

論文内容の要旨

申請者氏名 菅野 泰功

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。このタンパク質の膜透過の機構の1つを Sec タンパク質群が担っており、真正細菌ではモータータンパク質 SecA ATPase がタンパク質膜透過チャネル SecYEG 複合体と離合集散し、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。これまで X 線結晶構造解析などにより Sec タンパク質の構造解析が達成され、構造情報に基づいた機能解析も進められてきた。しかしながら、完全な SecYEG 複合体の高分解能構造の報告や、Sec タンパク質によるタンパク質膜透過の動的な解析の報告はなく、タンパク質膜透過反応については不明な点が多く残っている。本研究では SecYEG 複合体の高分解能結晶構造解析および SecA と SecYEG によるタンパク質膜透過の可視化を目指した。

SecYEG 複合体を Lipidic Cubic Phase 法を用いて結晶化を行ない、2.7 Å 分解能で構造を決定した。その形状から閉状態の SecYEG の構造であると解釈した。SecG の詳細構造がはじめて示され、SecG の2本の膜貫通ヘリックスを繋ぐループが SecY のポアを塞ぐように位置していた。変異体を用いた解析から、SecG のループがポアに蓋をしているという新しいタンパク質の膜透過機構のモデルを提唱した。またペプチドが SecYEG のラテラルゲートに相互作用した状態の構造も同時に決定した。これは、タンパク質膜透過の開始段階と考えられる。

次に動的解析を進めるにあたり、タンパク質膜透過反応の煩雑な系を単純化するため、SecY と SecA をリンカーで繋いだ融合タンパク質を用いて、SecY-A/E/G 複合体 (SecYAEG) を調製し、その機能の解析を進めた。SecYAEG はタンパク質膜透過活性を持ち、Nanodisc と呼ばれる1ユニット再構成系を用いて、基質タンパク質である proOmpA と相互作用することを明らかにした。また proOmpA の変異体を用いて、タンパク質膜透過中間体が形成されることおよび再開できることを、proOmpA 抗体を用いて確かめた。動的構造解析は優れた時空間分解能を持つ高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)を用いて測定を行った。まず Nanodisc に再構成された SecYEG と SecYAEG を SecA が検出できる細胞質側が上向きで固定化することに成功し、SecA が SecY 上に位置し構造変化することを確認した。また別の基板を用いることで Nanodisc の膜面を基板に対して縦向きに固定化し、別角度からの観察も進めた。最後に膜透過中間体の状態である Nanodisc を観察したところ、膜透過中間体らしき観察像の取得に成功した。本研究により Sec タンパク質によるタンパク質膜透過の動的解析が進展し、高速 AFM による Nanodisc を用いた膜タンパク質の動的解析の手法が確立できた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 菅野 泰功

すべての生物に保存されている必須の生命現象であるタンパク質膜透過反応は、タンパク質が適切な場所へ運ばれて適切に機能する上で非常に重要である。SecYEG 複合体と SecA ATPase は真正細菌におけるタンパク質の膜透過でチャンネルおよびモータータンパク質として機能する。これらの Sec タンパク質の構造解析が進められ、いくつかの結晶構造の報告がなされているが、すべてのコンポーネントを含んだ SecYEG 複合体の構造は最高で 4.5 Å 分解能であり、詳細な議論が妨げられていた。またタンパク質膜透過反応は Sec 複合体がそれぞれ独立に機能するため、1 ユニットでの動態観察が必要とされていた。本論文は Sec 複合体の高分解能構造解析および動的構造解析を進めた。基本的な生命現象のメカニズムに迫る価値の高い研究である。

本論文で報告した構造は、完全な SecYEG 複合体かつこれまでで最も高分解能である。今後の構造機能解析に、極めて有用である。本構造解析では、新たに SecG のループの詳細が明らかとなり、その構造情報に基づいた機能解析から SecYEG チャンネルのキャップ機構を提唱した。この知見はこれまで謎であった細胞質側 SecYEG チャンネルの制御メカニズムの解明につながる新規のタンパク質膜透過反応のモデルである。

SecYEG と SecA によるタンパク質膜透過は、*in vitro* で再現するには基質タンパク質を含むそれぞれのタンパク質を精製し、膜へと再構成するという煩雑な系となることも一因となり、分子メカニズムを明らかとできるような動的な解析は報告されていない。本研究では、リアルタイムで Sec 複合体の動的構造情報を得るために、その煩雑な系の単純化を目指した。SecYEG と SecA を融合させた融合タンパク質 (SecYAEG) を作製し、精製・活性測定後、Nanodisc と呼ばれる 1 ユニット再構成系を適応させた。Nanodisc へと再構成した SecYAEG が基質と相互作用することを詳細に検討し、SecA と基質のシグナル配列が強く関わっていること、および膜透過中間体を形成する基質を用いて膜透過中間体を制御できた。この単純化された系はタンパク質膜透過反応の動的解析を容易にする。最後に本研究で単純化された系を用いて、高速原子間力顕微鏡で 1 ユニット動態観察を進めた。細胞質側から測定できる基板への固定化を確立し、SecYEG と SecYAEG の再構成 Nanodisc を用いてその見え方の違いを明らかとした。タンパク質膜透過中間体の観察では、基質タンパク質が引き込まれている様子も取得され、詳細な膜透過反応の可視化にむけた大きな足がかりが得られた。この系は、他の膜タンパク質に応用可能な価値の高いものでもある。

以上のように、本論文は生物にとって必須の生命現象であるタンパク質膜透過について最も高分解能である静的な構造と、新規に確立した測定法を用いて動的な構造を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。