクレオチド結合フォールド(NBF1, NBF2)と、前駆体タンパク質架橋ドメイン(PPXD)、C 末端ドメイン(IRA1, HWD, CTL)であり、分子内を貫くように位置している HSD により繋がれている(図 1-3A, D, 英語正式名称は図参照)。一方、2004 年に Osborne らにより報告された BsSecA 単量体の構造では、Hunt らの構造と比較して PPXD ドメインが約 60°回転し、C 末端ドメインとの間に大きな溝が形成されており、open 型とされた(図 1-3B)。NMR による SecA-シグナル配列の構造解析からこの溝にシグナル配列が結合することが示唆されており(Gelis *et al.*, 2007)、これらの結晶構造が機能状態への構造変化を示すと考えられている。また、2008 年に報告された *Thermotoga maritime* (Tm)由来の SecA と SecYEG 複合体の結晶構造における TmSecA の構造は、Hunt らの構造と比較して PPXD 領域が NBF2 方向に 80°も回転する構造変化が見られ、NBF2 と PPXD の間にクランプが形成されていた(図 1-3C)(Zimmer *et al.*, 2008)。これは SecYEG との相互作用によるもので、膜透過過程における機能状態の SecA の構造であると解釈されている。またこの構造から IRA1 によって基質タンパク質が押し出されるモデルが提唱された。これまで解かれた SecA の構造は様々に異なっているが、これらはいずれも溶液中で実際に存在している結合様式であることが生化学的に確かめられている(Osborne *et al.*, 2004; Erlandson *et al.*, 2008)。しかし、共有結合で繋がれた SecA 二量体はタンパク質分泌活性を持たないこと(Or and Rapoport, 2007)や、単量体の SecA でも活性を持つといった報告もある(Deville *et al.*, 2011)。さらに膜透過途中の基質タンパク質を含んだ SecA と SecYEG の結晶構造(Li *et al.*, 2016)が報告され、膜透過中は単量体である可能性が大いに示唆されているが、SecA の機能単位についての統一見解は得られていない。

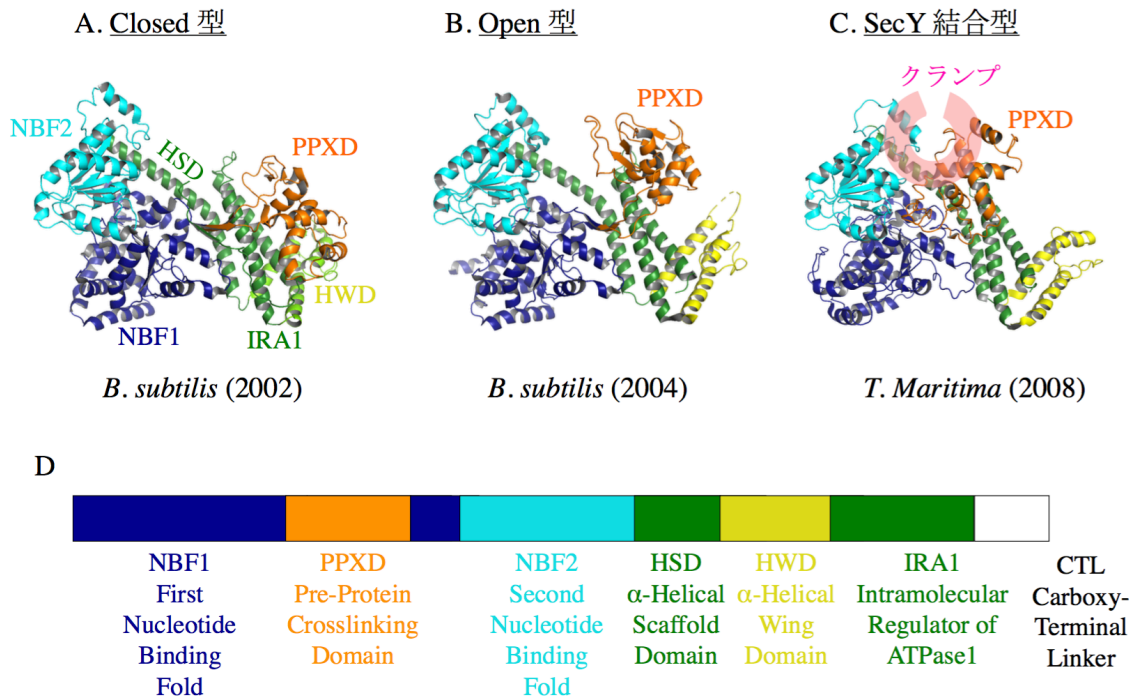


図 1-3. SecA ATPase の結晶構造

- BsSecA の結晶構造 : closed 型 (PDBID: 1M6N)
- BsSecA の結晶構造 : PPXD が NBF2 に約 60° 回転した open 型 (PDBID: 1TF2)
- TmSecA の結晶構造 : PPXD が NBF2 に約 80° 回転した SecY 結合型 (PDBID: 3DIN)
- SecA のドメイン構成 (Mori and Tsukazaki, 2009)
 - NBF1, 2 : Nucleotide Binding Fold 1, 2
 - PPXD : Pre-Protein Crosslinking Domain
 - HSD : α -Helical Scaffold Domain
 - HWD : α -Helical Wing Domain
 - IRA1 : Intramolecular Regulator of ATPase1
 - CTL : Carboxy-Terminal Linker

1.3.2 SecY, SecE, SecG

Sec トランスロコン複合体の中心部を形成するチャンネルは、SecY, SecE, SecG のヘテロ三量体によって構成される。SecY はチャンネルの中心を形成する 10 回膜貫通型の膜タンパク質であり、全ての生物にホモログが存在する必須の因子である。SecE は 1 回または 3 回膜貫通型の膜タンパク質であり、SecY の安定化に必須の因子である。SecG は 2 回膜貫通型の膜タンパク質であり、必須の因子ではないが、SecY と相互作用しタンパク質膜透過の促進に関わっている(Kudva *et al.*, 2013; Nishiyama *et al.*, 1994)。

2004 年に X 線結晶構造解析によって古細菌 *Methanococcus jannaschii*(Mj)由来 SecYE β の構造が報告され、Sec トランスロコンの基本構造が初めて明らかとなった(van den Berg *et al.*, 2004) (図 1-4, 1-5a)。この構造では、SecY の膜貫通ヘリックス TM1-5 と TM6-10 は二枚貝のような疑似対称構造であり、その間にあるループが蝶番の役割をしている(図 1-4)。また SecE がその蝶番を補強するように位置しており、チャンネルの安定化に寄与している。また TM2 と TM8 は膜組込みに関与すると考えられるラテラルゲートを形成している(図 1-4A)。チャンネルは内部に砂時計型の空間を持ち、そのくびれの部分には 6 つの疎水性アミノ酸残基により孔(pore ring)が形成されており、ペリプラズム側から TM2 によって形成された疎水性のプラグ(plug)ドメインで栓をされている。このプラグが前駆体タンパク質の挿入により外れることで、膜透過が起こると考えられた。その後、生化学的な実験による報告の膜透過にはプラグの移動が必要であり(Tam *et al.*, 2005)、前駆体タンパク質は砂時計型の孔の近くを通過する(Cannon *et al.*, 2005) という内容は、チャンネルの構造と一致するものであった。また、このプラグは膜透過途中のポリペプチドの親水性の度合いによって位置を変え、タンパク質のラテラルゲートからの遊離に関わっている可能性が示唆されている(Zhang and Miller, 2010; Hizlan *et al.*, 2012)。

タンパク質膜透過時における架橋実験によると、トランスロコンの中心に位置する TM2 と TM8 の入り口にシグナル配列がやってくると、SecY の二枚貝構造が変化すると同時にプラグの位置も移動し、タンパク質膜透過が駆動されるという報告がある(Harris and Silhavy, 1999; Wang *et al.*, 2004)。同時にラテラルゲートは、膜内へと膜タンパク質を輸送する働きに関与する重要な役割を持つと考えられている。また、プラグにより栓をされた closed 型 MjSecYE β の構造における孔は 5~8 Å であったが、トランスロコンは 2 本のポリペプチド鎖を同時に収容できる可能性があるとの報告(Kida *et al.*, 2007)もあり、膜透過時には closed 型から大きな構造変化が起こることが示唆されている。

2008 年に明らかにされた *Thermotoga maritime*(Tm)由来 SecA と SecYEG 複合体の構造では、SecA の前駆体タンパク質との相互作用部位と考えられる領域が

チャンネルの孔の真上に位置しており、SecA からチャンネルに連続的に前駆体タンパク質の通り道が形成されると提唱された(図 1-5c)。さらに前駆体タンパク質、SecA, SecY 間の架橋実験においても、前駆体タンパク質を連続的に孔へ受け渡すことを支持していた(Erlandson *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2010)。2008 年に報告された Fab との共結晶化により得られた *Thermus thermophilus*(Tt)由来 SecYE の構造(Tsukazaki *et al.*, 2008)と、MjSecYE β の構造 TmSecA-SecYEG 複合体の構造から機能状態のトランスロコンの構造変化の一端が明らかとなった(図 1-5)。

MjSecYE β の構造では、チャンネルはプラグが閉じた closed 型であったが、TtSecYE の構造ではプラグは閉じているものの SecY の TM7, 8, 9 領域が外側に移動し、細胞質側表面に凹型の溝が形成されている(図 1-5b)。Fab 結合部位は SecA 結合部位と同じ領域であり、Fab が SecA の機能に対して阻害的に働くこと、ならびに SecA 依存的に closed 型が減少することから、SecA の結合の初期段階ではチャンネルが pre-open 型をとると解釈された。また、TmSecA-SecYEG の構造では単独の構造と比較して SecA, SecYEG 双方に構造変化が見られた。SecY チャンネルでは SecA との相互作用によって TM7, 8, 9 が外側に移動し側面のゲートがやや開いた構造であった(図 1-5c)。

2010 年には、ラテラルゲートが開いた状態の open 型の状態が *Pyrococcus furiosus*(Pf)SecYE β の構造から解明された(Egea and Stroud., 2010) (図 1-5d)。これらの構造解析から SecA とチャンネル SecYEG は膜透過時の相互作用により、協調的に構造を変化させて機能する事が示された。

近年のクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の進歩により、2014 年に Sec61 とリボソームの構造が 3.4 Å 分解能で報告され、2016 年にはシグナルペプチド付きで膜透過途中の Sec61 とリボソームの構造が 3.6 Å 分解能で報告された(Voorhees *et al.*, 2014; Voorhees and Hegde, 2016)。また 2016 年に SecYEG においても、基質が膜透過途中の SecYEG-SecA-peptide 複合体の結晶構造が 3.7 Å 分解能で報告された(Li *et al.*, 2016)。膜透過途中の構造の両方でシグナルペプチドは、チャンネル内からラテラルゲートへと出てくるように位置しており、ラテラルゲートを構成している TM2 を押し上げていた。近年報告されたいずれの構造においても SecYEG は 1 分子であり、膜透過途中では SecYEG は 1 分子である可能性が高い。しかしながら細胞内において、SecA による膜透過途中の SecYEG を、光架橋実験や S-S 結合を用いた手法によって、ダイマーやオリゴマーで検出した報告(Zheng *et al.*, 2016)もあり、SecYEG の機能単位についても見解は統一されていない。

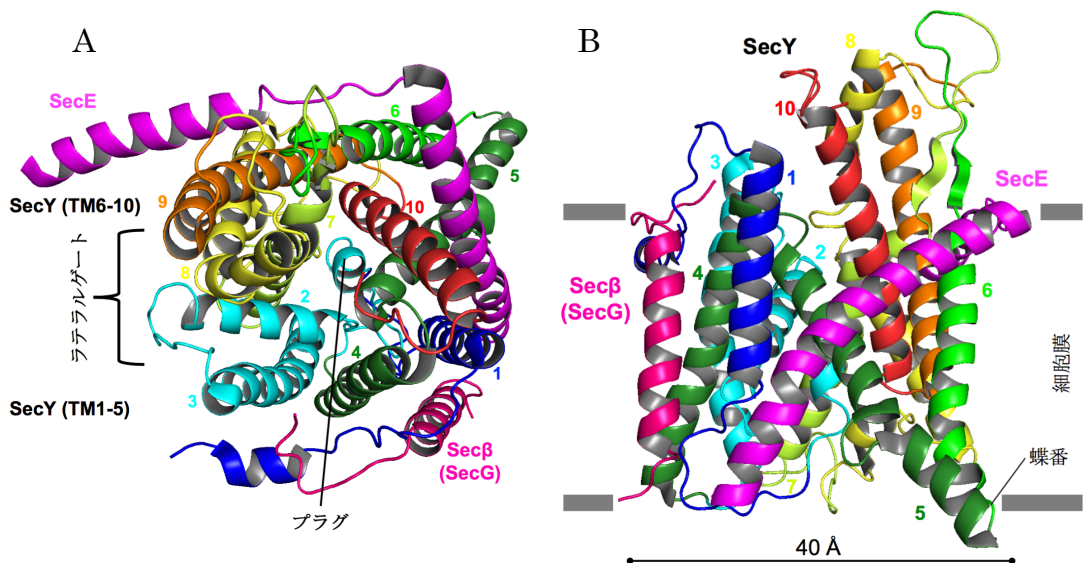


図 1-4. *Methanococcus jannaschii*(Mj)由来 SecYE β の構造

- A. 上から見た MjSecYE β の構造。ラテラルゲートとプラグを指し示している。
 B. 側面から見た MjSecYE β の構造。蝶番を指し示し、SecYE β のサイズを示した。

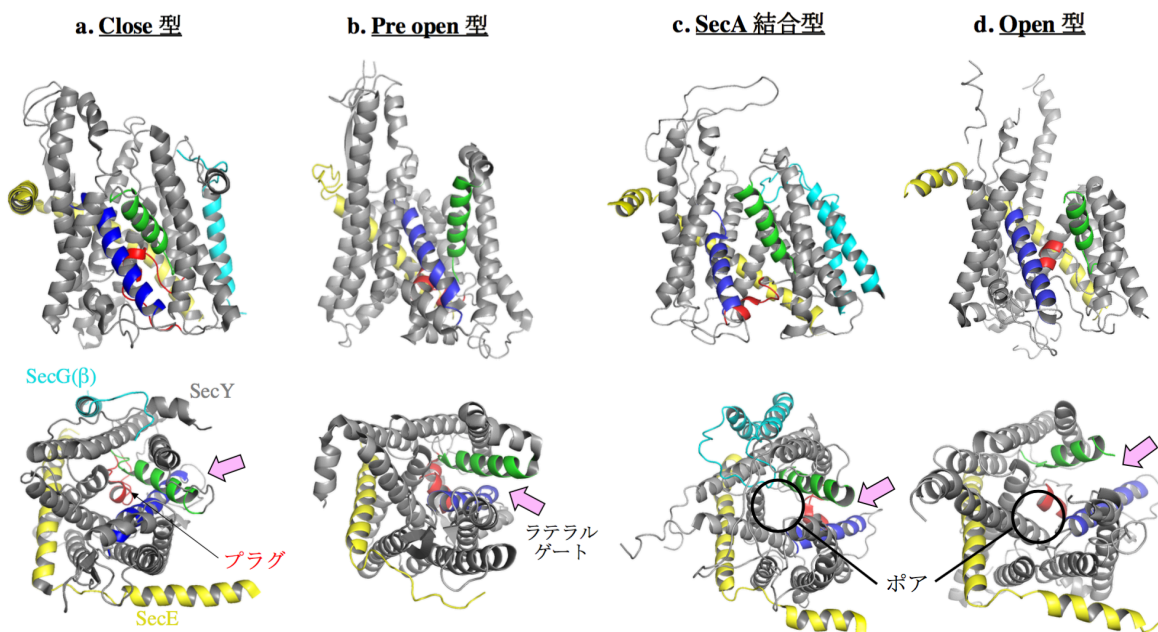


図 1-5. 膜透過チャネルの構造

(上図は細胞膜を横から見た図, 下図は細胞質側から見た図)

SecY の TM2 と TM8 を緑色と青色で表示し、プラグを赤色で、ラテラルゲートを桃色の矢印で表示している。また SecE, SecG はそれぞれ黄色と水色で示している。a から d のように一連の構造変化を起こすと考えられている (Lycklama and Driessen, 2012)。

- Methanococcus jannaschii* SecYE β (PDBID: 1RHZ) (Close 型)
- Thermus thermophilus* SecYE (PDBID: 2ZJS) (Pre-open 型)
- Thermotoga maritima* SecYEG (PDBID: 3DIN) (SecA 結合型)
- Pyrococcus furiosus* SecYE β (PDBID: 3MP7) (Open 型)

1.4 ダイナミックなタンパク質膜透過モデル

原核生物における前駆体タンパク質の膜透過についてのモデルは数多く存在し、現在のところ統一見解は得られていない。モータータンパク質 SecA が駆動するタンパク質膜透過におけるモデルとして、SecYEG 複合体はダイマーを形成するが、前駆体タンパク質のチャンネルとして機能するのは1つのユニットの SecYEG 複合体(translocating copy)であり、もう一方の SecYEG 複合体(non-translocating copy)は SecA を活性化するために必要な足場として機能するというモデル(Osborne and Rapoport, 2007; Tsukazaki *et al.*, 2008) (図 1-7A)がある。

他にも、1ユニットの SecYEG 複合体とモノマーの SecA が機能単位であり、ATP 加水分解のエネルギーを利用した SecA の IRA1 の構造変化により前駆体タンパク質が押し出されるというモデル(Zimmer *et al.*, 2008; Erlandson *et al.*, 2008) (図 1-7B)が提唱されている。

また SecA は通常ダイマーで存在しており、ダイマーのまま SecYEG へと結合する。その後、基質が結合することで SecA と SecYEG がそれぞれ構造変化し、基質が SecYEG へと受け渡され、タンパク質の膜透過が開始するときに SecA がダイマーからモノマーへ解離するというモデルも提唱されている。タンパク質の膜透過が開始されると SecA はモノマーで機能し、膜透過が終わるとその SecA も SecYEG から解離するというモデル(図 1-7C)も近年報告された(Gouridis *et al.*, 2013)。他にも多くのダイナミックなモデルが提唱されている(Mitra *et al.*, 2005; Deville *et al.*, 2011 他)。

近年の構造機能解析における知見からはタンパク質の膜透過中は SecYEG と SecA は 1 : 1 で機能することが統一見解として得られつつある(Zimmer *et al.*, 2008; Park and Rapoport, 2012; Li *et al.*, 2016)。

これらのモデルは構造情報や様々な生化学的実験により提唱されているが、未だ憶測の域を出ておらず、実際のタンパク質膜透過過程において SecYEG や SecA がどのような構造変化を伴い、タンパク質の膜透過を達成しているのかを明らかとするには、リアルタイムでの測定による動的な観察が必要となる。

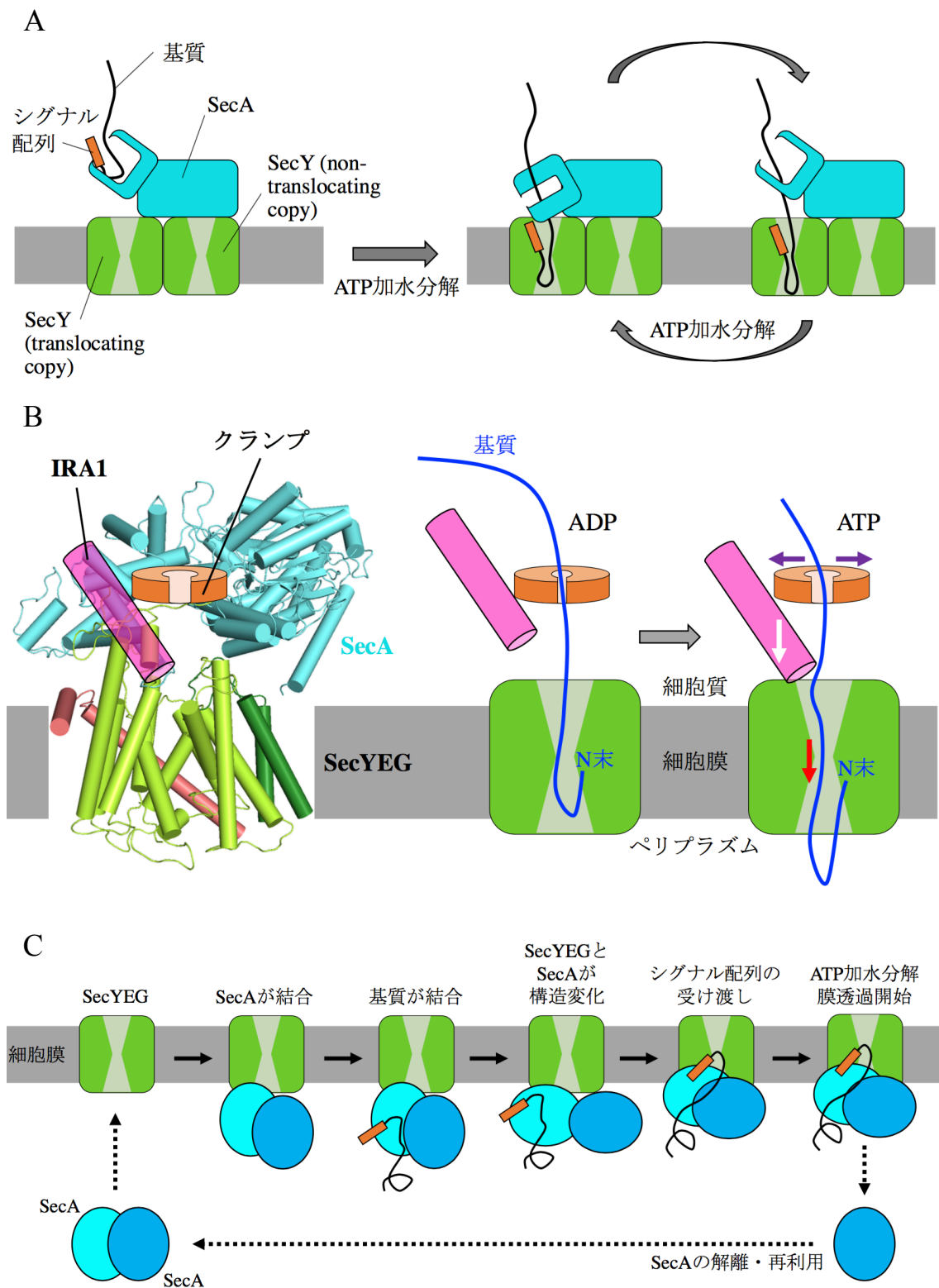


図 1-7. ダイナミックなタンパク質膜透過モデル

A. SecYEG 複合体のダイマーと SecA のモノマーのタンパク質膜透過モデル。

B. SecYEG 複合体 1 ユニットと SecA のモノマーのタンパク質膜透過モデル。

C. SecA のダイマーが SecYEG に結合して膜透過を開始するまでのモデル

1.5 1 ユニット動態観察の技術

1.5.1 Nanodisc

Nanodisc は、膜タンパク質の研究において非常に有効な *in-vitro* システムである。通常膜タンパク質はその性質上水に対して不溶性であり、界面活性剤などで可溶化させる必要がある。しかし、界面活性剤存在下における解析は、界面活性剤の影響により分析方法が限られること、また膜タンパク質が本来の膜環境にないために活性そのものが測定できてない場合がある。Nanodisc に膜タンパク質が組み込まれた状態であれば水に対して可溶化でき、組み込まれた膜タンパク質の機能活性も維持できる(Bayburt *et al.*, 2002; Nath *et al.*, 2007)。膜タンパク質と脂質と Membrane Scaffold Protein(MSP)を混合し、界面活性剤を取り除くことで Nanodisc への再構成が可能である。Nanodisc は、目的タンパク質を含む脂質二重層を MSP で囲まれた粒子であり(図 1-8)、溶液中で単分散しており、ミクロソームやプロテオリポソームに比べ粒子の均一性が改善されている(Shih *et al.*, 2007)。粒子の大きさが均一であり、膜の流動性も最小限に抑えられ、界面活性剤を含まない水性環境で使用できる Nanodisc 内に組み込まれた膜タンパク質は、これまで多くの研究報告がされている。Nanodisc へ再構成する SecYEG 複合体を 1 ユニットまたは 2 ユニットと調節できることを見出だし、その Nanodisc-SecYEG 複合体を用いて、SecA との相互作用解析を行なった報告(Alami *et al.*, 2007) (図 1-8B)や、タンパク質膜組み込み装置である YidC をモノマーとして Nanodisc に組み込んだ報告(Kedrov *et al.*, 2013)など Sec タンパク質の解析に利用されている。

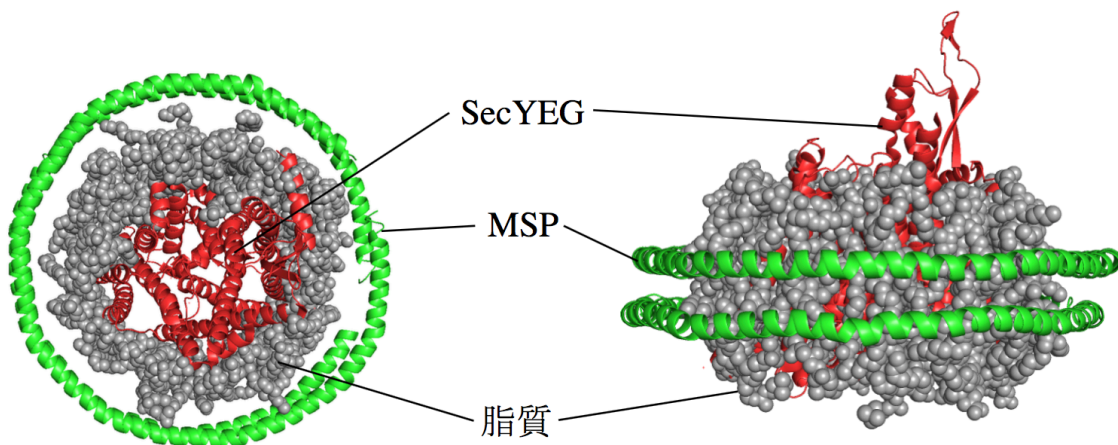


図 1-8. Nanodisc の概略図

Nanodisc を上部から見たモデル(左図)と側面から見たモデル(右図)。例として SecYEG 埋め込んでいるが、膜タンパク質の周辺を脂質が、その外側を膜骨格タンパク質(MSP)が囲んでいる。ディスク状に膜タンパク質が再構成されている様子が伺える。

1.5.2 高速 AFM(高速原子間力顕微鏡)

高速 AFM とは、従来の原子間力顕微鏡(atomic force microscope : AFM)のイメージングの速度を向上させたものである。従来の高速でない AFM でも、光学顕微鏡よりも高い空間分解能で試料をイメージングできるが、撮影速度が溶液散乱に比べて非常に遅く、実質的に静止した試料しか観察できない。高速 AFM はこの時間分解能を向上したことで、タンパク質などの生体分子の動作プロセスを捉えることができるようになった(Ando *et al.*, 2001; Ando *et al.*, 2008)。高速 AFM は上部から探針で検出することから、一般的な生体分子を用いて観察される像の高さ(z 方向)の分解能は 0.1 nm と高い値である。また水平方向(xy 方向)は、基盤を固定したステージが xy 方向に動いて検出していることや、探針の細さの影響もあり z 方向よりは低下するが、その分解能は 1 nm 程度と高い値となっている。これまでの観察の中で代表的なものは、アクチンフィラメント上を歩くミオシンVであり、連続的に約 36 nm 間隔で一方向に進むミオシンVが動画として得られている(Kodera *et al.*, 2010)。一般的な AFM の表示法では、観察される像の高さが高くなるにつれて、黒色から橙色そして白色と着色していく。

高速 AFM や高速でない AFM で可溶性のタンパク質は数多く報告があるが、膜タンパク質を可溶化させた溶液には界面活性剤が入っていることからその詳細な観察は難しく、観察できた粒子の中には生体膜ではありえない構造をしていることもある。また平面膜など脂質膜に埋め込んだ状態では、脂質が AFM の探針に付着し分解能が低下するなどの問題で可溶性ドメインの詳細な観察も困難であることから膜タンパク質の観察の報告例は可溶性のタンパク質と比べると少ない。

1.6 本研究の目的

タンパク質の膜透過・膜組込みを担う Sec トランスロコンの構成因子のうち、*Thermus thermophilus* 由来の Sec 因子(SecYEG, SecA, SecDF)はすべて結晶構造が解明された(Vassylyev *et al.*, 2006; Tsukazaki *et al.*, 2008; Tsukazaki *et al.*, 2011)。さらに様々な生物種において SecY と SecA の結晶構造が解かれ、タンパク質膜透過における動的メカニズムの解明は着実に進んでいる(Lycklama and Driessen, 2012)。近年、高速でない AFM 観察や、Nanodisc と FRET を用いた実験により、Sec トランスロコンの一分子観察が精力的に進められている(Taufiket *et al.*, 2013; Kedrov *et al.*, 2013; Sanganna Gari *et al.*, 2013)。しかしながら、動的要素の多いタンパク質の膜透過反応の完全理解には至っておらず、動的なところは未だ憶測の域を出ない。また、Sec トランスロコンのすべてのコンポーネント(SecY, SecE, SecG)が含まれた状態での構造解析は最高で 4.5 Å であったため、アミノ酸残基レベル以上の詳細な相互作用の検討は困難であった。さらに、それぞれのトランスロコンが同時に同じ構造変化を起こすのではなく、各々の因子が独立にタンパク質を膜透過させる。そのため、タンパク質膜透過過程の動的メカニズムの解析には、平均値をだすような測定法ではなく、「1 ユニットの動態解析」が必要である。

そこでナノメートルオーダーでの空間分解能・100 ミリ秒程度の時間分解能で観測が可能である高速 AFM を用いて、タンパク質膜透過過程を動画として捉えることを最終目標とした。タンパク質膜透過反応における Sec タンパク質は 1 nm 以上の構造変化が予測されており、タンパク質膜透過の完了にも数分かかることから、高速 AFM の各分解能と合っている。

本研究ではまず SecYEG 複合体の高分解能結晶構造を行ない、アミノ酸残基レベルでの詳細な相互作用の解析および、複雑なタンパク質膜透過の系を単純化した 1 ユニットの構築を進めてきた(3 章 3.1 および 3.2)。準備したタンパク質膜透過反応の系と最新の技術を駆使し、世界で初めて四次元でのタンパク質膜透過反応の可視化と Sec トランスロコンの動的メカニズムの解明を進めてきた(3 章 3.3)。

第2章 材料・方法

2.1 TtSecYEG 複合体の構造機能解析

2.1.1 TtSecYEG 複合体の発現・精製

本実験に用いたプラスミドは表1にまとめた。*Thermus thermophilus*(Tt)由来の SecYEG 発現プラスミド(pAK24)と SecG を2つ発現するプラスミド(pAK22)もしくは、SecYの C4 ループの 248 番目から 254 番目のアミノ酸配列 KVVGGRV を GAAG へと短くした変異体を発現するプラスミド(pAK80)と SecG を2つ発現するプラスミド(pAK22)を用いて、それぞれ大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。pAK24 を用いない場合 SecG の発現量が十分でなく、SecYE 複合体と SecYEG 複合体の混合物となる。この大腸菌を 50 µg/mL アンピシリンと 20 µg/mL クロラムフェニコールを含む 10 L の LB 培地中で、40°C にて 18 時間培養した。

以下の操作は全て 4°C もしくは氷上で行なった。遠心(HITACHI, R9A2, 5000 g × 15 分)によって菌体を回収し、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)バッファーで懸濁・洗浄した後に、再度遠心によって菌体を回収した。テフロンホモジナイザーを用いて菌体を 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA-Na(pH 8.0), 0.1 mM PMSF バッファーに均一に懸濁し、マイクロフルイダイザー(Microfluidizer, 15,000 psi × 3 cycle)によって細胞を破碎した。粗抽出液から遠心(HITACHI, R13A, 25000 g × 30 分)で未破碎細胞を除いた後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g × 1 時間)により膜画分を得た。膜画分は 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 20 mM imidazole(pH 8.0), 2% DDM (ドデシルマルトシド)バッファーに均一に懸濁し可溶化(30 分)した。可溶化後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g × 30 分)により不溶性物質を除いた。超遠心後の上清を、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーで平衡化した 10 mL Ni-NTA Agarose(QIAGEN)に添加し、バッチ法(30 分)により SecYEG 複合体を樹脂に吸着させた。20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 40 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで不純物を除いた後、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 300 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで濃度勾配により溶出させ回収した。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g × 30 分)により不溶性物質を取り除いた後、Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いた限外濾過法によりタンパク質溶液を濃縮した。その後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer

10S (GE Healthcare) を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーで平衡化した Supedex200 10/300 GL (GE Healthcare)カラムによりゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、ピーク画分を回収した。そのピーク画分を Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いた限外濾過法により濃縮した。その後、塩濃度下げるために 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.25% DM (デシルマルトシド)バッファーにより濃縮希釈を繰り返した。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g×30 分)により濃縮希釈過程で生じた不溶性物質を取り除いた後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.25% DM バッファーで平衡化した Hi-Trap SP HP 1 mL(GE Healthcare)にタンパク質を吸着させ、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.25% DM, 0-1000 mM NaCl バッファーで濃度勾配により溶出させた。各精製段階において、サンプルは CBB 染色による SDS-PAGE 法により精製純度を確認した。

2.1.2 TtSecYEG 複合体の結晶化

Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いて、精製試料を 15 mg/ml ままで濃縮し、微量透析器“透くん”(日本ジェネティクス)を用いて 0.25% DM, 5% glycerol バッファーで透析を行なった。得られた精製試料を LCP 法(Laudau *et al.*, 1996)により結晶化した。精製試料とモノオレインを重量比 2:3 となるように 2つのガスタイトシリンジ(Hamilton)内で混合し、SecYEG 複合体をモノオレインに再構成した。再構成した SecYEG 複合体をタンパク質結晶化分注システムロボット Gryphon (Art Robbins Instruments)を用いて結晶化した。

2.1.3 X線回折実験およびデータ処理

得られた結晶の X線回折データは大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU にて測定・収集した。1.0 Å の波長を用い、振動角 1.0°で 360°に渡って回折データを収集した。すべてのデータ収集は、窒素ガスによるクライオストリーム条件下(100 K)で行なった。得られた回折データは、*I*222 構造ではプログラム HKL2000 (HKL Reserch Inc.)を用いて、*C*222₁ 構造ではプログラム XDS (Kabsch, 2010)を用いて、指数付けとブラベ格子・格子定数の決定を行ない、さらにスケーリング後、各指数に対する回折強度を算出した。

2.1.4 位相決定および精密化

*I*222 構造および *C*222₁ 構造ともにプログラム PHASER を用いて、SecYE (PDB ID 2ZJS) で分子置換を行ない、位相を決定した。続けてプログラム

COOT (Emsley *et al.*, 2010)およびプログラム PHENIX (Adams *et al.*, 2010)を用いて、モデルの構築と精密化を行なった。

2.1.5 分子動力学(MD)シミュレーション

分子動力学シミュレーションは、理化学研究所の杉田 有治 博士, 森 貴治 博士との共同研究により行なった。SecYEG の POPE の複合体のシミュレーションシステムをモデル化し, SecYEG の結晶構造を過剰な脂質を取り除いた POPE 脂質二重膜に埋め込んだ。OPM データベース (Lomize *et al.*, 2006) 中の SecYE (PDB ID 2ZJS) の配向を元にして, SecYEG の膜に対する配向と位置を決定した。タンパク質内部の空洞はプログラム DOWSER (Zhang and Hermans, 1996) を用いて水分子で満たし, プログラム VMD (Humphrey *et al.*, 1996) によって 150 mM の KCl を配置し, 1 分子の SecYEG, 361 個の POPE, 37527 個の水分子モデル, 106 個の K⁺, 116 個の Cl⁻ を 113.3 × 113.3 × 140.0 Å のボックスサイズのシステムを構築した。構築したシステムを使用し, プログラム GENESIS (Jung *et al.*, 2015) を用いて分子動力学シミュレーションを行なった。peptide-bound 型の構造の MD シミュレーションは, ペプチドを含まない条件下で行なった。

2.1.6 SecYEG 変異体の作製

pAK24 の SecY の 272 番目のイソロイシンと SecG の 35 番目のロイシンに, QuikChange®法によりシステイン変異を導入したプラスミド pRF353 を作成した。また pAK22 の 2 つの SecG にも同様にシステイン変異を導入したプラスミド pRF369 を作成した。発現および精製方法は 2.1.1 と同様の方法で行なった。

2.1.7 proOmpA-His6 の精製

Fandl らと同様の方法 (Fandl and Tai, 1987) により, 大腸菌由来の proOmpA の C 末端に His₆-tag が付加されたプラスミド pTT642 で *secY24* 株を形質転換し, proOmpA-His₆ を発現する菌体を作製した。大腸菌を 50 µg/mL アンピシリンと 20 µg/mL クロラムフェニコールを含む 1 L の LB 培地で OD₆₀₀ が 0.7 になるまで 30 °C で培養し, 終濃度 1 mM IPTG を添加した後, 30 °C で 2 時間培養した。以下の操作は全て室温で行なった。遠心 (HITACHI, R13A, 5000 g × 10 分) によって菌体を回収し, Tris-HCl (pH 8.0) バッファーで懸濁・洗浄した後に, 再度遠心によって菌体を回収した。菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 8 M Urea バッファーに懸濁し, Q500 Sonicator (QSONICA) によって超音波破砕を行なった。その後, 遠心 (TOMY, AR01524, 10000 rpm × 10 分) で未破砕細胞を除いた後, 超遠心 (Beckman, TLA100.3, 109,000 g × 30 分) を行なった。超

遠心後の上清を、50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 8 M Urea, 20 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで平衡化した0.7 mL Ni-NTA Agarose (QIAGEN)に添加し、バッチ法(30分)によりタンパク質を樹脂に吸着させた。50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 8 M Urea, 20 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで洗浄した後、50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 8 M Urea, 200 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで溶出させ回収した。回収したフラクションと同量の15% TCAを加え、TCA沈殿を行なった。沈殿物を50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 8 M Urea バッファーに溶解させ、5 mM Tris-HCl(pH 8.0), 8 M Urea バッファーで平衡化した HiTrap Q HP 1 mL (GE Healthcare)にタンパク質を吸着させ、5 mM Tris-HCl(pH 8.0), 8 M Urea, 50-250 mM NaCl バッファーで濃度勾配により溶出させた。

2.1.8 リポソームへの再構成

20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーに懸濁された 25 mg/mL の大腸菌の脂質(Avanti) 30 μ L と、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 M NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファー 70 μ L と、0.2 mg/mL に調整した SecYEG(WT)もしくは SecY(272C)EG(35C)変異体のタンパク質溶液 100 μ L を混合し、4 $^{\circ}$ C で1時間インキュベートした。その後、100 μ L の SM2 Beads(Bio-Rad)を加え、4 $^{\circ}$ C で3時間インキュベートし、上清を回収後に再び100 μ L の SM2 Beads を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。上清を回収し、超遠心(Beckman, TLA100.3, 109,000 g \times 30分)により得られた沈殿を 25 mM HEPES-Na(pH 7.5), 100 mM NaCl に懸濁させ、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2.1.9 タンパク質膜透過活性測定

タンパク質膜透過活性測定の前に、SecYEG(WT)および SecY(272C)EG(35C)変異体の再構成リポソームは 0 mM もしくは 5 mM DTT を添加し、氷上で15分インキュベートした。タンパク質膜透過反応は、50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM MgSO₄, 0.5 mg/mL BSA, 5 mM ATP, 0.025 mg/mL SecA, 0.02 mg/mL の SecYEG 再構成リポソーム, 0 mM もしくは 5 mM DTT となるように混合し、反応液とした。各反応液に精製した基質 proOmpA(wild-type)を加えた後、すぐに0分のサンプリングを行ない、残りを 50 $^{\circ}$ C でインキュベートした。同様に30分後サンプリングを行なった。サンプリングした反応液 20 μ L は、4 μ L の 0.6 mg/mL Proteinase K と混合し、氷上で20分間インキュベートすることで liposome 内に膜透過されていない基質を分解させた。その後 15% TCA を 24 μ L 加え、さらに氷上で20分間インキュベートした後、遠心(TOMY, AR01524,

15000 rpm×5分)し、上清を除き、アセトンを100 µL加え、さらに遠心(TOMY, AR01524, 15000 rpm×5分)を2回繰り返した。アセトンを乾燥させた後、20 µLのSDS サンプルバッファーを加え、電気泳動し、1次抗体にα-myc抗体(SANTA-CRUZ, sc-789)、2次抗体にα-rabbit IgG (Bio-Rad)を用いてウェスタンブロットティングを行なった。

2.2 TtSecY-SecA/SecE/SecG 複合体(SecYAEG)の機能解析

2.2.1 TtSecYAEG 複合体の精製

本実験に用いたプラスミドは表1にまとめた。SecYAEG複合体を発現させるプラスミド pTT610 と SecG を2つ発現させるプラスミド pAK22 を用いて、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。この大腸菌を50 µg/mL アンピシリンと20 µg/mL クロラムフェニコールを含む15 LのLB培地でOD₆₀₀が0.7になるまで37°Cで培養し、終濃度1 mM IPTG を添加した後、25 °Cで16時間培養した。

以下の操作は全て4 °Cもしくは氷上で行なった。遠心(HITACHI, R9A2, 5000 g×15分)によって菌体を回収し、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)バッファーで懸濁・洗浄した後に、再度遠心によって菌体を回収した。テフロンホモジナイザーを用いて菌体を10 mM Tris-HCl(pH 8.0)、1 mM EDTA(pH 8.0)、0.1 mM PMSF バッファーに均一に懸濁し、マイクロフルイダイザー(Microfluidizer, 15,000 psi × 3 cycle)によって細胞を破碎した。粗抽出液から遠心(HITACHI, R13A, 25000 g×30分)で未破碎細胞を除いた後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g×1時間)により膜画分を得た。膜画分は20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 20 mM imidazole(pH 8.0), 2% DDM バッファーに均一に懸濁し可溶化(30分)した。可溶化後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g×30分)により不溶性物質を除いた。超遠心後の上清を、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーで平衡化した5 mL Ni-NTA Agarose (QIAGEN)に添加し、バッチ法(30分)によりSecYAEG複合体を樹脂に吸着させた。20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 30-60 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで不純物を除いた後、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 100-300 mM imidazole(pH 8.0)バッファーで濃度勾配により溶出させ回収した。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g×30分)により不溶性物質を取り除いた後、Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いた限外濾過法によりタンパク質溶液を濃縮した。その後、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、5% glycerol, 0.1% DDM, 50 mM NaCl バッファーにより塩濃度を50 mM NaCl程度になるように濃縮希釈を繰り返した。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g×30分)により濃縮希釈過程で生じた不溶性物質を取り除いた

後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.1% DDM, 50 mM NaCl バッファーで平衡化した HiTrap SP HP 1 mL (GE Healthcare)にタンパク質を吸着させ、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.1% DDM, 50-1000 mM NaCl バッファーで濃度勾配により溶出させた。SecYAEG 複合体を高純度で含む画分を集め、Amicon Ultra-4 50K NMWL (Millipore)で、400 μ L まで濃縮後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare) を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーで平衡化した Superose6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare)によりゲル濾過クロマトグラフィーで最終精製を行なった。15 L の培養液から約 5 mg の SecYAEG 複合体を得た。

2.2.2 proOmpA(L59), proOmpA(L59)-sfGFP 変異体発現プラスミド作製

本実験に用いたプラスミドは表 1 にまとめた。大腸菌由来の proOmpA の C 末端に His₆-tag が付加されたプラスミド pTT642 を用いて、Uchida らによってタンパク質分泌中間体が形成されることが報告 (Uchida *et al.*, 1995) されている proOmpA(L59)変異体を発現するプラスミドを QuikChange®法により作製し pYS12 とした。その後 QuikChange®法で His-tag 前に SpeI サイトを導入し、その部位に GFP もしくは *super folder GFP(sfGFP)*の配列をライゲーションで挿入したプラスミド pYS16 と pYS92 を作製した。

2.2.3 proOmpA(L59), proOmpA(L59)-sfGFP 変異体の精製

proOmpA(L59)は、2.1.7 と同様の方法で精製した。proOmpA(L59)-sfGFP は、Ni-NTA 精製後に TCA 沈殿をして Hi-trap Q HP を行なう手順を、Ni-NTA 精製後にバッファー(5 mM Tris-HCl(pH 8.0), 8 M Urea)で希釈し Hi-trap Q HP させる方法に変更した以外は 2.6 と同様の方法で行なった。

2.2.4 Nanodisc への再構成

MSP(Membrane Scaffold Protein)は過去の論文を参考に精製した(Alvarez *et al.*, 2010)。20 mg/mL の大腸菌の脂質 20 μ L と、31 mg/mL の Membrane Scaffold Protein (MSP1D1) (Nath *et al.*, 2007) 12.5 μ L と、33 mg/mL の SecYAEG 複合体タンパク質溶液 16.4 μ L を混合し、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーを加えて全量 50 μ L とした。その後、4 °C で 1 時間インキュベートし、100 μ L の SM2 Beads を加え、4 °C で一晩インキュベートした。遠心(TOMY, AR01524, 10000 rpm \times 10 分)し、上清を回収後、Centrifugal Filters PVDF 0.22 μ m(Millipore)

もしくは超遠心(Beckman, TLA100.3, 109,000 g × 30 分)を用いて不溶性物質を除去した。液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare) を用いて 50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 300 mM NaCl バッファーで平衡化した Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)によりゲル濾過クロマトグラフィーで最終精製を行なった。

Nd-SecYEG は, 25 mg/mL の大腸菌の脂質 32 μ L と, 41.7 mg/mL の MSP(MSP1D1) 23.7 μ L と, 30.0 mg/mL の SecYEG 複合体タンパク質溶液 21 μ L を混合し, 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーを加えて全量を 100 μ L とした。以降の操作は上述の Nd-SecYAEG と同様に行なった。

2.2.5 Nanodisc-SecYAEG と基質との相互作用

Nanodisc-SecYAEG と基質との反応において ATP, Nanodisc, proOmpA のすべてが存在する時は, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM MgSO₄, 5 mM ATP, 精製した Nd-SecYAEG が 5 倍希釈となるように混合した反応液に, proOmpA(L59)を加えて全量を 50 μ L とし反応開始とした。それぞれ非存在下の場合には, 各バッファーを加えた。37 °C で 30 分インキュベートした後に, 各反応液から 6 μ L サンプルングし, 6 μ L の 2 × sample buffer を加えて全量を泳動(Native-PAGE)した。泳動はバッファー(25 mM Tris, 192 mM グリシン)を用いて 4 °C で, 150 mA , 50 分で行ない, CBB で染色した。Nd-SecYEG や proOmpA の 3Q 変異体を用いた場合も同様の手法にて行なった。

2.2.6 再構成リポソームを用いたタンパク質膜透過中間体の検出

タンパク質膜透過反応は, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM MgSO₄, 0.5 mg/mL BSA, 5 mM ATP, 0.025 mg/mL SecA, 0.02 mg/mL の SecYEG 再構成リポソーム, 0 mM もしくは 5 mM DTT となるように混合し, 反応液とした。各反応液に精製した基質 proOmpA(L59)を加えた後, すぐに 0 分のサンプルングを行ない, 残りを 50 °C でインキュベートした。同様に 15 分後サンプルングを行なった。途中から還元剤 DTT を添加する場合はこの 15 分後のサンプルングの直後に 5 mM DTT となるように DTT を添加した。最後に反応開始から 30 分後のサンプルングを行なった。サンプルングした反応液 20 μ L は, 4 μ L の 0.6 mg/mL Proteinase K と混合し, 氷上で 20 分間インキュベートすることで liposome 内に膜透過していない基質部分および基質全長を分解させた。その後 15% TCA を 24 μ L 加え, さらに氷上で 20 分間インキュベートした後, 遠心(TOMY, AR01524, 15000 rpm×5 分)し, 上清を除き, アセトンを 100 μ L 加え, さらに遠心(TOMY, AR01524, 15000 rpm×5 分)を 2 回繰り返した。アセトンを

乾燥させた後、20 μ L の SDS サンプルバッファーを加え、電気泳動し、1 次抗体にウサギポリクローナル抗体 α -proOmpA(35-54)、2 次抗体に α -rabbit IgG(Bio-Rad) を用いてウェスタンブロッティングを行なった。

2.3 高速 AFM を用いたタンパク質膜透過反応の観察

高速 AFM 解析は共同研究先である金沢大学バイオ AFM センターに滞在して測定した。また本研究室の博士研究員である春山 隆充 博士と協力して測定を行なった。

2.3.1 TtSecYAEG 複合体発現用プラスミドベクター

本実験に用いたプラスミドは表 1 にまとめた。SecY のペリプラズム側の 2 ヶ所にシステイン変異(S148C,R208C)を導入してある *Thermus thermophilus* 由来の SecYEG を発現するプラスミド(pTT636)と、SecA の融合タンパク質を作製するために、*Thermus thermophilus* 由来の SecA(1-939)とリンカーL16(Ser と Gly によるリンカーのアミノ酸残基数が 16)により繋がれた SecY を発現するプラスミド(pTT610)を材料に、システイン変異を持つ SecY と SecA の融合タンパク質 SecY-A と SecE と SecG を発現させるプラスミド pYS3 を作製した。

2.3.2 TtSecYAEG 複合体の精製・ビオチン化

SecYAEG 複合体を発現させるプラスミド pYS3 と SecG を 2 つ発現させるプラスミド pAK22 を用いて、大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。この大腸菌を 50 μ g/mL アンピシリンと 20 μ g/mL クロラムフェニコールを含む 15 L の LB 培地で OD₆₀₀ が 0.7 になるまで 37°C で培養し、終濃度 1 mM IPTG を添加した後、25 °C で 16 時間培養した。

以下の操作は全て 4 °C もしくは氷上で行なった。遠心(HITACHI, R9A2, 5000 g \times 15 分)によって菌体を回収し、10 mM Tris-HCl(pH 8.0)バッファーで懸濁・洗浄した後に、再度遠心によって菌体を回収した。テフロンホモジナイザーを用いて菌体を 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0), 0.1 mM PMSF バッファーに均一に懸濁し、マイクロフルイダイザー(Microfluidizer, 15,000 psi \times 3 cycle)によって細胞を破碎した。粗抽出液から遠心(HITACHI, R13A, 25000 g \times 30 分)で未破碎細胞を除いた後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g \times 1 時間)により膜画分を得た。膜画分は 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 20 mM imidazole(pH 8.0), 2% DDM バッファーに均一に懸濁し可溶化(30 分)した。可溶化後、超遠心(Beckman, 45Ti, 140,000 g \times 30 分)により不溶性物質を除いた。超遠心後の上清を、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファーで平

平衡化した 5 mL Ni-NTA Agarose (QIAGEN)に添加し、バッチ法(30分)により SecYAEG 複合体を樹脂に吸着させた。20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 30-60 mM imidazole(pH 8.0)バッファで不純物を除いた後、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM, 100-300 mM imidazole(pH 8.0)バッファで濃度勾配により溶出させ回収した。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g × 30分)により不溶性物質を取り除いた後、Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いた限外濾過法によりタンパク質溶液を濃縮した。その後、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.1% DDM, 50 mM NaCl バッファにより塩濃度を 50 mM NaCl 程度になるように濃縮希釈を繰り返した。400 μ L まで濃縮した後、終濃度 15 mM となるように還元剤 β -mercaptoethanol (β -ME)を加えた。超遠心(Beckman, 70Ti, 140,000 g × 30分)により濃縮希釈過程で生じた不溶性物質を取り除いた後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare)を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.1% DDM, 50 mM NaCl バッファで平衡化した HiTrap SP HP 1 mL (GE Healthcare)にタンパク質を吸着させ、20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 5% glycerol, 0.1% DDM, 50-1000 mM NaCl バッファで濃度勾配により溶出させた。SecYAEG 複合体を高純度で含む画分を集め、5 倍モル量の Biotin-PEAC₅-maleimide を加え、室温で 1 時間インキュベートした後、さらに 4°C で一晩インキュベートし、ビオチン化を行なった。

Amicon Ultra-4 50K NMWL (Millipore)で、400 μ L まで濃縮後、液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10S (GE Healthcare) を用いて 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 5% glycerol, 0.1% DDM バッファで平衡化した Superose6 increase 10/300 GL (GE Healthcare)によりゲル濾過クロマトグラフィーで最終精製を行なった。15 L の培養液から約 5 mg のビオチン化された SecYAEG 複合体を得た。

2.3.3 ストレプトアビジンの二次元結晶基板の作成・観察

マイカ基板上に、10 mM HEPES-Na(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ バッファに懸濁させ、DOPC : DOPS : biotin-Cap-DOPE = 7 : 2 : 1 となるよう調節した約 0.1 mg/mL の脂質溶液を 2 μ L 滴下し、室温で 5 分間インキュベートした。10 mM HEPES-Na(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ バッファ 20 μ L で 5 回洗浄し、0.2 mg/mL ストレプトアビジン, 10 mM HEPES-Na(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ を 5 μ L 滴下し、室温で 15 分間インキュベートした。その後、10 mM HEPES-Na(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ バッファ 20 μ L で 5 回洗浄し、10 mM HEPES-Na(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM

CaCl₂, 0.1% glutaraldehyde バッファー 10 μ L で 1 度洗浄し、室温で 5 分間インキュベートした。最後に 10 mM Tris-HCl(pH 7.2) バッファー 20 μ L で 3 回洗浄し、ストレプトアビジンの二次元結晶をマイカ基板上に作製した。作製したストレプトアビジン二次元結晶を 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl の測定バッファー条件で観察した。

2.3.4 Nanodisc-SecYEG(Nd-SecYEG)の観察

精製後の Nd-SecYEG 溶液を, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl のバッファーで観察に適した濃度に希釈し, ストレプトアビジン二次元結晶上に 10 μ L 滴下後, 5 分間インキュベートした。その後, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl のバッファーで 3 回洗浄し, 高速 AFM で観察した。観察時のスキャンレートは, 300 ms/frame で行なった。

2.3.5 Nanodisc-SecYAEG(Nd-SecYAEG)の観察

精製後の Nd-SecYAEG 溶液を, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl のバッファーで観察に適した濃度に希釈し, ストレプトアビジン二次元結晶上に 10 μ L 滴下後, 5 分間インキュベートした。その後, 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl のバッファーで 3 回洗浄し, 高速 AFM で観察した。観察時のスキャンレートは, 300 ms/frame で行なった。

2.3.6 Nd-SecYAEG と基質の複合体の観察

精製した proOmpA(L59)-sfGFP 溶液を 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM NaCl, 8 M Urea のバッファーで希釈した。精製された Nd-SecYAEG 溶液を 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl, 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.4 M Urea のバッファーで希釈し, 希釈した proOmpA(L59)-GFP 溶液と混合させ, 37 °C で 1 時間インキュベートして複合体を形成させた。その反応溶液をストレプトアビジン二次元結晶基板上に 10 μ L 滴下し, 5 分間インキュベートした後, 20 μ L の 50 mM HEPES-NaOH(pH 8.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl, 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.4 M Urea のバッファーで 3 回洗浄し, 高速 AFM で観察した。観察時のスキャンレートは, 300, 400, 600ms/frame で行なった。

2.3.7 Nd-SecYAEG の高速 AFM 画像のシミュレーション

Nanodisc の pdb ファイル(PDB: 2MSC)と SecYEG と SecA の複合体の pdb ファイル(PDB : 3DIN)を、プログラム COOT とプログラム Pymol (Schrodinger)を用いて Nd-SecYAEG のモデルとなる pdb ファイルを作成した。その pdb ファイルと 10°傾いた直径 0.5-1 nm の AFM プローブを用いて、以前に報告された手法(Kozai *et al.* 2017)で計算を行ない AFM 画像として得た。シミュレーションで得られた画像は、fast-Fourier transform frequency filtering (cut-off wavelength of 0.77-2.50 nm)でフィルターをかけることにより鮮明にした。

表 1 使用したプラスミド一覧

番号	ベクター	発現タンパク質(略称)
pAK24	pTV118N	<i>TtSecY</i> -His ₆ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i>
pAK22	pACYCDuet	<i>TtSecG</i> (MCS1)/ <i>TtSecG</i> (MCS2)
pAK80	pTV118N	<i>TtSecY</i> (248KVVGGRV254 to GAAG)-His ₆ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i>
pRF353	pTV118N	<i>TtSecY</i> (I272C)-His ₆ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i> (L35C)
pRF409	pACYCDuet	<i>TtSecG</i> (L35C)(MCS1)/ <i>TtSecG</i> (L35C)(MCS2)
pTT610	pTV118N	<i>TtSecY</i> (R252G)-(GGSG) ₄ - <i>TtSecA</i> (1-939)-His ₁₀ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i>
pTT636	pTV118N	<i>TtSecY</i> (S148C,R208C)-His ₆ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i>
pYS3	pTV118N	<i>TtSecY</i> (S148C,R208C,R252G)- (GGSG) ₄ - <i>TtSecA</i> (1-939)-His ₁₀ / <i>TtSecE</i> / <i>TtSecG</i>
pTT642	pBluescript SK(-)	<i>EcproOmpA</i> -His ₆
pYS12	pBluescript SK(-)	<i>EcproOmpA</i> (L59)-His ₆
pYS92	pBluescript SK(-)	<i>EcproOmpA</i> (L59)-super folder GFP-His ₆

第3章 結果と考察

3.1 TtSecYEG 複合体の構造機能解析

～序～

真正細菌の SecYEG 複合体は、それ自体は受動的な protein-conducting channel として機能する。モータータンパク質 SecA ATPase により基質である前駆体タンパク質の輸送が駆動される。SecYEG 複合体は構造変化によりタンパク質の通り道を形成し、膜の透過障壁を保持したまま、タンパク質の膜を越えた輸送(タンパク質の膜透過)を可能にする。SecYEG 複合体の構造に関してはこれまで複数の報告があるが、サブコンポーネントである SecG まで含めた完全な SecYEG 複合体の構造は、低分解能の SecYEG 複合体と SecA の複合体の構造しか報告されていない。したがってタンパク質の膜透過反応を詳細に解析するには、SecYEG 複合体の高分解能構造が必要不可欠である。そこで、本研究ではまず SecYEG 複合体の高分解能結晶構造解析を進めた。SecYEG 複合体の高分解能構造は、近年急速に発展してきたクライオ電子顕微鏡によるリボソームと Sec トランスロコン(SecYEG もしくは Sec61 $\alpha\gamma\beta$)の単粒子解析の結果や、他の様々な機能解析の解釈に寄与する。本研究により、SecYEG 複合体の構造を決定し、今後のタンパク質膜透過反応の詳細な解析に利用する。

3.1.1 SecYEG 複合体の結晶化

SecYEG 複合体は 2 種類の異なる良質な結晶が得られた(図 3-1)。1 つ目は、タンパク質溶液とモノオレインの重量比 2 : 3 の LCP 法により 20 °C で結晶化を行ない、30-32% PEG500, 100 mM MgSO₄, 100 mM Na₂SO₄, 50 mM MOPS(pH 6.5)のリザーバー溶液で得られた結晶である(図 3-1A)。もう一方は、タンパク質溶液とモノオレインの重量比 2 : 3 の LCP 法により 20 °C で結晶化を行ない、27% PEG500, 25 mM ZnSO₄, 100 mM クエン酸ナトリウム(pH 5.0)のリザーバー溶液で得られた結晶である(図 3-1B)。

3.1.2 X 線回折実験

得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において X 線回折実験を行なった。得られた結晶の X 線回折データは大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL32XU にて測定・収集した。1.0 Å の波長を用い、振動角 1.0°で 360°に渡って回折データを収集し、約 500 枚をマージした。すべてのデータ収集は、窒素ガスによるクライオストリーム条件下(100 K)で行なった。得られた回折データに対して、*I*222 構造ではプログラム HKL2000(HKL Reserch Inc.)を用いて、また *C*222 構造ではプログラム XDS(Kabsch, 2010)を用いて、指数付けとブラベ格子・格子定数の決定を行ない、さらにスケーリング後、各指数に対する回折強度を算出した。結果、2.7 Å 分解能の回折データセットおよび、3.6 Å 分解能の回折データセットが得られた。空間群は、それぞれ *I*222, *C*222₁であった。得られた回折データセットの統計値は表 3.1 に示した。

3.1.3 位相決定と精密化

*I*222 構造と *C*222₁構造のそれぞれの回折データに対して SecYE の構造(PDB ID 2ZJS)(Tsukazaki *et al.*, 2008)を用いた分子置換法により位相を決定し、その後モデル構築とモデル精密化を行なった。最終的に *I*222 構造のモデルは分解能 2.7 Å で $R_{\text{work}} = 21.9$, $R_{\text{free}} = 26.8$ (%)まで、一方 *C*222₁構造のモデルは分解能 3.6 Å で $R_{\text{work}} = 25.4$, $R_{\text{free}} = 27.9$ (%)まで精密化することができた(図 3-2, 表 3-1)。

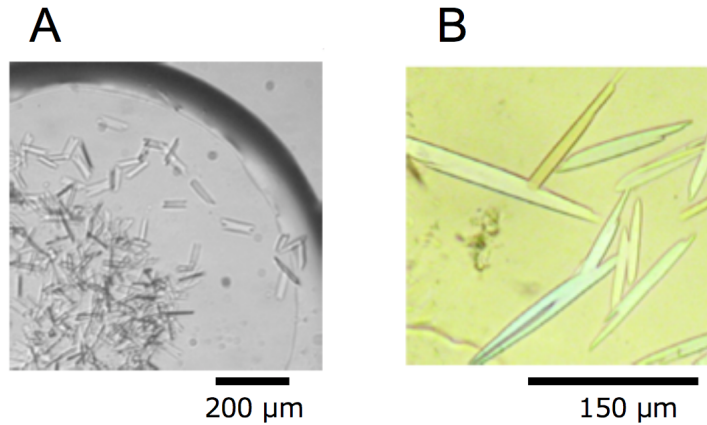


図 3-1. TtSecYEG 複合体の結晶

- A. 30-32% PEG500, 100 mM MgSO₄, 100 mM Na₂SO₄, 50 mM MOPS(pH 6.5)のリザーバー溶液にて得られた結晶。
- B. 27% PEG500, 25 mM ZnSO₄, 100 mM クエン酸ナトリウム(pH 5.0)のリザーバー溶液にて得られた結晶。

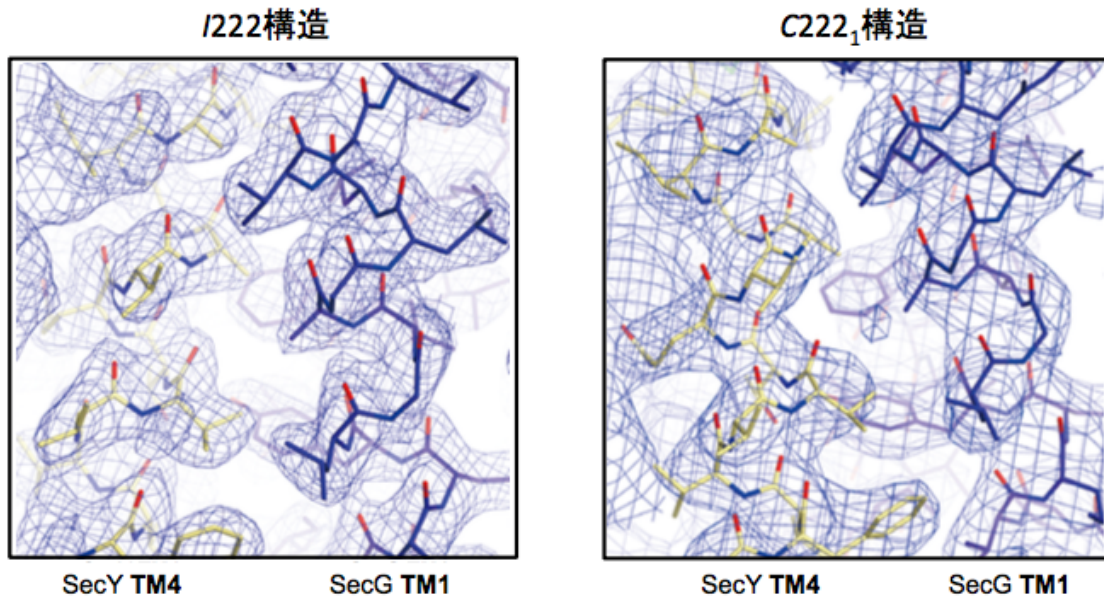


図 3-2. 構造精密化後の $2mFo-DFc$ マップ

構造精密化後の $I222$ および $C222_1$ 構造の $2mFo-DFc$ 電子密度マップと拡大図。左図が $I222$ 構造であり、右図が $C222_1$ 構造である。両方とも SecY と SecG の間を拡大図とした。

	TtSecYEG Resting state	TtSecYEG Peptide-bound state
Data Collection		
Wavelength (Å)	1.0	1.0
Space group	I222	C222 ₁
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	105.5, 112.9, 140.0	97.8, 138.0, 116.0
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	50-2.7 (2.8-2.7)	50-3.6 (3.8-3.6)
Unique reflections	21,452	9,099
Total reflections	100,399	66,968
Completeness (%)	94.5 (75.8)	99.8 (99.5)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	10.5 (1.3)	5.9 (1.3)
Redundancy	4.7 (2.5)	7.4 (7.5)
<i>R</i> _{sym} *	0.067 (0.396)	0.134 (0.780)
CC(1/2)	99.7 (56.7)	99.1 (59.8)
Refinement		
Resolution (Å)	43.9-2.7 (2.8-2.7)	46.8-3.6 (4.1-3.6)
No. reflections	21,452	9,079
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.219/0.268 (0.286/0.322)	0.254/0.279 (0.350/0.360)
No. atoms	4,504	4,249
Protein	4,348	4,249
Water	7	
Others	149	
<i>B</i> -factors (Å ²)		
Protein	59.9	96.8
Water	42.9	
Others	56.5	
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.003	0.002
Bond angles (°)	0.62	0.58
Ramachandran plot statistics (%)		
Favored regions	96.9	98.0
Allowed regions	2.9	2.0
Disallowed regions	0.2	0.0

The numbers in parentheses are for the highest resolution shell.

$$*R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I_{\text{avg}} - I_i|}{\sum I_i}$$

表 3-1. 回折データセットの統計値および構造精密化の統計値

3.1.4 resting-state SecYEG(閉状態, I222 構造)

3.1.4.1 構造の概要

2.7 Å 分解能の結晶構造である I222 の構造は, SecY の C 末端側の 14 個のアミノ酸残基を除いた 1 から 424 番目のアミノ酸残基と SecE, SecG のすべてのアミノ酸残基を配置できた(図 3-3)。

SecY はこれまで報告された構造と同様に, 10 個の膜貫通領域(TM1-10)および, ループを含む 6 つの細胞質領域(C1-C6), 5 つのペリプラズム領域(P1-P5)で構成されている。SecY は二枚貝のような擬似対称構造をしており, TM2 と TM8 が基質タンパク質の膜組込みに関与するとされているラテラルゲートを形成している(図 3-3 右)。その後方は SecE によって安定化されており, N 末端側(TM1-5)と C 末端側(TM6-10)の膜貫通領域により, 砂時計型の protein-conducting channel を形成している(図 3-4 左)。その中心には, 6 つのアミノ酸(I77, I81, T184, I188, I275, I403)からなり, タンパク質の通り道の狭窄部位“pore-ring”を形成する (図 3-4)。タンパク質輸送時にはこの pore-ring が広がる。

SecG は, 細胞質側のループを介して側面に並んだ 2 つの膜貫通領域(TM1, TM2)から構成されており, 疎水性相互作用により SecY と強固に結合している(図 3-2, 3-3)。その相互作用部位は, SecG の表面のおよそ 30%と SecY の TM3, TM4, C2 および C3 領域である。この結果は過去の S-S 結合形成を用いて同定された SecG と SecY の相互作用部位の報告とも一致している(Satoh *et al.*, 2003)。また SecG の膜貫通領域の B-factor は SecY の膜貫通領域と比べて低く, 安定に SecY と複合体を形成し機能していることが予測される。これらの観察結果から, SecG がタンパク質膜透過中はフレキシブルであり膜の配向が反転する(Nishiyama *et al.*, 1996)ことは考えにくい。

I222 構造の SecY の pore ring は, I188 と I275 のアミノ酸側鎖間の距離が 3.7 Å であるように, 基質であるタンパク質が通るにはあまりにも狭くなっている(図 3-4 右)。また図 3-3 および 3-4 において紫色で表示したプラグ(plug)と呼ばれるドメインが砂時計型のチャンネルのペリプラズム側を埋めるように位置している。pore ring が狭いことおよび, ペリプラズム側からプラグ(plug)ドメインにより閉じられていることは, 過去の closed 型の構造(図 1-5)と一致しており, I222 構造も休止状態(resting state)であると考えられる。今回の resting state の構造では, 新たに SecG の全長のモデルが配置でき, SecG のループはチャンネルに覆いかぶさるように位置している(図 3-3)。このことから, closed や resting state では, ペリプラズム側からプラグ(plug)が栓をし, 細胞質側からは SecG のループにより蓋(キャップ)されているのではないかと考えられる。

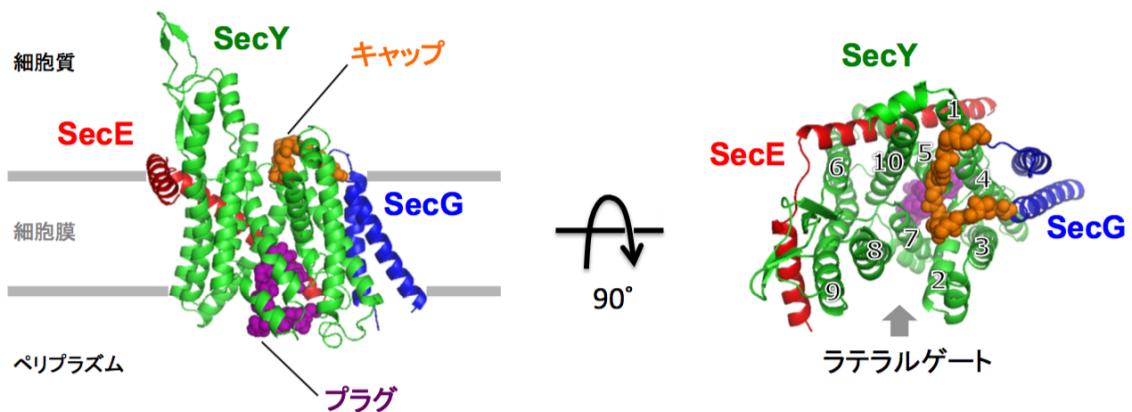


図 3-3. resting-state SecYEG 複合体の結晶構造

SecY を緑色，SecE を赤色，SecG を青色で TtSecYEG 複合体の全体構造をリボンモデルで示した。細胞膜に平行な面および細胞質側から見た構造を示している。またチャンネルに栓をしている部分であるプラグ(plug)ドメインを紫色，キャップを橙色で示した。右図内の数字は SecY の 10 本の膜貫通領域(TM1-10)を示している。完全にチャンネル部分が閉じられており閉状態(resting state)である。

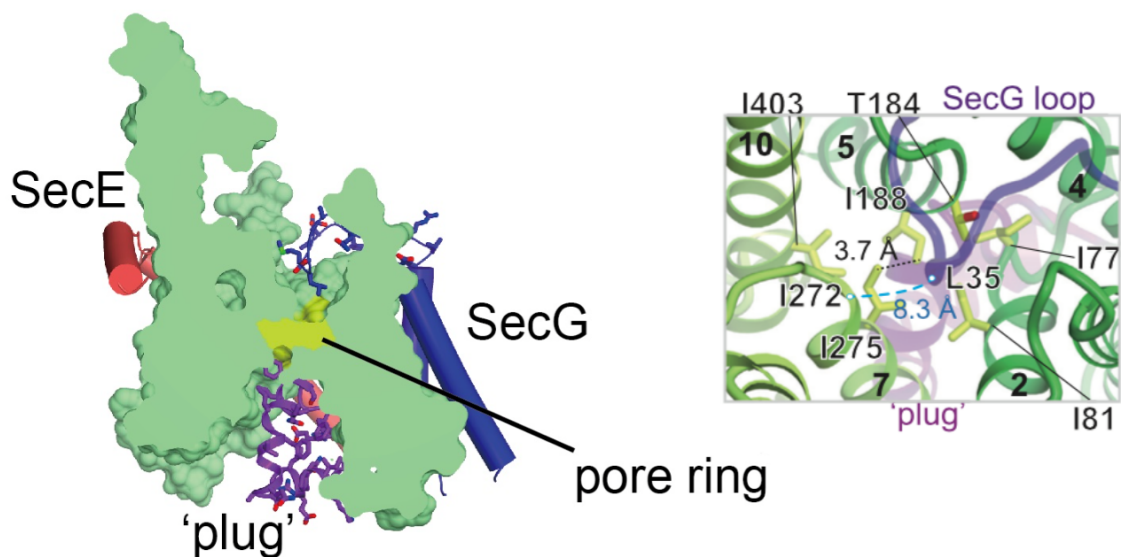


図 3-4. SecY の断面図および pore ring の拡大図

SecY を断面図で示し，SecY のプラグ(plug)ドメインを紫色のスティックモデル，SecG のループを青色のスティックモデルで示した。断面図から分かるように砂時計型のチャンネル構造であり，その中心には 6 つのアミノ酸(I77, I81, T184, I188, I275, I403)により pore ring(黄色)が形成されている。

右図は pore ring を拡大して示している。SecG のループが SecY の pore ring 上部まで伸びており，SecG のループの先端のアミノ酸 L35 と SecY の pore ring 付近のアミノ酸 I272 との距離は 8.3 Å であった。

3.1.4.2 pre-open state SecYE との構造比較

TtSecYE は以前に Fab との共結晶化により, pre-open state の構造が得られている(Tsukazaki *et al.*, 2008)。その構造と resting state の構造を比較した。全体構造は、よく似た構造をしている。しかしながら、基質結合部位(Plath *et al.*, 1998)として考えられている pre-open state の構造の crack 中にある2つのアミノ酸 T92 と V329 の C α 間の距離が, pre-open state の 14.4 Å と比べて resting state では 11.7 Å と短くなっている(図 3-5)。これは, resting state には保存された SecY の C5 ループ部分への Fab の結合がなかったためかもしれない。

また, ラテラルゲートだけを見た場合では resting state の構造は過去に closed state と報告された古細菌の Sec トランスロコンより開いている。しかしながら, pre-open state と比べると閉じている。チャンネルも細胞質, ペリプラズムの両側から閉じられているので閉状態(resting state)であると考えられる。

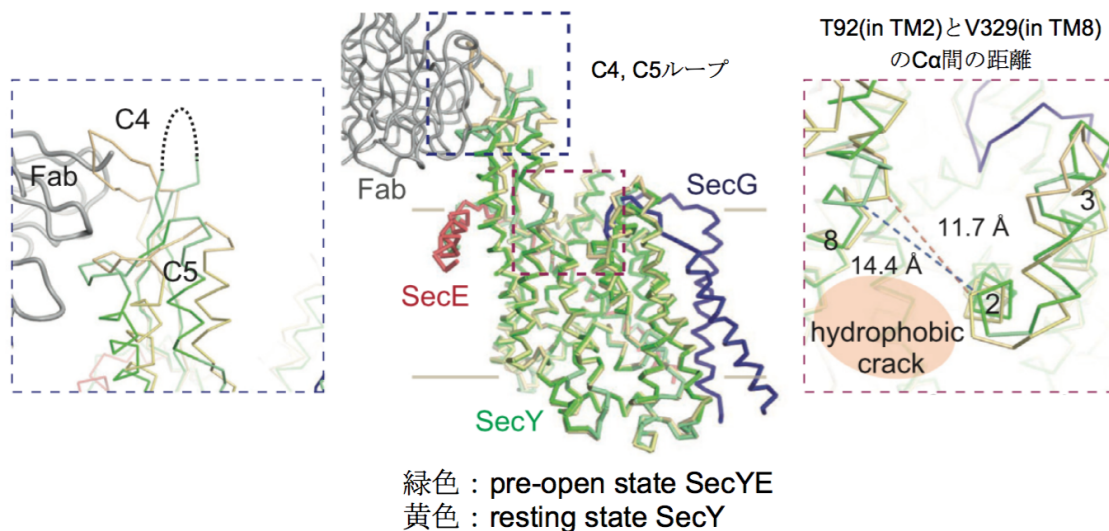


図 3-5. resting state SecYEG と pre-open state SecYE の構造比較

resting state の構造を黄色(SecY), 赤色(SecE), 青色(SecG)で, pre-open state の構造を緑色(SecYE), 灰色(Fab)で示した。左の青色の破線と右の赤色の破線で囲まれた図はそれぞれ C4, C5 ループ部分の拡大図および, 疎水的な crack 部分の拡大図である。青色の破線内では, C5 ループが手前に位置し, C4 ループが奥に位置している。SecYE(緑色)の C4 ループはディスオーダーしておりアミノ酸が配置されていないので, 黒色の点線でおおよその位置を示した。Fab がないことから C4, C5 ループ部分が少しだけ異なっており, 疎水的な crack 部分も閉じている。

3.1.4.3 SecA 結合状態の SecYEG との構造比較

Thermotoga maritima(Tm) 由来の SecA と結合した構造である SecA 結合状態の TmSecYEG の構造と resting state の TtSecYEG の構造を比較した(図 3-6)。SecA 結合状態は図 3-6A にも示されているように SecA の two-helix finger がチャンネル上部まで入り込んでおり, SecY の C4, C5 ループも SecA に押されて大きく構造が変化している。SecA 結合状態では pore ring が開いているのに対し, resting state の構造では pore ring がしっかりと閉じている(図 3-6)。

また SecA 結合状態ではプラグ(plug)ドメインが, チャンネルが開くように移動しているが, resting state のプラグ(plug)ドメインはしっかりとチャンネルを閉じるように位置している(図 3-6)。

さらにこれまでは比較対象がなかった SecG のループに関して, 今回の resting state の構造を用いることで比較できた。SecA 結合状態では SecG のループはチャンネルから外れて位置していたが, resting state では SecG のループはチャンネルに蓋をするように位置していた(図 3-6 上)。また SecG のループの先端と SecY のチャンネル付近のそれぞれのアミノ酸間の距離は, SecA 結合状態が 14.7 Å であるのに対し, resting state では 8.3 Å であった(図 3-6 下)。

以上のことから SecG のループは, タンパク質の膜透過が起こるまでは透過障壁としての役割を果たし, タンパク質の膜透過が起きる時, つまりは SecA が SecYEG に結合するとチャンネルの上部から立体障害により押し出されて, タンパク質の通り道を開けているのではないかと考えられる。

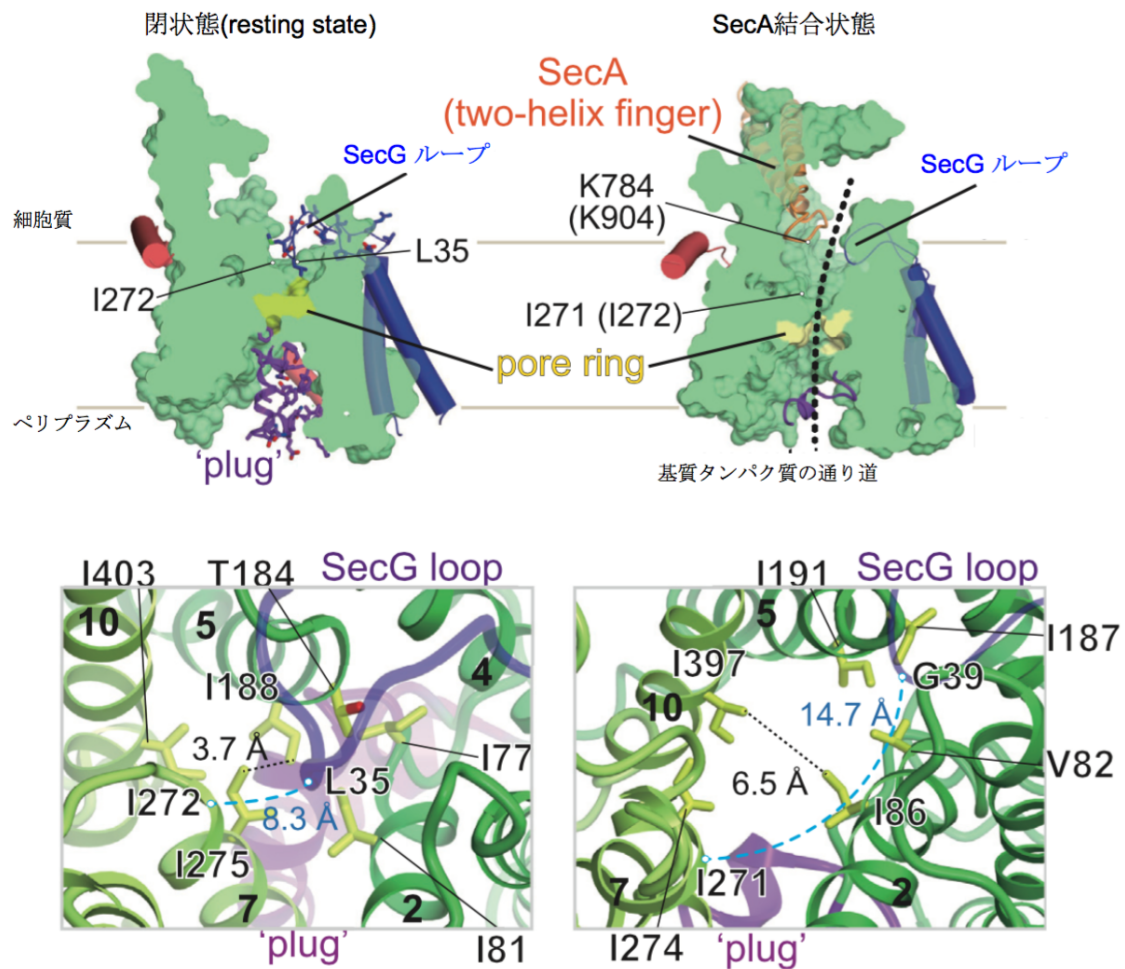


図 3-6. 閉状態 SecYEG と SecA 結合状態 SecYEG の構造比較

上部には、閉状態 SecYEG と SecA 結合状態 SecYEG のそれぞれの SecY の断面図を示した。SecA 結合状態の図には、SecA の two-helix finger を橙色で、基質タンパク質の通り道を黒色の破線で示した。

下部には、両者の pore ring の拡大図(細胞質側から見た図)を示した。pore ring を形成するアミノ酸残基をスティックで表示し、SecY の pore ring 付近のアミノ酸(左:I272, 右:I271)と SecG のループの先端(左:L35, 右:G39)のアミノ酸残基間の距離を水色の文字で示した。SecA 結合状態が全体的にかなり開いた状態であるのに対し、閉状態では pore ring が閉じており、plug がペリプラズム側から栓を、SecG のループが細胞質側から蓋をしている様子が分かる。

3.1.5 分子動力学シミュレーション(MD シミュレーション)

次に, resting state の安定性を評価するために, SecYEG の分子モデルを脂質二重膜に埋め込んだ状態で, 700 ns の分子動力学シミュレーションを理研の杉田研究室との共同研究により行なったところ, SecYEG の構造は複合体で安定して膜中に存在していた。SecG のループも安定して SecY の pore ring 上部に蓋をするように存在していた。結晶構造中の SecY の pore ring 付近のアミノ酸残基 I272 と SecG のループの先端付近のアミノ酸残基 L35 の C α 間の距離は 8.6 Å であった(図 3-7A)。分子動力学シミュレーションによる 700 ns の間においても C α 間に多少の揺らぎは見られたが, 大きな変動は見られなかった(図 3-7B)。

この結果から SecG のループは SecA やリボソームが結合するといったような変化が訪れるまではチャンネルに蓋をしていると考えられる。

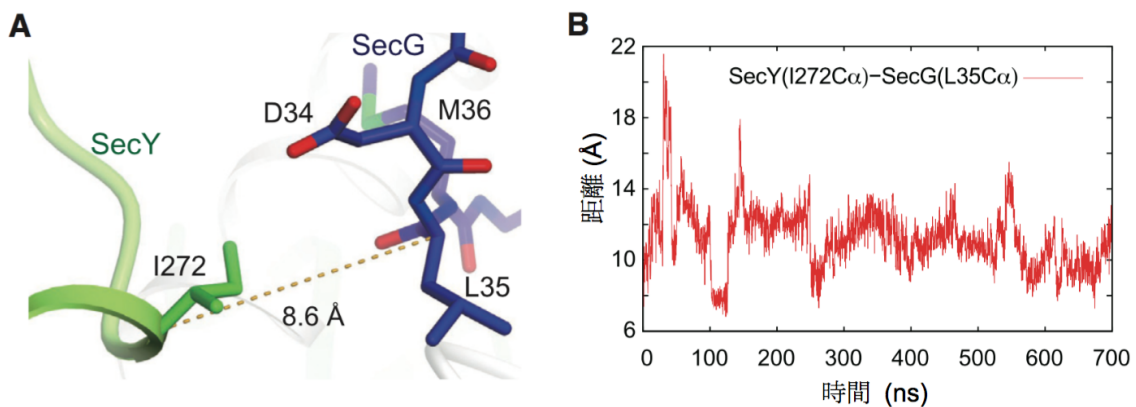


図 3-7. 分子動力学シミュレーション

- A. SecY の pore ring 付近のアミノ酸残基 I272 と SecG のループの先端付近のアミノ酸残基 L35 を拡大して示した。それらの C α 間を破線で示した。距離は 8.6 Å であり, この 2 つのアミノ酸残基が近いことが分かる。
- B. 分子動力学シミュレーションによる SecY の pore ring 付近のアミノ酸残基 I272 と SecG のループの先端付近のアミノ酸残基 L35 の C α 間の距離の変化を示した。多少の揺らぎはあるが, 700 ns 間を通して大きな変動がなかった。

3.1.6 SecY と SecG のループの架橋実験

MD シミュレーションの結果では、常に SecG のループが SecY の pore ring に蓋をするように位置していた。次に、実際に SecG のループの細胞膜内での挙動を確かめるために架橋実験を進めた。SecG のループの先端(L35)および SecY の pore ring 付近(I272)のアミノ酸残基をそれぞれシステインに置換した変異体を作製した。SecY(I272C)EG(L35C)変異体を発現させた大腸菌から膜画分を回収し、S-S 結合が形成されているかどうか確認した。WT および SecY, SecG それぞれ片方ずつにシステイン変異を導入した SecY(I272C)EG, SecYEG(L35C)変異体では、非還元状態 (+IA)・還元状態 (+β-ME)に関わらず、S-S 結合形成によるシフトアップしたバンドは見られなかった(図 3-8)。しかしながら、SecY, SecG 両方にシステイン変異を導入した SecY(272C)EG(35C)変異体では、非還元状態(+IA)時に、シフトアップしたバンドが見られた(図 3-8 左)。還元状態(+β-ME)では、このシフトアップしたバンドのほとんどは消失した(図 3.8 右)。

これらのことからシフトアップしたバンドは SecY と SecG の架橋産物であると考えられ、実際の細胞膜内でも SecG のループは SecY の pore ring 上部の近くに存在していることが示された。

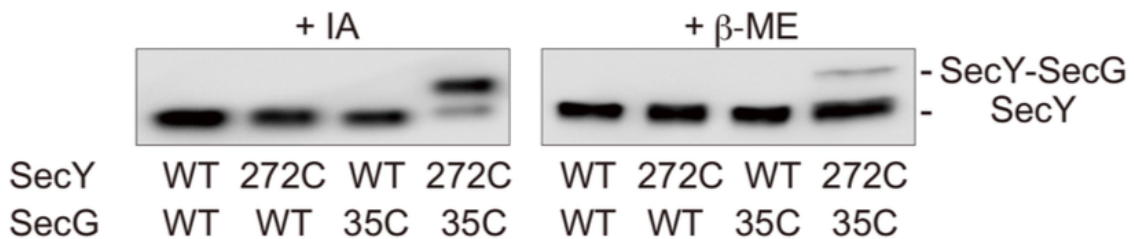


図 3-8. SecY と SecG のループの架橋実験

大腸菌から回収した膜画分中の SecY と SecG のループの架橋実験の結果を示した。回収した膜画分を非還元状態(+IA)もしくは還元状態(β-ME)で電気泳動し、SecY の C 末端に付加している His タグを検出する α-His 抗体を用いてウェスタンブロッティングで検出した。SecY および SecG の両方にシステイン変異が導入された場合にのみ、非還元状態でシフトアップしたバンドが検出され、還元状態でそのバンドは消失した。

3.1.7 SecY-SecG 架橋産物のタンパク質膜透過活性測定

細胞膜内で SecY(272C)EG(35C)変異体が S-S 結合により SecY-SecG の架橋産物を形成することが示されたので、次にタンパク質の膜透過において SecG のループが“キャップ”の役割を果たすかどうかを明らかにするために、再構成リポソームを用いたタンパク質膜透過活性測定を行なうこととした。タンパク質の膜透過活性は、SecYEG 再構成リポソーム、モータータンパク質 SecA、基質タンパク質 proOmpA を用いて膜透過反応を起こし、リポソーム内部へと膜透過した基質タンパク質 proOmpA がプロテアーゼ耐性を示すことを利用して測定できる(図 3-9)。

SecY(272C)EG(35C)変異体を WT と同様の方法で精製したところ、80%以上が架橋産物として精製できた(図 3-10A)。精製したタンパク質が SecY と SecG のジスルフィド結合による架橋産物であることを確かめるために、N 末端解析を行なったところ、SecY の N 末端と SecG の N 末端の両方が検出され、架橋産物であることが示唆された。

WT と SecY(272C)EG(35C)変異体を再構成したりポソームを用いて、タンパク質膜透過活性測定を行なったところ、非還元状態(-DTT)では WT のみ膜透過した proOmpA が検出され、SecY(272C)EG(35C)変異体ではほとんど検出されなかった。一方、還元状態(+DTT)では WT も SecY(272C)EG(35C)変異体も同程度の膜透過した proOmpA が検出された(図 3-10B)。膜透過反応後の SecY を検出したところ、非還元状態では 6 割以上が架橋産物のまま残っており、還元状態では架橋産物はほとんど見られなかった(図 3-10B)。

これらのことから、SecG のループを SecY のチャンネル上に固定した場合にはタンパク質は膜透過できないが、その固定を外してやると膜透過活性は回復することが示された。したがって、SecG のループはタンパク質膜透過反応が起こっていないときは、SecY のチャンネル上においてキャップとしての役割を担うことが示唆された。

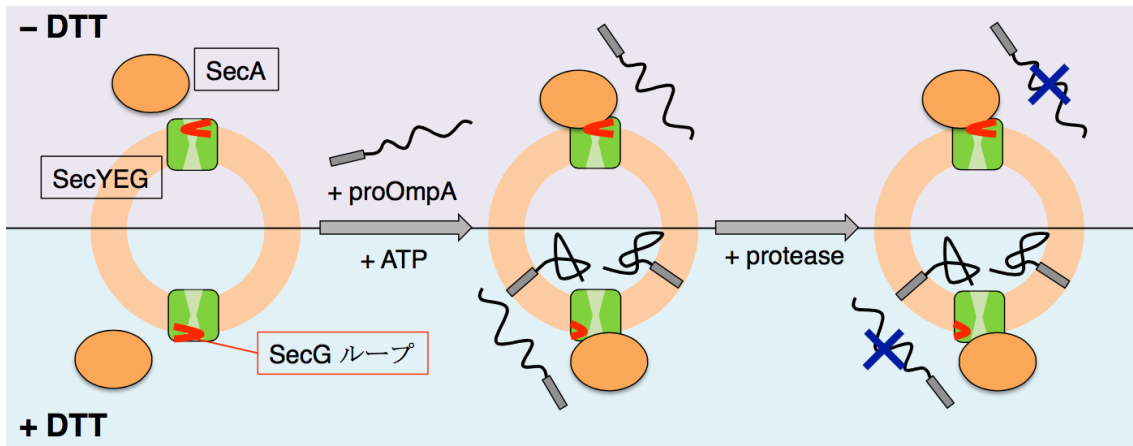


図 3-9. タンパク質膜透過活性測定の概略図

タンパク質膜透過活性測定は、SecYEG 再構成リポソーム、モータータンパク質 SecA、基質タンパク質 proOmpA を用いて実際に膜透過反応を行なう(図の左から中央)。その後、プロテアーゼにより膜透過していない基質タンパク質 proOmpA を分解する。その結果、プロテアーゼ耐性の proOmpA を検出することでタンパク質膜透過活性が測定できる。図上部は非還元状態(-DTT)であり、SecG のループがキャップの役割を果たしているならば図のように基質タンパク質は透過しない。図下部は還元状態(+DTT)であり、SecG のループの拘束が解かれ、WT と同条件になるので基質タンパク質が透過できる。

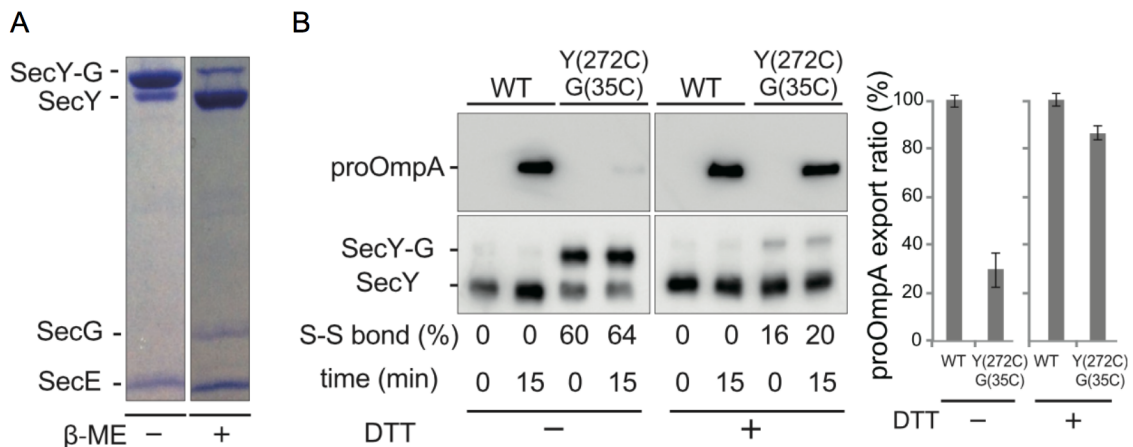


図 3-10. SecY-SecG 架橋産物のタンパク質膜透過活性

- A. 精製した SecY(272C)EG(35C)変異体の電気泳動結果。非還元状態(-β-ME)では架橋産物(SecY-G)のバンドが見られ、還元状態(+β-ME)では架橋産物のバンドが SecY と SecG のそれぞれのバンドに分かれた。
- B. タンパク質膜透過活性測定の結果。非還元状態(-DTT)と還元状態(+DTT)でそれぞれ測定した。膜透過した proOmpA がプロテアーゼ耐性のバンドとして検出され、WT のバンドを基準とし膜透過の効率をグラフとして右に示した。また膜透過開始時(0 min)と膜透過終了時(15 min)の架橋産物を検出し、S-S 結合の形成率をバンドの下に示した。

3.1.8 peptide-bound SecYEG

3.1.8.1 構造の概要

本研究で得られたもう一方の構造である C222 構造の SecYEG は, I222 構造と比較して膜貫通領域はほとんど同じ構造であるが, C4 や C5 ループなどの膜から突出している細胞質のループの配置がやや異なっている(図 3-11B)。特筆すべき点は, C222 構造は回転対称の SecYEG 分子がお互いにユニークな相互作用をしていることである。SecYEG 分子の SecE の N 末端がもう一方の SecYEG 分子の SecY のよく保存された疎水性の crack 内へと直接入り込んでいる (図 3-11C)。この相互作用によって, TM2 と TM8 によって形成されている crack(T92 と V329 の C α 間の距離 15.0 Å)が, resting state の SecY の crack(11.7 Å)よりも広がっている(図 3-11A vs B)。

SecY の TM2 と TM7 と TM8 は, シグナルペプチドと相互作用すると報告がある(Plath *et al.*, 1998)。また SecE の N 末端 5 残基の配列 MFARL は, 膜透過するタンパク質 YP_347420.1 や YP_755825.1 のシグナル配列の N 末端配列と同様であり, シグナルペプチドとして認識される可能性が考えられる。過去に, TtSecY は他のバクテリアのシグナルペプチドも認識することができると報告がある(Mori *et al.*, 2003)。SecE の N 末端側のアミノ酸 F2 と A3 の疎水性の側鎖は, SecY の細胞質に面した疎水性の crack 内の I85, I89, F322 と相互作用している(図 3-11D)。また SecE の N 末端から 4 番目のアミノ酸 R4 の側鎖は, SecY の保存性の高いアミノ酸 Q88 と相互作用している(図 3-11D)。

以上のことから C222 構造は, SecY の crack とペプチドが相互作用している初めての結晶構造と考えられる。またシグナル配列としては疎水性の配列が不足しているが, SecE の N 末端の MFARL 断片と crack の相互作用に着目すると十分にシグナルペプチドを模倣していると考えられる。したがって, この構造はタンパク質膜透過の開始時におけるシグナルペプチドと SecY のラテラルゲートの相互作用を明らかにする手がかりになるかもしれない。

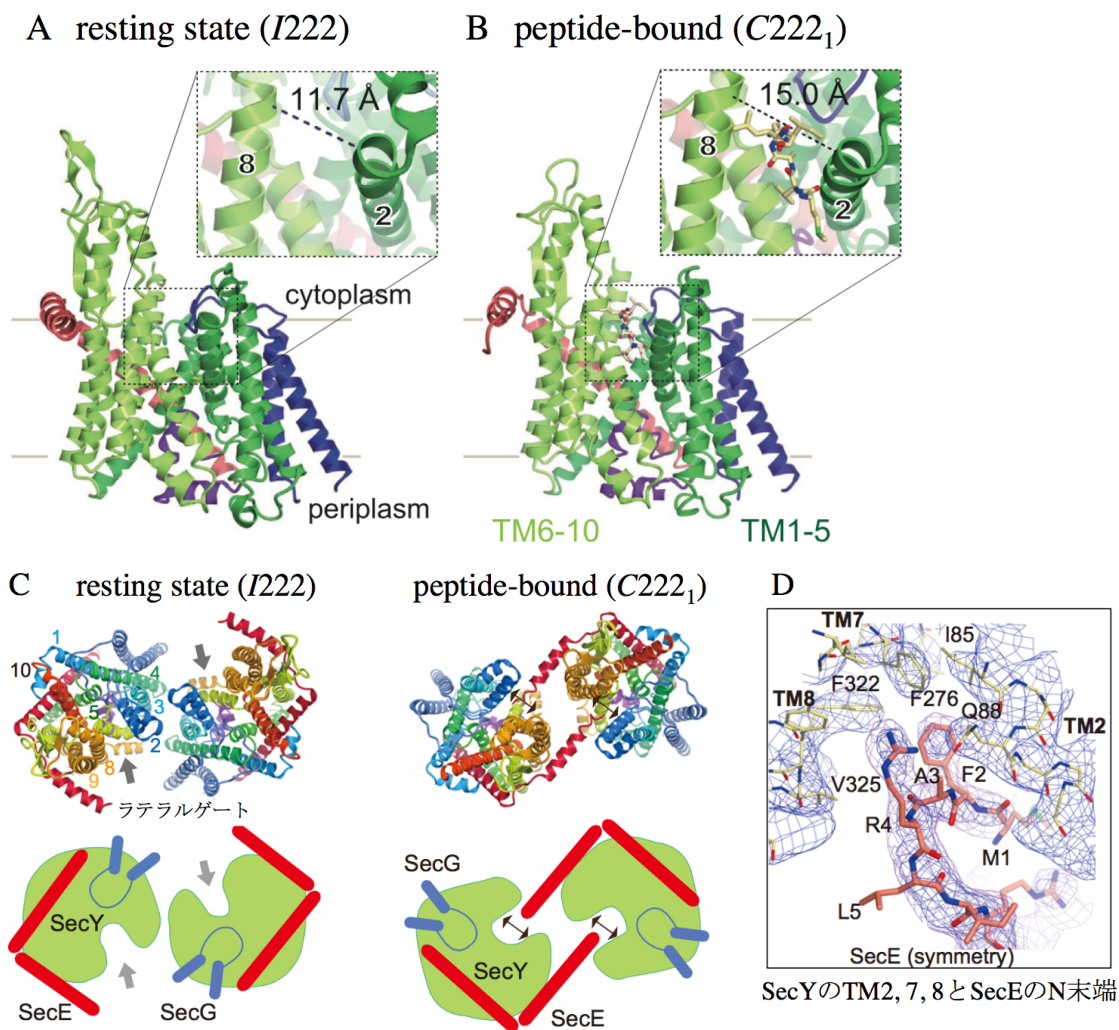


図 3-11. resting state 構造($I222$)と peptide-bound 構造($C222_1$)

- A. resting state 構造($I222$)をリボンモデルで表示した。ラテラルゲートの細胞質側にある crack 部分を拡大し、T92 と V329 の C α 間の距離を表示した。
- B. peptide bound 構造($C222_1$)をリボンモデルで表示した。ラテラルゲートの細胞質側にある crack 部分を拡大し、T92 と V329 の C α 間の距離を表示した。またシグナルペプチドを模倣しているであろう SecE の N 末端 5 残基をスティックで表示した。
- C. 結晶構造中の対称な 2 分子を細胞質側から見た図。下にはラテラルゲートが分かりやすいように簡略図を示した。SecE の N 末端が、もう一方の SecY のラテラルゲートに入り込んで相互作用し広がっている。
- D. SecY のラテラルゲートの細胞質側にある crack 部分と SecE の N 末端の相互作用部位の拡大図。SecE の F2, A3 と SecY の I85, I89, F322 の側鎖が互いに疎水性で相互作用している。また SecE の R4 と SecY の保存性の高い Q88 も相互作用している。

3.1.8.2 分子動力学シミュレーション(MD シミュレーション)

peptide-bound SecYEG 複合体のうちペプチド部分を除いた結晶構造を用いて、resting state と同様に理研の杉田研究室との共同研究による分子動力学シミュレーションを行なった。開始後すぐに 17.4 Å まで広がっていた crack(T92 と V329 の C α 間の距離)は閉じられ、resting state の SecY の大きさである 11.7 Å 付近を揺らぐ形になった(図 3-12)。

したがって、前述の通りペプチドが結合することと、ラテラルゲートの細胞質側の crack が広がることは相関があると考えられる。一方で、ラテラルゲートのペリプラズム側は大きな変化は見られなかった。この結果は、部分的にチャンネルが開いた時にラテラルゲートのペリプラズム側は大きな変化が見られなかったという過去の蛍光分子を用いた研究結果と一致する(Taufik *et al.*, 2013)。このように細胞質側の crack が柔軟であることは、様々な基質タンパク質を認識するにあたって適した構造になっているのかもしれない。

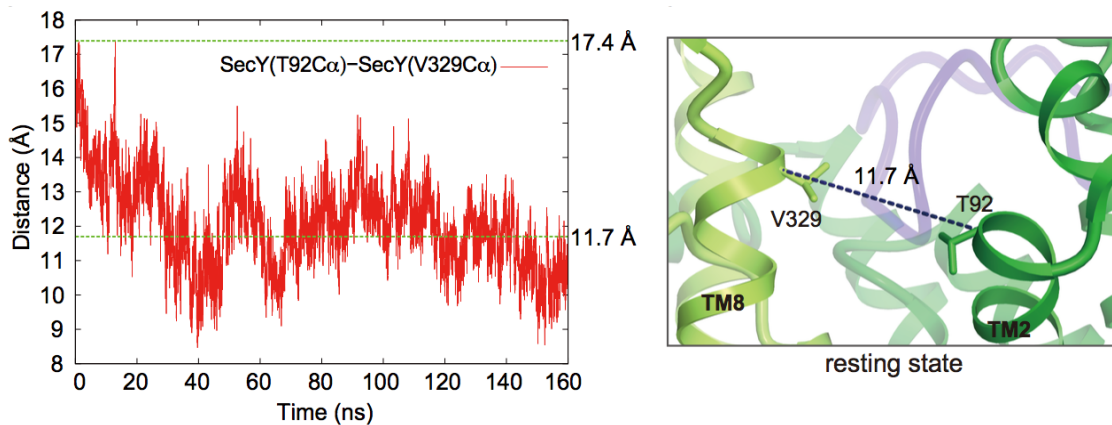


図 3-12. peptide bound SecYEG 複合体の MD シミュレーション

MD シミュレーション間の SecY の T92 と V329 の C α 間の距離を示した。右に resting state における T92 と V329 を示した。シミュレーション開始後すぐに最大 17.4 Å まで広がるが、すぐに閉じられ 11.7 Å 付近で揺らいでいる結果になった。

3.1.9 SecG の役割を含めたタンパク質膜透過のモデル

今回の2種類の結晶構造とそれらを基にした機能解析により、SecGのループがタンパク質膜透過において“キャップ”としての役割を果たすこと、SecEのN末端がシグナルペプチドを模倣しSecYのcrackと相互作用していることを明らかにした。過去の構造機能解析によって、ヌクレオチドが結合したSecAが、基質タンパク質が存在しない状態でもSecYのラテラルゲートを広げることが報告されている(Taufik *et al.*, 2013; Tsukazaki *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2008)。この内の1つであるSecYとSecAの複合体の結晶構造では、SecYの細胞質側の表面はSecAに覆われている。したがって、タンパク質膜透過におけるSecYの構造の変化は、最初にSecYとSecAが細胞質側で相互作用し、SecYのラテラルゲートが広がると考えられる。その後、peptide-bound SecYEG複合体のように基質がSecYの細胞質側に結合することで、ラテラルゲートを広げた状態で安定化する。このような状態を経ることによって、プラグ(plug)ドメインが移動し、ラテラルゲートをさらに広げ、SecGのループをチャンネルから外し、SecY自身の中央にタンパク質の通り道を形成するのかもしれない(図3-13)。

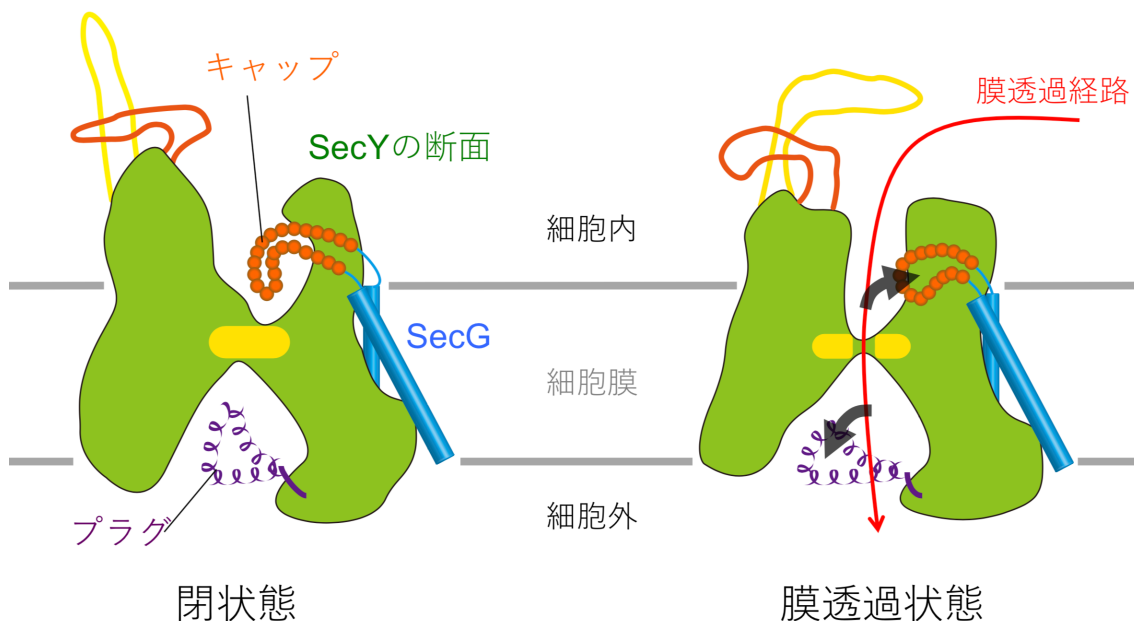


図3-13. SecG の役割を含めたタンパク質膜透過のモデル

タンパク質膜透過におけるSecYEG複合体の閉状態と膜透過状態の模式図。閉状態ではSecYのチャンネルは、細胞質側からSecGのループによりキャップがされ、ペリプラズム側からはプラグにより栓がされている。膜透過状態では、基質タンパク質の通り道を形成するようにキャップもプラグも移動する。

3.1.10 まとめ

これまでの SecYEG 複合体の構造は、SecG が含まれていない不完全な複合体の構造であったり、アミノ酸の側鎖が正確に配置できないほど低分解能であったりしたため、タンパク質膜透過反応の詳細な解析に利用することが困難であった。しかし、本研究により詳細な解析に十分な高分解能かつ完全な SecYEG 複合体の構造解析を達成した。resting state の構造はこれまでで最も高分解能の構造であり、今後のさらなる複合体の構造解析にも有用となることが考えられる。また、新たに SecG のループがキャップの役割を担っていることを構造機能解析により明らかにした。本研究では、SecE の N 末端側がシグナルペプチドを模倣したような peptide bound SecYEG の構造も明らかにし、タンパク質膜透過反応の初期段階の考察を進めた。

本研究により得られた SecYEG 複合体の詳細な構造情報を用いて、タンパク質膜透過反応の詳細な解析へと進めていく。

3.2 TtSecY-SecA/SecE/SecG 複合体(SecYAEG)の機能解析

～序～

これまでタンパク質の膜透過反応を *in vitro* で行なうためには、膜に再構成された SecYEG, SecA, proOmpA の3つのタンパク質を混ぜ合わせる必要があった。膜へ再構成された SecYEG は脂質などを含み、SecYEG のトポロジーが均一でなく、順方向に再構成されたアクティブな SecYEG を正確に把握することは困難である。そのため、SecA を添加する手法で、活性をもつ SecYEG と SecA の物質量(モル数)を正確に合わせる事が不可能である。混合法を用いる限りはどうしても、SecA または SecYEG の過不足が生じてしまう。また、たとえ物質量を一致させたとしても、SecYEG と SecA は結合解離を繰り返すために、常に安定な複合体を形成していないヘテロなサンプルになってしまう。したがって、詳細な解析を目指した場合、サンプル調整時にタンパク質を混合させる手順は避けるべきである。そこで SecYEG と SecA を、アミノ酸リンカーを用いて融合させた SecY-SecA/SecE/SecG 複合体(SecYAEG)を用いることを考え、実際に精製しその機能解析を進めた(図 3-14)。

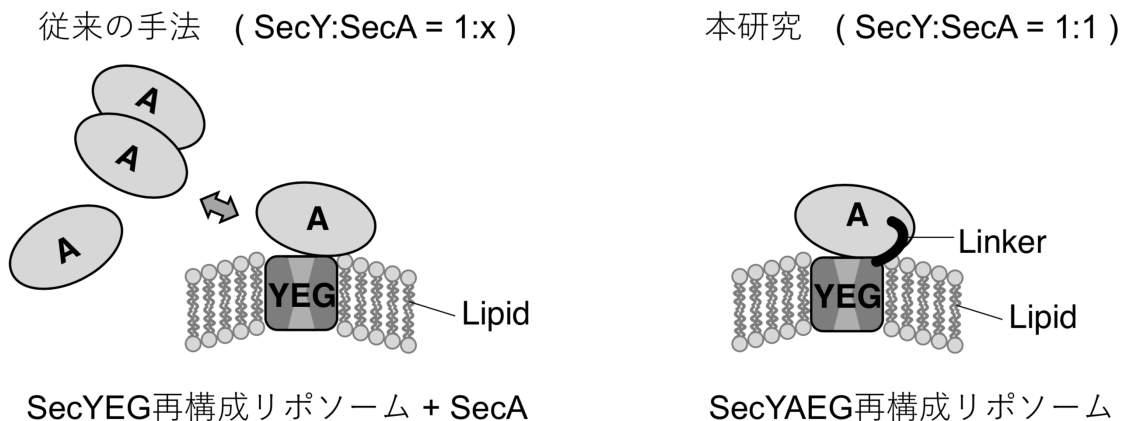


図 3-14. 従来の手法と本研究におけるタンパク質膜透過の活性測定

図の左側には従来の SecYEG 再構成リポソームに対して SecA を添加する手法の概略図を示した。右側には本研究における SecYAEG 融合タンパク質を用いた手法の概略図を示した。従来の手法では1つの SecYEG に対して複数の SecA が結合解離を繰り返すが、本研究では1つの SecYEG には1つの SecA が結合し、ある一定の距離から解離しないようになっている。

3.2.1 SecYAEG 複合体のタンパク質膜透過活性測定

SecYAEG 複合体を発現させた大腸菌を破碎し、細胞膜を界面活性剤により可溶化した後、Ni アフィニティーカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。15 L の培養液から約 5 mg の精製 SecYAEG 複合体を得た(図 3-15A)。得られた SecYAEG 複合体をリポソームに再構成し、基質に proOmpA を用いてタンパク質膜透過の活性測定を行なった。タンパク質膜透過反応は 50 °C で行なった。精製した SecYEG 複合体を含むリポソームは SecA 非存在下ではタンパク質膜透過活性を示さず(図 3-15B, レーン 1, 2), SecA の添加によりタンパク質膜透過活性を示した(図 3-15B, レーン 5, 6)。この結果が一般的なタンパク質膜透過反応である。一方、今回の SecYAEG 複合体を含むリポソームは SecA を添加しなくとも活性を持つことが示された(図 3-15B, レーン 3, 4)。SecYEG と SecYAEG のどちらも ATP がない条件では活性は見られなかった(図 3-15B, レーン 9-12)。また、追加で SecA を加えたり、同一リポソーム内に追加で SecYEG を加えたりしても基質タンパク質の膜透過量にはあまり影響がなかった(図 3-15B, レーン 3, 4 対 レーン 7, 8 対 レーン 13, 14)。

以上のことから SecYAEG 複合体だけで十分な活性を保持していると考えられる。しかしながら、リポソーム内で、SecYAEG 複合体が単独で機能しているのか、またいくつかの SecYAEG 複合体がさらなる複合体を形成しているのかについては不明瞭なままである。リポソーム中でさらなるオリゴマー形成が起こっている可能性は残るが、本実験において SecY : SecA のモル比 1 : 1 の複合体は膜透過活性を十分に持つことを示した。

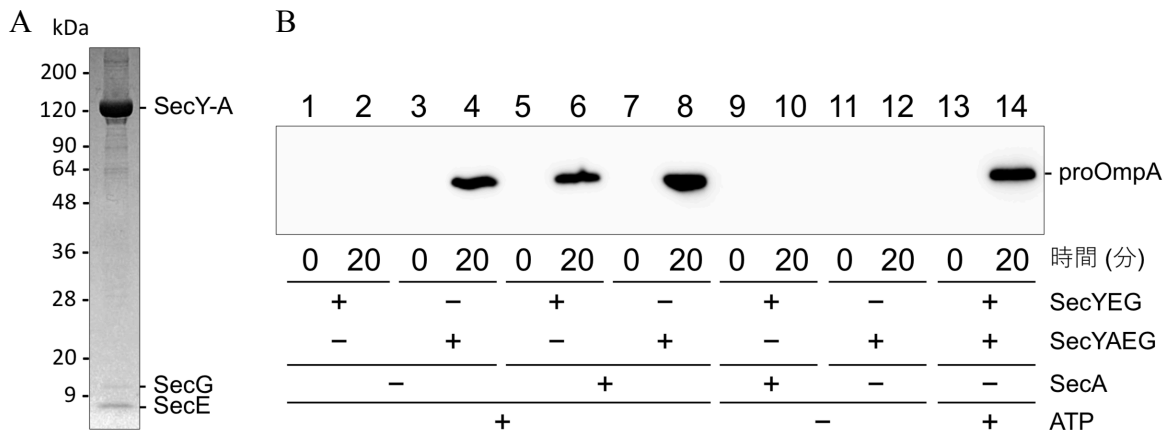


図 3-15. SecYAEG 複合体のタンパク質膜透過活性測定

- A 精製後 SecYAEG 複合体の SDS-PAGE 結果。SecY-A 融合タンパク質および SecE, SecG のバンドが検出された。
- B SecYEG 複合体もしくは SecYAEG 複合体を再構成したリポソームを用いたタンパク質膜透過活性測定の結果。SecYEG 複合体はモータータンパク質である SecA の非存在下では活性がなく, SecA 存在下で活性を示した。SecYAEG 複合体は追加の SecA なしに活性を示した。どちらも ATP 非存在下では活性はなかった。また, 追加で SecA や SecYEG を加えても活性にあまり影響がなかった。

3.2.2 1 ユニット再構成系である Nanodisc への再構成

SecYAEG 複合体が再構成リポソーム中で活性を持つことは確認できたが、再構成リポソーム中では SecYAEG 複合体のオリゴマー状態の制御ができておらず、モノマーで機能しているのかについては不明なままである。そこで膜タンパク質のオリゴマー状態を制御できる再構成系である Nanodisc と呼ばれる技術に着目した。SecYEG を再構成した Nanodisc(Nd-SecYEG)は、タンパク質の膜透過活性を持ち中間体を形成することが示されている(Taufik *et al.*, 2013)。Alami ら (Alami *et al.*, 2007)の SecYEG を Nanodisc に再構成する手法を参考にして、SecYAEG 再構成した Nanodisc の調整を進めた。精製した SecYAEG 複合体、脂質、Membrane Scaffold Protein(MSP)の量を調節し、SM2 ビーズで界面活性剤を除去した後にサイズ除去クロマトグラフィーを行ない、1 ユニットの SecYAEG 複合体が再構成されている Nanodisc(Nd-SecYAEG)を調製した(図 3-16)。サイズ除去クロマトグラフィーでは、Nd-SecYEG を再構成した場合(Alami *et al.*, 2007)と同様のピーク波形を示したが、最大のピーク位置が早くなっていた。SecA の増加分だけ溶出位置がシフトしたと仮定すれば、最大のピーク位置が Nd-SecYAEG と考えられる。各ピークのフラクションにおいて Native-PAGE と SDS-PAGE を行なった。その結果、Alami らの論文と同様に Native-PAGE で単一のバンドが得られ、SDS-PAGE で SecYAEG 複合体と MSP といった Nd-SecYAEG の構成要素が確認できた。以上のことから、Nd-SecYAEG が再構成および単離されたと判断した。最大ピーク前の低いピーク(図 3-16, 10 ml 付近)はその溶出位置から、2 ユニットの SecYAEG 複合体が再構成された Nanodisc[Nd-(SecYAEG)₂]か、もしくは2分子の Nd-SecYAEG が SecA 同士で相互作用した(Nd-SecYAEG)₂と想定される。もし Nanodisc[Nd-(SecYAEG)₂]であれば、この結果は Alami らの論文においても SecYEG が 2 ユニット再構成されたことと一致する。図 3-16 の*のピークは SecYAEG 複合体が検出されず、また MSP 単体のゲルろ過におけるピーク位置(16 ml 付近)より早く溶出していることから、タンパク質が入っていない状態の脂質のみ再構成された膜タンパク質フリーの Nanodisc であると考えられる。

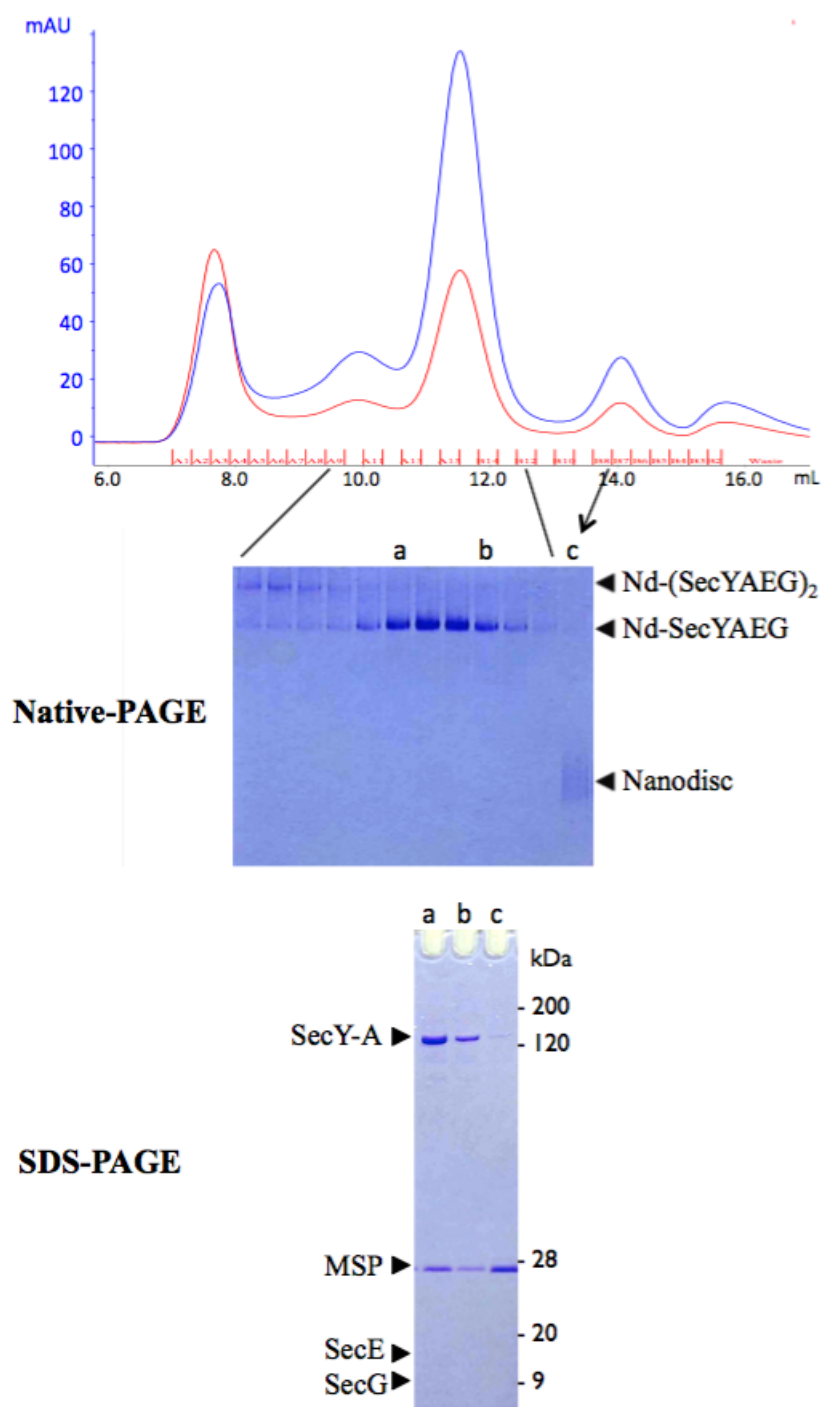


図 3-16. SecYAEG 複合体 Nanodisc への再構成

SecYAEG 複合体, 脂質, MSP を混合し, 界面活性剤を除去した後のサイズ除去クロマトグラフィーの溶出パターンと, 各フラクションの Native-PAGE および SDS-PAGE における CBB 染色の結果。溶出パターンの青線が 280 nm の吸収で, 赤線が 254 nm の吸収を表している。縦軸は 280 nm の吸収を, 横軸は溶出量を示している。

3.2.3 Nd-SecYAEG と基質との相互作用

Nd-SecYAEG は Native-PAGE で Nd-SecYEG よりも小さい移動度を示した(図 3-18)。本研究では、まず SecYAEG 複合体を含む Nanodisc を用いて正確に基質である proOmpA を認識するのかについて検討をした。本実験で用いた proOmpA は分子内に S-S 結合を持ち、タンパク質膜透過時には膜透過中間体を形成すると報告されている変異体 proOmpA(L59)である。WT のシグナル配列をもつ proOmpA(L59)と Nd-SecYAEG を混合した場合、Native-PAGE での Nd-SecYAEG の移動度が小さくなったバンドが現れた(図 3-17)。このバンドは proOmpA(L59)が存在している時にのみ現れた(図 3-17, レーン 3, 4 対 5, 6)が, ATP の有無では変化はなかった(図 3-17, レーン 3 対 4)。proOmpA(L59)のシグナル配列を不活性型にした 3Q 変異体を用いると移動度の変化はなかった(図 3-18, レーン 3, 4 対 5, 6)。さらに, proOmpA(L59)の C 末端に super folder GFP(sfGFP)を付加した変異体(L59-sfGFP)では, Native-PAGE での移動度がさらに小さくなったバンドが現れた(図 3-17, レーン 5, 6 対 7, 8)。以上のことから, 移動度が減少した 2 種類のバンドは, Nd-SecYAEG と基質 proOmpA の複合体であると解釈した。また, Nd-SecYEG を用いた場合においても, proOmpA(L59)の添加による Nd-SecYEG のバンドの移動度の変化はみられなかった(図 3-18, レーン 7-10)。

以上のことから, Nd-SecYAEG と基質 proOmpA の複合体形成はシグナル配列と SecA に依存していることが明らかとなった。また ATP の添加の有無に関わらず複合体のバンドが形成することから, シグナル配列の認識や, Nd-SecYAEG と基質 proOmpA の複合体の形成には ATP の加水分解エネルギーは必要ないと考えられる。この単純化された Nd-SecYAEG の系を応用すれば, 高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)による解析や, 蛍光一分子観察など, タンパク質膜透過反応の動態を 1 分子解析で追跡することが可能となるだろう。

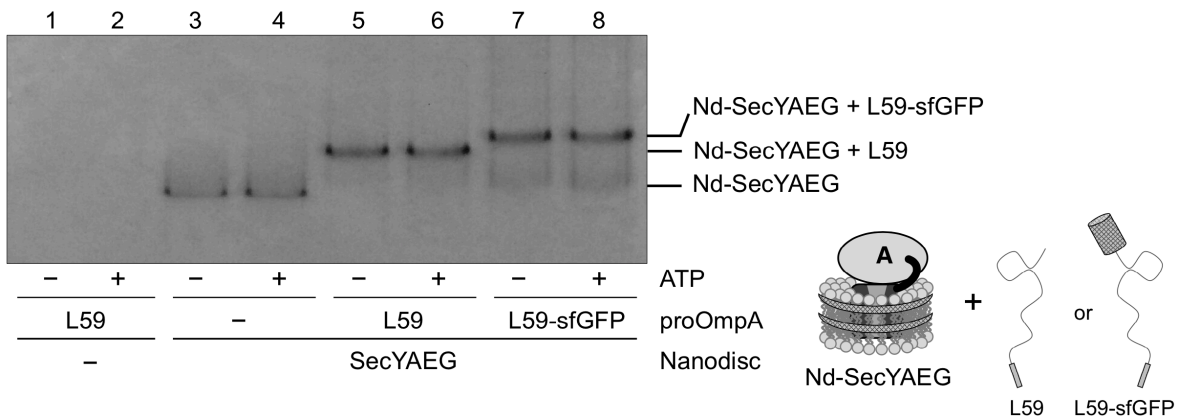


図 3-17. Nd-SecYAEG と基質の相互作用 1

Nd-SecYAEG と proOmpA(L59) を用いたタンパク質膜透過反応後の Native-PAGE の結果。proOmpA(L59) だけではバンドは検出されなかった(レーン 1, 2)。Nd-SecYAEG と proOmpA が存在する場合に、ATP の有無に関わらず移動後が小さくなったバンドが検出された(レーン 5, 6)。proOmpA(L59)-sfGFP を用いた場合にはさらに移動度が小さくなったバンドが検出された(レーン 7, 8)。また ATP の有無ではこれらのバンドに変化はなかった(レーン 5 対 6, レーン 7 対 8)。また右下に Nd-SecYAEG と基質 proOmpA の各変異体を模式図で示した。

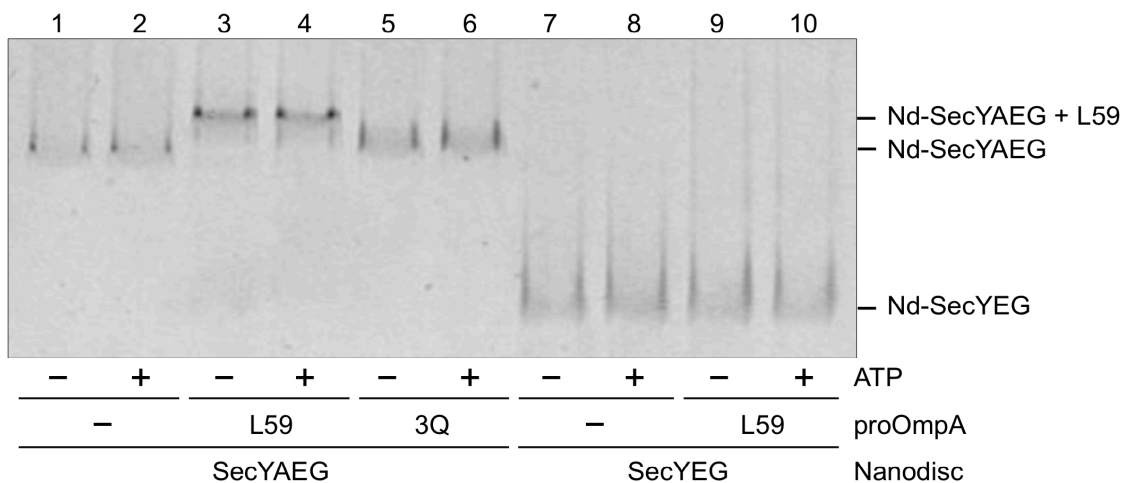


図 3-18. Nd-SecYAEG と基質の相互作用 2

シグナル配列を不活性にした 3Q 変異体もしくは Nd-SecYEG を用いたタンパク質膜透過反応後の Native-PAGE の結果。3Q 変異体を用いた場合には、移動度が小さくなったバンドは検出されなかった(レーン 1-6)。Nd-SecYEG と proOmpA(L59) を用いた場合では、Nd-SecYEG のバンドの位置に変化は見られなかった(レーン 7-10)。またどの Nanodisc と基質の組み合わせにおいても ATP の有無で変化はなかった。

3.2.4 再構成リボソームを用いたタンパク質膜透過中間体の検出

将来的に, Nd-SecYAEG を用いた系で Sec によるタンパク質膜透過を 1 ユニットで詳細に観察するためには, SecYAEG を用いてタンパク質膜透過中間体が準備できることが望ましい。proOmpA(L59)は, 分子の内部に S-S 結合を導入した基質であり, タンパク質膜透過中間体を形成することがアイソトープを用いた手法により確かめられている(Uchida *et al.*, 1995)。本実験では, SecYAEG 複合体がタンパク質膜透過中間体を形成させ, 還元剤である DTT 依存的に膜透過が再開することを確認するために, 新たに抗体を作製し, 検討した。この抗体は proOmpA の N 末端側のシグナル配列の後の 38-54 残基を認識するウサギポリクローナル抗体(α -proOmpA(38-54))であり, タンパク質膜透過中間体を, アイソトープを使わずに, ウェスタンブロッティングで検出できると考えた(図 3-19)。精製した proOmpA(L59)を用いて, タンパク質膜透過反応を行なった。還元剤である DTT 非存在下では, proOmpA の全長よりも短い 2 本のバンド I (Intermediate) が検出された(図 3-20, レーン 2, 3, 5)。また DTT 存在下では, この 2 本のバンド I が消失し, 全長のバンド F (Full length)が検出された(図 3-20, レーン 6, 8, 9)。proOmpA(L59)の S-S 結合を形成する 2 つのシステイン残基のうち, N 末端側のシステイン残基までのアミノ酸の総分子量は約 28,300 であり, 検出されたバンド I とよく一致する(図 3-20)。

これらのことから, 抗体 α -proOmpA(38-54)を用いて, S-S 結合による立体障害によりタンパク質の膜透過が途中で停止した proOmpA が検出されたと考えられる。つまりは今回精製した proOmpA(L59)と SecYAEG 複合体を用いることでタンパク質膜透過反応の安定な中間体と, 反応の再開が確認できたといえる。以上のことから, 高速 AFM 解析への準備が整った。

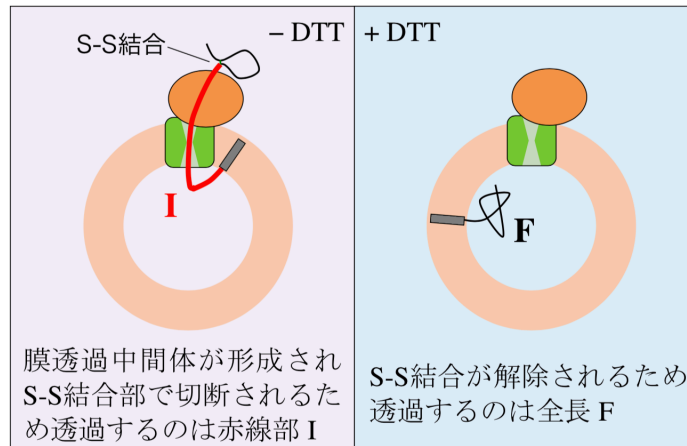


図 3-19. タンパク質膜透過中間体の検出方法の概略図

還元剤 DTT 非存在下では、S-S 結合で膜透過が停止するため、proteinase K により S-S 結合付近で切断される。膜透過中間体の赤色部分は proteinase 耐性のバンド I (Intermediate)として検出される。還元剤存在下では、膜透過が停止しないため全長が透過したバンド F (Full length)が検出される。膜透過中間体を形成させた後に DTT を加えることで、バンド I が減少しバンド F が増加する。

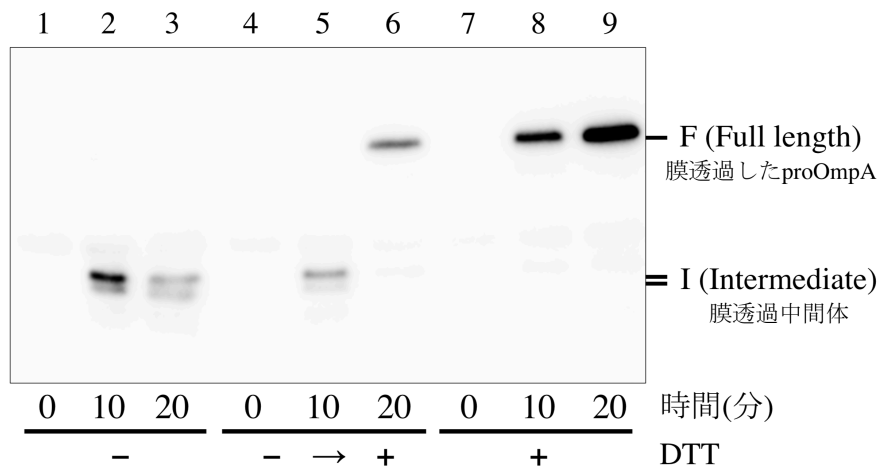


図 3-20. タンパク質膜透過中間体の検出

膜透過中間体を形成する基質 proOmpA(L59)を用いて、中間体の形成をウェスタンブロッティングにより確かめた結果。図中の F は全長が膜透過したバンド(Full length)を、I は中間体が形成され膜透過していない C 末端側が proteinase K により分解された分子量の小さなバンド(Intermediate)を示している。還元剤 DTT を最初から加えた場合は F のバンドが検出され、加えなかった場合は I のバンドが検出された。10 分後から DTT を加えると、中間体が解除され、その 10 分後には全長のバンド F が検出された。

3.2.5 SecYEG と SecA の化学量論

本研究では SecYEG : SecA = 1 : 1 の SecYAEG 融合タンパク質を作成し、その有効性を評価してきた。過去の報告では序論に明記したように複数のオリゴマー状態で機能することが議論されてきたが、近年の複合体や膜透過中間体の結晶構造解析により、タンパク質の膜透過中は SecYEG : SecA = 1 : 1 で機能しているという共通認識に落ち着いてきている(Zimmer et al., 2008; Li et al., 2016)。タンパク質の膜透過が開始されるまでのオリゴマー状態は定かではないが、膜透過中は SecYEG : SecA = 1 : 1 で機能することから、本研究で使用した SecYAEG 融合タンパク質は今後の解析において有効な系であると考えられる。

3.2.6 まとめ

膜透過反応中における SecYEG または SecA のオリゴマー状態については、未だ議論の続いているところではあるが、本研究では SecYEG と SecA の物質量を合わせることを、SecYEG と SecA の融合タンパク質 SecYAEG を用いることで達成した。精製 SecYAEG 複合体を用いるだけで、自動的に SecY, SecE, SecG, SecA のモル比が揃う。本結果では、1 ユニットの SecYAEG が基質 proOmpA と強固に結合すること、また、融合タンパク質は活性を持つこと、安定な中間体を形成することを示した。SecYAEG 複合体以外に追加で SecA を添加することによる活性の向上もなかったが、活性が下がるということもなかった。このデータは *in vitro* で最低限の活性は1 ユニットの SecYAEG があれば十分であることを相補する。実際には複数ユニットで働く可能性を完全に除去できていない。しかしながら、今回用いた Nanodisc-SecYAEG の系は今後の一分子観察に有用な実験系となる可能性が大いに考えられる。まずは今回の系を用いて、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いた観察へと進める。

3.3 高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質膜透過反応の観察

～序～

タンパク質の膜透過反応を担う Sec トランスロコンの構成因子のうち、*Thermus thermophilus* 由来の Sec 因子(SecYEG, SecA, SecDF)はすべて結晶構造が解明された(Vassylyev *et al.*, 2006; Tsukazaki *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2015; Tsukazaki *et al.*, 2011)。また様々な生物種において、SecY と SecA の結晶構造が解かれ、タンパク質膜透過の詳細な解析が進められてきた。結晶構造をもとに機能解析が進められ、多くのモデルが提唱されているが、未だ統一見解は得られていない。近年、Sec トランスロコンの一分子観察が精力的に進められている(Taufik *et al.*, 2013; Kedrov *et al.*, 2013; Sanganna Gari *et al.*, 2013)。しかしながら、複数の因子が複雑に絡み、動的要素の多いタンパク質膜透過反応の完全理解には至っておらず、特に膜透過の動的なところは未だ憶測の域を出ない。そこで、本研究ではこれまでに行なってきた単純化した SecYEG と SecA によるタンパク質膜透過反応の系を用いて、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)による動態観察を進めた。

3.3.1 ストレプトアビジン二次元結晶基板

SecYEG や SecYAEG が再構成された Nanodisc のみを観察するために、ストレプトアビジンの二次元結晶基板を用いることを考えた。通常の AFM 測定時に使用するマイカ基板では、非特異的な相互作用により不純物も多く観察される可能性があるが、ストレプトアビジン二次元結晶基板を用いることで非特異的な相互作用を防ぐことができる。SecY のシステインにビオチンマレイミドを付加した場合、ビオチン化した SecY がストレプトアビジン二次元結晶に結合すると、基板と SecY の間に隙間ができる。マイカ基板上に結合した場合には、5 Å 以下しかない隙間が、ビオチンマレイミドの分および二次元結晶の隙間も加えるとタンパク質が膜透過するには十分な隙間が形成されると考えられる(Karner *et al.*, 2016)。

第 2 章の材料と方法 2.3.1 の手順に従い、マイカ基板上にストレプトアビジン二次元結晶を展開させた。ストレプトアビジン二次元結晶基板を高速 AFM で観察したところ図 3-21A, B のような画像が得られた。この図から分かるように整列した格子状の二次元結晶基板が形成できた。以下の観察はすべて同様の手法で作成したストレプトアビジン二次元結晶基板上にて行なった。

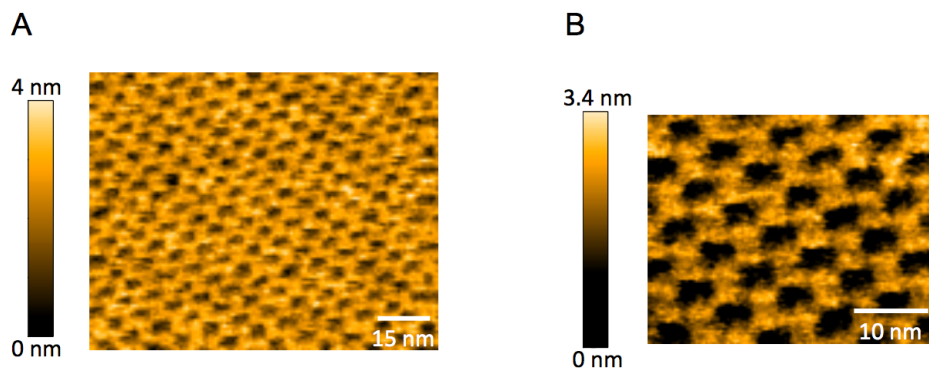


図 3-21. ストレプトアビジン二次元結晶基板の観察

- A. マイカ基板上に展開させたストレプトアビジン二次元結晶を 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl のバッファー条件下にて観察した動画のスナップショット。画像横のスケールバーは高さを示しており、橙色を中心として白色になるほど高さは高く、黒色になるほど低い。ストレプトアビジン二次元結晶の高さとよく一致した格子状の二次元結晶が綺麗に展開されていることが確認できた。
- B. A の拡大図。拡大するとより均一な格子状である。

3.3.2 SecYEG 再構成 Nanodisc の観察

はじめに Nd-SecYEG と Nd-SecYAEG のみを詳細に観察することにした。SecY のペリプラズム側 2 ヶ所(S148, R208)にシステイン変異を導入し、ビオチンマレイミドによりビオチン化した。そのビオチン化された SecYEG 複合体を再構成した Nd-SecYEG を、ストレプトアビジン二次元結晶基板に結合させると図 3-22A のようになると考えられる。実際に Nd-SecYEG を基板に結合させ、高速 AFM で観察した結果、観察している間は安定に存在する高さ 7-8 nm 程度の円形の像が得られた(図 3-22B)。像の高さは、ストレプトアビジン二次元結晶を基準として算出した。図 3-22B は動画のスナップショットであり、横幅・高さともに均一な像であった。観察した Nd-SecYEG と考えられる像をピックアップし、その高さを解析したところ、 7.7 ± 0.6 nm の高さのヒストグラムが得られた(図 3-22C)。

Nd-SecYEG のみの高さは SecYEG の結晶構造からおよそ 7.0 nm と推定されるが、実際の観察結果から得られた高さは 7.7 nm 程度であった。この高さの増加はストレプトアビジンと結合しているビオチンマレイミドの分だけ高さが増加した等の理由が考えられる。また粒子の高さや横幅が均一であることや、ストレプトアビジン二次元結晶上に安定に固定されていることから、観察された像は Nd-SecYEG であり、Nd-SecYEG と基板の間にタンパク質が膜透過する隙間が形成され、Nd-SecYEG の配向性も揃っていると考えられる。

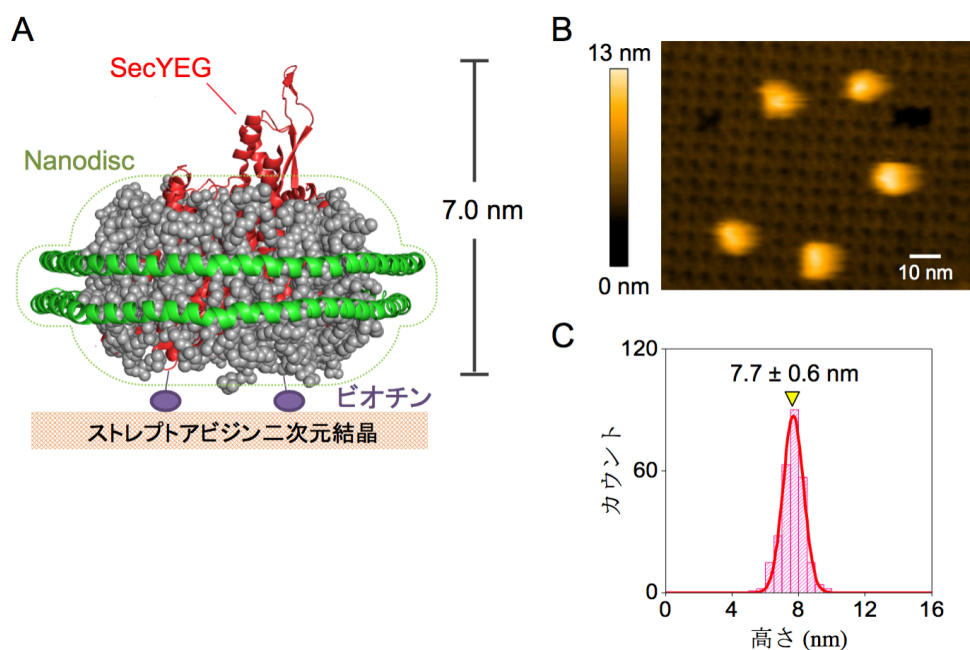


図 3-22. Nanodisc-SecYEG の高速 AFM 観察

- A. ストレプトアビジン二次元結晶基板上におけるビオチン化された Nd-SecYEG の概略図。Nd-SecYEG は本稿 3-1 章の結晶構造(PDB: 5AWW)と、膜タンパク質フリーの Nanodisc の NMR 構造(PDB: 2MSC)を組み合わせたモデルである。高さ 7.0 nm は結晶構造から見積もった。
- B. 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 300 mM NaCl の測定バッファー条件下で、観察した Nd-SecYEG のスナップショット。画像中の Nd-SecYEG の像の大きさは均一であり、基板のストレプトアビジン二次元結晶の格子も観察できた。
- C. 観察された Nd-SecYEG の像の高さを解析したヒストグラム (N = 277)。

3.3.3 SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察

続いて Nd-SecYAEG の観察を行なった。Nd-SecYEG の場合と同様に SecY のペリプラズム側 2ヶ所をビオチン化した SecYAEG 複合体を再構成した Nd-SecYAEG を、ストレプトアビジン二次元結晶基板に結合させると図 3-23A のようになると考えられる。Nd-SecYAEG の高速 AFM 観察において様々な測定バッファの条件を検討したところ、Nd-SecYEG と同条件の 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl バッファに KCl を加えた 50 mM HEPES-NaOH(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl のバッファ条件下において、安定に固定化された高さ 11 nm 程度の X 型の像が数多く得られた(図 3-23B)。像の高さは、Nd-SecYEG と同様にストレプトアビジン二次元結晶を基準として算出した。図 3-23B は動画のスナップショットであり、実際の動画では X 型の像は若干変化していた。観察した Nd-SecYAEG と考えられる像をピックアップし、その高さを解析したところ、 10.9 ± 0.8 nm の高さのヒストグラムが得られた(図 3-23C)。

Nd-SecYAEG のみの高さはおよそ 9.6 nm と推定されるが、実際の観察結果から得られた高さは 10.9 nm 程度であった。この高さの増加は Nd-SecYEG と同様にビオチンマレイミドの分の増加と考えられ、Nd-SecYAEG においても基板との間にタンパク質が膜透過する隙間が形成できたと思われる。

次に Nd-SecYAEG の観察像を Nd-SecYEG の観察像と比較したところ、その高さは 3.2 nm 増加しており、この増加量は SecA の高さによく一致している(図 3-24A)。高さの分布からも明らかに SecA の分だけ増加していることが分かる。Nd-SecYEG と Nd-SecYAEG の観察画像を三次元で表示してみると、実際の観察結果からも明らかに高さ・横幅・形状の異なる粒子であることが分かる(図 3-24B)。これらの観察は、Nd-SecYAEG をストレプトアビジン二次元結晶上に固定できたことを示す。

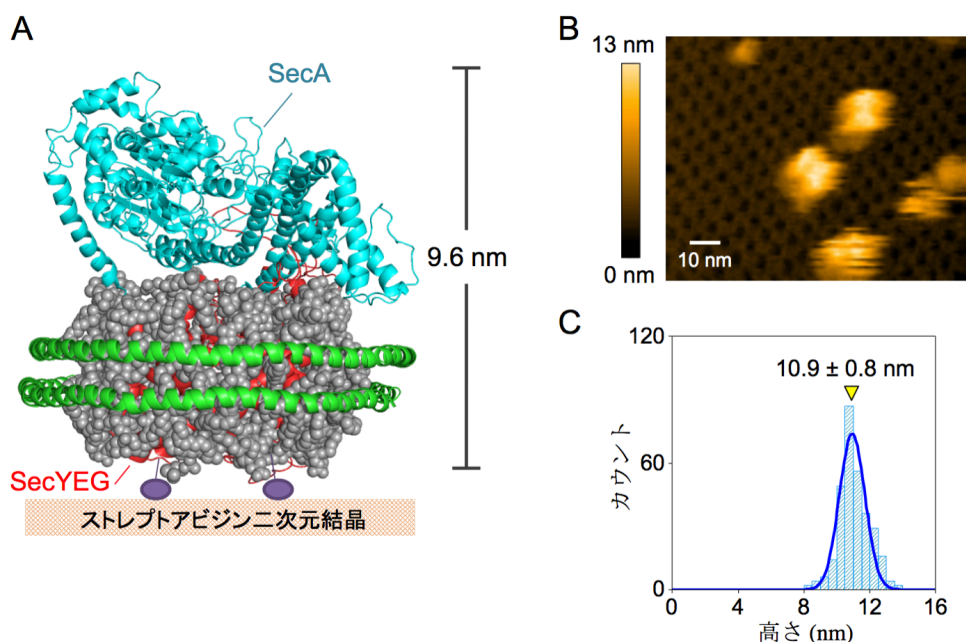


図 3-23. Nd-SecYAEG の高速 AFM 観察

- A. ストレプトアビジン二次元結晶板上におけるビオチン化された Nd-SecYAEG の概略図。Nd-SecYAEG は SecYEG と SecA の複合体の結晶構造(PDB: 3DIN)と、膜タンパク質フリーの Nanodisc の NMR 構造(PDB: 2MSC)を組み合わせたモデルである。高さは SecYEG と SecA の複合体の結晶構造から算出。
- B. 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl の測定バッファー条件下で、観察した Nd-SecYAEG のスナップショット。
- C. 観察された Nd-SecYAEG の像の高さを解析したヒストグラム (N=305)。

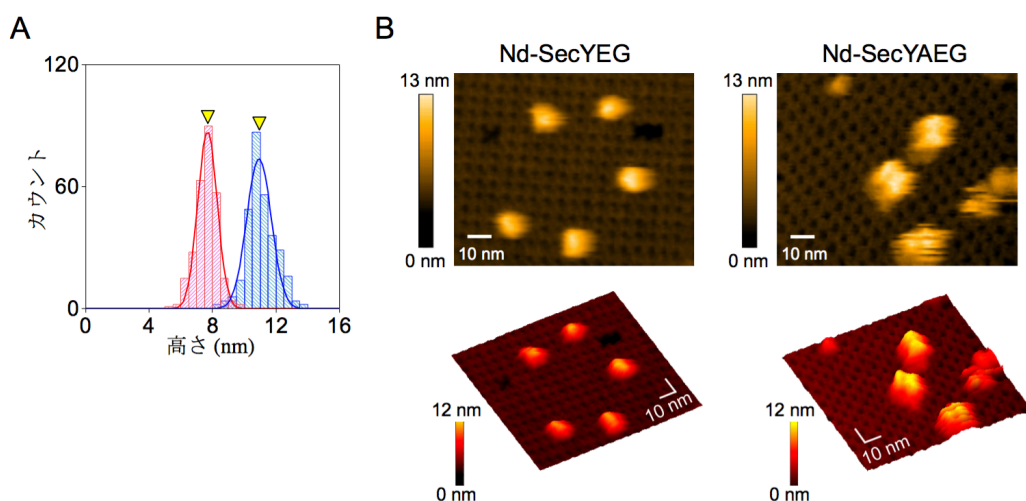


図 3-24. Nd-SecYEG と Nd-SecYAEG の比較

- A. Nd-SecYEG と Nd-SecYAEG の観察像の高さのヒストグラムを統合したグラフ。赤色が Nd-SecYEG で、青色が Nd-SecYAEG である。
- B. 高速 AFM 観察像の三次元画像。上部に元となった Nd-SecYEG(図 3-22B)と Nd-SecYAEG(図 3-23B)の二次元画像を、下部にその三次元画像を表示した。

3.3.4 SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察結果の解析

Nd-SecYAEG をストレプトアビジン二次元結晶上に固定し測定を行なうと細胞質側から見た Nd-SecYAEG の像が得られる(図 3-25A)。この Nd-SecYAEG のモデルを用いて、AFM 画像のシミュレーションを行なったところ、図 3-25B のような SecA が4つのドメインに分かれて見える像が得られた。実際に高速 AFM で得られた高分解能の観察において、シミュレーション画像とよく一致する4つのドメインに分かれているような粒子が確認できたことから Nd-SecYAEG が観察できていることが分かる。また Nd-SecYAEG の観察像では複数の形状が確認できた(図 3-25C)。図 3-25C の画像はストレプトアビジン二次元結晶上で観察しているが、詳細に解析するために基板部分のバックグラウンドを削除してある。SecA は SecY と相互作用すると構造変化することが報告されているおり、これらのことから今回のヌクレオチドフリーの条件下において SecA の構造変化が追跡できたと考えられる。

続いて多くの観察結果の中からある1つの Nd-SecYAEG の観察像に着目し、その変化の様子を追跡した(図 3-26)。この観察動画中の Nd-SecYAEG にクロスセクションを固定し、その高さと大きさの変化を解析した。0 秒から 34.2 秒にかけて、最大の高さは少し減少しているが大きさにはあまり変化は見られなかった。34.2 秒から 74.4 秒にかけては、最大の高さおよびその大きさも減少していた。特に高さは Nd-SecYEG に相当する高さにまで減少した。これらのことから、0 秒から 34.2 秒にかけては Nd-SecYAEG の SecA が構造変化し、34.2 秒から 74.4 秒にかけては SecA が SecYEG 上から一時的に解離し、高速 AFM での追跡ができなかったことが考えられる。Nd-SecYAEG の観察において安定に存在する Nd-SecYAEG もあれば、SecA と SecYEG の相互作用が弱まることで構造変化し、最終的には一時的に SecA が SecYEG 上から解離することがあるのかもしれない。

詳細に Nd-SecYAEG の高速 AFM 観察像を解析した結果から、本解析法はその動態を追跡することが十分に可能である。

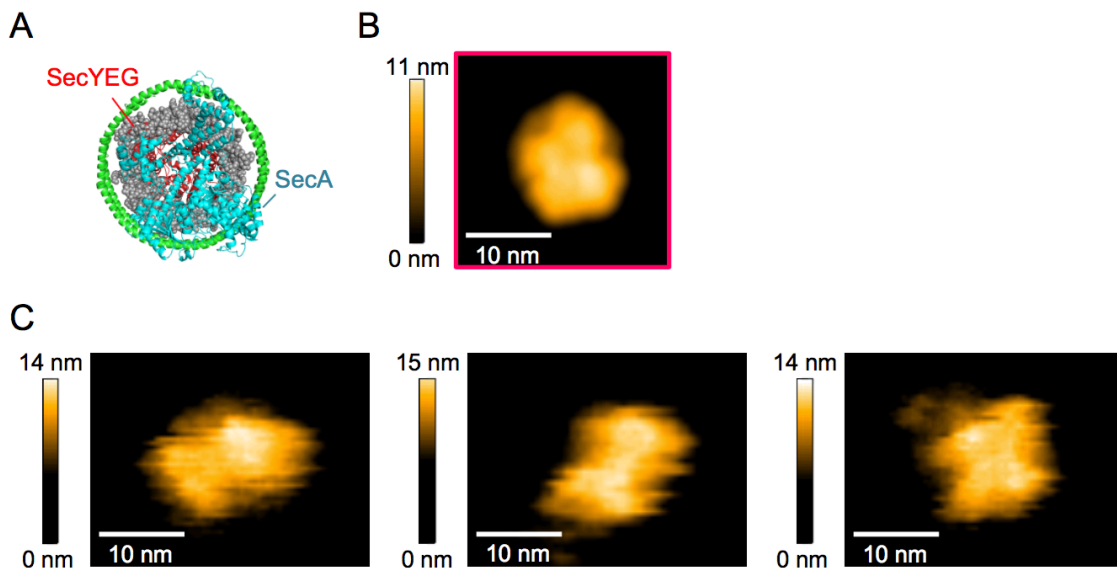


図 3-25. Nd-SecYAEG のモデルと実際の観察像の形状

- A. Nd-SecYAEG のモデルを細胞質側から見た図。ストレプトアビジン二次元結晶上での高速 AFM 観察はこの方向からの像が得られる。
- B. Nd-SecYAEG のモデルを用いたシミュレーション画像。
- C. 形状の異なる複数の Nd-SecYAEG の観察像。それぞれの粒子は異なる Nd-SecYAEG である。

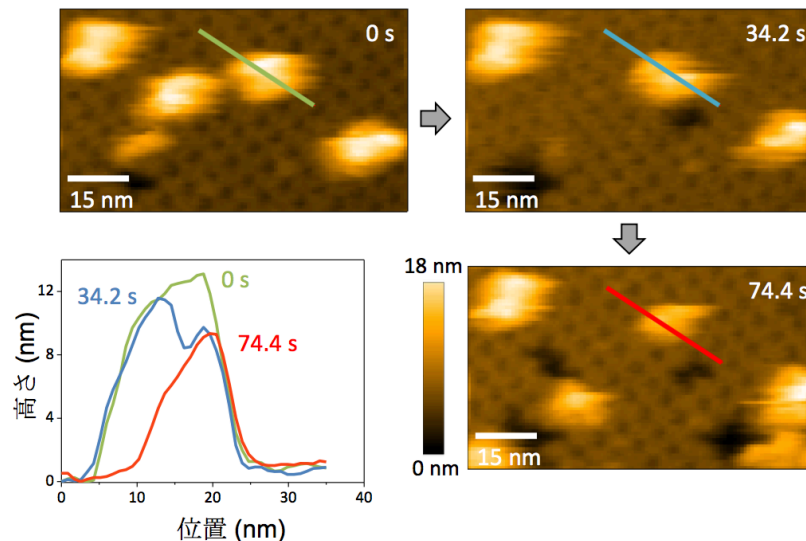


図 3-26. Nd-SecYAEG 観察時における 1 つの像の経時変化

Nd-SecYAEG の観察中に得られた構造が変化する像に注目し追跡した。各高速 AFM 画像のスナップショットはそれぞれ 0 秒, 34.2 秒, 74.4 秒時点での像を示した。それぞれのスナップショット中の Nd-SecYAEG において、縦軸を像の高さ、横軸をクロスセクションの位置としてグラフ化した。クロスセクションは固定しているため、高さの減少とともに大きさの減少も確認できた(0 秒 : 緑色, 34.2 秒 : 青色, 74.4 秒 : 赤色)。

3.3.5 別角度からの SecYAEG 再構成 Nanodisc の観察

これまでストレプトアビジン二次元結晶上で Nd-SecYAEG を観察してきたが、次にマイカ基板上ではどのように観察できるのか確かめた。過去の Nd-SecYEG と高速でない AFM を用いた報告(Koch *et al.*, 2016)では、図 3-27A だけでなく観察された像の大きさや高さなどの情報を加味して図 3-25 のように縦向き状態で観察されたと報告されている。実際に観察した結果、予想とは異なる形状の観察像が得られた(図 3-27B)。図 3-27B の左図から分かるように、大きさの異なる 2 つの楕円状の粒子からなる均一な観察像であった。また白でマーカーした部分に境目が見られており、Nd-SecYAEG の SecA 部分と Nd-SecYEG 部分の境目のようである。つまり、図 3-27B の右図のように Nd-SecYAEG が横向きに固定されている可能性が示唆された。

Nd-SecYAEG の SecY のペリプラズム側にはビオチンが付加してあることから、ストレプトアビジンを反応させて観察を行なった。するとストレプトアビジンを反応させていない時には見られなかった観察像が得られた。Nd-SecYAEG の SecY のペリプラズム側の 2 ヶ所に新たな粒子が見られた(図 3-27C)。この粒子の高さを解析したところストレプトアビジンの高さによく一致した。

続いて Nd-SecYAEG のモデルを用いて、横向きに固定された時の観察像のシミュレーションを行なった。SecA 部分に相当する小さな楕円と Nd-SecYEG 部分に相当する大きな楕円からなる像が得られた(図 3-27D)。実際の観察像と比較するとその形状はよく一致していることが分かる。

これらのことから、SecY にビオチンが付加された Nd-SecYAEG をマイカ上で測定すると横向きに固定された Nd-SecYAEG が観察できると考えられる。これはおそらくストレプトアビジンを付加したことによる立体障害により、以前報告された縦向きに(Koch *et al.*, 2016)はならなかったと考えられる。したがって本研究により、Nd-SecYAEG を別々の方向から動態解析できることが明らかとなった。

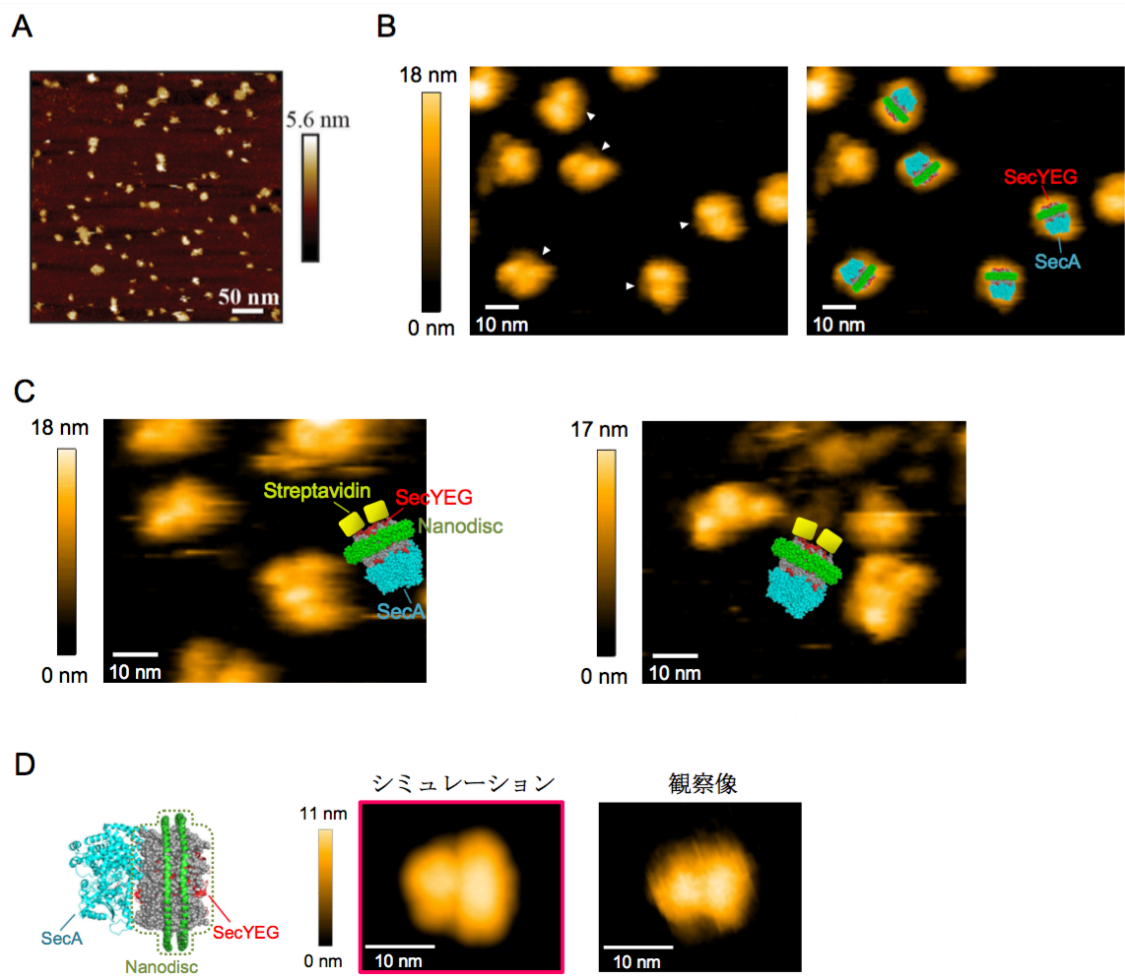


図 3-27. マイカ基板上における Nd-SecYAEG の観察

- A. Nd-SecYEG の高速でない AFM 観察画像(Koch et al., 2016 から引用)。粒子は均一ではないが、Nd-SecYEG らしき像の高さと大きさから縦向きであると判断されていた。
- B. マイカ基板上における Nd-SecYAEG の観察。左図の白マーカーは 2 種類の楕円粒子の境目を示している。右図には Nd-SecYAEG のモデルを実際の観察像に重ねて示した。
- C. ストレプトアビジンに反応させた Nd-SecYAEG の高速 AFM 観察像。実際の観察像の横にストレプトアビジンが結合した Nd-SecYAEG のモデルを示した。
- D. Nd-SecYAEG を横向きに示したモデル。横向きモデルのシミュレーションの画像および実際の測定画像。

3.3.6 Nd-SecYAEG と基質の複合体の観察

Nd-SecYAEG が、基質 proOmpA(L59)と相互作用し複合体を形成することは3.2章で証明した。この複合体が膜透過中間体を形成しており、基質のシグナル配列が Nanodisc の脂質中に保持されていると考えると高速 AFM での観察像は図 3-28A のようなイメージとなる。

まず Nd-SecYAEG と proOmpA(L59)-sfGFP を用いてタンパク質膜透過反応を行ない、Nd-SecYAEG と proOmpA(L59)-sfGFP の複合体を形成させた。その複合体をストレプトアビジン二次元結晶に展開させ、高速 AFM で観察した。得られた観察像では、Nd-SecYAEG のみの観察では見られなかった Nd-SecYAEG よりも小さな粒子が確認できた(図 3-28C 中の白三角形)。その小さな粒子は、ストレプトアビジン二次元結晶上に安定に固定されているものとそうでないものが観察されたが、どちらの場合においても Nd-SecYAEG の周辺に存在した。したがって小さな粒子は proOmpA(L59)-sfGFP 由来のものであり、Nd-SecYAEG の周辺に存在することから Nd-SecYAEG と相互作用しているものであると考えられる。しかしながら、その小さな粒子が図 3-28A の sfGFP 部分に相当するのか、アンフォールドした proOmpA の紐状部分に相当するのか、膜透過した proOmpA 部分に相当するのかは、分解能の不足により明らかにはできなかった。それでも Nd-SecYAEG が proOmpA(L59)-sfGFP と相互作用することと、Nd-SecYAEG のみの観察では得られなかった粒子であることから、この観察像は Nd-SecYAEG と proOmpA(L59)-sfGFP の複合体であり、図 3-28A に近い観察像が得られたと考えられる。

次に得られた観察像の Nd-SecYAEG に相当する粒子を詳細に解析したところ、その構造変化が見えてきた(図 3-29)。過去の報告から SecA によるタンパク質膜透過反応の開始は「ATP 存在下」・「膜に埋め込まれた SecY との結合」・「基質との結合」が起因となり誘発されることが分かっている。それらを踏まえると今回の条件ではすべての要因が揃っておりタンパク質膜透過反応が起こっている条件である。図 3-29 にその観察像を示した。観測の間、SecA が構造変化し、9.6 秒付近では大きく揺らいだ。結晶構造解析などから明らかにされている Closed 状態と Open 状態が多く見られ(わからないので、SecA の構造の図示が必要)、0.4, 16, 24.8 秒では Closed 状態であり、20.8, 21.2 秒では Open 状態らしき粒子が観察できた。これらのことから SecA が構造変化している様子が捉えられた。

続いて基質 proOmpA(L59)-sfGFP らしき粒子が観察中に移動した観察動画に着目した(図 3-30)。Nd-SecYAEG に隣接している粒子(図 3-30, 赤三角形)と 10 nm 程度離れた位置に存在する粒子(図 3-30, 白三角形)が確認できた観察像を見ると、9.2, 9.6 s の時点では 10 nm 程度離れている粒子が 10.0, 10.4, 10.8 s と時間が経つとともに Nd-SecYAEG 粒子に接近した(図 3-30)。このことから、

Nd-SecYAEG に初めから隣接している粒子(図 3-30, 赤三角形)は, 基質 proOmpA(L59)-sfGFP の膜透過した proOmpA 部分であり, 10 nm 程度離れた位置に存在し Nd-SecYAEG に接近した粒子は基質 proOmpA(L59)-sfGFP の C 末端の proOmpA もしくは sfGFP ではないかと考えられる。基質 proOmpA(L59)-sfGFP の proOmpA 部分はアンフォールドした紐状で高さが低く, ストレプトアビジン二次元結晶基板と相互作用しないことから高速 AFM での観察は困難であるが, アンフォールドした proOmpA 部分が Urea の希釈により何らかの形にフォールドし基板に固定され, 観察像として検出できた可能性を考慮すると proOmpA が膜透過したと考えられる。したがって, この観察結果は Nd-SecYAEG による基質 proOmpA(L59)-sfGFP の膜透過を反映していたものかもしれない(図 3-30)。

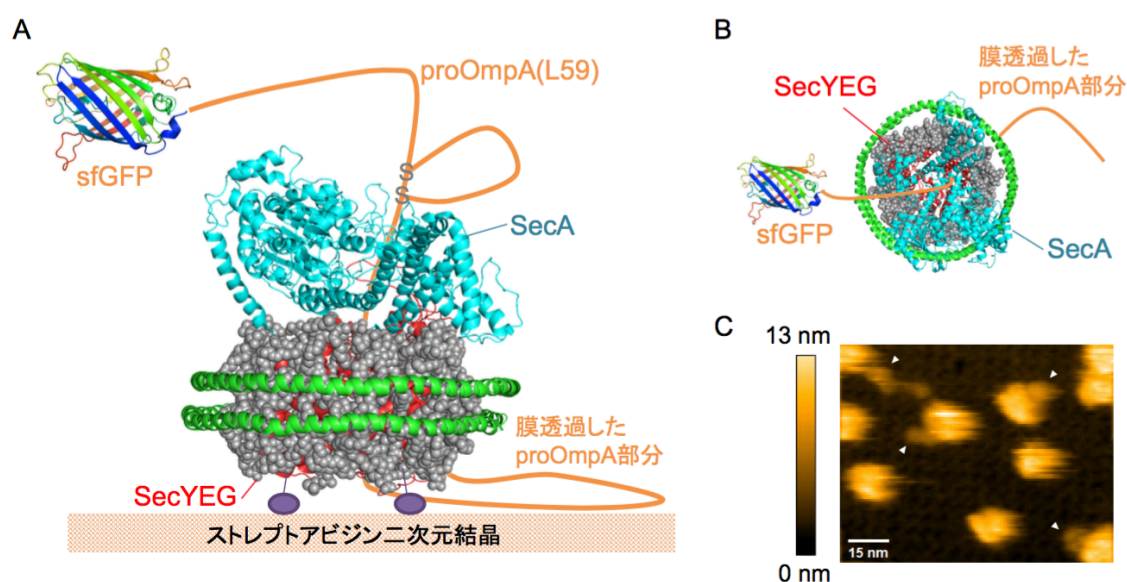


図 3-28. Nd-SecYAEG と基質の複合体の高速 AFM 解析

- A. Nd-SecYAEG と基質の複合体を基板と平行な側面からみた模式図。ストレプトアビジン二次元結晶上での Nd-SecYAEG と基質 proOmpA(L59)-GFP の複合体が膜透過中間体であり, シグナル配列が Nanodisc 内に留まると仮定した時, 基質の膜透過した部分は, その空間内に収まり高速 AFM では観察できない可能性がある。
- B. Nd-SecYAEG と基質の複合体の高速 AFM により観察される像の模式図。分かりやすいように膜透過した基質 proOmpA 部分を示しているが, 紐状かつ基板と相互作用しないので実際は見えない可能性がある。
- C. 複合体の高速 AFM による観察結果。50 mM HEPES-Na(pH 7.0), 300 mM NaCl, 100 mM KCl, 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.4 M Urea バッファー条件下にて測定を行なった。Nd-SecYAEG 粒子の付近に, 白三角形で示した Nd-SecYAEG とは異なる小さな粒子がいくつも観測された。

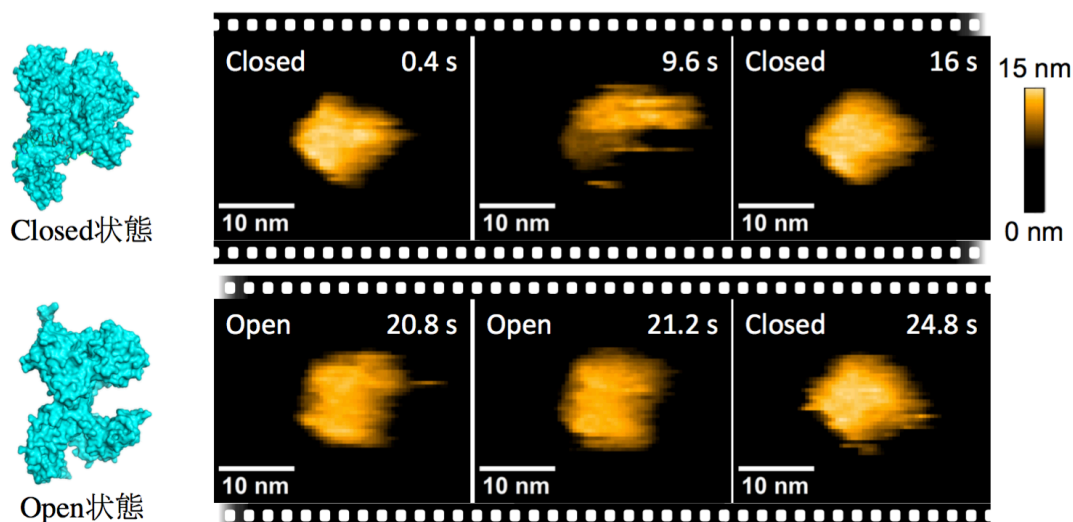


図 3-29. Nd-SecYAEG と基質の複合体の SecA の解析

Nd-SecYAEG と基質 proOmpA-sfGFP を ATP 存在下で 37 °C, 1 時間インキュベートして作成した複合体の観察で Nd-SecYAEG の SecA に着目し, その変化を追跡した。見やすくするために基板などのバックグラウンドを消した画像である。これらは同一の Nd-SecYAEG であるが, その像の変化から明らかに SecA が構造変化している。

細胞質側から見た SecA の Closed 状態(PDB : 3DIN)と Open 状態(PDB : 1TF5)の分子表面モデルを左側に示した。

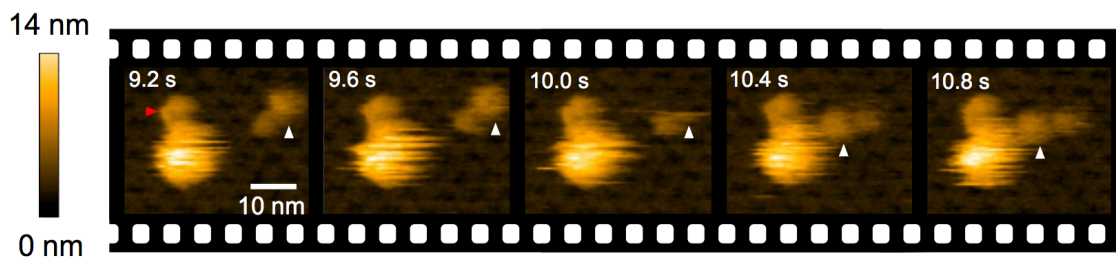


図 3-30. 基質 proOmpA(L59)-sfGFP の膜透過画像

複合体の観察のうちいくつかの動画で, sfGFP に相当する粒子が Nd-SecYAEG に引き込まれる様子が観察された。ある動画で粒子が動いた前後の画像を時間経過とともに並べた図である(9.2-10.8 s)。赤三角形は Nd-SecYAEG よりも明らかに低い粒子だが基板に固定されている。また白三角形で示した粒子も Nd-SecYAEG よりも明らかに低い粒子であるが, 時間経過とともに Nd-SecYAEG に相当する粒子に引き込まれている。基質の sfGFP に相当する粒子が初めは固定されているのに, 時間経過とともに固定が剥がされ Nd-SecYAEG に相当する粒子に引き込まれている。

3.3.7 過去の Sec トランスロコンの AFM 解析との比較

これまでの Sec トランスロコンの AFM 解析と本研究の高速 AFM 解析の結果を比較した。まずデータの精度を見ると、高速でない AFM を用いたデータよりも Nanodisc の純度もよく、分解能もはるかに高いことから観察像だけで Nanodisc がどのように固定化されたのかまで明らかである(Koch *et al.*, 2016)。また同じ高速 AFM を用いた解析においても、平面膜では粒子の動きが明らかに捉えきれていない観察像や、不純物が観察された可能性を排除できていないデータが報告されている (Karner *et al.*, 2016)。その解析と比較すると、本研究で得られた観察像が本当に Sec タンパク質であるのかは、SecYEG と SecYAEG を比較した高さの解析や高分解能の観察像の形状もしくは、ストレプトアビジンを結合させるなどの手法を用いて明らかとしてきた(図 3-31C, D)。

したがって本研究で得られた観察像は非常に精度の高い高速 AFM 観察結果であるといえる。

3.3.8 まとめ

本研究では、高速 AFM と Nanodisc を用いて SecYAEG 複合体の構造変化およびタンパク質膜透過中間体の観察を進めた。まず初めにストレプトアビジン二次元結晶基板を用いて Nd-SecYAEG の配向性を固定でき、Nd-SecYAEG と基板との間の空間の確保もできた。それにより Nd-SecYAEG の SecA の詳細な解析を進め、SecY との相互作用による構造変化や、基質もしくはヌクレオチドによる構造変化の観察も可能となった。実際に基質タンパク質を用いた中間体の観察では、基質タンパク質らしき粒子の観察も成功した。本研究により確立された手法を用いることで、基質タンパク質が Nd-SecYAEG により膜透過される現象を捉えることが、実現可能であることが考えられる。しかしながら基質タンパク質が紐状でありかつ Nd-SecYAEG と比較するとその大きさが小さいことからその詳細な構造変化の追跡が今度の検討課題である。本研究を進めるにあたり、ストレプトアビジン二次元結晶基板とマイカ基板とで異なる角度から Nd-SecYAEG を観察できることが明らかとなった。これは他の膜タンパク質にも応用可能な技術であり、実際に他の膜タンパク質でも同様の観察結果が得られている(補足章)。この手法はタンパク質膜透過反応の可視化にも有効な系であるだけでなく、今後の膜タンパク質の動的な解析に非常に役立つものである。

第 4 章 参考文献

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 66: 213-221.
- Alami M, Dalal K, Lelj-Garolla B, Sligar SG, Duong F. (2007). Nanodiscs unravel the interaction between the SecYEG channel and its cytosolic partner SecA. *EMBO J* 26: 1995-2004.
- Alvarez FJ, Orelle C, Davidson AL. (2010). Functional reconstitution of an ABC transporter in nanodiscs for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132: 9513-9515.
- Ando T, Kodera N, Takai E, Maruyama D, Saito K, Toda A. (2001). A High-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12468-12472.
- Ando T, Uchihashi T, Fukuma T. (2008). High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes. *Prog. Surf. Sci.* 83: 337-437.
- Bayburt TH and Sligar SG. (2002). Self-assembly of single integral membrane proteins into soluble nanoscale phospholipid bilayers. *Protein Sci* 11: 2476-2481
- Bayburt TH, Grinkova YV, Sligar SG. (2006). Assembly of single bacteriorhodopsin in bilayer nanodiscs. *Arch Biochem Biophys* 450: 215-22.
- Cannon KS, Or E, Clemons WM Jr, Shibata Y, Rapoport TA. (2005). Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol* 169: 219-225.
- Deville K, Gold VAM, Robson A, Whitehouse S, Sessions RB, Baldwin SA. (2011). The oligomeric state and arrangement of the active bacterial translocon. *J Biol Chem* 286: 4659-4669.
- Denks K, Vogt A, Sachelaru I, Petriman NA, Kudva R, Koch HG. (2014). The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Membr Biol* 31: 58-84.
- du Plessis DJ, Nouwen N, Driessen AJ. (2011). The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta* 1808: 851-865.
- Egea PF, Stroud RM. (2010). Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 17182-17187.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66: 486-501.
- Erlandson KJ, Miller SBM, Nam Y, Osborne AR, Zimmer J, Rapoport TA. (2008).

A role for the two-helix finger of the SecA ATPase in protein translocation. *Nature* 455: 984–987.

- Fandl JP and Tai PC. (1987). Biochemical evidence for the secY24 defect in *Escherichia coli* protein translocation and its suppression by soluble cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7448-7452.
- Furukawa A, Yoshikaie K, Mori T, Mori H, Morimoto YV, Sugano Y, Iwaki S, Minamino T, Sugita Y, Tanaka Y, Tsukazaki T. (2017). Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF. *Cell Rep* 19: 895-901.
- Gelis I, Bonvin AMJJ, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, et al. (2007). Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* 131: 756–769.
- Gouridis G, Karamanou S, Sardis MF, Schärer MA, Capitani G, Economou A. (2013). Quaternary dynamics of the SecA motor drive translocase catalysis. *Mol Cell* 52: 655-666.
- Harris CR and Silhavy TJ. (1999). Mapping an interface of SecY (PrIA) and SecE (PrIG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J Bacteriol* 181: 3438–3444.
- Hizlan D, Robson A, Whitehouse S, Gold Vicki A, Vonck J, Mills D, et al. (2012). Structure of the SecY complex unlocked by a preprotein mimic. *Cell Rep* 1, 21–28.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38, 27-28.
- Hunt JF, Weinkauff S, Henry L, Fak JJ, McNicholas P, Oliver DB, Deisenhofer J. (2002). Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* 297: 2018–2026.
- Jung, J., Mori, T., Kobayashi, C., Matsunaga, Y., Yoda, T., Feig, M., and Sugita, Y. (2015). GENESIS: A hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations. *WIREs Computational Molecular Science* 5: 310-323.
- Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 66: 125-132.
- Karner A, Nimmervoll B, Plochberger B, Klotzsch E, Horner A, Knyazev DG, Kuttner R, Winkler K, Winter L, Siligan C, Ollinger N, Pohl P, Preiner J. (2017). Tuning membrane protein mobility by confinement into nanodomains. *Nat Nanotechnol* 12: 260-266.
- Kedrov A, Kusters I, Driessen AJ. (2013). Single-molecule studies of bacterial protein translocation. *Biochemistry* 52: 6740-6754.
- Kida Y, Morimoto F, Sakaguchi M. (2007). Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispanning protein topogenesis. *J Cell Biol* 179: 1441-1452.
- Koch HG, Hengelage T, Neumann-Haefelin C, MacFarlane J, Hoffschulte HK, Schimz K-L, et al. (1999). In vitro studies with purified components reveal signal

- recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol* 10: 2163–2173.
- Koch S, de Wit JG, Vos I, Birkner JP, Gordiichuk P, Herrmann A, van Oijen AM, Driessen AJ. (2016). Lipids Activate SecA for High Affinity Binding to the SecYEG Complex. *J Biol Chem* 291: 22534-43.
 - Kodera N, Yamamoto D, Ishikawa R, Ando T. (2010). Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468: 72-76.
 - Kozai T, Sekiguchi T, Satoh T, Yagi H, Kato K, Uchihashi T. (2017). Two-step process for disassembly mechanism of proteasome $\alpha 7$ homo-tetradecamer by 6 revealed by high-speed atomic force microscopy. *Sci Rep* 7: 15373.
 - Kudva R, Denks K, Kuhn P, Vogt A, Muller M, Koch HG, Müller M. (2013). Protein translocation across the inner membrane of Gram-negative bacteria: The Sec and Tat dependent protein transport pathways. *Res Microbiol* 164:505–534.
 - 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 T, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T, Nureki O. (2014). Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509: 516-520.
 - Landau EM, Rosenbusch JP. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. (1996). *Proc Natl Acad Sci* 93: 14532-5.
 - Li L, Park E, Ling J, Ingram J, Ploegh H, Rapoport TA. (2016). Crystal structure of a substrate-engaged SecY protein-translocation channel. *Nature*. 531: 395-9.
 - Ling Lin, Zi Rong X, Wei Fen L, Jiang Bing S, Ping L, Chun Xia H. (2007). Protein secretion pathways in *Bacillus subtilis*: implication for optimization of heterologous protein secretion. *Biotechnology advances* 25, 1-12.
 - Lomize, M.A., Lomize, A.L., Pogozheva, I.D., and Mosberg, H.I. (2006). OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 22: 623-625.
 - Lycklama ANJA and Driessen AJ. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367, 1016-1028.
 - Manting EH, van der Does C, Driessen AJ. (1997). In vivo cross-linking of the SecA and SecY subunits of the *Escherichia coli* preprotein translocase. *J Bacteriol* 179: 5699-5704.
 - Mitra K, Schaffitzel C, Shaikh T, Tama F, Jenni S, Brooks CL, et al. (2005). Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* 438: 318–324.
 - Mitra K, Frank J, Driessen A. (2006). Co-and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work?. *Nat Struct Mol Biol*. 13: 957-964.
 - Mori T, Ishitani R, Tsukazaki T, Nureki O, Sugita Y. (2010). Molecular mechanisms underlying the early stage of protein translocation through the Sec

- translocon. *Biochemistry* 49: 945-950.
- Mori T and Tsukazaki T. (2009). Molecular mechanisms of SecA-mediated protein translocation viewed from structural studies. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 54: 685-695.
 - Mori T, Tsukazaki T, Masui R, Kuramitsu S, Yokoyama S, Johnson AE, Kimura Y, Akiyama Y, Ito K. (2003). Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem* 278: 14257-64.
 - Nasr ML, Baptista D, Strauss M, Sun ZJ, Grigoriu S, Huser S, Plückthun A, Hagn F, Walz T, Hogle JM, Wagner G. (2017). Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry. *Nat Methods*. 14: 49-52.
 - Nath A, Atkins WM, Sligar SG. (2007). Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane protein. *Biochemistry* 46: 2059-2069.
 - Nishiyama K, Hanada M, Tokuda H. (1994). Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J* 13: 3272-3277.
 - Nishiyama K, Suzuki T, Tokuda H. (1996). Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85: 71-81.
 - Or E and Rapoport TA. (2007). Cross-linked SecA dimers are not functional in protein translocation. *FEBS Lett* 581: 2616-2620.
 - Osborne AR, Clemons WM Jr, Rapoport TA. (2004). A large conformational change of the translocation ATPase SecA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10937-42.
 - Osborne AR, Rapoport TA. (2007). Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* 129: 97-110.
 - Papanikou E, Karamanou S, Economou A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* 5: 839-851.
 - Park E and Rapoport TA. (2012). Bacterial protein translocation requires only one copy of the SecY complex in vivo. *J Cell Biol* 198: 881-93.
 - Patel R, Smith SM, Robinson C. (2014). Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1620-1628.
 - Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA. (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94: 795-807.
 - Sanganna Gari RR, Frey NC, Mao C, Randall LL, King GM. (2013). Dynamic structure of the translocon SecYEG in membrane: direct single molecule observations. *J Biol Chem* 23: 16848-16854.
 - Saraogi I and Shan SO. (2014). Co-translational protein targeting to the bacterial membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1843: 1433-1441.
 - Satoh Y, Matsumoto G, Mori H, Ito K. (2003). Nearest neighbor analysis of the

- SecYEG complex. 1. Identification of a SecY-SecE interface. *Biochemistry* 42: 7434-41.
- Sharma V, Arockiasamy A, Ronning DR, Savva CG, Holzenburg A, Braunstein M, Jacobs WR Jr, Sacchettini JC. (2003). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2243-2248
 - Shih AY, Arkhipov A, Freddolino PL, Sligar SG, Schulten K. (2007). Assembly of lipids and proteins into lipoprotein particles. *J Phys Chem B* 111: 11095-11104.
 - Tam PC, Maillard AP, Chan KK, Duong F. (2005). Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J* 24: 3380-3388.
 - Taufik I, Kedrov A, Exterkate M, Driessen AJ. (2013). Monitoring the activity of single translocons. *J Mol Biol* 425: 4145-4153.
 - Tsirigotaki A, De Geyter J, Šoštaric N, Economou A, Karamanou S. (2017). Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol* 15: 21-36.
 - Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, et al. (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature* 474: 235-238.
 - Tsukazaki T, Mori H, Fukai S, Ishitani R, Mori T, Dohmae N, et al. (2008). Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature* 455: 988-991.
 - Uchida K, Mori H, Mizushima S. (1995). Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 30862-30868.
 - Van den Berg B, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
 - Vassylyev DG, Mori H, Vassylyeva MN, Tsukazaki T, Kimura Y, Tahirov TH, Ito K. (2006). Crystal structure of the translocation ATPase SecA from *Thermus thermophilus* reveals a parallel, head-to-head dimer. *J Mol Biol* 364: 248-258.
 - Voorhees RM, Fernández IS, Scheres SH, Hegde RS. (2014). Structure of the Mammalian ribosome-sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell* 157: 1632-43.
 - Voorhees RM, Hegde RS. (2016). Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science* 351:88-91
 - Wang L, Miller A, Rusch SL, Kendall DA. (2004). Demonstration of a specific *Escherichia coli* SecY-signal peptide interaction. *Biochim Biophys Acta* 1808: 866-875.
 - Zhang B and Miller TF 3rd. (2010). Hydrophobically stabilized open state for the lateral gate of the Sec translocon. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5399-5404.
 - Zhang, L., and Hermans, J. (1996). Hydrophilicity of cavities in proteins. *Proteins* 24: 433-438.
 - Zhang X, Rashid R, Wang K, Shan So. (2010). Sequential checkpoints govern

- substrate selection during cotranslational protein targeting. *Science* 328: 757–760.
- Zheng Z, Blum A, Banerjee T, Wang Q, Dantis V, Oliver D. (2016). Determination of the Oligomeric State of SecYEG Protein Secretion Channel Complex Using in Vivo Photo- and Disulfide Cross-linking. *J Biol Chem* 291: 5997-6010.
 - Zimmer J, Li W, Rapoport TA. (2006). A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of *B. subtilis* SecA. *J Mol Biol* 364: 259-265
 - Zimmer J, Nam Y, Rapoport TA. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455: 936–943.

謝辞

本研究は、指導教官である塚崎智也准教授のご指導と温かい激励の基で行なわれたものです。5年間もの間、素晴らしい研究環境を与えていただきました。また研究環境だけでなく日常生活から様々な場面で助力いただき、心から感謝致します。また、研究を進める上で非常に多くの相談を聞いていただき、特に技術面において多大なご指導をいただいた田中良樹助教に感謝致します。高速AFM装置の使用法の指導および測定において非常にお世話になりました春山隆充博士研究員に感謝致します。技術員の吉海江国仁さん、小林久美さん、現秘書の鈴木千裕さん、前秘書の藤田亜希さん、阿部香代さんには研究面のみならず生活面においてもご協力を頂き支えていただいたこと感謝致します。また修士1年から5年間お互いに切磋琢磨し、研究生活を共にしてきた膜分子複合機能学研究室の同期の古川新さんに感謝致します。膜分子複合機能学研究室で共に研究してきた同期の齊藤瑠璃子さん、後輩の岡村英幸さん、藤井景さん、吉見旭人さん、村坂基樹さん、岩木薫大さん、谷口勝英さん、櫻田洋人さん、Aisyah Binti Abdul Hamidさん、臼井理緒さん、中山慎太郎さん、中山喜子さん、藤本圭さん、泉岡祥也さん、内野清香さん、河瀬拓斗さん、長谷英理菜さん、Mohammad Shahrizal Mohammad Umarさんに感謝致します。

奈良先端科学技術大学院大学の箱嶋敏雄教授、稲垣直之教授には本研究を進めるにあたりアドバイザーとして様々なご指導をいただきました。心から感謝致します。

X線結晶構造解析では、理研 SPring-8 BL32XU ビームラインおよびその使用にあたり平田邦生博士、河野能顕博士、山下恵太郎博士に大変お世話になりました。心から感謝致します。

MD シミュレーションでは、理研の杉田理論分子科学研究室の杉田有治博士、森貴治博士に大変お世話になりました。心から感謝致します。

また高速AFMによる解析では、金沢大学バイオAFM先端研究センターの安藤敏夫教授、紺野宏記准教授、古寺哲幸准教授、名古屋大学の内橋貴之教授に非常にお世話になりました。心から感謝致します。

最後になりましたが、生活面において常に支えとなり応援してくださった家族に深く感謝致します。