

博士論文

「膜タンパク質 YidC と SecDF の結晶構造から
解明されたタンパク質輸送の原理」

古川 新

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

所属 (主指導教員)	膜分子複合機能学研究室(塚崎 智也)		
氏名	古川 新	提出	平成 29 年 12 月 12 日
題目	膜タンパク質 YidC と SecDF の結晶構造から 解明されたタンパク質輸送の原理		
<p>全ての生物は、生体膜によって外部から隔離された細胞システムを持つ。その生体膜へのタンパク質の膜組込みや膜を越えた輸送は、生命に必須の現象である。このようなタンパク質輸送の研究は、1999年にノーベル賞の対象となった「シグナル仮説」を含めて数多く行われてきた。細胞質で合成された膜タンパク質の多くは、全ての生物に保存されているタンパク質を通すチャネルである Sec トランスロコン (バクテリアでは SecYEG 複合体) により膜組込み、膜透過される。しかし、SecYEG や他の因子によって達成されるタンパク質膜組込み、膜透過の過程は複雑であり、その詳細な機構は未だ不明な点が多い。本研究では、バクテリアにおいて SecYEG と協力してタンパク質膜組込みを行う YidC の機能解析およびタンパク質膜透過を駆動する SecDF の X 線結晶構造解析・機能解析を行い、膜を介したタンパク質輸送メカニズム解明を目指した。</p> <p>・ YidC によるバクテリアタンパク質の膜組込み機構の解明</p> <p>共同研究により YidC の結晶構造を決定した。この構造から、YidC は5本の保存された膜貫通ヘリックスをもち、その膜貫通領域には親水性の内溝が存在するユニークな構造体であることが明らかとなった。この溝は細胞質側だけでなく、脂質二重膜側へも開いた状態であった。この溝の中心には保存されたアルギニンが存在しており、溝は正に帯電していた。YidC によって膜へ組み込まれる基質タンパク質は N 末端側負電荷をもつものが多く、細胞質で合成された YidC の基質タンパク質は、正に帯電した親水性の溝を経由して膜へと組み込まれると考えられた。</p> <p>そこで私はまず、YidC 溝内の保存されたアルギニンの重要性を検証するため、生育相補試験を行った。その結果、アルギニンをアラニンに置換したところ、低温条件下において著しい生育の阻害が見られた。一方で、リジンに置換した場合、生育の阻害はおこらなかった。これらの結果から、正電荷をもつアミノ酸が YidC の膜組込みと強い関連があることが示唆された。続いて、この溝内で YidC と基質タンパク質が相互作用するかを検証すべく、部位特異的 <i>in vivo</i> UV クロスリンク実験を行った。その結果、UV 反応性アミノ酸を親水性の溝に導入した場合でのみ、特異的なクリスリンク産物が検出された。これらの成果と構造解析の結果と合わせ、YidC による 1 回膜貫通タンパク質の膜組み込みモデルを提唱した。</p>			

・ SecDF によるバクテリアタンパク質の膜透過機構の解明

SecDF は、プロトン流入に伴うエネルギーを利用してタンパク質膜透過を促進するバクテリアに特有の膜タンパク質である。長らく SecDF の詳しい機能は不明であったが、2011 年に詳細な構造が初めて解明された。この構造から、SecDF は 12 本の膜貫通ヘリックスと細胞外側に突出した head 領域、head 領域と膜貫通領域の間に存在する base 領域から構成されることが明らかとなった。この全長構造の報告では head 領域が細胞膜に近づいた「F 型」と呼ばれる状態をとっていたが、部分構造の決定と生化学的な実験から、head 領域が細胞膜から離れ、base 領域の真上に位置する状態である「I 型」の存在が予想された。しかし、I 型 SecDF の全体像は不明であり、膜透過基質タンパク質と SecDF の結合部位や、プロトン流入メカニズムは不明であった。

そこで本研究では X 線結晶構造解析による I 型 SecDF の結晶構造の決定と機能解析を行い、SecDF の詳細な機能メカニズム解明を試みた。SecDF の発現精製、結晶化、構造決定を進め、最終的に SecDF の I 型構造を 3 種類、分解能 2.6-2.8 Å で決定した。これらの構造では、head は膜貫通領域の真上に位置しており、存在が予想されていた I 型に類似していた。この構造のうちの 1 つは膜貫通領域に、他の I 型構造や F 型構造には見られない細胞膜を貫通するトンネル構造を保持していた。生化学的な実験や共同研究でのコンピュータシミュレーションにより、このトンネル内に水分子が入り込むこと、そしてトンネルに存在する保存されたアスパラギン酸がトンネルの開閉に重要であることが示唆された。

また、base 領域を固定した変異体は生育不全となり、タンパク質膜透過活性も低下した。これらの結果から、SecDF は全てのドメインがプロトン透過と連動したダイナミックな構造変化を起こし、タンパク質の膜透過を駆動することが示唆された。

前述の生化学実験から予想された base 領域の構造変化を見出すべく、別状態の SecDF の構造決定を目指した。そして、SecDF の新規構造を分解能 2.8 Å で決定することができた。この構造は、head 領域が F 型よりも細胞膜に近づいた状態であったため、「超 F 型」と名付けた。超 F 型 SecDF では、F 型および I 型では 8 本の β ストランドからなる β シートであった base 領域が β バレルに組変わり、それによって head 領域がさらに細胞膜に接近していた。このダイナミックな構造変化のメカニズムを明らかとすべく、生化学的な実験を行った。その結果、超 F 型でのみ相互作用が確認された膜貫通領域の保存されたアルギニンとアスパラギン酸を置換すると、生体内で超 F 型構造を形成しなかった。この結果から、膜貫通領域の相互作用が細胞外領域の構造変化を制御する「リモートカップリング機構」が強く支持された。

これらの構造情報と機能解析の結果をまとめ、SecDF の連続した一連の構造変化が駆動するタンパク質膜透過現象の作業仮説を提唱した。

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)		
氏名	古川 新	提出	平成 29 年 12 月 12 日
<p>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)</p> <p>Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF. <u>Arata Furukawa</u>, Kunihito Yoshikaie, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka & Tomoya Tsukazaki. (2017). <i>Cell Reports</i> 19, 895-901.</p> <p>Remote Coupled Drastic β-Barrel-β-Sheet Transition of the Protein Translocation Motor. <u>Arata Furukawa</u>, Shintaro Nakayama, Kunihito Yoshikaie, Yoshiki Tanaka & Tomoya Tsukazaki. (2018). <i>Structure, in press</i>.</p> <p>参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <p>Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. Kaoru Kumazaki, Shinobu Chiba, Mizuki Takemoto, <u>Arata Furukawa</u>, Ken-ichi Nishiyama, Yasunori Sugano, Takaharu Mori, Naoshi Dohmae, Kunio Hirata, Yoshiko Nakada-Nakura, Andrés D. Maturana, Yoshiki Tanaka, Hiroyuki Mori, Yuji Sugita, Fumio Arisaka, Koreaki Ito, Ryuichiro Ishitani, Tomoya Tsukazaki & Osamu Nureki. (2014). <i>Nature</i> 509, 516-520.</p> <p>Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase Kaoru Kumazaki, Toshiki Kishimoto, <u>Arata Furukawa</u>, Hiroyuki Mori, Yoshiki Tanaka, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Tomoya Tsukazaki & Osamu Nureki. (2014). <i>Scientific Reports</i> 4, 7299.</p>			

目次

はじめに	8
第1章 YidC によるバクテリアタンパク質の膜組込み機構の解明	9
1.1 序論	9
1.1.1 バクテリアタンパク質の膜組込み・膜透過	9
1.1.2 バクテリアのタンパク質組込み	10
1.1.3 タンパク質組込みを行う因子の構造生物学的知見	12
1.1.3.1 SecY, SecE, SecG	12
1.1.3.2 YidC	14
1.1.4 本研究の目的	15
1.2 材料・方法	18
1.2.1 研究に用いた YidC プラスミド	18
1.2.2 EcYidC を用いた生育相補試験	20
1.2.3 BhYidC を用いた <i>In vivo</i> 光架橋実験	20
1.3 結果と考察	21
1.3.1 EcYidC のアルギニンの重要性の検証	21
1.3.2 BhYidC と膜組込みタンパク質との相互作用解析	24
1.3.3 YidC による一回膜貫通タンパク質膜組込みモデル	26
1.3.4 YidC と SecYEG によるタンパク質膜組込みモデル	28
第2章 SecDF によるバクテリアタンパク質の膜透過機構の解明	30
2.1 序論	30
2.1.1 Sec トランスロコンを介したバクテリアのタンパク質膜透過	30
2.1.2 タンパク質膜透過を行う SecD, SecF (SecDF)の構造生物学的知見	32
2.1.3 本研究の目的	36
2.2 材料・方法	37
2.2.1 研究に用いた SecDF, SecD, SecF プラスミド	37
2.2.2 DrSecDF の発現系の構築	39

2.2.3 DrSecDF の発現・精製.....	39
2.2.4 DrSecDF の結晶化.....	40
2.2.5 DrSecDF の X 線回折実験およびデータ処理.....	40
2.2.6 DrSecDF の位相決定および構造精密化.....	40
2.2.7 TtSecDF の発現系の構築	41
2.2.8 TtSecDF の発現・精製	41
2.2.9 TtSecDF の結晶化	42
2.2.10 TtSecDF の X 線回折実験およびデータ処理.....	42
2.2.11 TtSecDF の位相決定および構造精密化	43
2.2.12 生育試験とジスルフィド結合の確認.....	43
2.2.13 タンパク質膜透過活性測定.....	43
2.2.14 <i>In vitro</i> 光架橋実験	44
2.2.15 水素イオン透過活性測定	45
2.2.16 分子動力学(MD)シミュレーション.....	45
2.3 結果と考察.....	46
2.3.1 DrSecDF の発現・精製・結晶化.....	46
2.3.2 DrSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化.....	46
2.3.3 DrSecDF の構造.....	51
2.3.4 変異体 DrSecDF の発現・精製・結晶化.....	53
2.3.5 変異体 DrSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化.....	53
2.3.6 変異体 DrSecDF の構造概要と構造比較.....	55
2.3.7 膜貫通領域のトンネル構造.....	55
2.3.8 アスパラギン酸 365 のプロトン化状態の変化とトンネル構造の形成.....	60
2.3.9 トンネル内部のチロシン 662 の機能解析.....	63
2.3.10 ヘッドドメインの動きとプロトン透過との相関.....	64
2.3.11 P1-base と P4 の構造変化の重要性.....	69
2.3.12 別状態 SecDF の構造決定に向けた SecDF の発現・精製・結晶化.....	72
2.3.13 TtSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化.....	72
2.3.14 新規に決定した超 F 型 TtSecDF の構造	75
2.3.15 P1-base 及び P4 のダイナミックな構造変化の考察.....	79
2.3.16 リモートカップリングによる超 F 型への SecDF の構造変化の制御.....	82
2.3.17 P1-head への小分子の結合	84
2.3.18 P1-head のくぼみと膜透過タンパク質との相互作用.....	87
2.3.19 P1-head のくぼみの構造変化.....	90
2.3.20 SecDF 結晶構造のまとめ	92
2.3.21 SecDF による新たなタンパク質膜透過の作業仮説.....	94
2.3.22 本研究の総括と今後の課題.....	96

第3章 参考文献.....	98
第4章 謝辞	106
サブリ情報.....	107

はじめに

全ての生物は、生体膜によって外部から隔離された細胞システムを持つ。その生体膜へのタンパク質の膜組込みや膜を越えた輸送は、全ての生命にとって必須の現象である。このようなタンパク質輸送の研究は、1999年にノーベル賞の対象となった「シグナル仮説」や「小胞輸送」を含めて数多く行われてきた。細胞内でリボソームにより合成されたタンパク質の約30%程度は、細胞膜へと組込まれたり、細胞膜を透過して細胞外で機能したりする。この細胞膜を介したタンパク質の輸送の多くは、全ての生物に保存されているタンパク質を通すチャネルである Sec トランスロコン (真核生物では小胞体に存在する Sec61 $\alpha\beta$ 複合体, バクテリアでは SecYEG 複合体)を通して行われる。Sec トランスロコンそれ自体は受動的なトンネルであり、タンパク質輸送を駆動するためには他に協力してタンパク質輸送を行うタンパク質群を必要とする。これらのタンパク質として、バクテリアではタンパク質膜組込みを行う YidC や、タンパク質膜透過を行う SecA, SecDF などが存在する。

SecYEG を含め、これらの因子の遺伝学的・生化学的な研究は古くから行われてきた。これら因子のより詳細な分子レベルでのメカニズムを明らかにするアプローチとしては、X線結晶構造解析をはじめとする構造生物学的手法が力を発揮してきた。私が本研究を開始した2013年時点で、トランスロコンを形成する SecY を含む複合体や可溶性タンパク質である SecA の全長構造はそれぞれ10例以上報告されており、構造情報に基づいた機能モデルが提唱されていた。一方で、YidC や SecDF を対象とした研究は遅れており、2013年時点では YidC の全長構造はまだ不明であり、SecDF の構造報告も1例にとどまっていた。

こうした背景から、私はX線結晶構造解析による構造決定と構造情報に基づいた機能解析により、YidC 及び SecDF のより詳細な作動機序の解明を目指した。2013年に共同研究先である東京大学の濡木研究室で YidC の初めての全長に近い結晶構造が明らかとされたため、私はこの構造情報に基づいた機能解析を進めた。これらの内容について、「第1章 YidC によるバクテリアタンパク質の膜組込み機構の解明」に述べた。さらに、SecDF の新規結晶構造決定と機能解析を行い、こちらについては「第2章 SecDF によるバクテリアタンパク質の膜透過機構の解明」に記した。

第1章 YidCによるバクテリアタンパク質の膜組込み機構の解明

1.1 序論

1.1.1 バクテリアタンパク質の膜組込み・膜透過

バクテリアの細胞質で合成されたタンパク質の一部は、細胞内以外の場所で機能する。そのためには、細胞膜へ組み込まれたり (タンパク質膜組込み)、細胞膜を超えて細胞外へと分泌されたりする必要がある (タンパク質膜透過)。これらのタンパク質は様々なシグナル伝達や細胞形成などの生命現象に欠かせない。よって、タンパク質膜組込み・膜透過は全ての生物にとって必須の機構である。バクテリアにおいて、これらのタンパク質の細胞膜 (内膜) を介した輸送は主に Sec タンパク質群や YidC により達成される (Sec 経路) (図 1-1)。Sec 経路を介したタンパク質の内膜を超えた輸送は、真核生物では小胞体膜を越えた輸送に相当する。タンパク質を通すトンネルとして、真核生物では Sec61 $\alpha\beta$ 複合体が、バクテリアでは SecYEG 複合体が中心的な役割を果たす (Plessis *et al.*, 2011; Lycklama *et al.*, 2012; Denks *et al.*, 2014; Tsirigotaki *et al.*, 2017)。第1章では以降、バクテリア内膜へのタンパク質膜組込みに焦点を当て説明する。

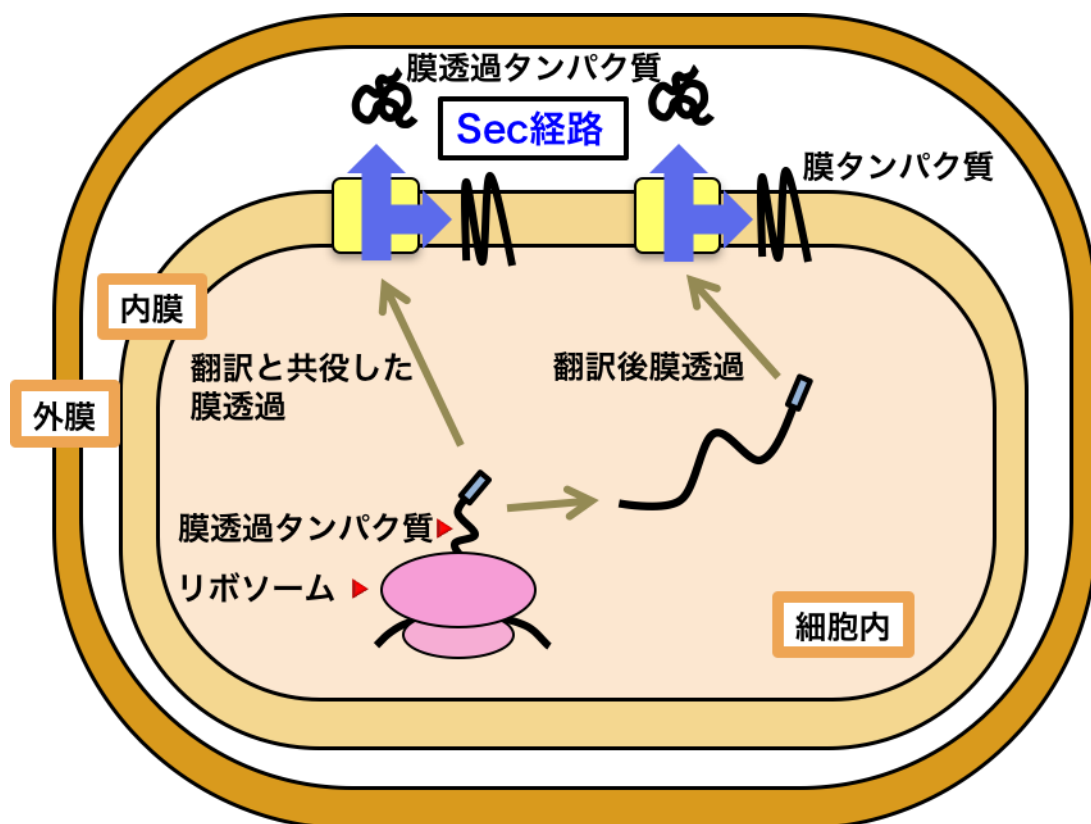


図 1-1. バクテリアの Sec 経路におけるタンパク質の膜組込み・膜透過

1.1.2 バクテリアのタンパク質組込み

バクテリアのタンパク質膜組込みは、主に SecYEG と YidC が相互作用することにより、あるいは YidC 単独により行われる。SecYEG-YidC による膜組込みでは、主に複数回膜貫通型のタンパク質が膜へと組込まれる。具体的には、ラクトース輸送体 LacY や NADH 酸化酵素である NuoK, FoF₁ ATP 合成酵素のサブユニット F₀a や F₀b などが SecYEG-YidC 複合体によって膜組込みされる (Nagamori *et al.*, 2004; Price *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2004; Hennon *et al.*, 2015)。この場合、タンパク質を通すトンネルとして機能する SecYEG 複合体のみでも膜組込みは進行するが効率が悪く、タンパク質の正確なフォールディングに YidC が必要であることが報告されている (Nagamori *et al.*, 2004)。この方法では膜組込み反応は主に co-translational に進行する。リボソームによる合成途中のタンパク質の N 末端に存在するシグナル配列が SRP (Signal Recognition Particle) により認識され、内膜に存在する SRP 受容体である FtsY を経由して SecYEG へと輸送される (Denks *et al.*, 2014)。その後、リボソームによる翻訳が再開し、この駆動力によりタンパク質の膜組込みが進行する (図 1-2A)。

YidC 単独による膜組込みでは、1 回あるいは 2 回膜貫通タンパク質が膜へ組込まれる。具体的には、機械刺激受容チャネルである MscL, ウイルスのコートタンパク質である M13 や Pf3, YidC の活性を監視する MifM などが YidC 単独により膜へ組込まれることが報告されている (Van der Laan *et al.*, 2004; Samuelson *et al.*, 2000; Chiba *et al.*, 2012; Facey *et al.*, 2007; Hennon *et al.*, 2015)。この方法では SecYEG を介した経路と同様に co-translational に進行する場合と、post-translational な経路があるとされている (Robinson *et al.*, 2013)。post-translational な膜組込みは、ターゲティング方法の詳細や膜組込みの駆動力など不明な点が多い (図 1-2B)。

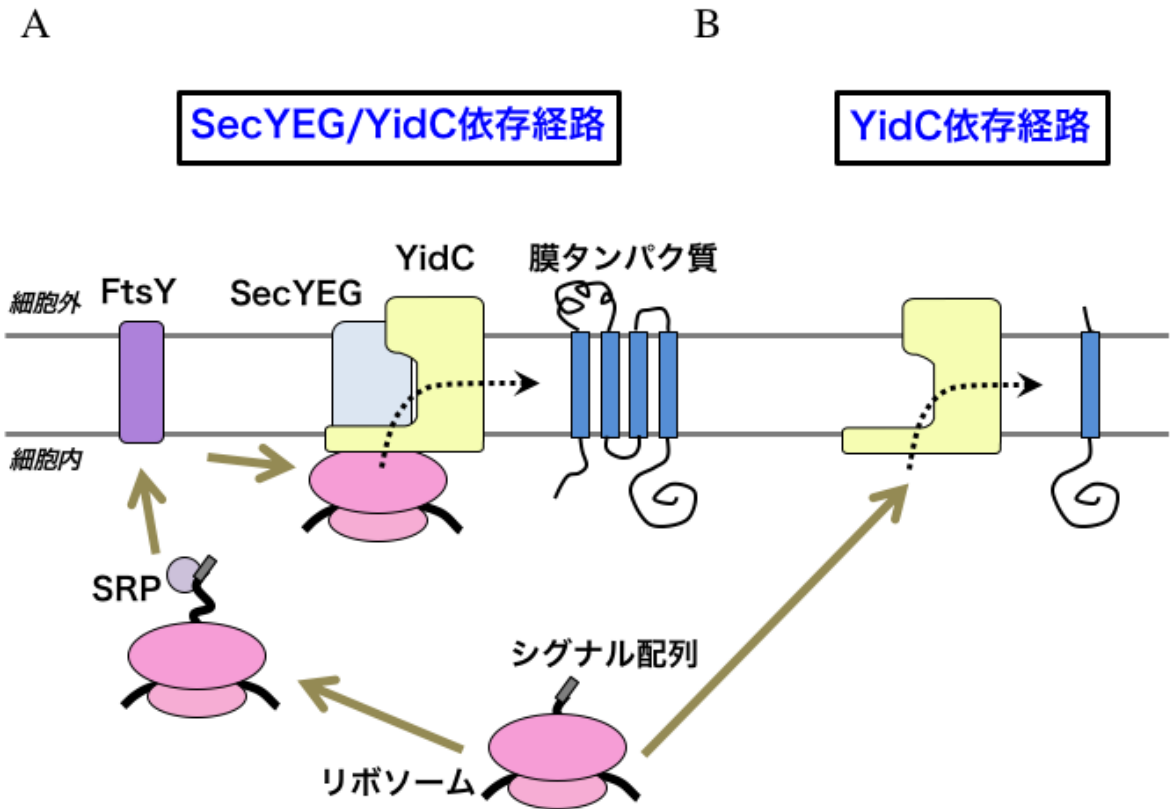


図 1-2. バクテリア内膜へのタンパク質膜組込みの詳細

A. SecYEG/YidC 依存経路. こちらの経路では, 主に複数膜貫通領域を持つタンパク質が膜組込みされる.

B. YidC 依存経路. こちらの経路では, 主に 1 回あるいは 2 回膜貫通領域を持つタンパク質が膜組込みされる.

1.1.3 タンパク質組込みを行う因子の構造生物学的知見

1.1.3.1 SecY, SecE, SecG

タンパク質輸送の中心的役割を担うチャネルは、SecY, SecE, SecG のヘテロ三量体によって構成される。この複合体は、タンパク質の膜透過・膜組込みのどちらの現象においても関与する。SecY は膜透過・膜組込みタンパク質の通り道となるトランスロコンを形成する 10 回膜貫通型膜タンパク質であり、真核生物では小胞体膜上に存在する Sec61 α に相当する。SecY は全ての生物にホモログが存在する生存に必須の因子である。SecE は 1 回または 3 回膜貫通型膜タンパク質であり、SecY の安定化に関与する必須の因子である。真核生物では Sec61 γ に相当する。SecG は 2 回膜貫通型膜タンパク質である。SecY や SecE と異なり、SecG は生育に必須の因子ではないが、タンパク質膜透過の促進に関与することが報告されている (Kudva *et al.*, 2013; Nishiyama *et al.*, 1994)。真核生物や古細菌では SecG と同程度の大きさの Sec β が SecG の代わりに位置しているが、機能的な類似性があるかは不明である。

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 1-3)。この構造では、SecY の膜貫通ヘリックス TM1-5 と TM6-10 は二枚貝様の疑似対称構造をとっており、その間にあるループがそれぞれの対称構造をつなぐ役割をしていた (図 1-3)。また TM2 と TM7 はシグナル配列やタンパク質の膜組込みに関与すると考えられる脂質二重膜方向に開いたゲート (ラテラルゲート)を形成していた (図 1-3A)。また SecE は SecY の二枚貝構造を繋ぎ止めるかすがいのような役割をしており、チャネルの安定化に寄与していることが示唆された。チャネル内部は砂時計型の空間を形成しており、その最も狭い部分には 6 つの疎水性アミノ酸残基からなるポアリングが形成されていた。この孔のペリプラズム側は、TM2 によって形成される疎水性のプラグドメインで栓をされていた。タンパク質のチャネルへの挿入によりこのプラグが外れることで、タンパク質輸送反応が進行すると考えられた。その後、生化学的な実験による報告がなされ、タンパク質輸送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)ということが明らかとなった。プラグ以外にも SecG のループが SecYEG の細胞内側の孔を塞ぐように配置されており、静止状態の孔はプラグと SecG のループにより両側を栓で塞がれていることが示された (Tanaka *et al.*, 2015)。

タンパク質膜透過時における架橋実験によると、TM2 と TM7 から構成されるラテラルゲートの入り口にシグナル配列が挿入されると、SecY の二枚貝構造が変化し、同時にプラグの位置も移動することによりタンパク質膜透過・膜組込み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、前駆体膜透過タンパク質が持つシグナル配列や膜タンパク質を内膜へと組み込む役割を持つと考えられている。その後も、細胞内側からタンパク質を押し出す SecA ATPase や抗体、膜輸送中の基質タンパク質の一部と Sec トランスロコンとの複合体結晶構造が報告されてきた (Zimmer *et al.*, 2008, Tsukazaki *et al.*, 2008, Tanaka *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2016)。さらに、近年飛躍的に分解能が改良された電子顕微鏡単粒子解析により、リボソーム-Sec61 複合体の構造が相次いで分解能 5-9 Å で報告されている (Gogala *et al.*, 2014, Pfeffer *et al.*, 2015, Voorhees *et al.*, 2016)。これらの報告においても、プラグが移動してトランスロコンの通り道が開くとともに、ラテラルゲートが開き、脂質側へのタンパク質の出口が形成されることが支持されている。

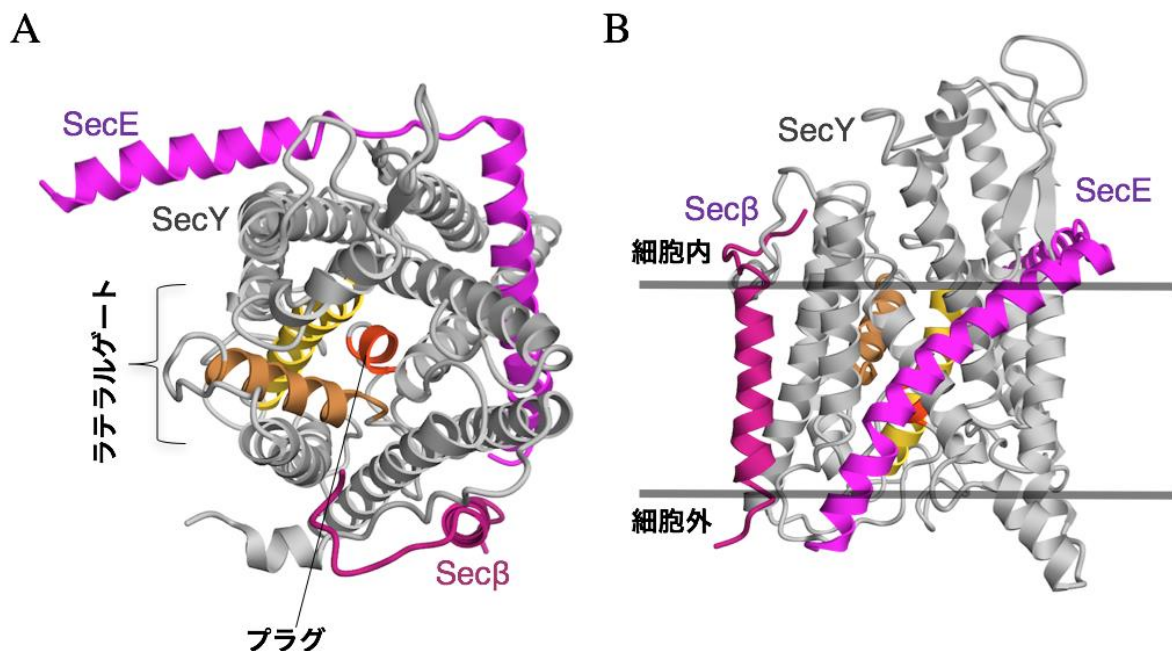


図 1-3. *Methanococcus jannaschi* (Mj)由来の SecYEβ の構造 (PDB ID : 1RH5)

A. 細胞質側から見た MjSecYEβ. 古細菌は SecG のかわりに Secβ を持つ。SecY をグレー、SecE をピンク、Secβ を赤紫で示した。SecY の脂質側への開口部分となるラテラルゲートを形成する 2 本のヘリックスを茶色と黄色で、ポアを塞ぐプラグを朱色で示した。

B. 側面から見た MjSecYEβ

1.1.3.2 YidC

YidC は YidC/Oxa1/Alb3 ファミリーに属し、タンパク質膜組込み装置として広く保存されている (図 1-4) (Hell *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2000). YidC は細菌の内膜で、Oxa1 はミトコンドリアの内膜で、Alb3 は葉緑体のチラコイド膜で機能する (Hennon *et al.*, 2015). YidC/Oxa1/Alb3 はアミノ酸配列から、5 本の保存された膜貫通ヘリックスを持つと予想されてきた。グラム陰性細菌型の YidC のみ N 末端側に追加で 1 本の膜貫通ヘリックスと分子量約 30 万の細胞外ドメイン (P1D) を保持する。この P1D は細胞外側で SecYEG や SecDF, 他のシャペロンタンパク質と相互作用することが示唆されているが、大腸菌においては必須ではない (Sachelaru *et al.*, 2013; Hennon *et al.*, 2015). しかし、グラム陰性細菌である *Thermotoga Maritima* 由来の YidC (TmYidC) は、YidC が発現しない大腸菌の生育を相補することはできないが、P1D を大腸菌 YidC とスワップした TmYidC は生育相補活性を持つことから (Xin *et al.*, 2018), 条件によっては P1D の重要性が示されたが、その働きはよくわかっていない。

YidC/Oxa1/Alb3 ファミリーの中では YidC の研究が最も進められてきた。YidC は遺伝学的、生化学的な解析により、タンパク質膜組込みを行うことや生育に必須であることが報告されてきた (Beck *et al.*, 2001; Samuelson *et al.*, 2000). Oxa1 と Alb3 も YidC と同様の機構で機能すると考えられており、Oxa1 と YidC は互いに相補活性を持つことが報告されている (Preuss *et al.*, 2005; Bloois *et al.*, 2005). また Alb3 もタンパク質を大腸菌の内膜に挿入できることが報告されている (Jiang *et al.*, 2002; Benz *et al.*, 2009). また最近、真核生物の小胞体膜において YidC と一部アミノ酸相同性を持ち、Sec61 やリボソームと相互作用する膜タンパク質 TMCO1 が発見された (Anghel *et al.*, 2017). TMCO1 も YidC と類似した役割を果たすのかもしれない。YidC の作用機構として、YidC と膜組込みタンパク質の相互作用解析により、YidC は膜貫通ヘリックスで膜組込みタンパク質と相互作用することが示唆された (Klenner *et al.*, 2012). YidC により膜組込みされる一回膜貫通タンパク質の電荷や大きさを変化させると膜組込みに SecYEG を必要とするようになることから (Zhu *et al.*, 2013), YidC は小さなタンパク質を静電的相互作用により膜へと組み込むことが示唆された。

YidC の全長構造に関する知見として、電子顕微鏡単粒子解析によるリボソーム-YidC 複合体低分解能構造が報告されてきた (Kedrov *et al.*, 2013; Kedrov *et al.*, 2016). これらの解析では YidC はモノマーであった。また、2 分子の YidC を人工的につなぎ、その一方を不活化する変異を導入しても YidC は活性を持つことから、YidC はモノマーで十分に機能するという説が有力である (Spann *et al.*, 2018). しかし YidC の構造情報が不明であり、詳細な解析は困難であった。2014 年に、共同研究先であ

る東京大学のグループにより X 線結晶構造解析によりグラム陽性細菌 *Bacillus Halodurans* (Bh)由来の YidC (BhYidC)とグラム陰性細菌 *Escherichia coli* (Ec)由来の YidC (EcYidC)の構造がそれぞれ 2.4 Å, 3.2 Å 分解能で報告され, 2018 年にはグラム陰性細菌である *Thermotoga Maritima* 由来の YidC (TmYidC)の構造が別のグループにより 3.8 Å 分解能で報告された (図 1-5) (Kumazaki *et al.*, 2014a; Kumazaki *et al.*, 2014b; Xin *et al.*, 2018). EcYidC は細胞外側に予想されていた PID を保持していた. EcYidC 及び TmYidC の N 末端側の膜貫通ヘリックスに相当する電子密度は確認されず, フレキシブルに動いていることが示唆された. いずれの YidC も, アミノ酸配列から予想されていた通り, 保存された 5 本の膜貫通領域を保持していた. この膜貫通領域の分子内部には親水性の溝が形成されていた. この溝の細胞外側は膜貫通領域の密な相互作用により打閉ざされていた. 一方, 細胞内側と脂質側には開かれた状態をとっていた. この溝の中心には高度に保存されたアルギニンが存在しており, 溝は正電荷を帯びていた (図 1-5B). YidC により膜組込みされることが報告されている 1 回膜貫通タンパク質である MifM や Pf3 は N 末端側に負電荷のアミノ酸を持つことが報告されている (Dalbey *et al.*, 2014). さらに変異体解析から, MifM の負電荷アミノ酸を減少させるごとに MifM の YidC に依存した膜組込みが起こりにくくなること (Kumazaki *et al.*, 2014a)や, Pf3 が溝の開口部を形成する TM3 及び TM5 と相互作用することが報告されている (Xin *et al.*, 2018). これらの情報から, 静電的な相互作用により膜組込みタンパク質が YidC の正電荷を帯びた溝に引き込まれ, その後膜へと組込まれるという仮説が考えられた.

1.1.4 本研究の目的

本研究では, YidC 単独による 1 回膜貫通タンパク質の膜組込み機構に焦点を当て, 構造情報から考えられたタンパク質の膜組込みの機能モデルを検証するために, YidC の溝のアルギニンの重要性の検証と, 膜組込みタンパク質と YidC の溝の相互作用部位の同定を進めた.

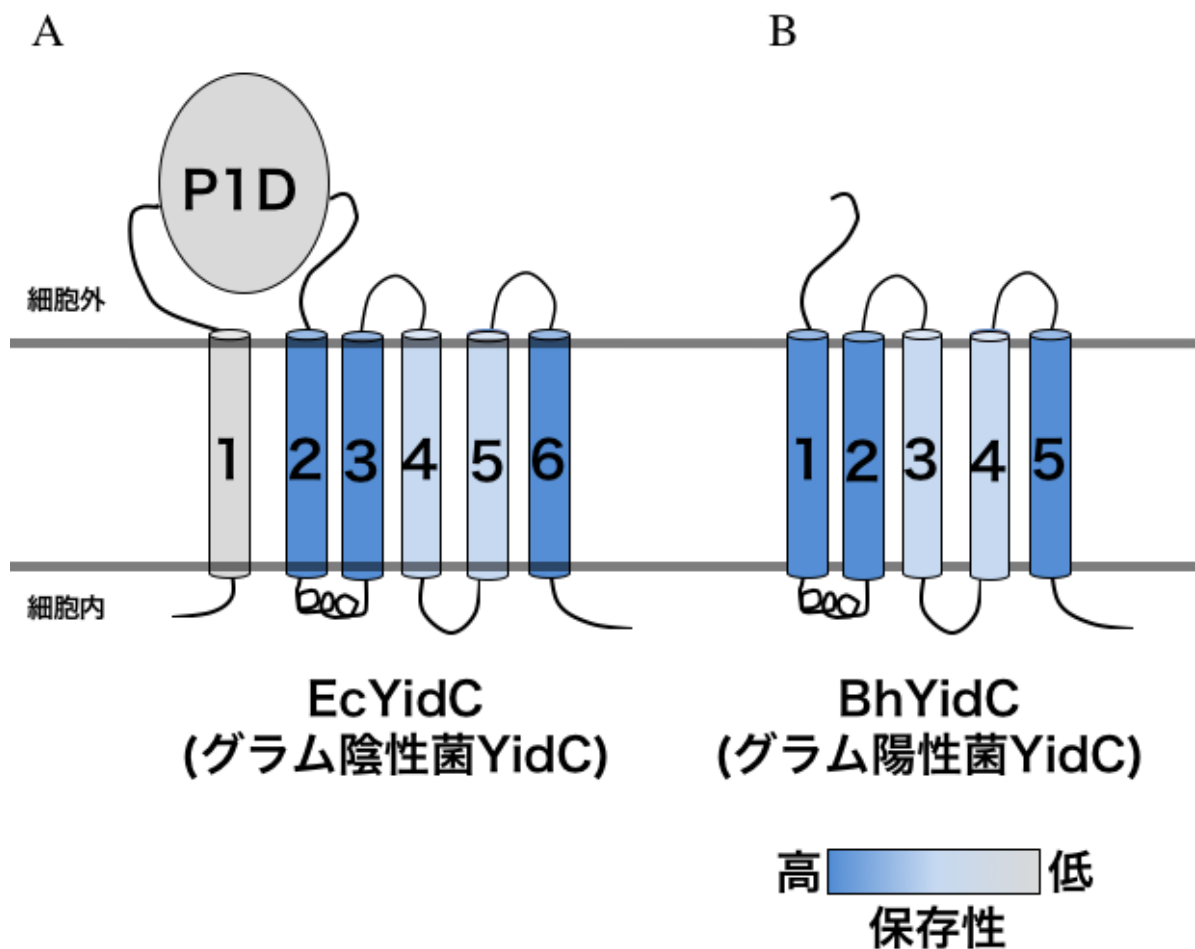


図 1-4. YidC のトポロジーと保存性

A. EcYidC (グラム陰性細菌型 YidC) のトポロジーと配列の保存性. 保存性の高さにより色分けした. グラム陰性細菌型 YidC は N 末端側に特有の 1 本の膜貫通ヘリックスと P1D を保持する.

B. BhYidC (グラム陽性細菌型 YidC) のトポロジーと配列の保存性. 保存性の高さにより色分けした. ミトコンドリアが保持する Oxa1 や葉緑体が保持する Alb3 もこちらの構成に近いが, グラム陽性細菌型 YidC よりも長い C 末端がわの配列を持つ.

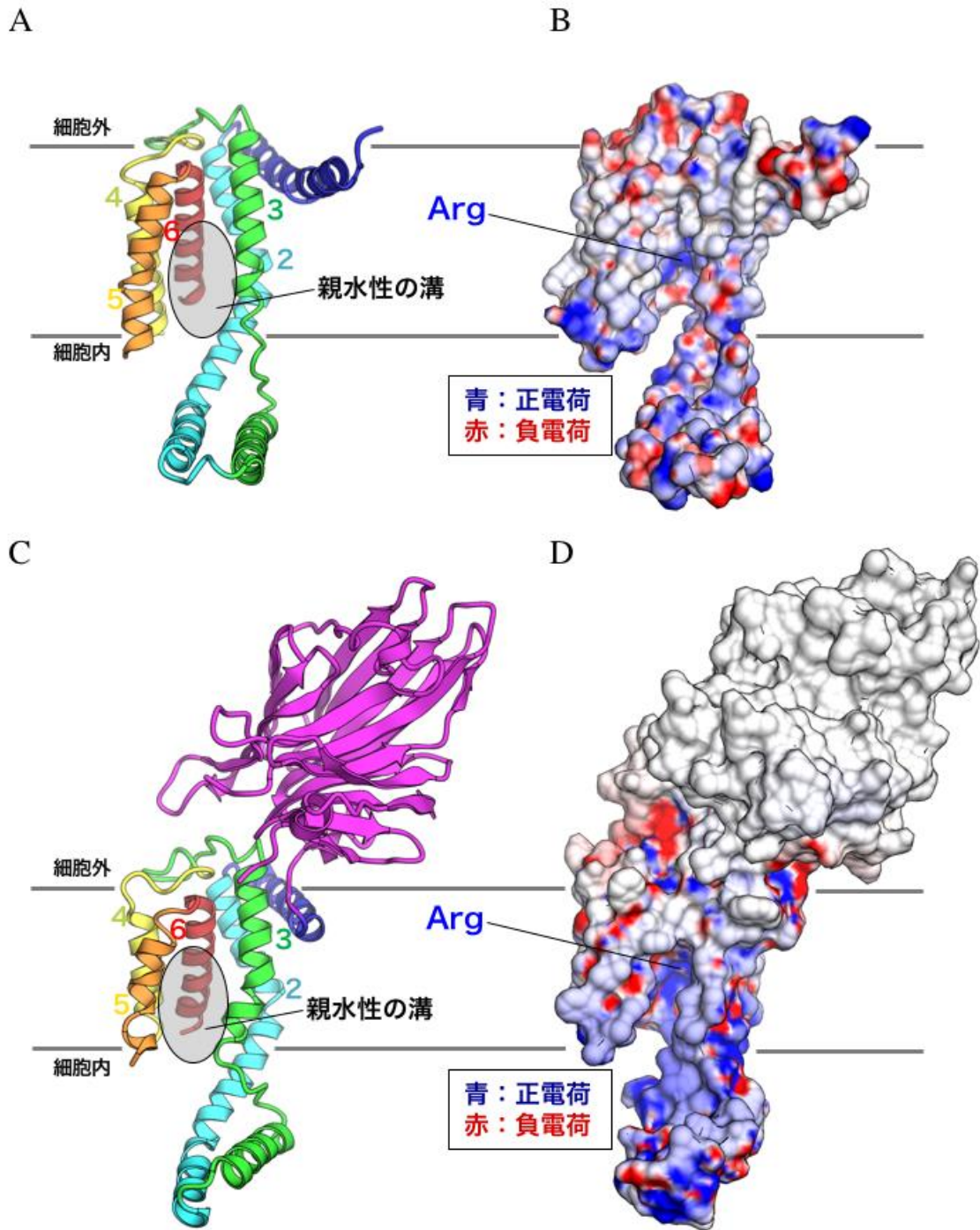


図 1-5. YidC の結晶構造

- A. BhYidC の構造のリボンモデル (PDB ID : 3WO6). 親水性の溝を示した.
- B. BhYidC の構造の表面電荷モデル. 静電ポテンシャル (+10 kT/e:青, -10 kT/e:赤) で色分けした. 保存された Arg を示した.
- C. EcYidC の構造のリボンモデル (PDB ID : 3WVF) . 親水性の溝を示した.
- D. EcYidC の構造の表面電荷モデル. 静電ポテンシャル (+10 kT/e:青, -10 kT/e:赤) で色分けした. 保存された Arg を示した.

1.2 材料・方法

1.2.1 研究に用いた YidC プラスミド

Escherichia coli YidC (EcYidC)と *Bacillus halodurans* YidC (BhYidC)変異体をコードするプラスミドは、それぞれ変異プライマーを用いた部位特異的変異導入法にて作製した.実験に用いたプラスミドは表 1-1 にまとめた.

表 1-1 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)	耐性	参考文献
pLACKUMA	pLACKUMA	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Kumazaki <i>et al.</i> , 2014
pRF233	pLACKUMA	EcYidC (1-540)-His ₈	Amp	Kumazaki <i>et al.</i> , 2014
pRF278	pLACKUMA	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Kumazaki <i>et al.</i> , 2014
pRF248	pLACKUMA	EcYidC (1-540,R366A)-His ₈	Amp	This study
pRF249	pLACKUMA	EcYidC (1-540,R366M)-His ₈	Amp	This study
pRF287	pLACKUMA	EcYidC (1-540,R366K)-His ₈	Amp	This study
pRF297	pLACKUMA	EcYidC (1-540,T373A)-His ₈	Amp	This study
pRF274	pLACKUMA	EcYidC (1-540,Q429A)-His ₈	Amp	This study
pRF283	pLACKUMA	EcYidC (1-540,S520A)-His ₈	Amp	This study
pETDuet	pETDuet	T7 プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Novy <i>et al.</i> , 2002
pKK465	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , A74 アンバー) in MCS1 BsMifM in MCS2	Amp	This study
pKK458	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , Q187 アンバー) in MCS1 BsMifM in MCS2	Amp	This study
pKK468	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , W244 アンバー) in MCS1 BsMifM in MCS2	Amp	This study

pKK469	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , I249 アンバー) in MCS1 BsMifM in MCS2	Amp	This study
pRF71	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , Q187 アンバー) in MCS1	Amp	This study
pRF72	pETDuet	BhYidC (1-280-FLAG-His ₈ , W244 アンバー) in MCS1	Amp	This study
pSTV28	pSTV28	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Cm	Selzer <i>et al.</i> , 1983
pEVOL	pSTV28	アンバーコドン認識 tRNA, アミノアシル tRNA 合成酵素	Cm	Chin <i>et al.</i> , 2002

1.2.2 EcYidC を用いた生育相補試験

生育試験には, YidC をアラビノースプロモーター制御下で発現させるように改変された大腸菌株 JS7131 (Samuelson *et al.*, 2000)を用いた. この株を, 各種 EcYidC-His₈ 変異体を発現する各種プラスミドで形質転換した. この大腸菌を 0.2% (W/V)アラビノースと 50 µg/ml Ampicillin を含む LB 培地で 37°C で前培養し, 0.9% (W/V)NaCl 溶液で段階希釈したのち, 寒天プレート (LB, 0.4% グルコース (W/V), 50 µg/ml Ampicillin)にスポットして 37°C で 24 h あるいは 20°C で 120 h 培養した. EcYidC の発現量は 1 次抗体に α-His 抗体 (MBL, PM032), 2 次抗体に α-rabbit IgG-HRP (Bio-Rad 170-6515)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した. シグナルは ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケア)により検出した.

1.2.3 BhYidC を用いた *In vivo* 光架橋実験

BhYidC-FLAG-His₈ と YidC により膜組込みされる 1 回膜貫通タンパク質である *Bacillus Subtilis* 由来の MifM (BsMifM)を発現するプラスミドと, アンバーコドンを認識して pBPA を導入する tRNA およびアミノアシル tRNA 合成酵素を発現するプラスミド pEVOL を用いて形質転換した. この大腸菌を 50 µg/mL Ampicillin, 20 µg/mL Chloramphenicol, 0.4% (w/v)グルコース, 0.1 mM pBPA を含む M9 培地で OD₆₀₀=0.5 まで培養した. 1 mM IPTG を加えて 37°C で 30 min 培養し, タンパク質の発現を誘導した. 以降の操作は全て 4°C あるいは氷上で行った. 培地を直径 5 cm のディッシュに移し, B-100AP UV lamp (Ultraviolet Products, Upland, CA) を用いて 5 cm の距離から 20 min UV 照射し, 光架橋を誘導した. 遠心(TOMY, MX-307, 10000 rpm × 1 min)によって菌体を回収し, 沈殿を保存液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 0.1 mM pefabloc)に懸濁した. Q500 (Qsonica)を用いて on 1 sec, off 1 sec, 強度 20% で細針を用いて 20 回細胞を超音波破碎した. その後, 遠心 (TOMY, MX-307, 10000 rpm × 10 min)で未破碎細胞を除いた後, 超遠心 (Beckman, TLA100.3, 109,000 g × 30 min)を行い, 沈殿を膜画分とした. これを可溶化バッファー (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 1%DDM, 0.1%CHS, 0.1 mM pefabloc, 20 mM イミダゾール)に懸濁し, 30 min 混和した. 超遠心 (Beckman, TLA100.3, 109,000 g × 30 min)を行い, 不溶性画分を除いた. 上清を可溶化バッファーで平衡化した Ni-NTA Agarose(QIAGEN)に添加し, バッチ法 (30 min)により YidC を樹脂に吸着させた. 20mM imidazole(p.H8.0)で不純物を除去後, 30-300mM imidazole (p.H8.0)の濃度勾配により溶出した. タンパク質は 1 次抗体に α-FLAG 抗体 (SIGMA, F3165-2MG)あるいは α-MifM 抗体, 2 次抗体に α-mouse IgG (Cell Signaling)あるいは α-rabbit IgG (Bio-Rad)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した. シグナルは ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケア)により検出した.

1.3 結果と考察

1.3.1 EcYidC のアルギニンの重要性の検証

YidC の親水性の溝の内部に存在する保存された Arg の重要性を検証するため、EcYidC の Arg 変異体の生育相補活性測定を行った。生育試験には、YidC をアラビノースプロモーター制御下で発現させるように改変された大腸菌株を用いた。YidC が欠損した大腸菌はタンパク質の膜組込み活性が低下し、37°Cでは生育できるが、20°Cでは生育できなくなる。Arg と保存されたいくつかの親水性アミノ酸を Ala に置換した EcYidC 変異体 (図 1-6A)作製し、大腸菌に導入した。アラビノース非存在下で培養することで内在性 YidC の発現を抑制し、変異体 EcYidC が大腸菌の生育を相補するかを調べた。

生育試験の結果を図 1-6B に示した、37°Cでは Arg と保存されたいくつかの親水性アミノ酸を Ala に置換した全ての EcYidC 変異体が生育相補活性を示したが(レーン 1, 3-8)、20°Cでは Arg を Ala, Met に置換した場合において著しい生育の阻害が見られた(レーン 3, 4)。一方で、この Arg を Lys に置換した場合、生育の阻害は起こらなかった(レーン 5)。これらの結果から、大腸菌 YidC において Arg の正電荷が失われると YidC としての機能が低下することが示された。同時に、グラム陽性細菌である *Bacillus Subtilis* でも YidC の活性に Arg が必須であることが示された (Kumazaki *et al.*, 2014b)。さらに、この Arg を溝内の別の位置に移した変異体は、WT と同程度の活性を保持することが報告された (Shimokawa-Chiba *et al.*, 2015)。これらの結果から、この親水性の溝が正電荷を帯びていることが YidC の活性に必須であることが考えられる。溝内の正電荷アミノ酸は YidC のホモログである葉緑体の Oxal やミトコンドリアの Alb3 にも保存されている。過去の研究で、酵母の Oxal の Arg に変異を加えると低温環境下で生育できなくなることが報告されている (Lemaire *et al.*, 2004)ことから、親水性の溝に存在する正電荷アミノ酸の役割は YidC /Oxal /Alb3 ファミリーに共通したものであることが考えられる。

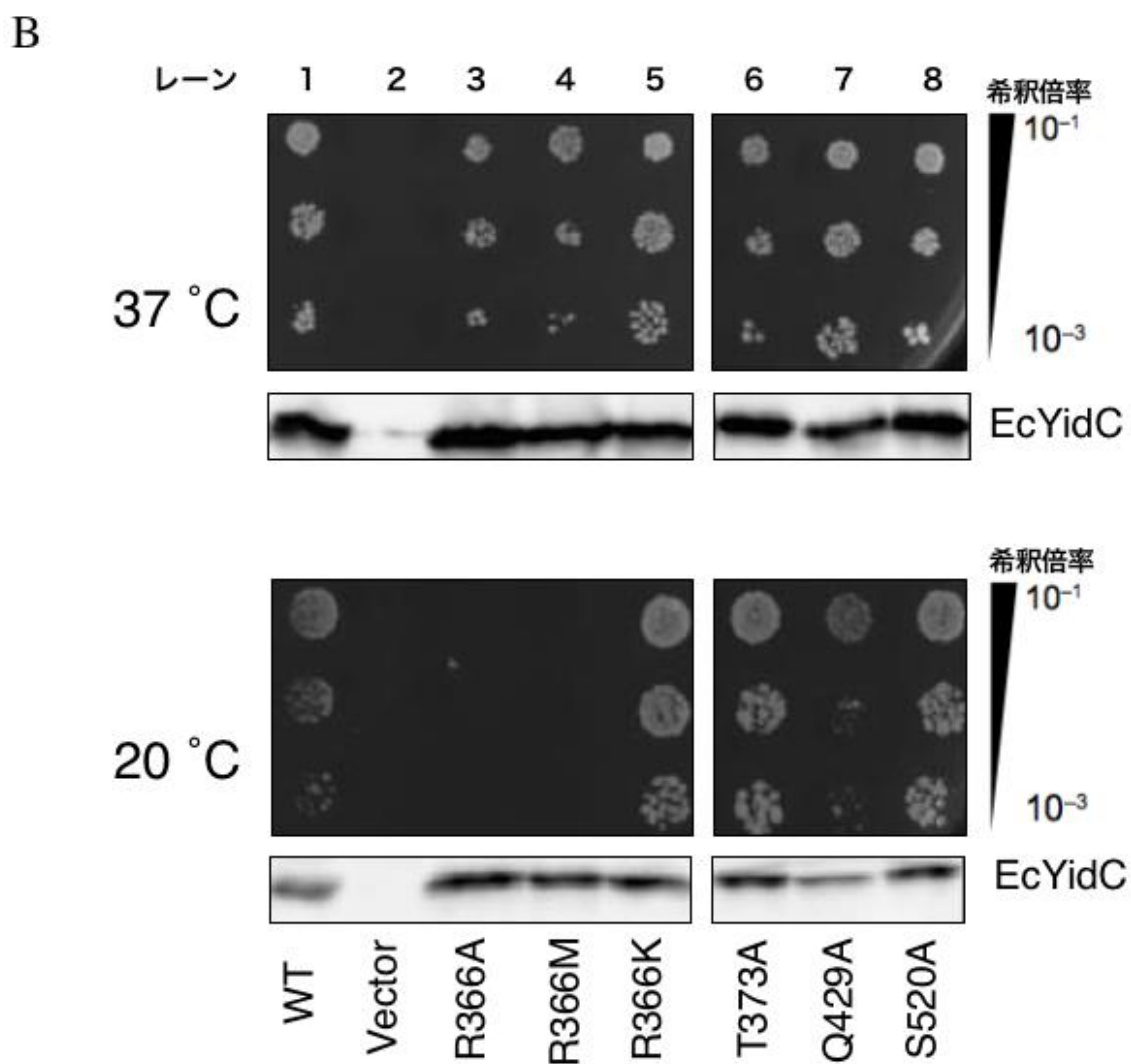
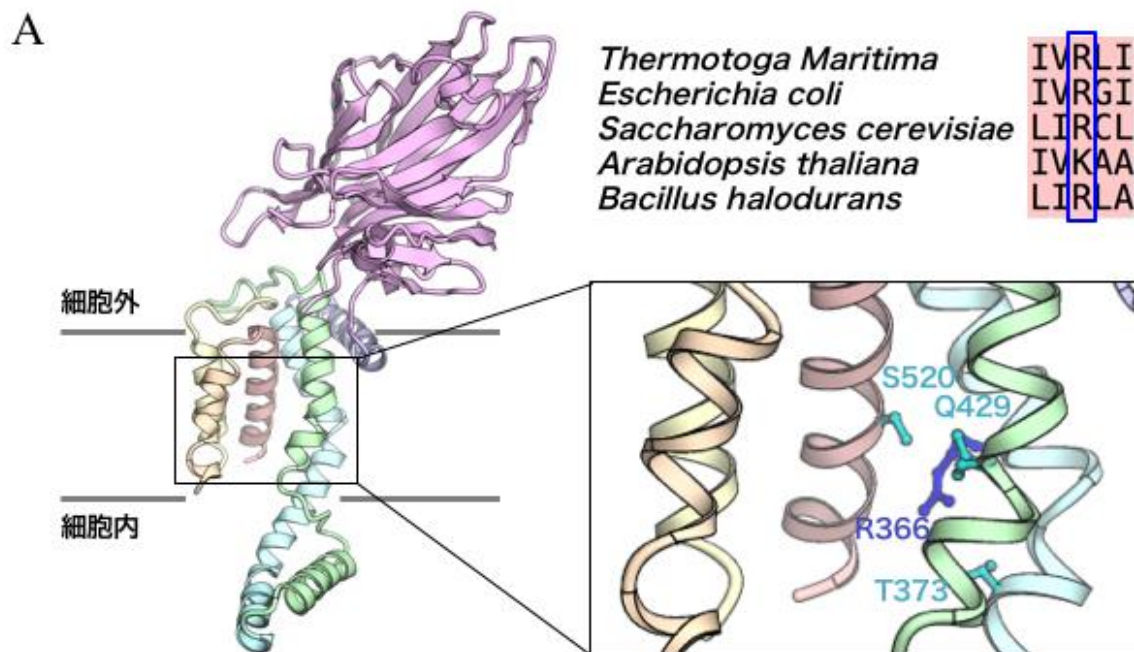


図 1-6. EcYidC アルギニン変異体の生育相補活性測定試験

A. EcYidC の構造と溝の拡大図. 正電荷アミノ酸の保存性と Arg の位置を青で示した. EcYidC 変異体の変異導入部位を水色で示した. EcYidC 変異体の変異導入部位を水色で示した.

B. EcYidC 変異体の生育相補試験. 20℃での培養では生育できなくなる $\Delta yidC$ 株を用い, EcYidC 変異体の生育相補活性を 37℃及び 20℃にて確認した. 20℃での培養では, R366A 及び R366M は生育相補しなかった. 各変異体 EcYidC 間で発現量に大きな違いがないことをウェスタンブロッティングにより確認した.

1.3.2 BhYidC と膜組込みタンパク質との相互作用解析

これまでに報告されている YidC により膜へと組み込まれる 1 回あるいは 2 回膜貫通タンパク質の多くは細胞外側に負電荷をもつことが報告されている。1.3.1 で YidC の親水性の溝に存在する正電荷アミノ酸の重要性が確認された。これらのことから、YidC の正電荷アミノ酸により負電荷をもつ基質タンパク質が引き寄せられ、親水性の溝内に入り込むというモデルが考えられた。

そこで、部位特異的 *in vivo* UV クロスリンクの技術を用いて、YidC と膜組込み基質タンパク質である一回膜貫通タンパク質 MifM との直接的な相互作用部位の同定を試みた。この手法では、UV 照射により活性化され近傍の分子と共有結合を形成するアミノ酸誘導体 p-Benzoyl Phenylalanine (pBPA, 図 1-7) を導入した BhYidC 変異体を用いた(図 1-8A)。

BhYidC 変異体と MifM を大腸菌内で共発現させ、各 YidC 変異体と MifM がサンプル間で同程度発現していることを確認した(図 1-8B 上下)。大腸菌を回収しシャーレ上で UV 照射を行い、クロスリンクを誘導した(図 1-8B レーン 1 から レーン 8)。その結果、pBPA を溝の内側に導入した条件 (187, 244)にて YidC と膜組込みタンパク質との架橋産物が UV 照射依存的に検出された(図 1-8B レーン 4, レーン 6)。これに対して、pBPA を溝の外側に導入した条件 (74, 249)では、架橋産物は確認されなかった(図 1-8B レーン 2, レーン 8)。これらの結果から、YidC が親水性の溝の内部で MifM と直接相互作用することが示された(図 1-8B レーン 4, レーン 6)。一方で、MifM を発現しない条件でも、BhYidC に付加した FLAG 配列を認識する抗 FLAG 抗体では弱いながらも架橋産物と思われるシグナルが検出された(図 1-8B レーン 10, レーン 12)。MifM を発現していないことと抗 MifM 抗体ではシグナルが検出されないことから、この架橋産物は BhYidC と MifM の架橋産物ではないと考えられる。この架橋産物は、大腸菌の内在性膜タンパク質が BhYidC の溝に取り込まれたことにより形成されたものかもしれない。

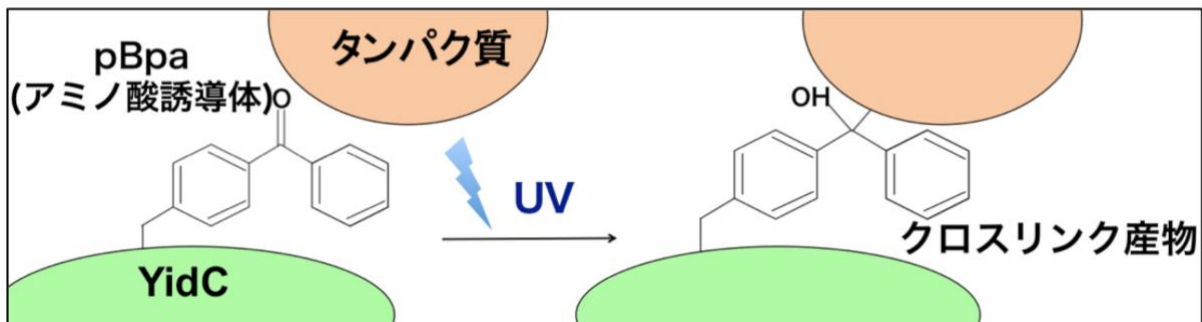
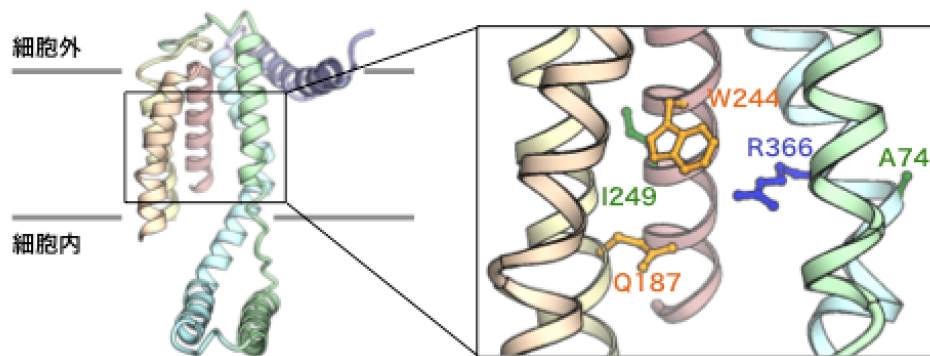


図 1-7. pBPA の反応様式

pBPA は UV 照射により近傍の分子と共有結合し、クロスリンク産物形成する。

A



B

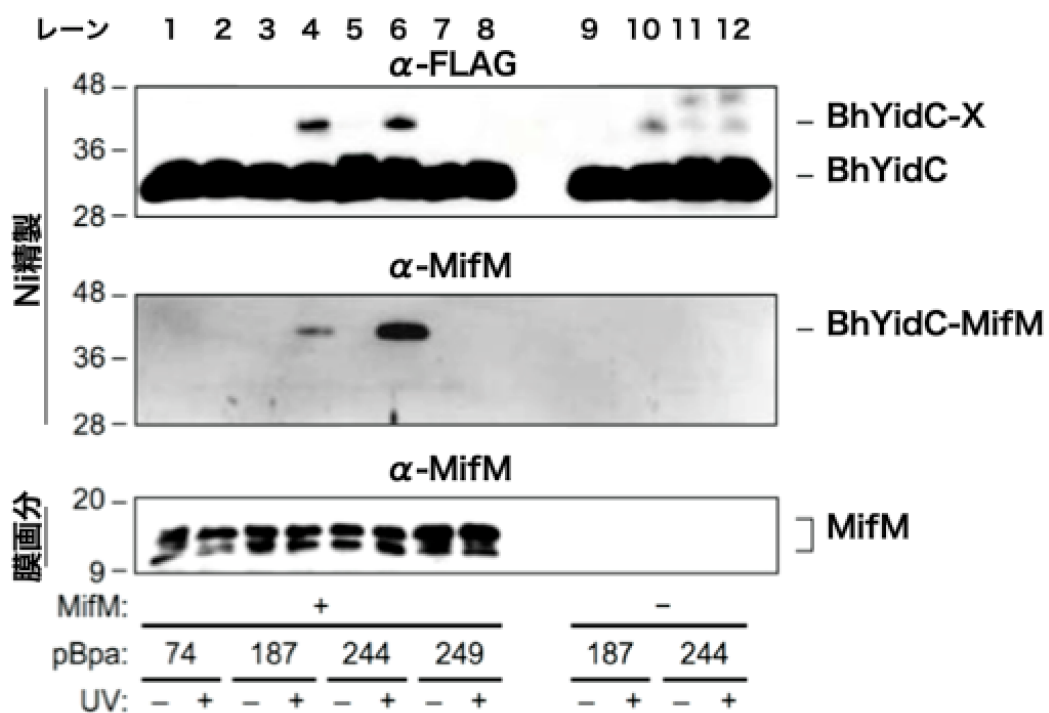


図 1-8. BhYidC と膜組み込み基質タンパク質 MifM との相互作用部位の同定

A. BhYidC の構造と親水性の溝の拡大図. 保存された Arg を青で示した. 溝の内側への BhYidC 変異体の変異導入部位をオレンジ, 溝の外側への変異導入部位を緑で示した.

B. BhYidC と MifM の *in vivo* 光架橋. Bh YidC の基質である 1 回膜貫通タンパク質 MifM と BhYidC をともに大腸菌内で発現させ, 光架橋を誘導した. YidC を精製し, 抗 FLAG 抗体による YidC(上), 抗 MifM 抗体(中)による検出を行った. 抗 FLAG 抗体及び抗 MifM 抗体により, BhYidC の 187 番目と 244 番目のアミノ酸の位置に pBPA を導入した条件で光架橋産物が検出された. MifM の蓄積量を示した(下).

1.3.3 YidC による一回膜貫通タンパク質膜組み込みモデル

共同研究で明らかにされた結晶構造により, YidC は膜貫通領域の内部に細胞質側と脂質膜側に開かれた親水性の溝を持ち, 保存されたアルギニンにより溝内は正電荷を持つことが示された. 本研究では, このアルギニンが YidC の活性に重要な役割を果たすこと, そして, 膜組込みタンパク質が YidC の溝の内部と直接相互作用することを実験的に証明することができた. 構造情報と生化学的な実験の結果を合わせ, 以下に YidC による 1 回膜貫通タンパク質膜組込みモデルを提唱する(図 1-9).

このモデルでは, 細胞内でリボソームにより合成された膜組込み基質タンパク質は, SRP 経路を経て, あるいは直接的に YidC へとターゲティングされる. 次に, 基質タンパク質は YidC のサイトゾル領域と相互作用する. このサイトゾル領域は MD シミュレーションの結果から柔軟に構造変化することが示唆されており (Kumazaki *et al.*, 2014a), 基質タンパク質を親水性の溝内へと円滑にリクルートする役割を持つと考えられる. 続いて, 負に帯電した基質タンパク質が YidC の正電荷アミノ酸により親水性の溝へと引き込まれる. この後, 膜組込みタンパク質は膜電位による静電的引力や脂質との疎水性相互作用により YidC の溝の開口部から脂質膜方向へと移動する. これらのプロセスにより基質タンパク質が膜へと組込まれ, 基質タンパク質の細胞外領域が膜を透過することが予想される.

最近, 水分子が YidC の溝内に入り込むことが報告され (Shimokawa-Chiba *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2017), 親水性の溝内が水分子で満たされていることが示された. さらに, YidC が存在することで, 近傍の脂質膜の厚さが薄く変化するという MD シミュレーションの結果も報告されている (Wickles *et al.*, 2014). これらの結果を合わせると, YidC は, 脂質膜内に一時的な親水的環境を構築するとともに, 静電的な相互作用により基質タンパク質の正しいフォールディングをするための時間と空間を提供する場として機能することが考えられる. さらに, 脂質二重膜を薄くしたりすることにより, 細胞内から細胞膜へとタンパク質を直接埋め込むには困難なエネルギー障壁を低くして, タンパク質膜組み込みを促進していることが予想される.

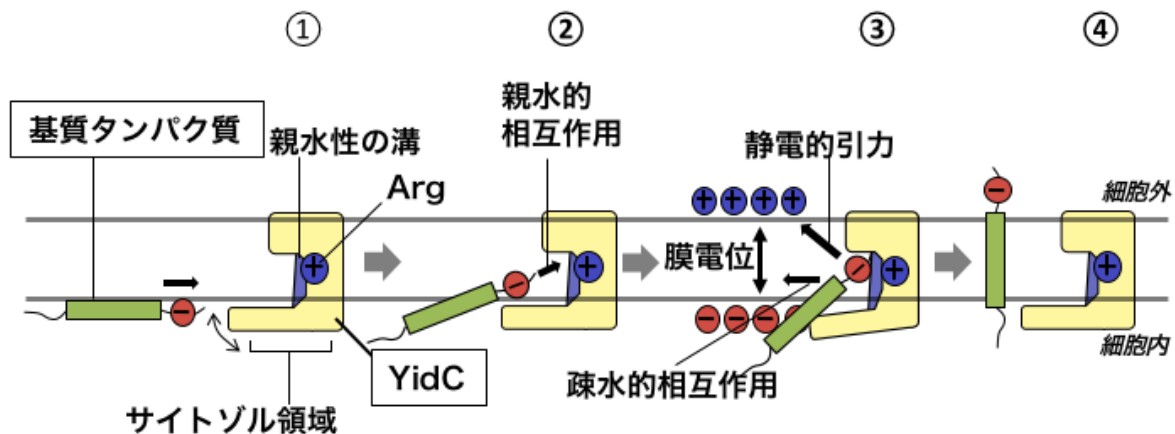


図 1-9. YidC による 1 回膜貫通型タンパク質の膜組み込みモデル

まず基質タンパク質は細胞内でリボソームにより合成されたのち、YidC へとターゲットニングされる (①)。次に、柔軟に曲がることが報告されている YidC のサイトゾル側領域と結合し、負に帯電した基質タンパク質は YidC の正電荷アミノ酸により親水性の溝へと引き込まれる (②)。その後、基質タンパク質は膜電位による静電的引力や脂質との疎水性相互作用により、YidC の溝の開口部から膜方向へと移動する (③)。これらのプロセスを経て、膜への組み込みが完了することが予想される (④)。

1.3.4 YidC と SecYEG によるタンパク質膜組込みモデル

本研究では YidC 単独によるタンパク質の膜組込みに焦点を当ててきた。このほかに、YidC は SecYEG と複合体を形成し、より複雑なタンパク質の膜組込みを行うことが報告されている。この SecYEG と協力したタンパク質膜組込み過程にも、本研究成果は新たな知見を提供する。以前の研究により、EcYidC は SecYEG のラテラルゲートとクロスリンクすること、EcYidC の P1 ドメインの Lys249 が SecYEG と複合体を形成してタンパク質膜透過を行う SecD とクロスリンクが報告されている (Sachelaru *et al.*, 2013)。さらに、最近報告された SecYEG と YidC, SecDF を含む複合体の電子顕微鏡低分解能構造 (Sachelaru *et al.*, 2017)では、SecYEG のラテラルゲートに面するように YidC の溝が位置していた。こうした複合体の構成から、次のような複数回膜貫通タンパク質の膜組込み機構が予想される (図 1-10)。

まず SecYEG へと取り込まれた複数膜貫通タンパク質は、段階的にラテラルゲートから脂質膜へと送り出されることになる。この時、フォールディングが完了していない部分が脂質膜内に露出することはエネルギー的に不利である。YidC は、SecYEG のラテラルゲート付近に位置し、SecYEG から送り出された膜タンパク質の一部を親水性の溝で一時的に受け入れることにより、誤ったフォールディングや凝集を防ぎ、正しいフォールディングを促すシャペロンタンパク質として機能しているのかもしれない。細胞質のシャペロンタンパク質は親水環境下で疎水的環境を提供することにより変性したタンパク質のフォールディングを修正する場となるのに対し (Bukau *et al.*, 2006)、YidC は脂質膜内部に親水的な領域を提供し、膜タンパク質のシャペロンとして機能するのだろう。

YidC 単独の膜組込み基質タンパク質とは異なり、YidC/SecYEG の膜組込み基質タンパク質の電荷的特徴についてはまだ統一見解は得られていない。YidC/SecYEG 経路における YidC の正電荷アミノ酸の重要性や役割については、今後さらなる検証が必要である。

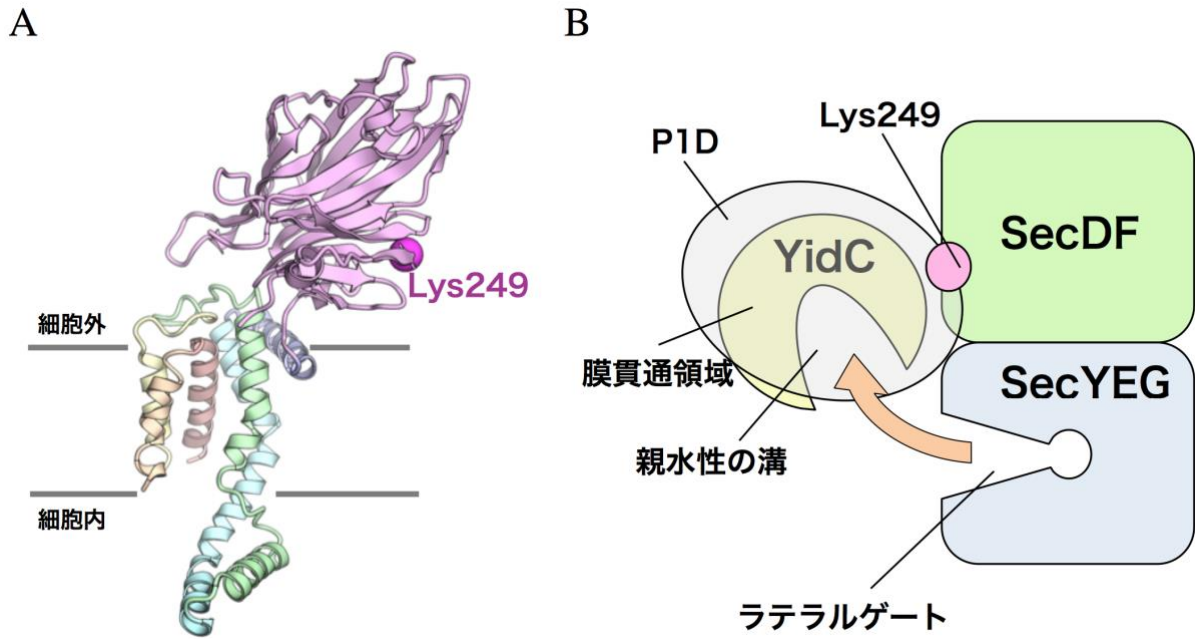


図 1-10. YidC-Sec タンパク質複合体モデル

A. SecD と相互作用することが報告されている EcYidC Lys249 をマゼンタで示した。
 B. 相互作用解析及び程分解能電子顕微鏡単粒子解析から示唆された YidC-Sec 複合体のモデル。細胞外側から見た図。YidC の PID は SecD と相互作用することにより複合体の安定化に寄与しているのかもしれない。SecY のラテラルゲートと YidC の親水性の溝が向かい合っており、膜組み込みタンパク質が SecYEG のラテラルゲートから YidC の親水性の溝へと渡されること (オレンジ矢印)が考えられる。

第 2 章 SecDF によるバクテリアタンパク質の膜透過機構の解明

2.1 序論

2.1.1 Sec トランスロコンを介したバクテリアのタンパク質膜透過

バクテリアの Sec 経路によるタンパク質膜組込みの概略については第 1 章の 1.1.2 で述べた。以降では、タンパク質の膜透過に焦点を当てる。バクテリア Sec トランスロコン (SecYEG 複合体) を介した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 2 つの方法がある(Koch *et al.*, 1999; Mitra *et al.*, 2006)。Co-translational translocation では、リボソームによる合成途中の分泌タンパク質の N 末端に存在するシグナル配列が SRP (Signal Recognition Particle)により認識され、内膜に存在する SRP 受容体である FtsY を経由して SecYEG へと輸送される。その後、リボソームによる翻訳と共役してタンパク質の膜透過が進行する(Saraogi *et al.*, 2014)(図 2-1A)。一方、Post-translational translocation では、リボソームによる翻訳が完了した分泌タンパク質前駆体は、SecB などのシャペロンタンパク質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。SecA は SecYEG と複合体を形成しており、N 末端側のシグナル配列が SecYEG へと受け渡される。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、タンパク質膜透過が進行する (図 2-1B)。いずれの方法でも、細胞外側から膜タンパク質 SecDF が SecYEG から出てきたタンパク質と相互作用し、プロトンの細胞内への流入に伴うエネルギーを利用し、タンパク質膜透過を促進する(Lycklama and Driessen., 2012)。いずれの経路においてもタンパク質膜透過に関わる Sec 膜タンパク質のうち、SecYEG の機能や構造については 1.1.3 で説明した。以下では、主に SecDF に焦点を当てて説明する。

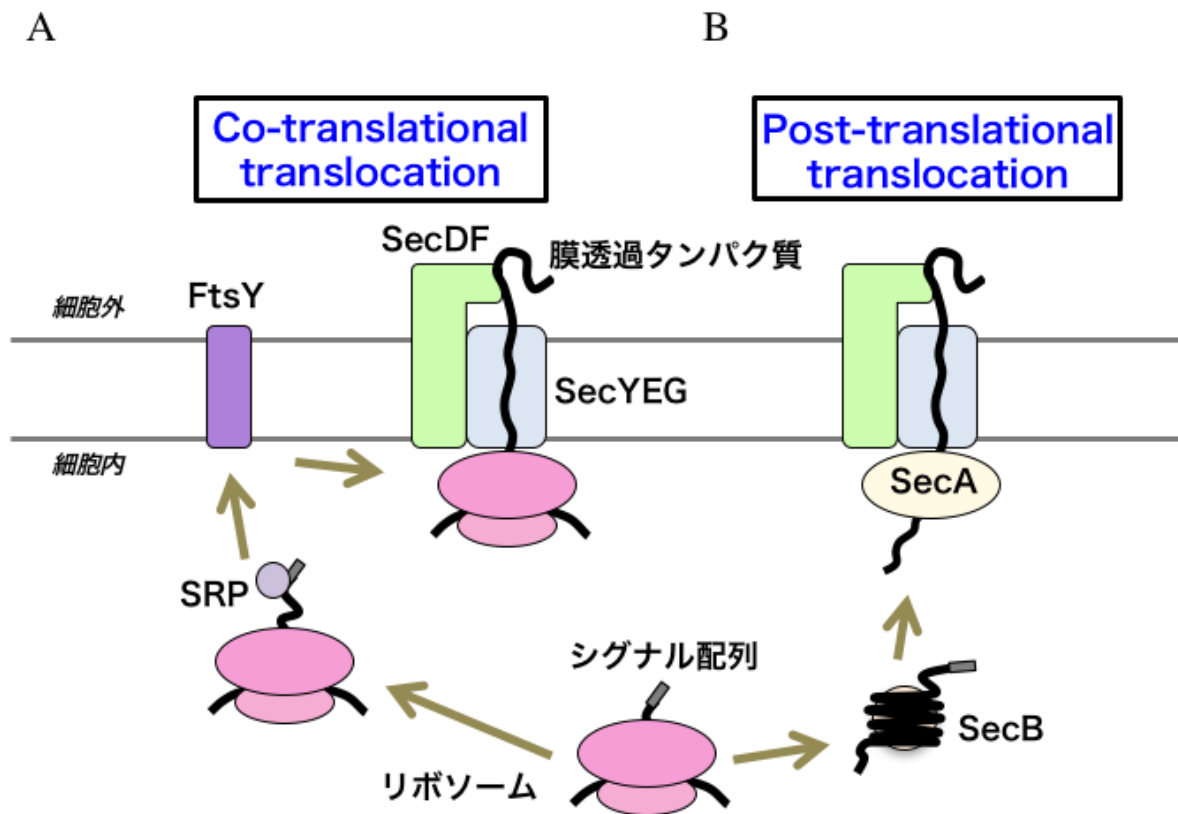


図 2-1. バクテリアの Sec 経路におけるタンパク質膜透過の詳細

A. Co-translational translocation. リボソームによる合成途中の分泌タンパク質の N 末端に存在するシグナル配列が SRP により認識され、内膜に存在する SRP 受容体である FtsY を経由して SecYEG へと輸送される。その後、リボソームによる翻訳と共役してタンパク質の膜透過が進行する。

B. Post Co-translational translocation. リボソームによる翻訳が完了した分泌タンパク質前駆体は, SecB などのシャペロンタンパク質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。

2.1.2 タンパク質膜透過を行う SecD, SecF (SecDF)の構造生物学的知見

SecD, SecF は SecYEG チャンネルと複合体を形成し、タンパク質膜透過を促進する。SecD, SecF はそれぞれ 6 回膜貫通タンパク質であり、相互作用することで安定な 12 回膜貫通タンパク質複合体を形成する。SecD, SecF は第 1, 第 2 膜貫通領域の間に大きなペリプラズム領域を持つ (Pogliano *et al.*, 1994). 特に SecD のペリプラズム領域は機能に重要なことが示されている (Nouwen *et al.*, 2005). 生物種によっては、同一オペロン上に *secD*, *secF* 遺伝子が存在し、1 つのつながったタンパク質 (SecDF) として発現する (Henne *et al.*, 2004). SecDF は多剤排出ポンプ AcrB を含む Resistance-Nodulation-Cell Division (RND)スーパーファミリーに属する (Saier *et al.*, 1998). 真核生物には SecDF のホモログは存在しないが、真核生物の Sec トランスロコンの電子顕微鏡単粒子解析から、Sec トランスロコンと相互作用し、小胞体内腔側に突出した大きな領域を持つ膜タンパク質 (TRAP)が確認されている (Menetret *et al.*, 2008, Pfeffer *et al.*, 2015, Pfeffer *et al.*, 2017). TRAP はタンパク質膜透過に関わることが報告されているが、詳しい機能はよくわかっていない。in vivo において、SecDF を細胞から欠損させるとタンパク質膜透過効率が低下し、低温条件下では細菌の生育が不能となることが報告された (Pogliano *et al.*, 1994). さらに、in vitro においても、SecDF 欠損もしくは SecDF 変異体は、膜透過活性を低下させることが示されている (Nouwen *et al.*, 2005).

SecDF の構造は長らく不明であったが、2011 年に TtSecDF (1 つのタンパク質として発現)の全長結晶構造が 3.3 Å 分解能で報告された (Tsukazaki *et al.*, 2011) (図 2-2A). この構造では、膜貫通領域(TM)1-6 と TM7-12 が擬似 2 回対称で配置していた。また、ペリプラズム側には P1-base, P4 と呼ばれるドメインが存在し、これらも擬似 2 回対称で配置していた。さらに P1-base から突出した P1-head と呼ばれるドメインが存在していた。この構造では P1-head は膜に近づいたコンフォメーションをとっていたため、F 型 (Membrane Facing form の略)と呼ぶ。一方、同時に 2.6 Å 分解能で報告された P1 ドメイン (P1-base + P1-head)のみの部分結晶構造 (図 2-2B)では、全長構造に比べ P1-head が約 120°ペリプラズム方向に回転し、膜貫通領域の真上に配置していた。こちらのコンフォメーションは I 型 (Intermediate form の略)と呼ぶ。P1-head は P1-base から伸びた 2 本のループによってつなぎとめられており、このループがヒンジの役割を果たし、柔軟に曲がることにより F 型, I 型構造を遷移することが考えられた。ジスルフィド架橋により P1-head の配座を固定するとタンパク質膜透過活性が低下することから、P1-head の構造変化が機能的に重要であることが示された。さらにパッチクランプアッセイにより、SecDF がプロトン透過させることが示された。SecDF の膜貫通領域に存在する保存されたアスパラギン酸及びアルギニンを置換した変異体ではプロトンの透過は確認されず、タンパク質膜透過

活性も低下した。さらに、P1-head は変性状態のタンパク質と相互作用し、プロトン透過を促進することも示された。

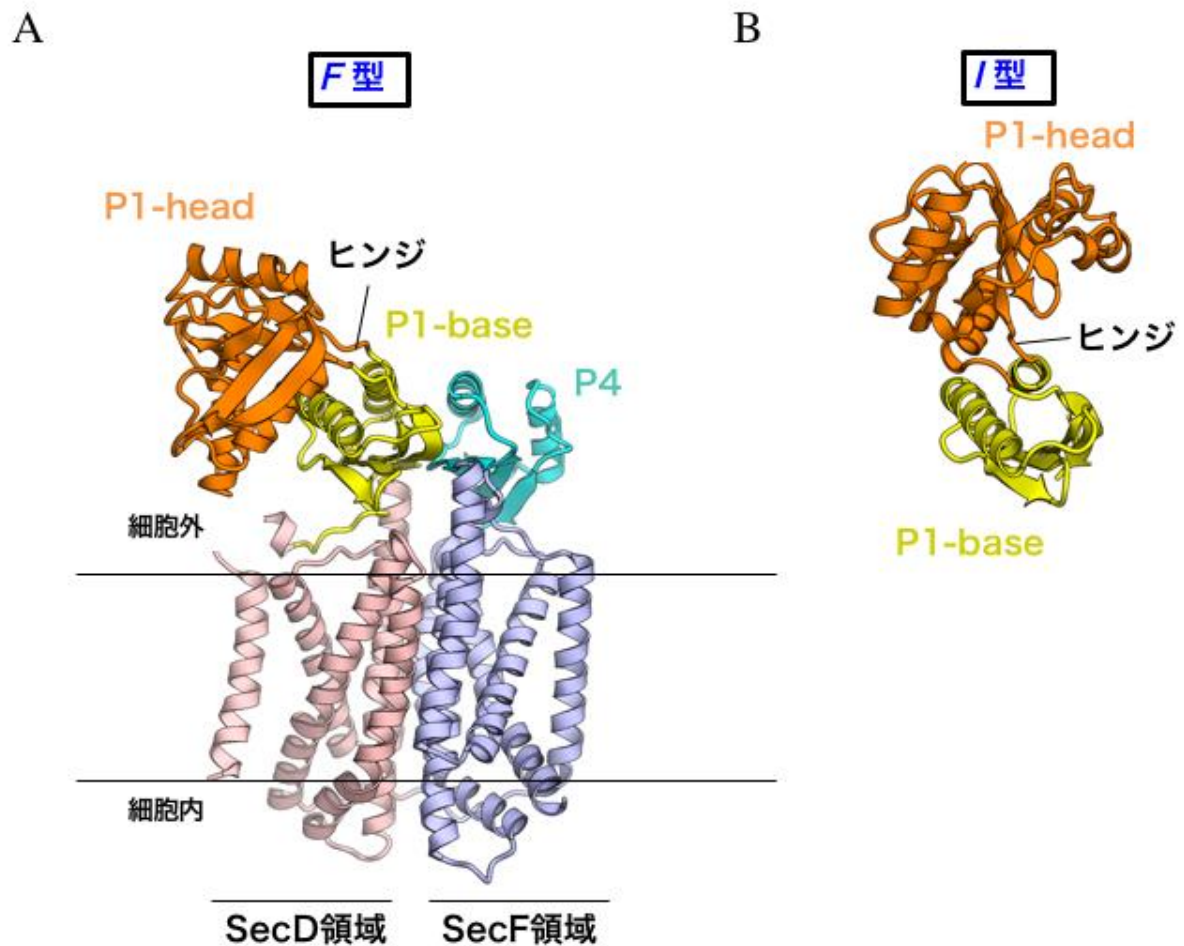


図 2-2. 本研究開始前に報告されていた SecDF の構造

A. F 型全長構造 (PDB ID : 3AQP)。TM1-6 をピンク, TM7-12 を青で示した。P1-head, P1-base, TM1-6 が SecD 領域を, P4, TM7-12 が SecF 領域を形成する。

B. I 型部分構造 (P1-head と P1-base のみ)(PDB ID : 3AQO)

これらの結果から, SecDFによるタンパク質膜透過モデルが提案された (図2-3). このモデルでは, SecDF はペリプラズム側で F 型の状態で, SecYEG から出てきた膜透過タンパク質と P1-head で相互作用する. その後 P1-head がコンフォメーション変化を起こして I 型へと移行し, 膜透過タンパク質をペリプラズム側へと牽引する. 次に分泌タンパク質が P1-head から乖離し, P1-head が F 型へと戻り, 再び膜透過タンパク質と結合する. この一連の構造変化はプロトンの細胞内への流入と共役して行われる. このサイクルを繰り返すことにより, タンパク質の膜透過が完了すると考えられた.

また, 2014 年には電子線トモグラフィーによる SecDF の全長低分解能構造が報告され, 2016 年には電子顕微鏡による SecDF を含む Sec トランスロコン複合体の構造が 14 Å 分解能で報告された (Mio *et al.*, 2014; Botte *et al.*, 2016). このように SecDF の構造生物学的知見は蓄積されつつあるが, 4 Å 分解能を超える高い分解能での構造解析例は Tsukazaki *et al.*, 2011 の結晶構造のみにとどまっている. また, 前述のように Tsukazaki *et al.*, 2011 では 2 つの異なるコンフォメーション (F 型と I 型) の SecDF の構造が示されているが, F 型の構造は全長構造であるのに対し, I 型の構造は SecD のペリプラズム領域の部分構造のみの解析であり, 分子全体の構造には, I 型の細胞外側の部分構造と F 型の膜貫通領域の構造を組み合わせたドッキングモデルとして予測されているのみである. このため P1-head と膜貫通領域の構造変化の相関はよくわかっていない. さらに, 膜透過タンパク質と SecDF との相互作用様式や, 駆動力となるプロトンの細胞内への流入経路は不明であり, SecDF によるタンパク質膜透過の詳細な分子機構には未解明の部分が多く残っている.

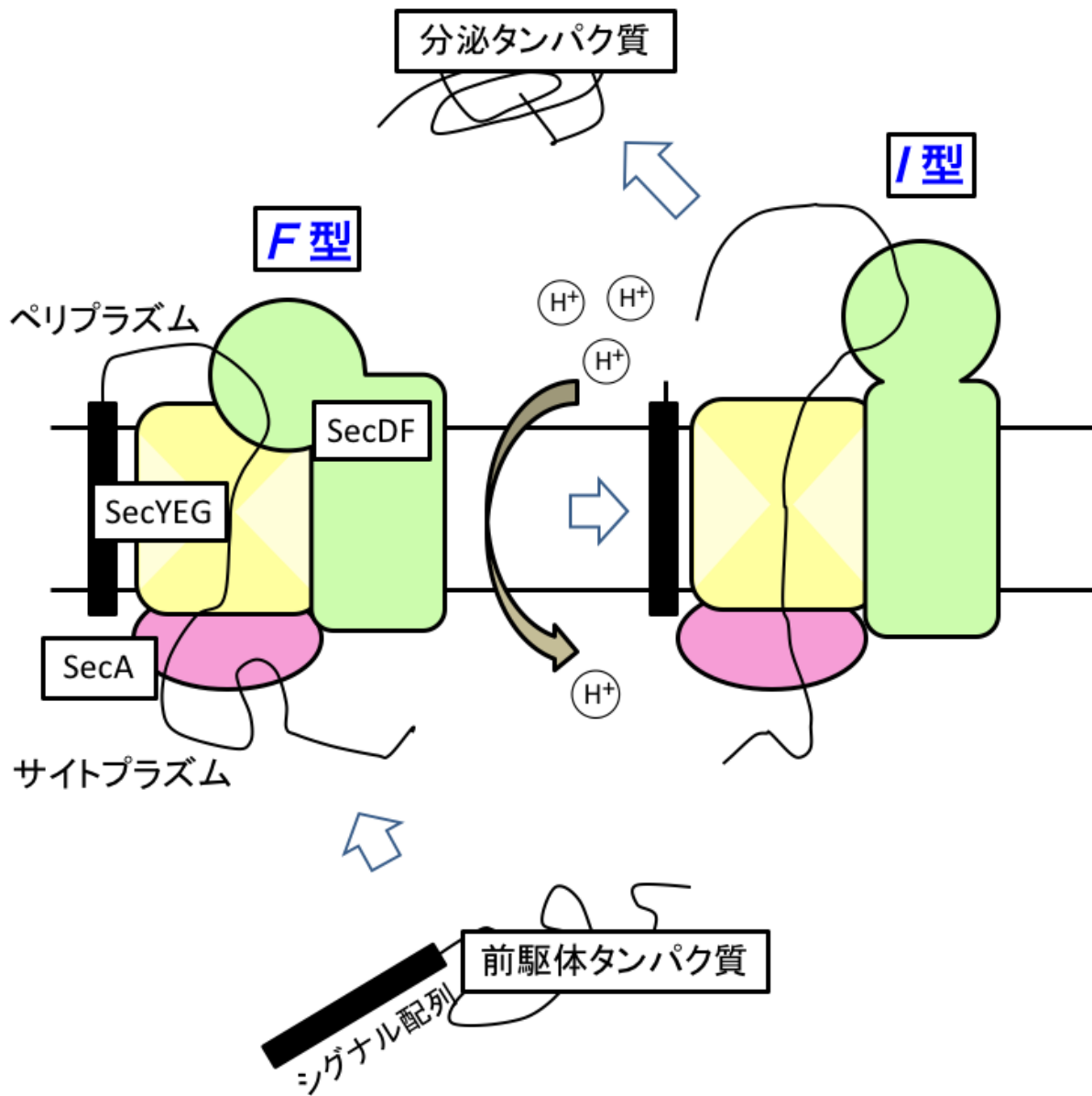


図 2-3. SecDF によるタンパク質膜透過モデル

SecDF はプロトンの細胞内への流入に伴うエネルギーを利用し、P1-head が F 型と I 型のコンフォメーション変化を繰り返すことによりタンパク質膜透過を駆動すると考えられる。

2.1.3 本研究の目的

これまでに述べてきたように、生物にとって必須の機構であるタンパク質膜透過の中心的な役割を担う Sec 膜タンパク質の学術的研究価値は高く、多くの研究が行われてきた。その中で、X線結晶構造解析や電子顕微鏡による構造生物学的なアプローチは、ナノメートルオーダーのタンパク質マシーナリーの詳細な作動機序を明らかにする上で有用な情報を提供してきた。バクテリアの Sec トランスロコンを形成する SecY を含む複合体の結晶構造はこれまでに数多く報告されており (Van den Berg *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2007, Zimmer *et al.*, 2008, Tsukazaki *et al.*, 2008, Tanaka *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2016), トランスロコン内部を膜透過タンパク質が通過していく様子が明らかになりつつある。一方で、タンパク質膜透過を促進する膜タンパク質である SecDF の 4 Å 分解能を超える全長構造の報告は 1 例にとどまっており、SecYEG に比べて理解が遅れている。これまでに唯一報告されている全長 SecDF の構造は F 型に限られており、SecDF の機能サイクルを理解する上では I 型 SecDF の構造決定が必要である。また、F 型 SecDF の構造はタンパク質膜透過の理解に有用な多くの情報を与えたが、分解能は 3.3Å と中程度で、多くのアミノ酸側鎖の正確な位置は不明である。そのため、アミノ酸側鎖レベルでの構造変化の議論はなされていない。これらの現状から、全長 I 型 SecDF の高分解能構造決定が待ち望まれてきた。また、P1-head がスイングする過程で F 型や I 型以外のコンフォメーションを取ることとも考えられた。

そこで本研究では、I 型全長構造及び別状態の SecDF の構造を X 線結晶構造解析により高分解能で決定し、構造情報に基づいた機能解析と合わせて、SecDF によるより詳細なタンパク質膜透過機構の解明を目的とした。

2.2 材料・方法

2.2.1 研究に用いた SecDF, SecD, SecF プラスミド

本研究に用いたプラスミドを表 1 にまとめた. *DrsecDF*, *EcsecD*, *EcsecF* 変異体をコードするプラスミドはそれぞれ変異プライマーを用いた部位特異的変異導入法にて作製した.

番号	ベクター	発現タンパク質(略称)	耐性	参考文献
pMM2-1	pLACKUMA	Met-DrSecDF (28-768)-His8	Amp	This study
pRF468	pLACKUMA	Met-DrSecDF (28-768 (I143C, L268C))-His8	Amp	This study
pTV118n	pTV118n	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Maki <i>et al.</i> , 1987
pTT587	pTV118n	TtSecDF (1-735)-His10	Amp	Tsukazaki <i>et al.</i> , 2006
pSTV28	pSTV28	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Cm	Selzer <i>et al.</i> , 1983
pYE134	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF	Cm	This study
pKK124	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (Y209F)	Cm	This study
pKK73	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (Y209N)	Cm	This study
pKK76	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (Y209Q)	Cm	This study
PKK139	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (Y209A)	Cm	This study
pFLAG-CTC	pFLAG-CTC	lac リプレッサー	Amp	Russell <i>et al.</i> , 1982
pKK134	pSTV28	HA-EcSecD (R439C, C457A), SecF	Cm	This study
pRF456	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (E132C)	Cm	This study
pKK166	pSTV28	HA-EcSecD (R439C, C457A), SecF (E132C)	Cm	This study
pKK278	pBAD24	EcSecD (Q228 アンバー), SecF	Amp	This study
pRF473	pBAD24	EcSecD (R235 アンバー), SecF	Amp	This study
pRF470	pBAD24	EcSecD (Q340 アンバー), SecF	Amp	This study
pRF471	pBAD24	EcSecD (Q407 アンバー), SecF	Amp	This study
pBAD24	pBAD24	pBAD プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Guzman <i>et al.</i> , 1995
pEVOL	pSTV28	アンバーコドン認識 tRNA,	Cm	Chin <i>et al.</i> , 2002

アミノアシル tRNA 合成酵素

pLACKUMA	pLACKUMA	lac プロモーターを持つ タンパク質発現用ベクター	Amp	Kumazaki <i>et al.</i> , 2014a
pKK45	pLACKUMA	DrSecDF (Met-28-768(D365N))-His8	Amp	This study
pKK212	pLACKUMA	DrSecDF (Met-28-768(Y662A))-His8	Amp	This study
pRF468	pLACKUMA	DrSecDF (Met-28-768(I143C, L268C))-His8	Amp	This study
pYVM063	pBAD33	pH indicator protein pHluorin(M153R)	Cm	Nakamura <i>et al.</i> , 2009
pSN38	pSTV28	HA-EcSecD (Q251C, C457A), SecF	Cm	This study
pSN30	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (V134C)	Cm	This study
pSN31	pSTV28	HA-EcSecD (Q251C, C457A), SecF (V134C)	Cm	This study
pSN36	pSTV28	HA-EcSecD (Q251C, C457A, D519N), SecF (V134C)	Cm	This study
pSN37	pSTV28	HA-EcSecD (Q251C, C457A), SecF (V134C, R247M)	Cm	This study
pSN18	pSTV28	HA-EcSecD (Q448C, C457A), SecF	Cm	This study
pSN19	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (D69C)	Cm	This study
pSN27	pSTV28	HA-EcSecD (Q448C, C457A), SecF (D69C)	Cm	This study
pSN34	pSTV28	HA-EcSecD (Q448C, C457A, D519N), SecF (D69C)	Cm	This study
pSN35	pSTV28	HA-EcSecD (Q448C, C457A), SecF (D69C, R247M)	Cm	This study
pSN39	pSTV28	HA-EcSecD (N232C, C457A), SecF	Cm	This study
pSN8	pSTV28	HA-EcSecD (C457A), SecF (D141C)	Cm	This study
pSN24	pSTV28	HA-EcSecD (N232C, C457A), SecF (D141C)	Cm	This study
pSN32	pSTV28	HA-EcSecD (N232C, C457A, D519N),	Cm	This study

SecF (D141C)				
pSN33	pSTV28	HA-EcSecD (N232C, C457A),	Cm	This study
SecF (D141C, R247M)				

表 2-1 使用したプラスミド一覧

2.2.2 DrSecDF の発現系の構築

Deinococcus radiodurans (Dr)由来の *secDF* (Gene ID : 1799461) の DNA 配列 (アミノ酸配列 Met-28-768 をコード) (サプリ配列 1, 2) の 5'末端に NcoI サイト, 3'末端にヒスチジン 8 タグと XhoI サイトを付加した DNA 断片を注文し(GenScript), 大腸菌におけるタンパク質発現用ベクター pLACKUMA (pTV118n 改変ベクター) のマルチクローニングサイトに導入した. pLACKUMA は *lac* プロモーター制御により目的の遺伝子を発現させるプラスミドである. クローニングには制限酵素法を利用し, 制限酵素 NcoI と XhoI を用いて開裂させた pLACKUMA に DNA 断片を導入した. このプラスミドを大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換した. このコンストラクトを用いて以降の発現, 精製を行った.

2.2.3 DrSecDF の発現・精製

大腸菌を, 50 µg/ml Ampicillin と 0.4 % (w/v) グルコースを含む LB 培地で, 37°C で前培養した. その後, 50 µg/ml Ampicillin と 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) を含む LB 培地 10 L で 37°C で 15 時間培養した.

以下の操作は全て 4°C もしくは氷上で行った. 遠心 (HITACHI, R9A2, 7500 g × 15 min) 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バッファー A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na (pH 8.0), 0.1 mM Pefabloc) に均一に懸濁し, マイクロフルイダイザー (パウレック, 15,000 psi × 3 回) によって細胞を破碎した. 粗抽出液から遠心 (HITACHI, R13A, 22500 g × 30 min) で未破碎細胞を除いた後, 超遠心 (Beckman, 45Ti, 140,000 g × 1 h) により膜画分を得た. 膜画分はバッファー B (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 20 mM imidazole (pH 8.0), 2% DDM (ドデシルマルトシド)) に均一に懸濁し可溶化 (1 h) した. 可溶化後, 超遠心 (Beckman, 45Ti, 140,000 g × 1 h) により不溶性物質を除いた. 超遠心後の上精を 20 mM imidazole (pH 8.0) で平衡化した 5 mL Ni-NTA Agarose (QIAGEN) に添加し, バッチ法 (30 min) により SecDF を樹脂に吸着させた. 20 mM imidazole (pH 8.0) で不純物を除去後, 30-300 mM imidazole (pH 8.0) の濃度勾配により溶出した. 溶出画分を Amicon Ultra-15 50K

NMWL (Millipore)を用いて濃縮し、超遠心 (Beckman, TLA-100.3, 140000g × 30min)により不溶性画分を除去した. 超遠心の上清は液体クロマトグラフィーシステムAKTA explorer 10s (GE Healthcare)を用いてバッファーC (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 0.1%DDM, 0.1 mM Pefabloc)で平衡化したSuperdex200 16/600 Hi-Load (GE Healthcare)によりゲル濾過クロマトグラフィーを行った. サンプルの精製純度CBB染色によるSDS-PAGE法により確認した.

2.2.4 DrSecDF の結晶化

Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いて、精製試料を20 mg/mlまで濃縮した. タンパク質溶液の濃度は、ナノドロップ (Thermo Scientific)を用いて測定した280 nmの波長での吸光度とアミノ酸配列の吸光係数から算出した (Abs 1.0=1.0 mg/ml). 得られた精製試料をLCP法 (Landau *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、SecDF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20°Cにて結晶化スクリーニングを行った. その結果、WTSecDF の精製サンプルを用いて、条件1 (38% PEG200, 100mM Na-citrate pH5.9, 100mM NH₄-citrate)で最大で長辺約110 μm, 短辺約20 μmの結晶を取得した. また、変異体SecDF (I143C, L268C)を作製し、同様の方法で精製した20 mg/mlの精製サンプルを用いて、条件2 (40% PEG200, 100 mM Na-citrate pH 6.6 and 100 mM LiSO₄)で最大で長辺約30 μm, 短辺約15 μmの結晶を取得し、条件3 (41% PEG200, 100 mM Na-citrate pH 5.9 and 100 mM NH₄NO₃)で最大で長辺約100 μm, 短辺約30 μmの結晶を取得した. 結晶はクライオループ (Hampton)を用いてプレートから回収し、液体窒素内で保存した.

2.2.5 DrSecDF の 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 1.0 Å の波長を用い、同一条件から得られた 3-6 個の結晶に対して、振動角 1.0°で 180°にわた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)で行った. 得られた回折データは、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い、各データのマージを行った.

2.2.6 DrSecDF の位相決定および構造精密化

条件 1 で取得した WT SecDF の結晶構造初期位相は、プログラム PHASER により、フレキシブルな P1-head を除いた *Thermus thermophilus* (Tt) 由来の SecDF (PDB ID 3AQP) の膜貫通領域のみの構造を用いた分子置換法で決定した。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った。構造精密化を進めたところ P1-head の電子密度マップが視認できるようになったため、手動で P1-head の構造を配置し、構造精密化を進め、P1-head の位置を決定した。次に主鎖や側鎖の精密化を手動で行い、モデルの最適化を進めた。その結果、WT SecDF の結晶構造を、空間群 $P2_1$ 、分解能 4.0 Å, $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}=0.33/0.40$ で決定することができた。次にこの WT の構造を用いた分子置換により、条件 2 と条件 3 で取得した SecDF (I143C, L268C) の結晶構造の初期位相決定を行った。モデル構築と構造精密化を WT と同様の方法で行った。最終的に、条件 2 と条件 3 で取得した SecDF (I143C, L268C) のそれぞれの結晶構造を、空間群 $P2_12_12_1$ 、分解能 2.8 Å, $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}=0.21/0.27$ および空間群 $C2$ 、分解能 2.6 Å, $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}=0.20/0.26$ で決定した。

2.2.7 TtSecDF の発現系の構築

発現系の構築から精製までは Tsukazaki *et al.*, 2006 と同様の方法で行った。X 線結晶構造解析に用いるため、*Thermus Thermophilus* (Tt) 由来の *secDF* (Gene ID : 3168575) の DNA 配列 (アミノ酸配列 1-735 をコード) (サブ配列 3, 4) の 5' 末端に Nco1 サイト、3' 末端にヒスチジン 10 タグと Kpn1 サイトを付加した DNA 断片が組み込まれた大腸菌タンパク質発現用ベクター pTV118n を用いた。pTV118n は *lac* プロモーター制御により目的の遺伝子を発現させるプラスミドである。このプラスミドを大腸菌株 BL21 (DE3) に形質転換した。このコンストラクトを用いて以降の発現、精製を行った。

2.2.8 TtSecDF の発現・精製

大腸菌を、50 µg/ml Ampicillin と 0.4 % (w/v) グルコースを含む LB 培地で、37°C で前培養した。その後、50 µg/ml Ampicillin と 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) を含む LB 培地 10 L で 37°C で 12 時間培養した。

以下の操作は全て 4°C もしくは氷上で行った。遠心 (HITACHI, R9A2, 7500 g × 15 min) 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バッファー D (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA-Na (pH 8.0), 0.1 mM Pefabloc) に均一に懸濁し、マイクロフルイダイザー (パウレック, 15,000 psi × 3回) によって細胞を破碎した。粗抽出液から遠心 (HITACHI, R13A, 22500 g ×

30 min)で未破碎細胞を除いた後、超遠心 (Beckman, 45Ti, 140,000 g × 1 h)により膜画分を得た。膜画分はバッファーE (20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 mM Pefabloc, 20 mM imidazole(pH 8.0), 2% DDM (ドデシルマルトシド))に均一に懸濁し可溶化(1 h)した。可溶化後、超遠心 (Beckman, 45Ti, 140,000 g × 1 h)により不溶性物質を除いた。超遠心後の上精を20 mM imidazole (pH8.0)で平衡化した5 mL Ni-NTA Agarose (QIAGEN)に添加し、バッチ法 (30 min)によりSecDFを樹脂に吸着させた。20 mM imidazole (pH8.0)で不純物を除去後、30-300 mM imidazole (pH8.0)の濃度勾配により溶出した。溶出画分をAmicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いて濃縮希釈し、バッファーF (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM NaCl, 0.1%DDM)に置換した。超遠心 (Beckman, TLA-100. 3, 140,000g × 30min)により不溶性画分を除去した。超遠心の上清は液体クロマトグラフィーシステム AKTA explorer 10s (GE Healthcare)を用いてバッファーFで平衡化したHitrap-SPHP (GE Healthcare)に添加し、SecDFを吸着させた。その後1 M NaClを含むバッファーFを用いて50 mM-1 M NaClの濃度勾配により溶出した。溶出画分をAmicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いて濃縮し、バッファーG (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 0.1%DDM, 0.1 mM Pefabloc)で平衡化したSuperdex200 10/300 increase (GE Healthcare)によりゲル濾過クロマトグラフィーを行った。サンプルの精製純度CBB染色によるSDS-PAGE法により確認した。

2.2.9 TtSecDF の結晶化

Amicon Ultra-15 50K NMWL (Millipore)を用いて、精製試料を20 mg/mlまで濃縮した。ナノドロップ (Thermo Scientific)を用いて測定した280 nmの波長での吸光度とアミノ酸配列の吸光係数から算出した (Abs 1.0=1.6 mg/ml)。得られた精製試料をLCP法 (Landau *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、SecDFをモノオレインに再構成した。再構成サンプルを、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20°Cにて結晶化スクリーニングを行った。その結果、TtSecDFの精製サンプルを用いて、条件4 (50% PEG400, 100 mM Tris-HCl pH8.5, 100 mM KCl)で最大で長辺約250 μm, 短辺約30 μmの結晶を取得した。

2.2.10 TtSecDF の 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1.0 Åの波長を用い、同一条件から得られた3-6個の結晶に対して、振動角1.0°で180°にわた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)で行った。得られた回折データは、プログラムKAMO (<https://github.com/keitaroyam/yamtbx/blob/master/doc/kamo-en.md>)及びXDS (Kabsch, 2010)とXSCALE (Evans, 2006)を用いて指数付けとブラベ格子・格子定数の決定を行い、各データのマージを行った。

2.2.11 TtSecDF の位相決定および構造精密化

条件 4 で取得した TtSecDF の膜貫通領域の初期位相は、*Thermus thermophilus* (Tt)由来の SecDF (PDB ID 3AQP)の構造を用いた分子置換法で決定した。続いて、P1-head の位相を、プログラム MoRDa of ccp4-online (<https://www.ccp4.ac.uk/ccp4online/>)により決定した。続けてプログラム COOT (Emsley *et al.*, 2010)を用いて、モデルの配置を行った。はじめ P1-head ドメイン及び膜貫通領域のモデルを配置することができたが、P1-base 及び P4 領域のモデルは配置することができなかった。そこで、P1-base 及び P4 領域は電子密度マップに手動で配置した。その後、プログラム COOT 及び PHENIX を用い、モデルの構築と精密化を行った。モデルの最適化を進め、TtSecDF の結晶構造を、空間群 *P1*、分解能 2.8 Å、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}=0.20/0.24$ で決定した。

2.2.12 生育試験とジスルフィド結合の確認

この実験は所属研究室の修士課程二年生の中山慎太郎君と協力して行った。ゲノム中の *secD* 遺伝子に変異が導入され、SecD, SecF の発現が著しく低下し 20°C で生育ができない大腸菌株 *secD1* (Cs)を用いた (Kihara *et al.*, 1998)。この株を、N 末端側に HA タグを付加した SecD, SecF を発現する各種プラスミドと、*lac* リプレッサーを発現するプラスミド pFLAG-CTC を用いて形質転換した。この大腸菌を 37°C の LB 培地で前培養し、SecF Y209 変異体の生育試験では、寒天プレート (LB, 0.4% glucose, 50 mM Na-citrate (pH 5.0))に 2 ml スポットして 20°C で 24 h 培養した。システイン変異体の生育試験では、寒天プレート (LB, 1 mM IPTG, 50 mM Tris-HCl (pH7.0))または(LB, 1 mM IPTG, 50 mM Tris-HCl (pH9.0), 50 μM FeSO₄)にスポットして 20°C で 24 h 培養した。SecD の発現量は 1 次抗体に α -HA 抗体 (SANTA-CRUZ, sc-805), 2 次抗体に α -rabbit IgG (Bio-Rad 170-6515)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。シグナルは Fusion SOLO S (VILBER)により検出した。

2.2.13 タンパク質膜透過活性測定

この実験は、京都大学の森 博幸 博士との共同研究により行った。大腸菌 SecD, SecF を発現する各種プラスミドを導入した大腸菌株 *secD1* (Cs)を 0.4 % (w/v)グリセロール, 0.4 % (w/v)マルトース, 20 $\mu\text{g/ml}$ アミノ酸ミクスチャー (Met と Cys

を除く), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコールを含む M9 培地で $\text{OD}_{600}=0.5$ まで培養した. その後 1 mM IPTG を加え, 1 h 培養した. 細胞を回収し, 酸化条件でジスルフィド結合を形成する場合は 1 mM ジアミドを加え, 氷上で 20 min 培養した. 細胞を生理食塩水で洗い, IPTG を含まない M9 培地に移し替え, 20°C で 30 min 培養した. 還元条件でジスルフィド結合を切断する場合には, 10 mM ジチオスレイトール (DTT)を加えた. その後, ^{35}S メチオニンを用いて 1 min ラベル化を行った. その後, SecDF により膜透過が促進される内在性タンパク質であるマルトース結合タンパク質 (MBP)と外膜タンパク質 A (OmpA)を, それぞれ α -MBP 抗体, α -OmpA 抗体を用いて共免疫沈降した. ラベル化されたタンパク質は SDS-PAGE により分離し, 放射性同位体シグナルを検出した.

2.2.14 *In vitro* 光架橋実験

この実験は, 京都大学の森 博幸 博士との共同研究により行った. 大腸菌株 *secD1* (Cs)を, 光反応性アミノ酸誘導体 pBPA を導入した大腸菌 SecD, SecF 変異体を発現する各種プラスミドと, pBPA を認識する tRNA およびアミノアシル tRNA 合成酵素を発現するプラスミド pEVOL を用いて形質転換した. この大腸菌を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アンピシリン, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコール, 0.1 mM pBPA を含む LB 培地で $\text{OD}_{600}=0.5$ まで培養した. 0.2 % (w/v)アラビノースを加えて 37°C で 1 h 培養し, SecD (pBPA)の発現を誘導した. 細胞を回収し, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)でリンスした. 細胞をスフェロプラストバッファー (30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 % (w/v) スクロース, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ リゾチーム)に懸濁し, 4°C で 30 min インキュベートした. 細胞を回収し, バッファー D (30 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 % (w/v) スクロース, 3 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF)に懸濁した. Q500 (Qsonica)を用いて on 1 sec, off 1 sec, 強度 20 %で 20 回細胞を超音波破碎した. その後, 遠心(TOMY, AR01524, 14000 rpm \times 5 min)で未破碎細胞を除いた後, 超遠心(Beckman, TLA100. 3, 109,000 g \times 30 min)を行った. 沈殿を HEPES-KOH (pH 7.5), 20 %グリセロールに懸濁し, 反転膜小胞とした. 反転膜小胞を, 膜透過反応バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgSO_4 , 0.5 mg/ml BSA, 5 mM ATP, 5 mM コハク酸, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SecA, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{35}S -proOmpA (L59 (ジスルフィド結合により膜透過中間体を形成する変異体膜透過基質))に懸濁した. 還元条件で実験を行う場合には 5 mM DTT を加えた. 37°C で 60 min インキュベートして膜透過反応を進めたのち, B-100AP UV lamp (Ultraviolet Products, Upland, CA)を用いて 4°C で 20 min 光架橋を行った. その後 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K を加え, 氷上で 20 分間インキュベートすることで反転膜小胞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、³⁵S 標識タンパク質を直接あるいは α -SecD 抗体を用いた免疫沈降後に SDS-PAGE を行い、放射性同位体シグナルを検出した。

2.2.15 水素イオン透過活性測定

この実験は大阪大学の南野 徹 博士，九州工業大学の森本 雄祐 博士との共同研究により行った。大腸菌 BL23 (DE3)株を，SecDF (Met-28-768)を発現する各種プラスミド と，pH に依存して蛍光強度が変化するタンパク質である pHluorin(M153R) (Morimoto *et al.* , 2011)発現プラスミド (pYVM063)を用いて形質転換した。細胞を 1 mM IPTG と 0.2 % (w/v)アラビノースを含む LB 培地で 30°C で 8 h 培養した。還元条件で実験を行う場合には 5 mM DTT を加えた。pHluorin(M153R)の蛍光スペクトルは蛍光スペクトルメーター (RF-5300PC, Shimadzu)を用いて測定した。細胞内 pH は，pHluorin(M153R)の 410/470 nm での蛍光強度比の検量線 (Morimoto *et al.* , 2011)に基づいて測定した。SecDF の発現量は 1 次抗体に α -His 抗体 (MBL, PM032), 2 次抗体に α -rabbit IgG (Bio-Rad) を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。

2.2.16 分子動力学(MD)シミュレーション

MD 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った。空間群 C2 の DrSecDF (I143C, L268C) の結晶構造をコンピュータ上で過剰な脂質を取り除いた POPE 脂質二重膜に埋め込んだ。変異箇所 (I143C, L268C)は WT のアミノ酸に置換した。OPM データベース (Lomize *et al.* , 2006)中の SecDF(PDB ID 3AQP)の配向を元にして，DrSecDF 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 を配置した。全体として，1 分子の SecDF, 561 個の POPE, 56250 個の水分子モデル，159 個の K⁺, 169 個の Cl⁻を 127 × 127 × 147 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った。この系では，D365 のプロトン化，脱プロトン化状態の 2 条件でシミュレーションを行った。他のアミノ酸のプロトン化状態は PROPKA and MCCE (Li *et al.* , 2005; Song *et al.* , 2009)により算出された pKa 値に基づいて決定した。SecDF と POPE 脂質には CHARMM 力場パラメータ (Kluda *et al.* , 2010; Best *et al.* , 2012) を適応した。

2.3 結果と考察

2.3.1 DrSecDF の発現・精製・結晶化

前述のように、SecD、SecF はともに 6 回膜貫通タンパク質であり、複合体を形成することにより機能する。一部のバクテリアでは、同一オペロン上に *secD*、*secF* 遺伝子が存在し、1 つのつながったタンパク質 (SecDF) として発現する。1 つにつながつた SecDF を用いたほうが安定な複合体を形成しやすいのではないかと考え、そのような生物種として、ともにグラム陰性細菌である *Thermus thermophilus* (Tt) と *Deinococcus radiodurans* (Dr) を選択した。TtSecDF の全長結晶構造は 2011 年に F 型で決定されており、結晶中では F 型が安定なコンフォメーションであることが考えられた。一方、DrSecDF の安定なコンフォメーションは不明であったため、まずは DrSecDF の構造決定を目指すこととした。

DrSecDF と他の生物種の SecD、SecF のアラインメント (図 2-1, 2-2) を行ったところ、N 末端側に DrSecDF に生物種間で保存されていない挿入領域が存在したため、この部分を削除し C 末端側にタグを付加した DrSecDF_{Met-28-768-His8} というコンストラクトを作製した。大腸菌内で DrSecDF_{Met-28-768-His8} を発現させ、ウェスタンブロットにより発現を確認した。次に 2.2.3 に従って精製サンプルを得た (図 2-3A, B)。終濃度 20 mg/ml の精製サンプルを用いて初期スクリーニングを行った結果、微結晶が得られた。結晶化条件の最適化を進め、2.2.4 の条件 1 で最大で長辺約 110 μm 、短辺約 20 μm の結晶を取得した (図 2-3C)。

2.3.2 DrSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化

得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において 1.0 Å の波長を用いて X 線回折実験を行なった。最終的に、4.0 Å 分解能の回折データセットが得られた。空間群は $P2_1$ であった。得られた回折データを用いてセットの統計値は表 2-2 に示した。

回折データに対して、フレキシブルな P1-head を除いた TtSecDF (PDB ID 3AQP) の構造を用いた分子置換を行い、初期位相を決定した。その後手動でモデル構築とモデル精密化を行なった。最終的に分解能 4.0 Å で $R_{\text{work}} = 33.3$ 、 $R_{\text{free}} = 40.2$ (%) まで精密化することができた (表 2-2)。

ン酸を黒三角矢印で示した。アラインメントには、以下に記したバクテリアを用いた。

Deinococcus radiodurans, *Thermus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Aquifex aeolicus*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*.

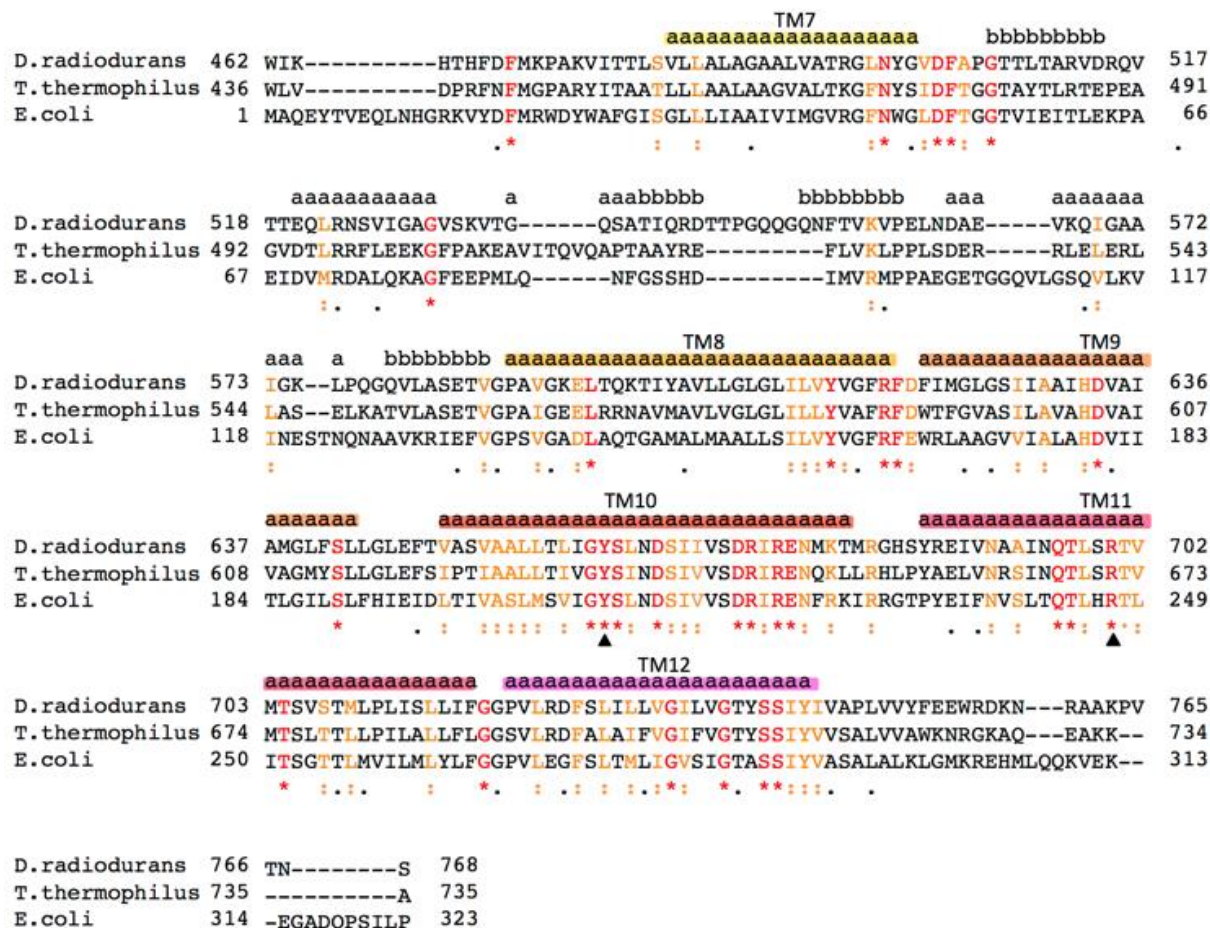


図 2-2. SecF のアミノ酸配列のアラインメント

DrSecDF, TtSecDF, EcSecF の配列アラインメント. DrSecDF の α -ヘリックスを”a”, β -シートを”b”で示した. T-Coffee を用いて行った 11 種のバクテリア SecF の配列アラインメントの結果, 完全に保存されたアミノ酸をアスタリスク(赤), 高度に保存されたアミノ酸をコロン(オレンジ)で示した. SecDF の活性に重要なチロシン及びアルギニンを黒三角矢印で示した. アラインメントには, 以下に記したバクテリアを用いた.

Deinococcus radiodurans, *Thermus thermophilus*, *Escherichia coli*, *Aquifex aeolicus*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*.

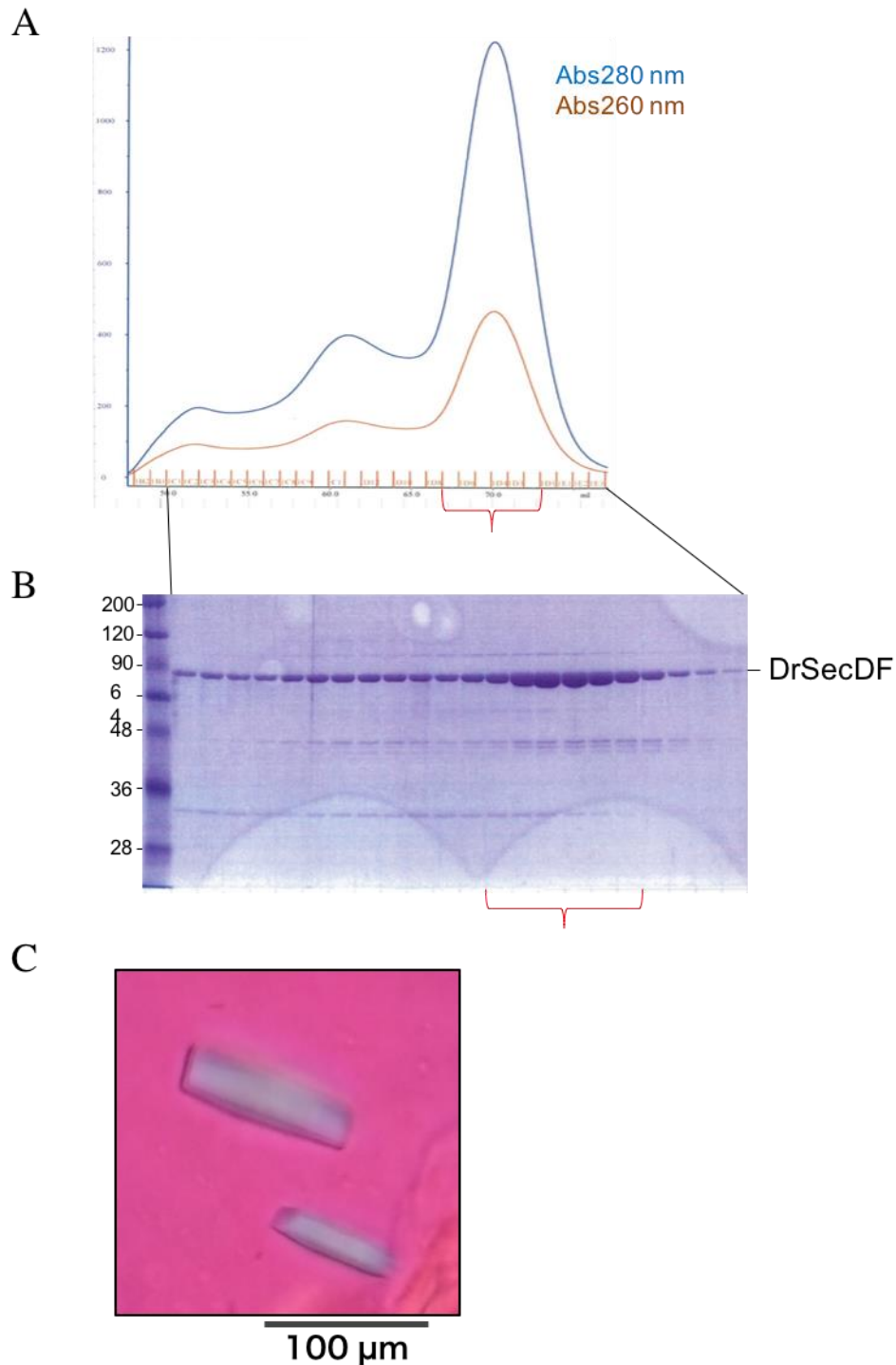


図 2-3. WTDrSecDF の精製, 結晶化

A. 最終精製段階のゲル濾過クロマトグラフィーのスペクトル. 回収し, 結晶化に用いた部分を赤で示した.

B. ゲル濾過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE . 回収し, 結晶化に用いた部分を赤で示した.

C. 38% PEG200, 100mM Na-citrate pH5.9, 100mM NH₄-citrate のリザーバ溶液にて得られた WTDrSecDF の結晶.

	DrSecDF (WT)	DrSecDF (S-S mutant) (MolC)	DrSecDF (S-S mutant) (MolA, MolB)
Data Collection			
Wavelength	1.0	1.0	1.0
Space group	$P2_1$	$C2$	$P2_12_12_1$
Cell dimensions			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	93.3, 62.3, 181.7	208.3, 69.8, 66.1	63.5, 73.8, 369.7
α , β , γ (°)	90.0, 101.7, 90.0	90.0, 94.9, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
Resolution (Å)	50.00-4.00 (4.07-4.00)	50.00-2.60 (2.64-2.60)	50.00-2.70 (2.75-2.70)
Unique reflections	6,301(127)	28,645 (1,409)	47,548 (2,054)
Total reflections	182,947	561,433	846,654
Completeness (%)	36.0 (14.5)	99.0 (98.9)	97.8 (86.4)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	5.5 (0.48)	15.1 (2.2)	12.0 (1.7)
Redundancy	2.5 (2.1)	10.2 (6.5)	6.4 (5.0)
CC(1/2)	85.4 (37.9)	92.8 (73.0)	95.5 (81.3)
Refinement			
Resolution (Å)	47.99-4.00 (4.12-4.00)	49.14-2.60 (2.67-2.60)	48.20-2.75 (2.82-2.75)
No. reflections	6,267	28,635	45,733
R_{work} / R_{free}	0.333/0.402 (0.374/0.489)	0.203/0.258 (0.224/0.321)	0.212/0.268 (0.243/0.317)
No. atoms			
Protein	9,852	5,545	11,035
Water	0	52	122
Others	0	132	156
B-factors (Å²)			
Protein	242.3	49.1	47.9
Water	-	37.8	30.6
Others	-	61.2	45.9
R.M.S. deviations			
Bond lengths (Å)	0.01	0.01	0.01
Bond angles (°)	0.71	1.05	1.06
Ramachandran plot statistics (%)			
Favored regions	92.3	98.5	97.3
Allowed regions	6.9	1.5	2.7
Disallowed regions	0.8	0.0	0.0

The values in parentheses are for highest resolution shell.

表 2-2. DrSecDF の回折データセットの統計値および構造精密化の統計値

2.3.3 DrSecDF の構造

$P2_1$ の 4.0 Å 分解能の結晶構造では、N 末端側の 2 アミノ酸残基と C 末端側の His タグと 10 アミノ酸残基を除く DrSecDF29-758 のアミノ酸残基を配置できた。

DrSecDF は Tsukazaki *et al.* , 2011 で報告された TtSecDF の全長構造 (PDB ID 3AQP)と同様に、12 回膜貫通領域 (TM1-12)およびペリプラズム側に突出した P1 head, P1 base, P4 ドメインを保持していた(図 2-4A オレンジ). 膜貫通領域および P1 base, P4 の配置は以前に報告された SecDF (PDB ID 3AQP)の構造によく似ていたが、ペリプラズム領域に突出した P1-head の配向が、3AQP では内膜に近づいた状態 (F 型)であったのに対し、DrSecDF では約 100°C 回転し、膜貫通領域の真上に位置する状態を取っていた. このコンフォメーションは、TtSecDF の部分構造 (PDB ID 3AQO)から提唱された”I 型”のコンフォメーションと非常によく似ており、DrSecDF は結晶中で安定な I 型をとると考えた。

しかし、4.0 Å 分解能の結晶構造では SecDF の詳細な機能メカニズムに迫ることは困難であった. 構造の揺らぎを示す温度因子 B factor を確認すると、膜貫通領域に比べ、P1 head で高い値が見られた. このことから、フレキシブルな P1 head の配向が結晶中で完全に一致していないため、分解能が上がらないのではないかと考え、P1 head の配向を固定する変異体を作製することとした。

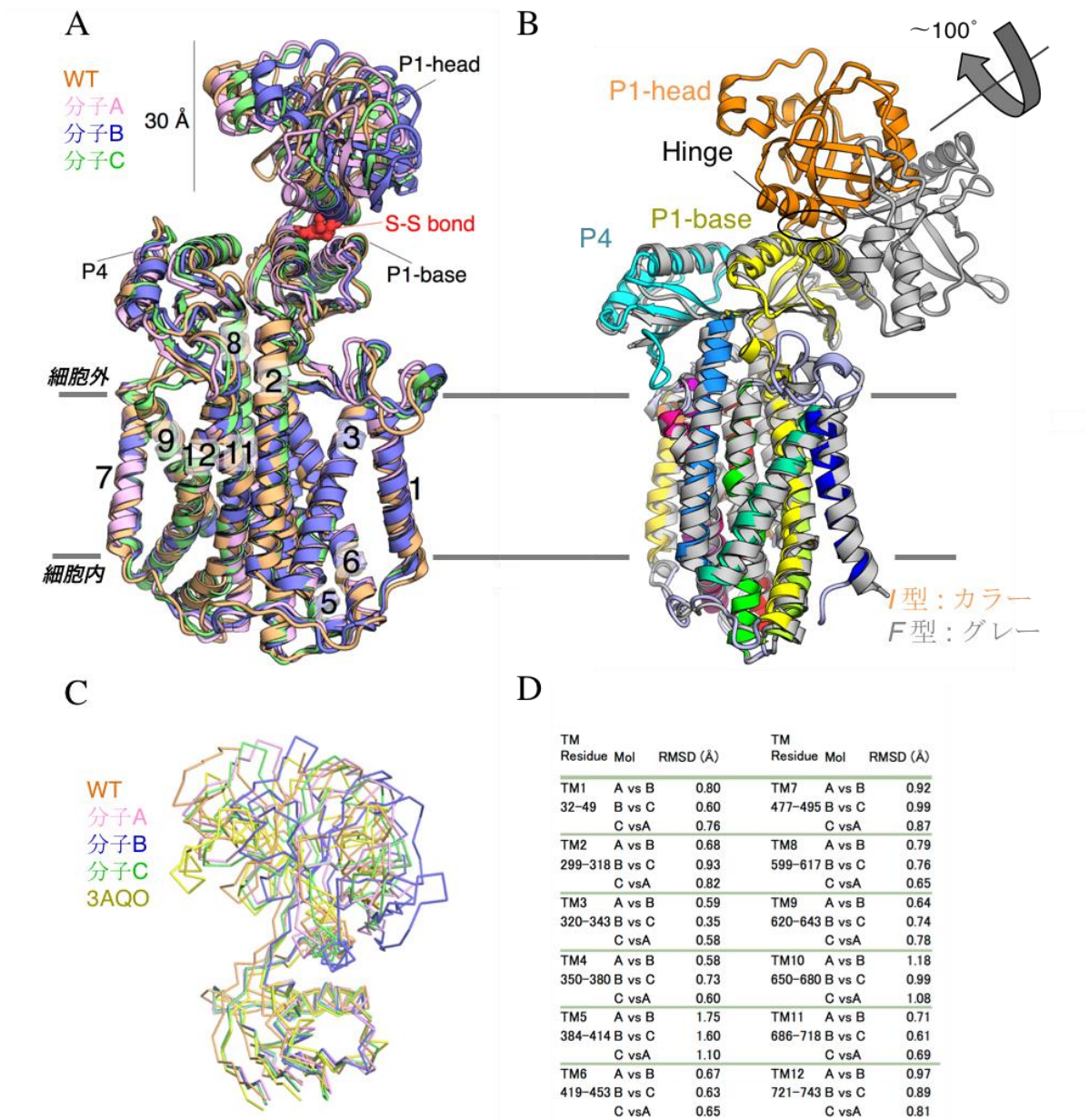


図 2-4. 本研究で決定した DrSecDF 構造の比較

A. 本研究で決定した DrSecDF 構造 (WT:オレンジ, 分子 A:ピンク, 分子 B:紫, 分子 C:オレンジ)の TM7-12 に基づいた重ね合わせ. 変異体のジスルフィド結合は赤で示した.

B. F 型 SecDF (TtsecDF (PDB ID : 3AQP), グレー)と I 型 SecDF (分子 B, カラー)の TM7-12 に基づいた重ね合わせ. I 型から F 型への P1-head の回転を矢印で示した.

C. P1 部分 (WT:オレンジ, 分子 A:ピンク, 分子 B:紫, 分子 C:オレンジ, TtSecDF の部分構造(PDB ID : 3AQO))の重ね合わせ. P1-head の配向はそれぞれの構造でやや異なっている.

D. 分子 A, B, C 間の膜貫通領域の RMSD.

2.3.4 変異体 DrSecDF の発現・精製・結晶化

DrSecDF_{Met-28-768-His8} の構造では、P1-head は P1-base と接近していた (図 2-4A)。このコンフォメーションをより安定化するため、P1-head と P1-base をジスルフィド結合により架橋する変異体 DrSecDF (I143C, L268C)_{Met-28-768-His8} を作製した。DrSecDF_{Met-28-768-His8} と同じ条件で発現、精製を進め、DrSecDF (I143C, L268C)_{Met-28-768-His8} の精製物を得た (図 2-5A, B)。SDS-PAGE の結果、DrSecDF (I143C, L268C)_{Met-28-768-His8} のバンドは WT に比べ移動度が異なっていたことから、精製中にほぼ 100%ジスルフィド結合が形成されたと考えた。終濃度 20 mg/ml の精製サンプルを用いて初期スクリーニングを行い、微結晶が得られた。結晶化条件の最適化を進め、2.2.4 の条件 2 で最大で長辺約 50 μm 、短辺約 20 μm の結晶を取得し(図 2-5C)、条件 3 で最大で約 120 μm 、短辺約 50 μm の結晶を取得した(図 2-5D)。

2.3.5 変異体 DrSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化

得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において 1.0 \AA の波長を用いて X 線回折実験を行なった。条件 2 で得られた結晶から最終的に、2.8 \AA 分解能の回折データセットが得られた。空間群は $P2_12_12_1$ であった。また、条件 3 で得られた結晶からは 2.6 \AA 分解能の回折データセットが得られた。空間群は $C2$ であった。得られた回折データセットの統計値は表 2-2 に示した。

回折データに対して、WT と同様の手法で分子置換による初期位相の決定と手動でのモデル構築ならびに精密化を行なった。 $P2_12_12_1$ の構造は分解能 2.8 \AA で $R_{\text{work}} = 21.2$, $R_{\text{free}} = 26.8$ (%)まで、 $C2$ の構造は分解能 2.6 \AA で $R_{\text{work}} = 20.3$, $R_{\text{free}} = 25.8$ (%)まで精密化することができた(表 2-2)。

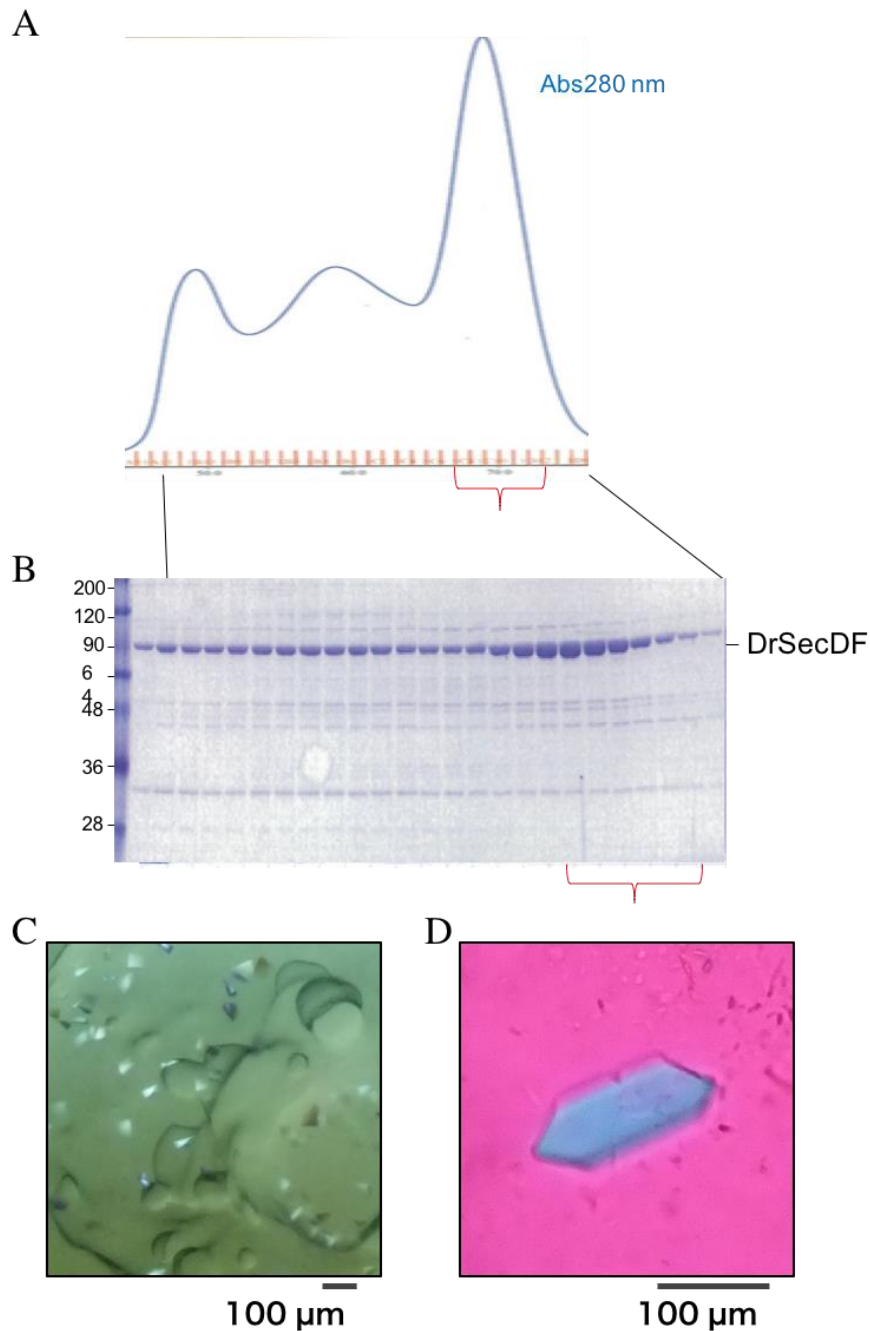


図 2-5. ダブルシステイン変異体 DrSecDF の精製，結晶化

A. 最終精製段階のゲル濾過クロマトグラフィーのスペクトル。回収し，結晶化に用いた部分を赤で示した。

B. ゲル濾過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE . 回収し，結晶化に用いた部分を赤で示した。

C. 40% PEG200, 100 mM Na-citrate pH 6.6 and 100 mM LiSO₄ のリザーバ溶液にて得られた変異体 DrSecDF の結晶。

D. 41% PEG200, 100 mM Na-citrate pH 5.9 and 100 mM NH₄NO₃ のリザーバ溶液にて得られた変異体 DrSecDF の結晶。

2.3.6 変異体 DrSecDF の構造概要と構造比較

空間群 $P2_12_12_1$ の構造は、非対称単位あたり 2 分子存在した。それぞれの分子は部分的に異なった構造を示し、それぞれ分子 A, 分子 B とした。分子 A では DrSecDF28-760, 分子 B でも DrSecDF28-761 のアミノ酸残基を配置することができた。空間群 $C2$ の構造は、非対称単位あたり 1 分子存在した。分子 C では DrSecDF28-760 のアミノ酸残基を配置することができた。分子 A, B, C では 3AQP と比べ分解能が向上しており、ほぼすべてのアミノ酸側鎖の向きを判別することができた (図 2-6)。変異体 SecDF の構造は変異導入前の $P2_1$ の構造と非常によく似た I 型のコンフォメーションをとっていたため(図 2-4A), 以降の解析はこれらの変異体 SecDF の構造に基づいて進めた。分子 A, B, C の P1-head はいずれも I 型のコンフォメーションを示したものの, 分子間で P1-head の配置はわずかに異なっていた (図 2-5A, C)。これは, P1-head と P1-base をつなぐループが持つ柔軟性の影響であると考えられる。代表例として, F 型(3AQP)と I 型(分子 B)の比較を図 2-4B に示した。

分子 A, B, C の中で, 分子 B は分子 A, 分子 C には見られない構造的特徴として, TM5 の動きにより形成された膜貫通領域内部のトンネル構造を示した (図 2-7)。まずはこのトンネル構造に注目して研究を進めた。

2.3.7 膜貫通領域のトンネル構造

構造決定した I 型 SecDF の中で, 分子 B には, 膜貫通領域の内側に, 内膜を貫通するトンネル構造が存在していた(図 2-7, 2-8, 2-9)。このトンネルは分子 A や分子 C, F 型 SecDF では認められなかった。分子 B のこのトンネルは TM4, 5, 6, 10 によって形成されており, TM5 が分子 A, C と比較して最大で 4 Å 外側に移動することにより形成されていた。分子 A, B, C 間で膜貫通ヘリックスの RMSD を比較したところ, TM5 で最も大きな動きが見られた (図 2-4D)。この部位では結晶中の分子間相互作用は認められず, トンネルの形成は結晶パッキングの影響ではないと考えられた。このトンネルの中心には生物種間で高度に保存されたアスパラギン酸が存在しており, トンネルの中心は負電荷を帯びていた。以前の研究からこのアスパラギン酸は SecDF によるタンパク質膜透過活性及びプロトン輸送活性に必須であることが報告されている(Tsukazaki *et al.* , 2011)。また, 分子 A, B, C の膜貫通領域サイトプラズム側には複数の水分子が存在しており, 分子 B では貫通したトンネル内部に水分子由来と思われる電子密度が認められた(図 2-8B)。

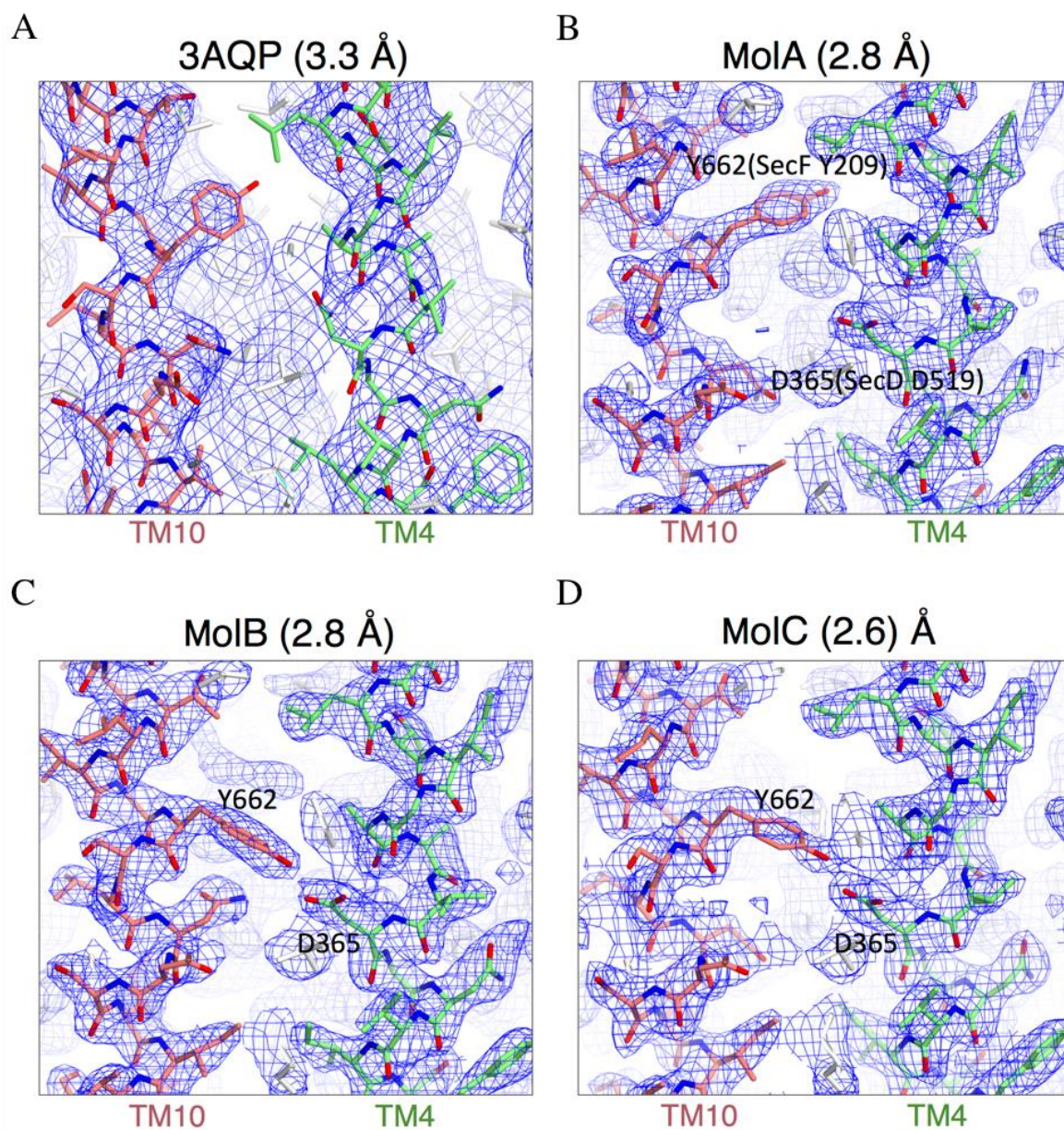


図 2-6. 構造精密化後の 2Fo-Fc マップ($\sigma=1.5$)

構造精密化後の TM4 と TM10 の拡大図. DrSecDF の機能に重要な D365 と Y662 部分を拡大した.

A. F 型 TtSecDF (PDB ID : 3AQP)

B. 分子 A

C. 分子 B

D. 分子 C

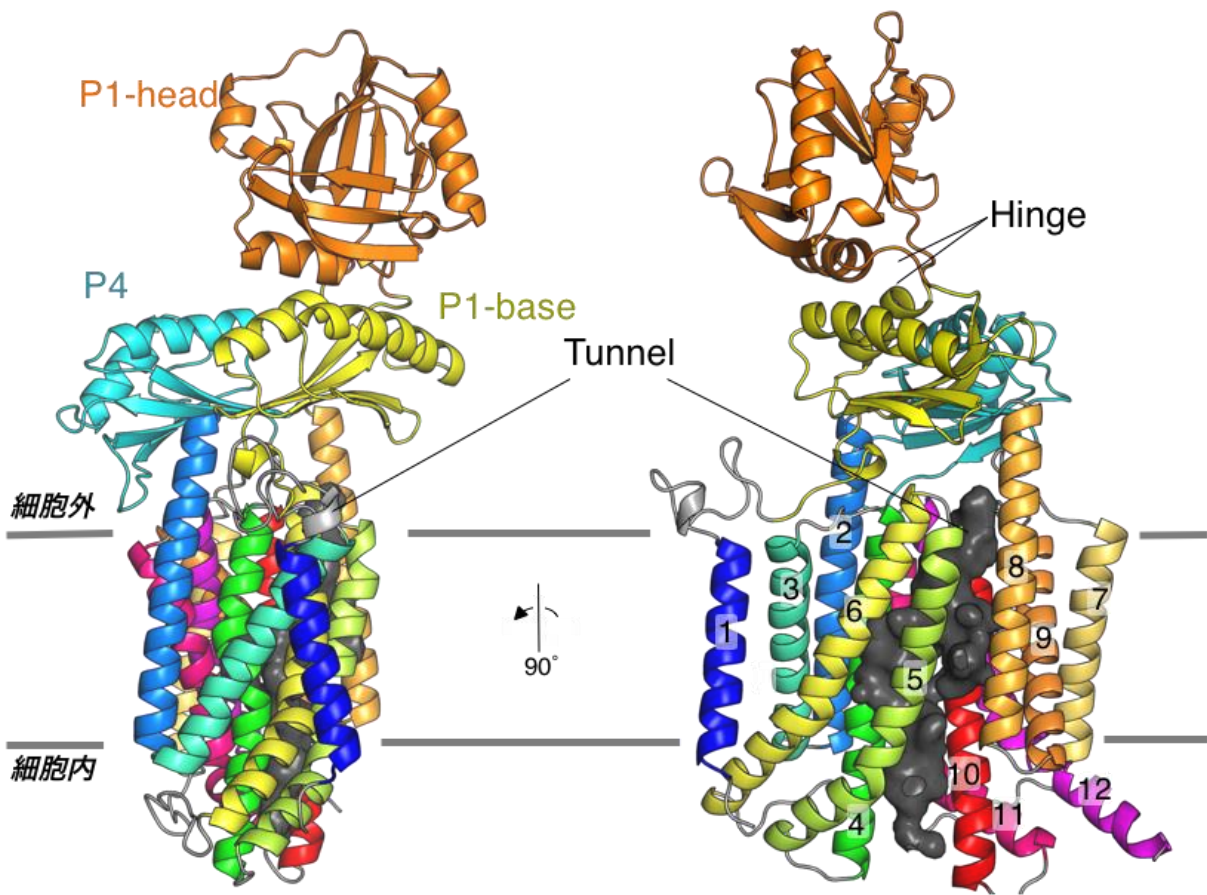


図 2-7. I型 SecDF (分子 B)のトンネル構造

分子 B の構造を膜側から見た図。膜貫通領域へリックスの番号を示した。膜貫通領域のトンネル構造を黒で示した。

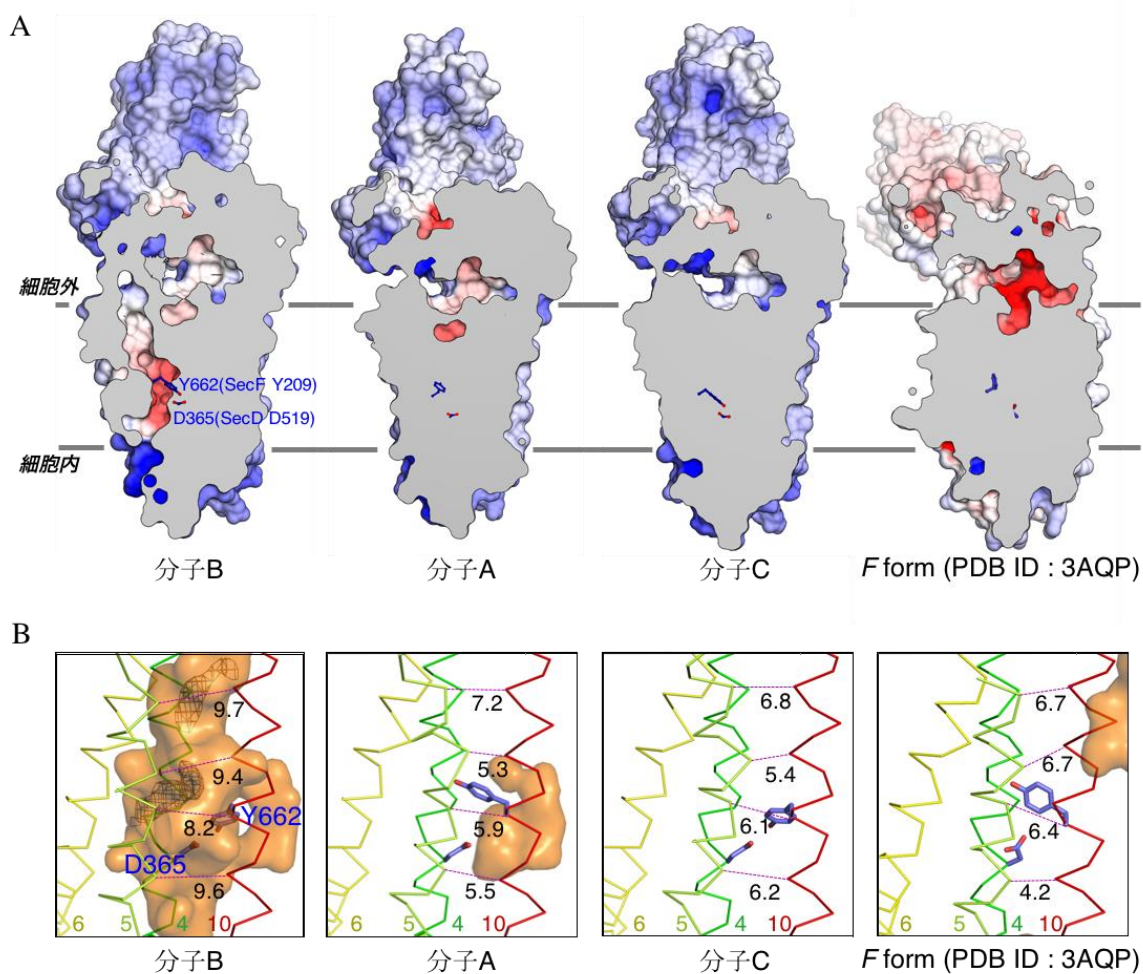


図 2-8. 膜貫通領域のトンネル構造

A. SecDF 表面モデルの断面図. 静電ポテンシャル (+10 kT/e:青, -10 kT/e:赤)で色分けした. 保存された D365 と Y662 をスティックモデルで示した. 相当する EcSecD, F のアミノ酸番号を括弧内に示した.

B. 膜貫通領域の拡大図. トンネル部分を透過度 40% の表面モデル (オレンジ) で示した. TM5, 10 の $C\alpha$ 間の距離を示した. 分子 B では TM5 がシフトすることによりトンネルが形成されている. 分子 B のトンネル内部に認められた水分子由来と思われる Fo-Fc 電子密度マップ (2.0σ) を黒で示した.

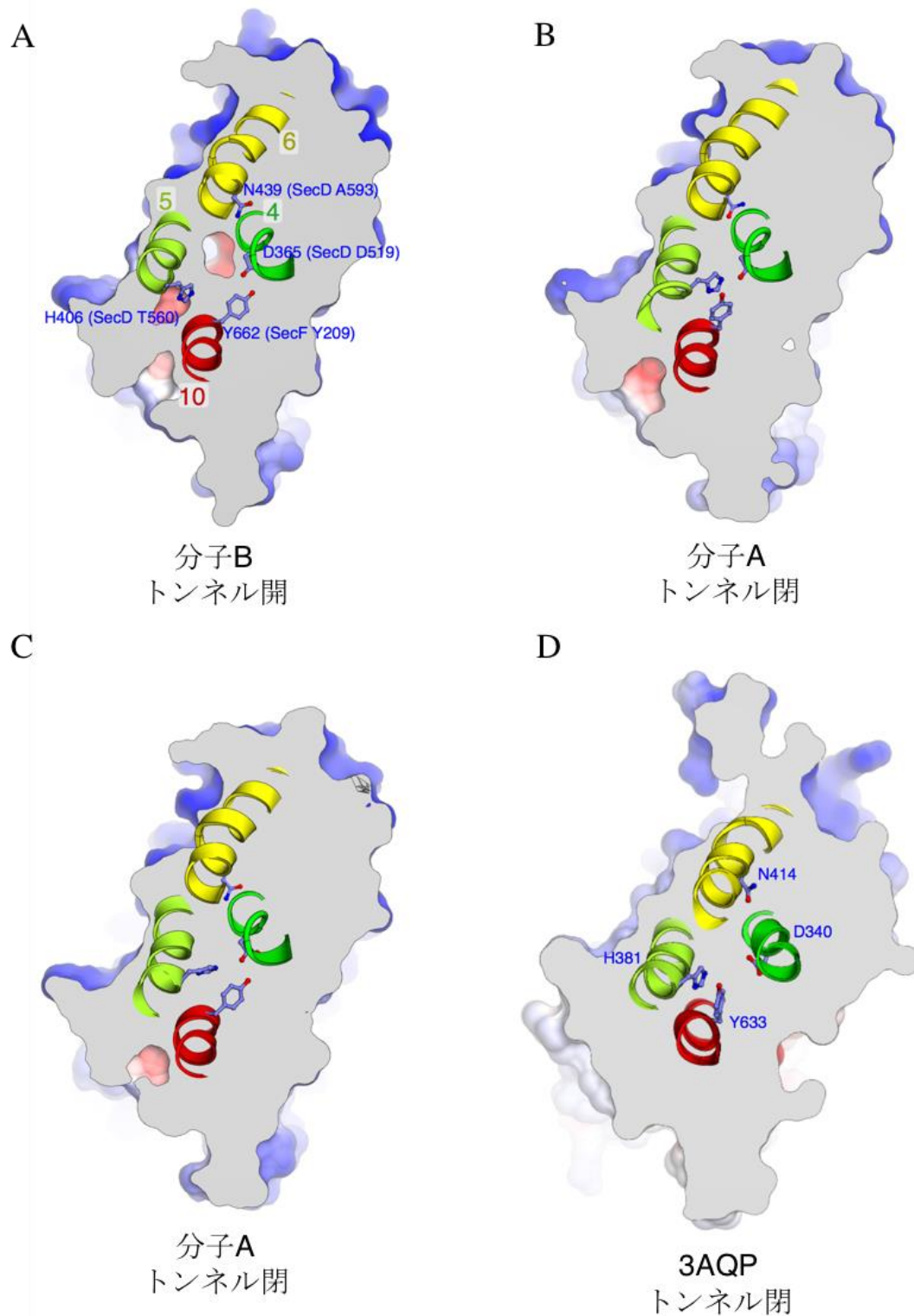


図 2-9. 膜貫通領域のトンネル構成

細胞外側から見た D365 を含む平面での SecDF の断面図。A. 分子 B, B. 分子 A, C. 分子 C, D. F 型 TtSecDF (PDB ID : 3AQP). 分子 B にのみトンネル構造が見られる。断面に存在するアミノ酸残基を示した。相当する EcSecD, F のアミノ酸番号を括弧内に示した。

2.3.8 アスパラギン酸 365 のプロトン化状態の変化とトンネル構造の形成

このトンネルの形成メカニズムを明らかにするため、最も高分解能の構造である分子 C を用いてコンピュータ上での分子動力学 (MD)シミュレーションをおこなった。シミュレーションに先立ち、P1-head 安定化のために導入した I143C, L268C 変異を WT の配列に戻した。そしてコンピュータ上で SecDF を脂質膜中に再構成し、外部環境を水分子で満たした。シミュレーションではトンネル中心の TM4 に存在する SecDF の機能に必須のアスパラギン酸 (D365)に注目した。通常アスパラギン酸側鎖の pKa は 3.9 程度であるが、pKa 予測ツールである PROPKA によると D365 の pKa は周囲の環境により 7.5 程度になっていると予想された。この pKa から、生体内で D365 はプロトン化/脱プロトン化状態の両方で存在することが考えられた。そこで、D365 をプロトン化/脱プロトン化させた状態で MD シミュレーションを行ない、TM5 の動きを調べた。このシミュレーションでは、SecDF を脂質膜中に再構成したのち、外部環境を水分子でみたした。プロトン化状態では、TM5 に目立った動きは認められなかった。一方脱プロトン化状態では、TM5 はトンネルが認められた分子 B と同様の方向に最大で 2.4 Å 外側への移動し、それに伴いトンネルの形成が認められた (図 2-10)。さらに、水分子がこのトンネルの内部に入り込み、水素結合を介してサイトプラズムからペリプラズムまで一列に並ぶ様子が観察された(図 2-11)。D365 が SecDF のプロトン透過活性に必須であることから、トンネル内に侵入した水分子を介してプロトンが流入することが示唆された。以前に報告されたパッチクランプアッセイでは一度のオープン状態で高いチャネル電流が観察されていることも、プロトンが水分子を介して一度に多数流入することを支持している (Tsukazaki *et al.* , 2011)。D365 の脱プロトン化は、周囲の水素結合ネットワークを変化させ、水分子のトンネルへの侵入を誘引し、トンネル形成を促進するのかもしれない。詳細なエネルギー伝達方法は不明であるが、このトンネルを介したプロトン流入に伴うエネルギーが、SecDF の機能サイクルを駆動することが考えられた。

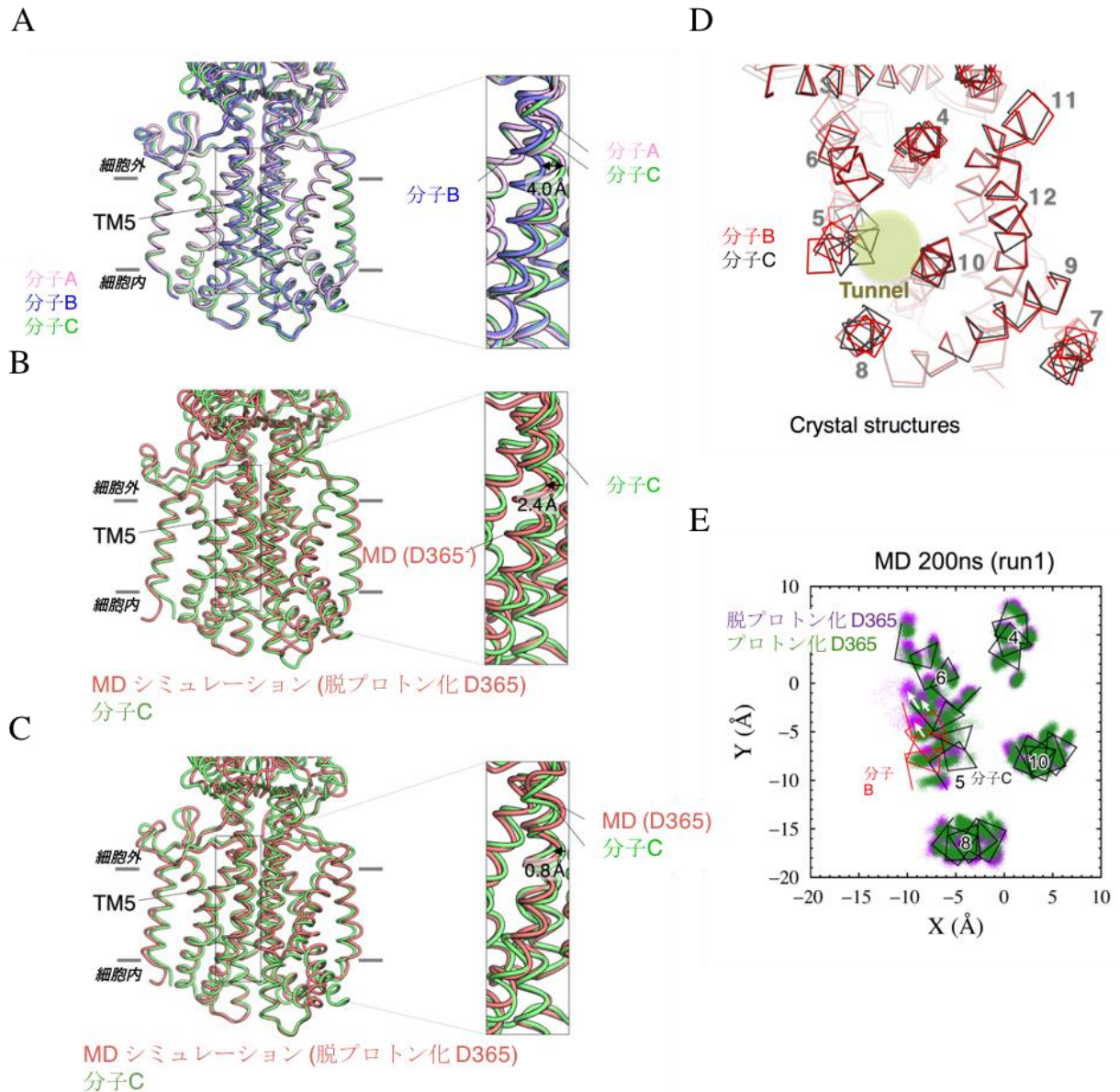


図 2-10. D365 のプロトン化状態の変化によるトンネル構造の開閉

A. 分子 A, B, C の膜貫通領域に基づく重ね合わせ (左). TM5 の拡大図 (右). 分子 C と分子 B の S409 の Ca 原子間の距離を示した. 分子 B では TM5 がシフトすることによりトンネルが形成されている.

B. 分子 C の D365 脱プロトン化状態の MD シミュレーションでの構造 (赤)

C. 分子 C の D365 プロトン化状態の MD シミュレーションでの構造 (赤)

D. ペリプラズム側から見た分子 B と分子 C の結晶構造比較. 分子 B を赤, 分子 C を黒で示した. 分子 B の TM5 と TM10 の間に形成されるトンネルを示した.

E. MD シミュレーションでの TM4, 5, 6, 7, 10 の Ca 原子の軌道. D365 脱プロトン化状態の MD シミュレーションを紫, D365 プロトン化状態の MD シミュレーションを緑で示した.

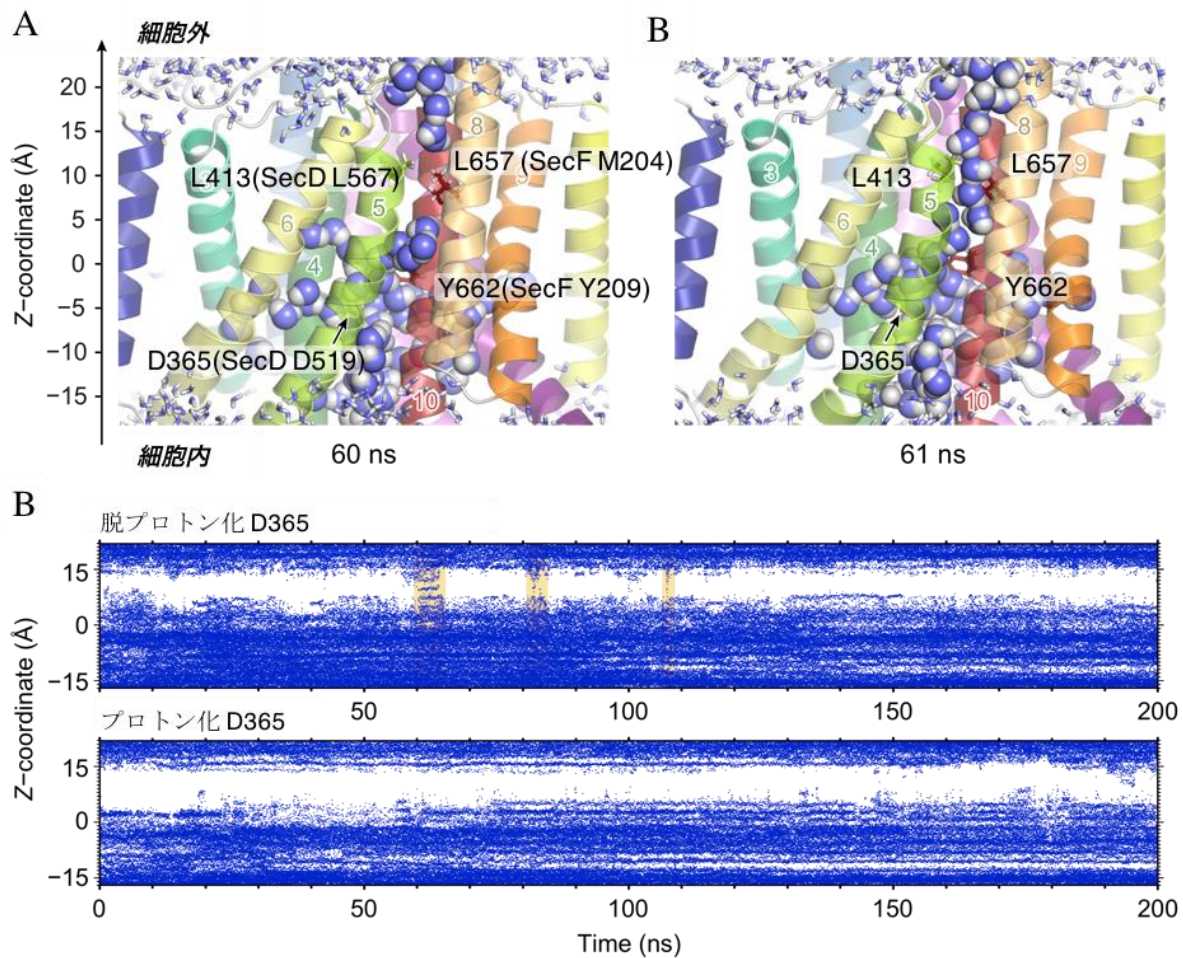


図 2-11. 水素結合を介してトンネル内に並ぶ水分子

A. 分子 C の D365 を脱プロトン化した状態での膜貫通領域の MD シミュレーションのスナップショット. トンネルに進入した水分子を示した. 60 ns (左), 61 ns (右). 61 ns では水分子が水素結合を介して細胞内から細胞外までつながっている. 保存された D365 と Y662、トンネルで水分子の侵入を制限しているように見える L413 と L657 をスティックモデルで示した.

B. シミュレーションにおける水分子の分布. D365 脱プロトン化状態 (上), D365 脱プロトン化状態 (下). 黄色のハイライトで水分子がトンネル内に連なった部分を示した.

2.3.9 トンネル内部のチロシン 662 の機能解析

D365 の近傍の TM10 には、同じく SecDF に高度に保存されたチロシン(Y662)が存在していた。Y662 は、分子 A, B, C 間で 2 つの異なるコンフォメーションを示した(図 2-6, 8)。Y662 は分子 B, C では D365 と相互作用していたのに対し、分子 A では D365 から乖離していた。Y662 の機能的な重要性を検証するため、DrSecDF Y662 に対応する大腸菌 SecD Y209 の変異体を用いた生育相補実験を行った(図 2-12A)。生育試験には、ゲノム中の *secD* 遺伝子に変異が導入され、SecD, SecF の発現が著しく低下し 20°C で生育ができない大腸菌株 *secD1* (Cs)を用いた。この株に、N 末端側に HA タグを付加した SecD, SecF を発現する各種プラスミドを導入し、生育が相補されるかを調べた。その結果、すべてのアミノ酸変異体で生育相補活性の著しい低下が認められたが、SecD Y209F 変異体のみわずかに生育相補活性を示した。

続いてより詳細な機能への影響を調べるため、タンパク質膜透過アッセイおよびプロトン透過アッセイを行なった(図 2-12B, 2-13B)。タンパク質膜透過アッセイでは、大腸菌 SecD, SecF を発現する各種プラスミドを導入した大腸菌株 *secD1* (Cs)を対数増殖期まで培養し、³⁵S メチオニンを用いて 1 min ラベル化を行った。その後、SecDF により膜透過が促進される内在性タンパク質であるマルトース結合タンパク質 (MBP)と外膜タンパク質 A (OmpA)を、それぞれ α -MBP 抗体、 α -OmpA 抗体を用いて共免疫沈降した。ラベル化されたタンパク質は SDS-PAGE により分離し、放射性同位体シグナルを検出した。プロトン透過アッセイでは、大腸菌 BL23 (DE3)株を、SecDF (Met-28-768)を発現する各種プラスミド と、pH に依存して蛍光強度が変化するタンパク質である pHluorin(M153R)発現プラスミドを用いて形質転換し、細胞内 pH を測定した。SecDF がプロトン透過活性を保持していれば、プロトンが細胞内へと流入し、細胞内 pH は低下する。

いずれの結果でも、SecD Y209F 変異体は WT に近い活性を示したのに対し、その他の変異体は著しい機能不全を示した。SecD Y209F で生育試験とタンパク質膜透過及びプロトン透過アッセイの結果が異なるのは、生育条件の違いや過剰発現によるものかもしれない。続いて、D365 のプロトン化状態の違いが Y662 の挙動に影響を与えるかを調べるため、MD シミュレーションを行った(図 2-12C, D)。その結果、D365 のプロトン化状態に関係なく、Y662 は分子 B, C と分子 A で見られた 2 つのコンフォメーションを取ることが示された。

当初は Y662 と D365 の水素結合を介した相互作用が重要ではないかと考えたが、Y662F 変異体が生育試験やタンパク質膜透過活性測定、プロトン透過活性測定で最低限の活性を持つこと、MD シミュレーションにて D365 のプロトン化状態に関係なく、Y662 の側鎖の配向が変化することを考慮すると、Y662 の側鎖の芳香環がトンネル内に適切な空間をもたらすことが SecDF 活性に重要であることが考えられた。

2.3.10 ヘッドドメインの動きとプロトン透過との相関

これまでの研究から, SecDFはプロトン透過に伴い P1-head が構造変化を起こし, タンパク質膜透過を促進すると考えられてきた. しかし, プロトン透過と P1-head の動きの連動性はよくわかっていなかった. そこで, 結晶化に用いたジスルフィド結合による P1-head の動きを制限した変異体 SecDF (I143C, L268C)を大腸菌で発現させ, プロトン透過活性を調べた(図 2-13). 酸化条件でジスルフィド結合を誘導すると, SecDF (I143C, L268C)のプロトン透過活性は著しく低下した. 一方, 還元剤 DTT を加えてジスルフィド結合を切断すると, WT と同等のプロトン透過活性を示した. これらの結果から, 詳細なメカニズムは不明であるが, プロトン透過と P1-head の動きの相関が強く示唆された.

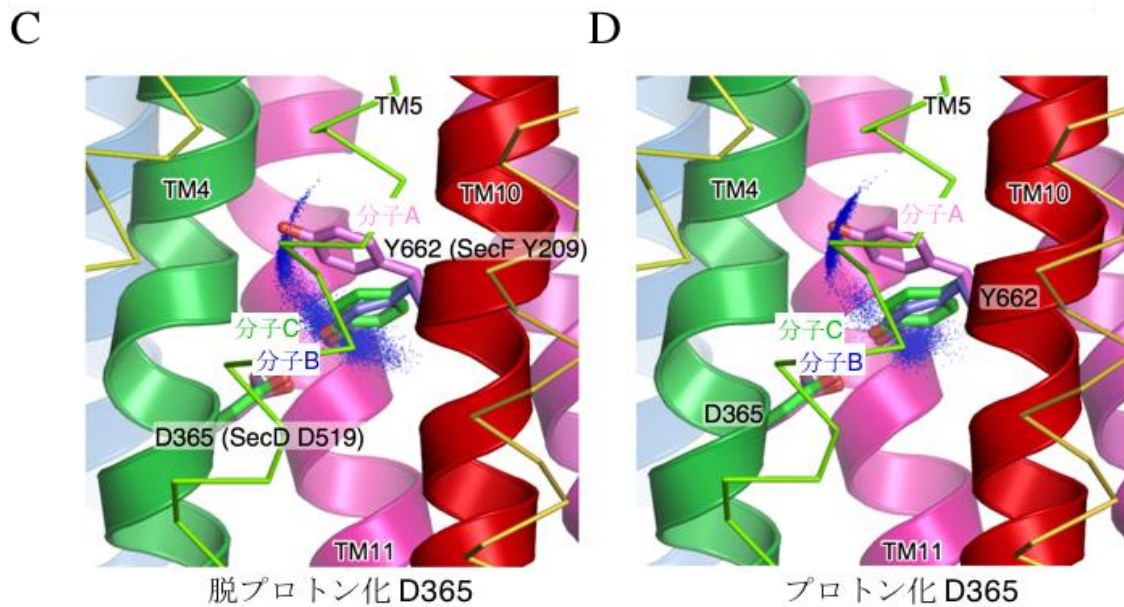
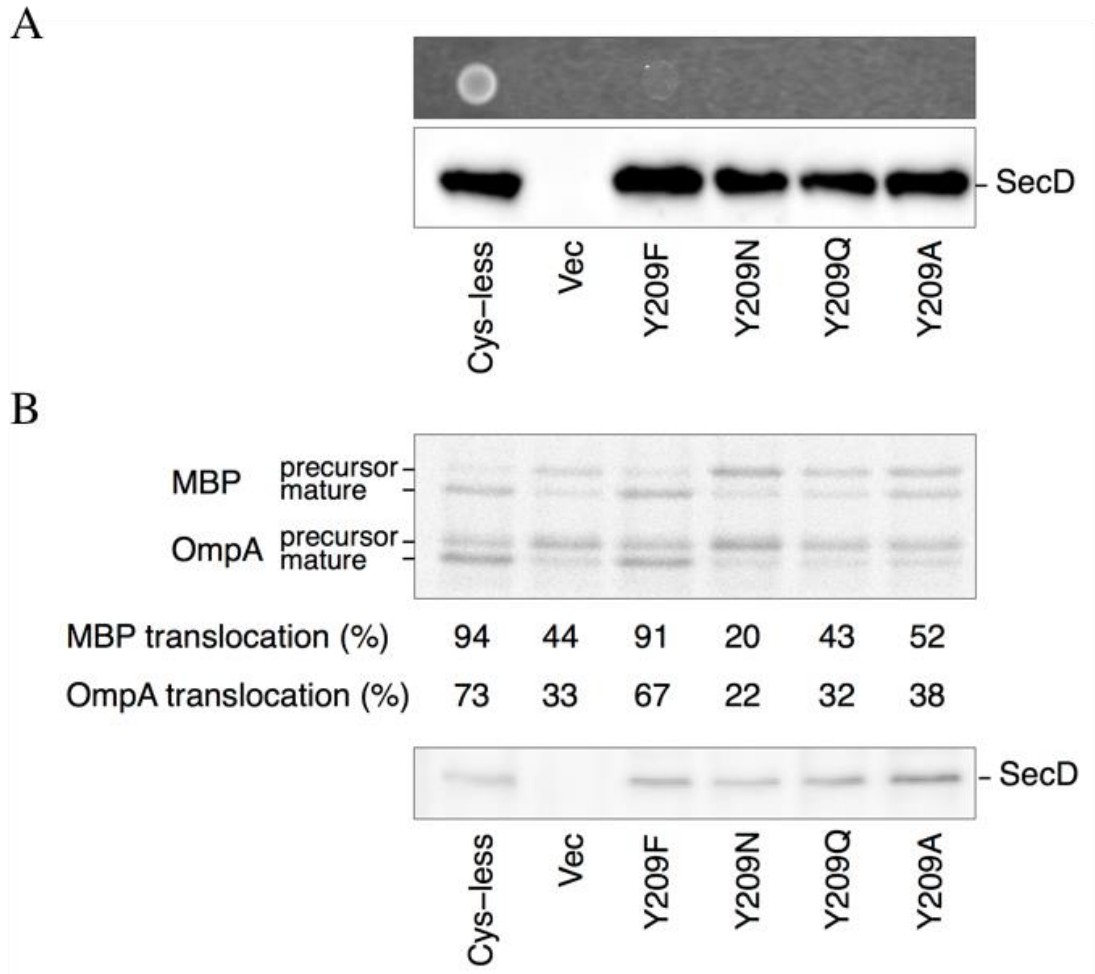
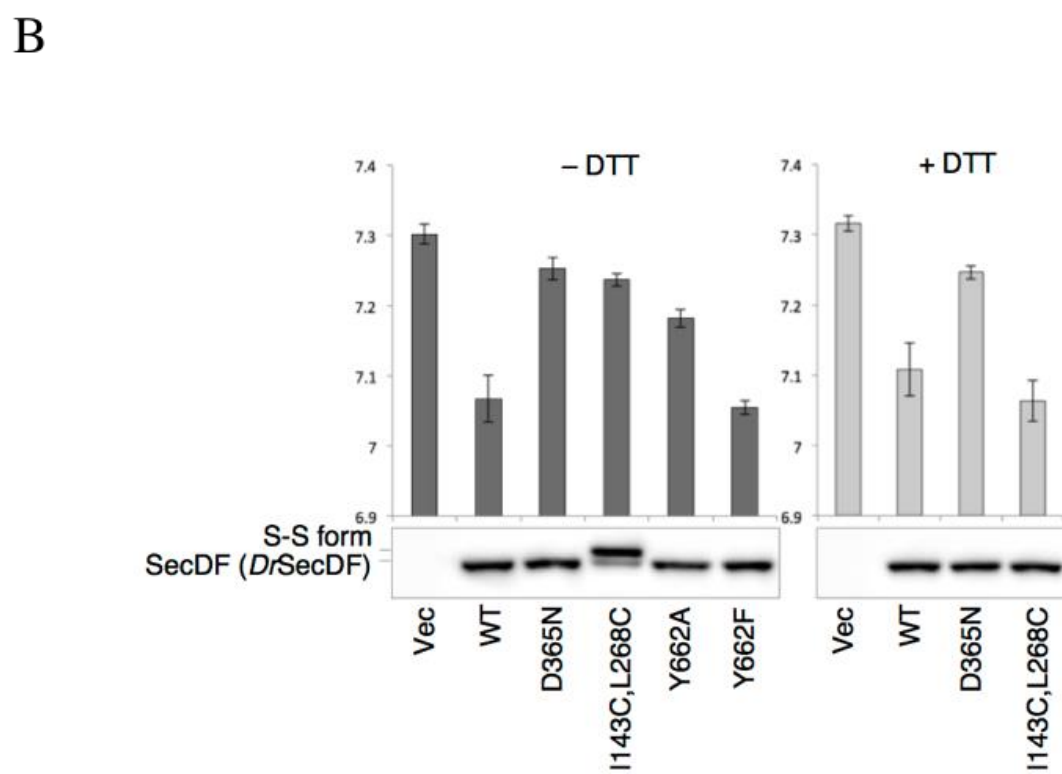
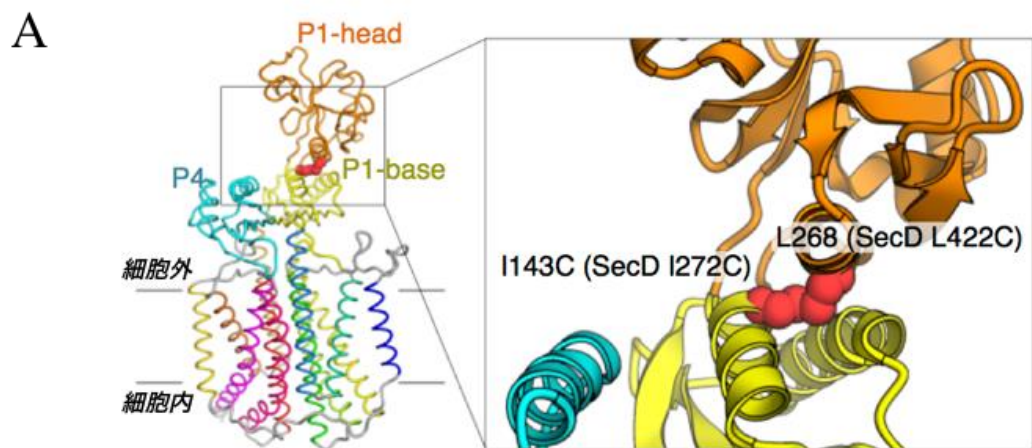


図 2-12. Y662 の機能解析

A. DrSecDF Y662 に相当する EcSecF Y209 変異体を用いた大腸菌の生育相補実験. Y209F 変異体のみがわずかに生育相補活性を示した.

B. EcSecDF 変異体を用いたタンパク質膜透過アッセイ. 膜透過タンパク質として、³⁵S メチオニンを用いてラベルされた MBP と OmpA を用いた. MBP と OmpA は膜透過時にシグナル配列が切断され、成熟タンパク質となる。成熟タンパク質の割合をタンパク質膜透過率とした (上). 各変異体 EcYidC 間で発現量に大きな違いがないことをウェスタンブロッティングにより確認した(下).

C. D. MD シミュレーション中の DrSecDF Y662 のコンフォメーション変化. 分子 A, 分子 B の Y662 を分子 C の結晶構造に重ねた. 200 ns の MD シミュレーションでの Y662 の側鎖の軌道を青点で示した (D365 脱プロトン化状態 (C), D365 プロトン化状態 (D)). MD シミュレーションにおいて, Y662 は結晶構造で見られたコンフォメーション遷移を繰り返した.



C

SecDF (<i>EcSecDF</i>)	Vec	WT	SecD(D519N)F	SecD(I272C, L422C)F	SecDF(Y209A)	SecDF(Y209F)	Vec	WT	SecD(I272C, L422C)F
MBP translocation (%)	17	94	21	34	52*	91*	17	93	76

図 2-13. P1-head の可動性とプロトン流入の相関

A. P1-head を固定するために導入したシステインの部位. 相当する EcSecD, F のアミノ酸番号を括弧内に示した.

B. DrSecDF を過剰発現する大腸菌の細胞内 pH を測定した. 測定には、pH に依存して蛍光強度が変化するタンパク質である pHluorin(M153R)を用いた。SecDF が活性を保持していれば低 pH を示す. エラーバーは標準誤差を示す. ジスルフィド結合を乖離させるためには還元剤である DTT を添加した.

C. 対応する大腸菌 SecD / SecF の変異体を用いたタンパク質膜透過効率を示した (Tsukazaki *et al.* , 2011). * Y209 突然変異体のタンパク質膜透過効率は図 2-12 で測定した.

2.3.11 P1-base と P4 の構造変化の重要性

トンネル形成に続くプロトン透過と P1-head の動きが連動するためには、膜貫通領域と P1-head をつなぐ 2 つのドメインである P1-base と P4 も構造変化を起こす必要があると考えられる。P1-base と P4 は共に 4 本の β -シートから構成されており、今回明らかとした SecDF の結晶構造では境界面に存在する β -シートが水素結合を介して相互作用していた。一方、2014 年に報告された電子線トモグラフィーによる SecDF の全長低分解能構造 (Mio *et al.* , 2014) では、詳細な構造変化は不明であるが P1-base と P4 が乖離した様子が観察されている。

P1-base と P4 の結合・乖離が SecDF の機能に重要な役割を調べるため、DrSecDF の P1-base と P4 のインターフェース (R258, E585) に相当する大腸菌 SecD, SecF の部位をシステインに置換した変異体 SecD (R439C), SecF (E132C) を作製し、ジスルフィド結合による P1-base と P4 固定した条件での生育試験を行った (図 2-14A, B)。pH 7.0 での培養ではジスルフィド結合はわずかに形成されたが、生育相補活性の低下は認められなかった。しかし、pH9.0 で酸化剤である硫酸鉄を含む培地で培養したところ、50%程度の SecD, SecF がジスルフィド結合を形成し、生育相補活性の顕著な低下が認められた。

続いて、この変異体を用い、タンパク質膜透過実験を行った。この実験は M9 培地を用いて行い、この条件ではほぼすべての SecD (R439C), SecF (E132C) がジスルフィド結合を形成した (図 2-14C)。ジスルフィド結合を形成した条件ではタンパク質膜透過活性は空ベクターよりも低くなっており、SecD (R439C), SecF (E132C) はドミナントネガティブ性を示した。一方、還元剤 DTT を加えてジスルフィド結合を切断すると、WT と同等のタンパク質膜透過活性を示した。これらの結果から、P1-base と P4 間を固定すると SecDF は活性を失い、P1-base と P4 間の乖離が SecDF の機能に必須であることが明らかとなった。これまでに示された P1-head のコンフォメーション変化、トンネル構造形成に伴う膜貫通領域の構造変化と合わせて、SecDF は、動力となる水素イオン流入に伴い膜貫通領域、P1-base, P4, P1-head 全てのドメインがダイナミックな構造変化を起こし、タンパク質膜透過を促進することが考えられた。

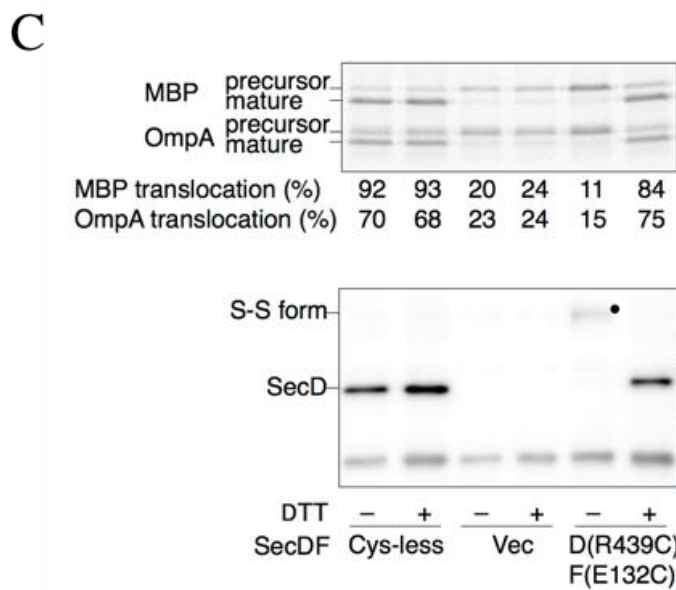
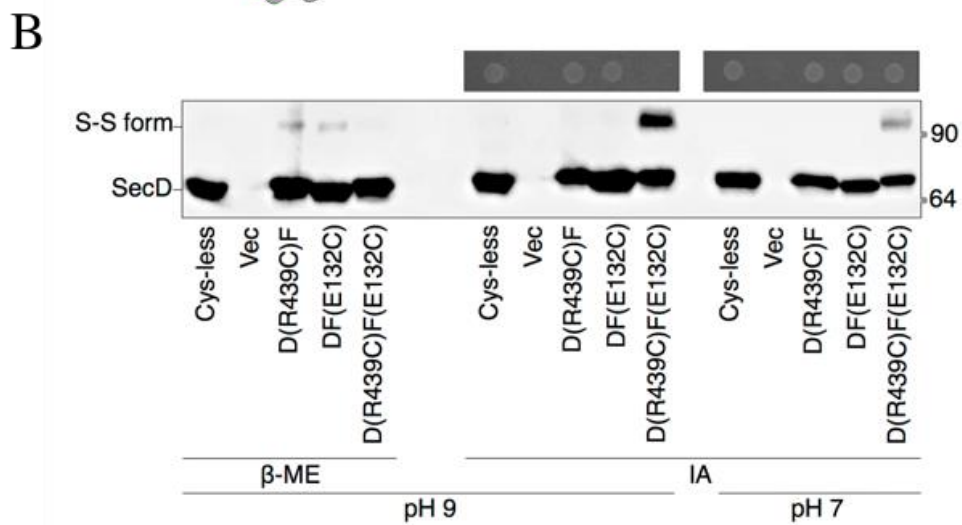
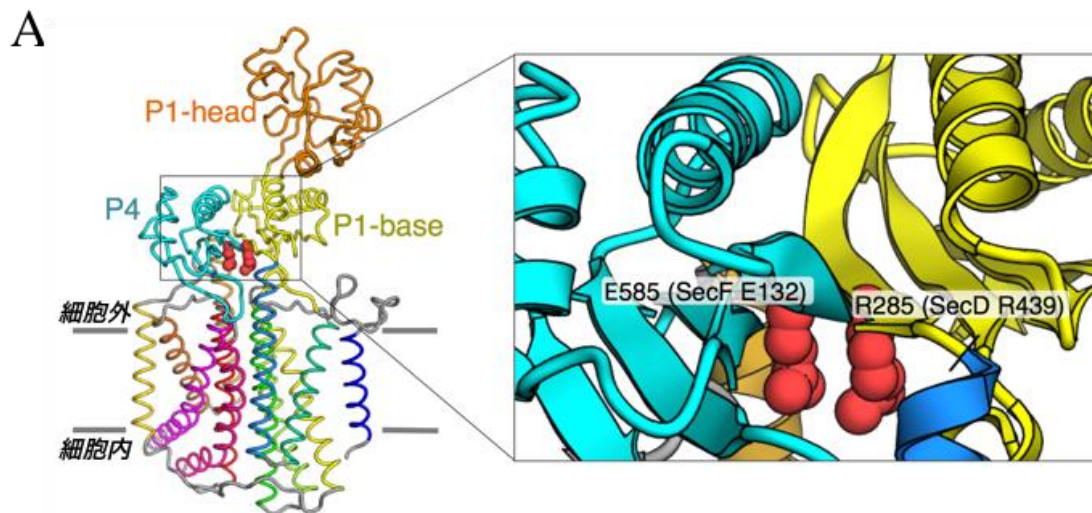


図 2-14. P1-base と P4 のダイナミズムの重要性

A. P1-base と P4 を固定するために導入したシステインの部位. 相当する EcSecD, F のアミノ酸番号を括弧内に示した.

B. DrSecDF Y662 に相当する EcSecD, F 変異体 を用いた大腸菌の生育相補実験. 非還元状態では SecD-SecF に相当するバンドが確認された。酸化剤である硫酸鉄を加えた条件では 50%程度の分子がジスルフィド結合を形成し, 生育相補活性の低下が認められた.

C. EcSecD, F 変異体を用いたタンパク質膜透過効率 (上). ジスルフィド結合形成効率 (下). この実験は M9 培地を用いて行い、この条件ではほぼすべての分子がジスルフィド結合を形成した。ジスルフィド結合を乖離させる条件では還元剤である DTT を添加した。ジスルフィド結合形成条件では, タンパク質膜透過効率が低下した.

2.3.12 別状態 SecDF の構造決定に向けた SecDF の発現・精製・結晶化

この実験で構造変化を起こすことが示唆されたP1-baseとP4は合わせて、8本の β シートから構成されている。この領域はこれまでに得られた結晶構造では安定した構造体に見えていた。しかし、2.3.11でP1-baseとP4のインターフェースが開裂する可能性が示された。そこで、この β シートの構造変化を見出すため、別状態の構造決定を目指すこととした。しかし、全長I型構造解明を目指した時とは異なり、どのような構造体が存在するのかの手がかりはなかった。

そこで、これまでと異なる条件で結晶を作製することで、異なる構造を見出すことができるのではないかと考えた。ここで、2011年に報告された好熱菌 *Thermus Thermophilus* (Tt)由来のF型SecDF (PDB ID 3AQP)に注目した。当時は膜タンパク質の結晶化法としてLCP法が現在ほど普及しておらず、F型SecDFの結晶は蒸気拡散法により取得された。このTtSecDFをLCP法により結晶化できれば別状態の構造が得られるのではないかと考え、TtSecDFのLCP法による結晶化の取り組みを開始した。

発現と精製は Tsukazaki *et al.* , 2011 と同一の方法で行い、終濃度 20 mg/ml の精製サンプルを得た (図 2-15A, B)。このサンプルを用いて初期スクリーニングを行った結果、微結晶が得られた。結晶化条件の最適化を進め、2.2.9 の条件 4 で最大で長辺約 250 μm 、短辺約 30 μm の結晶を取得した(図 2-15C)。

2.3.13 TtSecDF の X 線回折実験・位相決定・構造精密化

得られた結晶に対して SPring-8 BL32XU において 1.0 \AA の波長を用いて X 線回折実験を行なった。条件 4 で得られた結晶から最終的に、2.8 \AA 分解能の回折データセットが得られた。空間群は P1 であった。得られた回折データセットの統計値は表 2-2 に示した。

回折データに対して、TtSecDF (PDB ID 3AQP)の構造を用いた分子置換を行い、初期位相を決定した。その後手動でモデル構築を進めた。はじめ P1-head ドメイン及び膜貫通領域のモデルを配置することができたが、P1-base 及び P4 領域のモデルは配置することができなかった。そこで、P1-base 及び P4 領域は電子密度マップに手動で配置した。最終的に分解能 2.8 \AA で $R_{\text{work}} = 20.2$ 、 $R_{\text{free}} = 23.6$ (%)まで精密化することができた(表 2-2)。

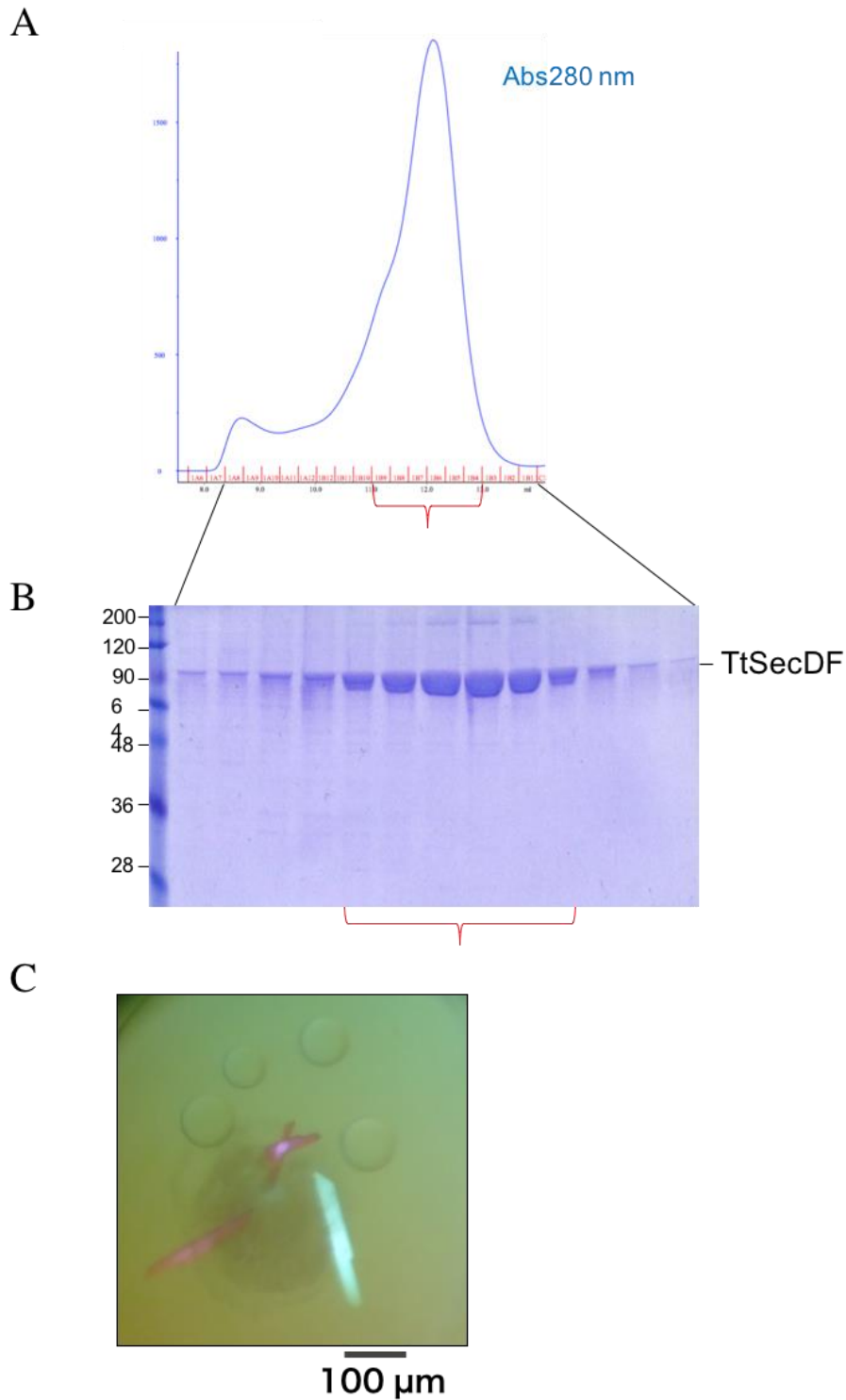


図 2-15. TtSecDF の精製，結晶化

A. 最終精製段階のゲル濾過クロマトグラフィーのスペクトル。回収し，結晶化に用いた部分を赤で示した。

B. ゲル濾過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE . 回収し，結晶化に用いた部分を赤で示した。

C. 50% PEG400, 100 mM Tris-HCl pH8.5, 100 mM KCl のリザーバ溶液にて得られた TtSecDF の結晶。

	TtSecDF (WT)
Data Collection	
Wavelength	1.0
Space group	<i>P</i> 1
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	55.2 65.6 80.0
α , β , γ (°)	75.1 75.2 80.8
Resolution (Å)	44.10-2.80 (2.90-2.80)
Unique reflections	25,693(2,574)
Total reflections	590,953
Completeness (%)	99.9 (99.9)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	8.2 (1.72)
Redundancy	23.0 (22.8)
CC(1/2)	98.7 (79.5)
Refinement	
Resolution (Å)	44.10-2.80 (2.90-2.80)
No. reflections	25,676
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.202/0.236 (0.279/0.344)
No. atoms	
Protein	5,631
Water	27
Others	132
<i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	47.5
Water	37.2
Others	72.8
R.M.S. deviations	
Bond lengths (Å)	0.003
Bond angles (°)	0.49
Ramachandran plot statistics (%)	
Favored regions	98.8
Allowed regions	1.2
Disallowed regions	0.0

The values in parentheses are for highest resolution shell.

表 2-2. TtSecDF の回折データセットの統計値および構造精密化の統計値

2.3.14 新規に決定した超F型 TtSecDF の構造

その結果、これまでに報告されていないSecDFの構造を決定することができた。新規に決定したTtSecDFの構造をとこれまでに報告されたSecDFの構造の比較を図2-16に示した。全体像として、膜貫通領域にトンネル構造は見られず、保存されたアスパラギン酸とチロシン側鎖は相互作用していなかった。膜貫通領域の大まかな配置はこれまでの構造と同じであったが、P1-headがF型よりも約90°捻れてさらに細胞膜方向に近づいて配置されていた。このP1-headのコンフォメーションは、F型よりもさらに前のステップの、SecYのポア上で出てくるタンパク質を捉える状態を模しているのかもしれない。この特徴から、本構造を「超F型 (Super membrane Facing form の略)」と呼ぶこととした。

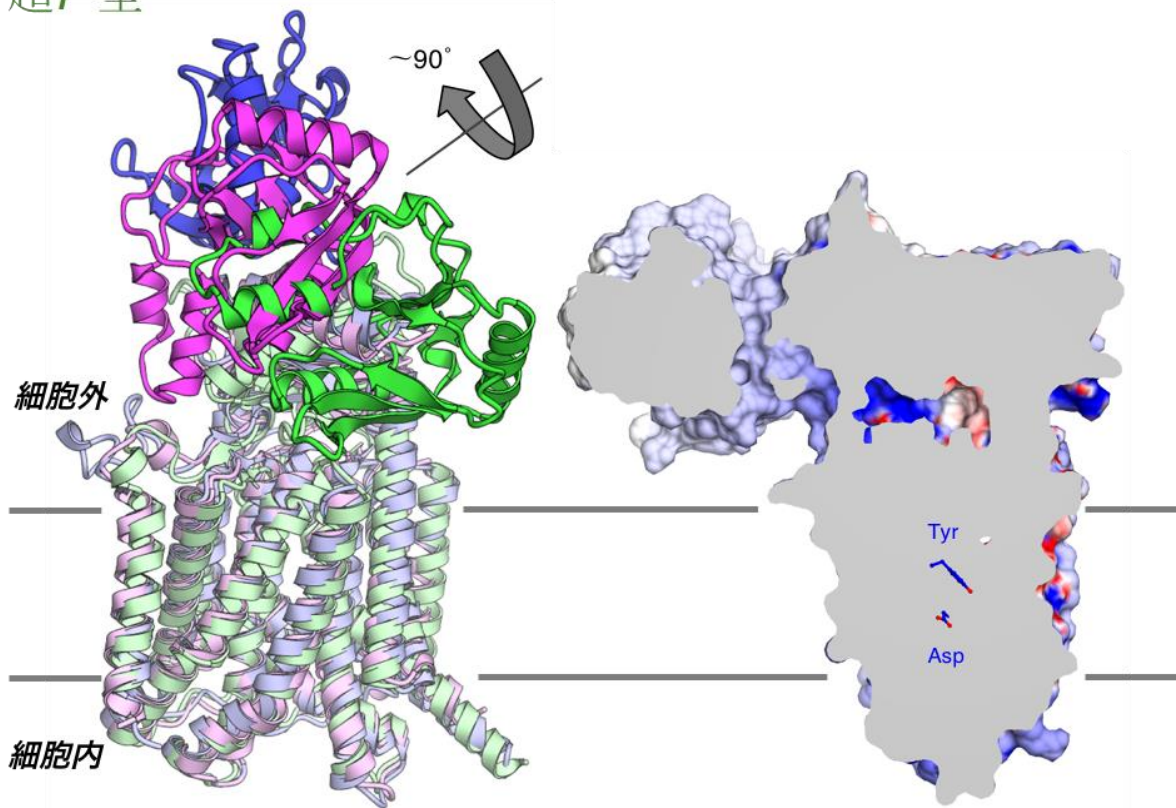
この超F型構造のペリプラズム領域には、以前の構造と比べてダイナミックな構造変化が見出された。これまでに報告されたすべてのSecDF構造ではβシートとなっていたP1-base及びP4領域がβバレルに組み変わっていたのである(図2-17)。P1-base及びP4の構造はF型とI型でほぼ同一であったため、以降は主に同一生物種由来であるF型SecDFとの構造比較を進めた。超F型のβバレルの内側は、βストランドから伸びた側鎖で埋められており、βバレル内部に空洞は形成されていなかった(図2-17B)。次に、βシートからβバレルへの構造変化の詳細を検証した。F型構造で示されていたβシートの順番を図2-18のように1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, とすると、超F型構造ではP1-baseとP4をつなぐβシート4, 5の間の水素結合が開裂し、新たにβシート1, 5及び4, 8間で新たに水素結合が形成されており、水素結合が組換わっていた(図2-18B)。この水素結合の組換えによりβバレル構造が形成されることが明らかとなった。P1-baseとP4間のインターフェースには、F型やI型では6本の水素結合が形成されていたが、超F型ではβシート1, 5及び4, 8間にそれぞれ2本の水素結合が形成されているのみであった(図2-18B)。超F型のP1-baseとP4のβバレル構造はF型やI型のβシート構造に比べて、エネルギー的にやや不安定なのかもしれない。

A

I型 (PDB ID : 5XAN 分子B)

F型 (PDB ID : 3AQP)

超F型



B

図2-16. 新たに決定した超F型SecDF 構造と他のSecDF構造の比較

A. 超F型 (緑), F型 (マゼンタ), I型 (緑)を、構造変化が少ない領域であるTM1, 5, 6, 7, 8, 9の構造に基づいて重ね合わせた. P1-headを濃色で示した. 超F型のP1-headはF型に比べ, 矢印方向に約90°回転して配置されていた. I型, F型, 超F型の順にP1-headが細胞膜に近づいて配置されている.

B. 図2-8Aと同一面で切断した超F型SecDFの断面図. 図2-8Aと同様に保存されたAspとTyrをスティックモデルで示した. 膜を貫通するトンネル構造は見られず, AspとTyrは離れて位置していた.

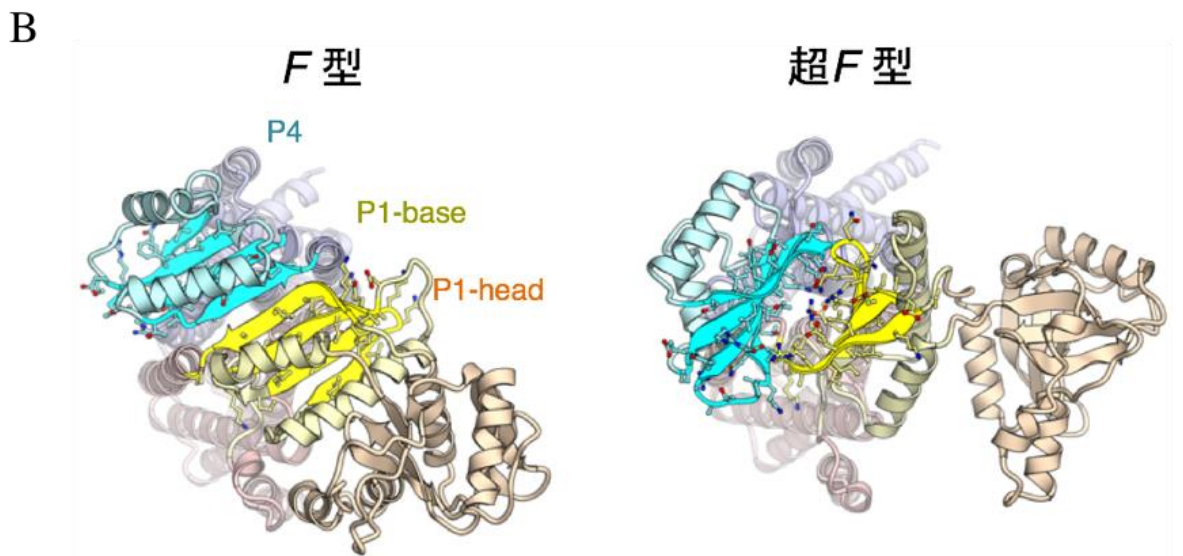
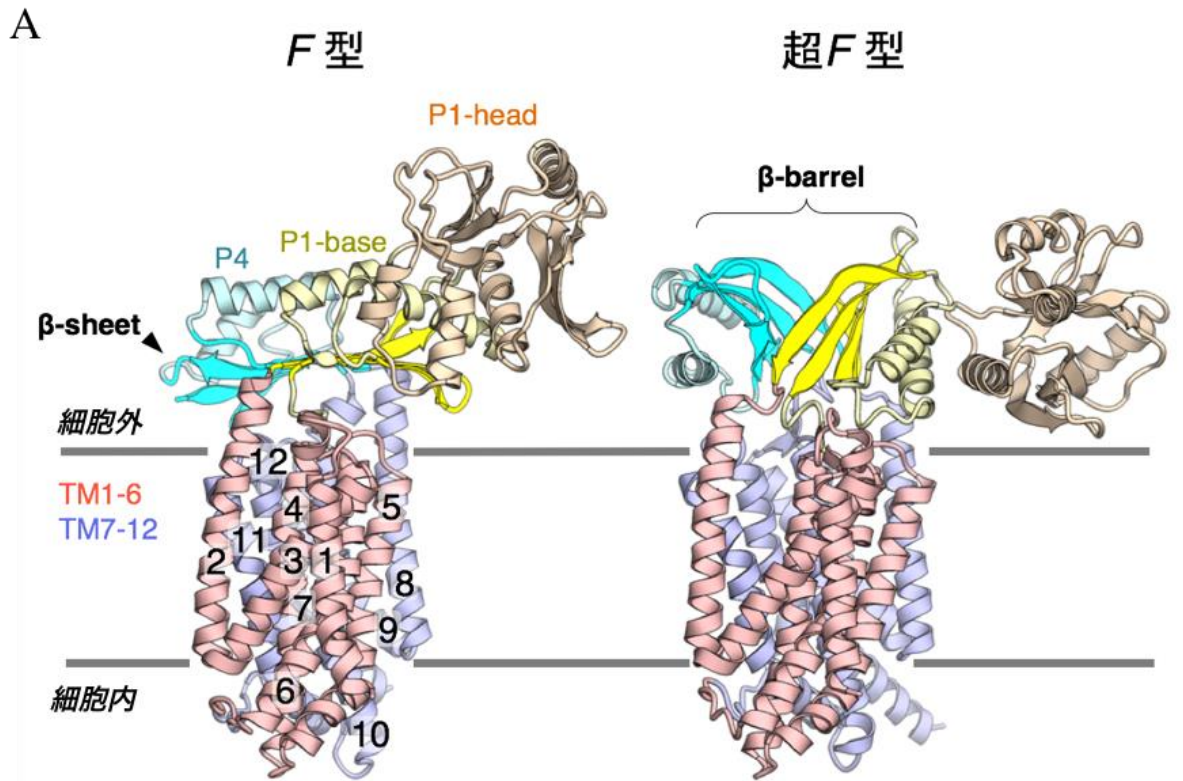


図2-17. 超F型とF型SecDFの構造比較

A. 膜方向から見たF型 (左)と超F型 (右)の構造比較. 膜貫通ヘリックスの番号を示した. 構造変化が大きいP1-baseとP4の β ストランド部分を強調して示した.

B. Aを細胞外側から見た図. β シートまたは β バレル部分のアミノ酸側鎖をボールアンドスティックモデルで示した. 超F型ではP1-baseとP4は β バレルから形成されているが, バレル内部はアミノ酸側鎖で満たされており, 空洞は見られなかった.

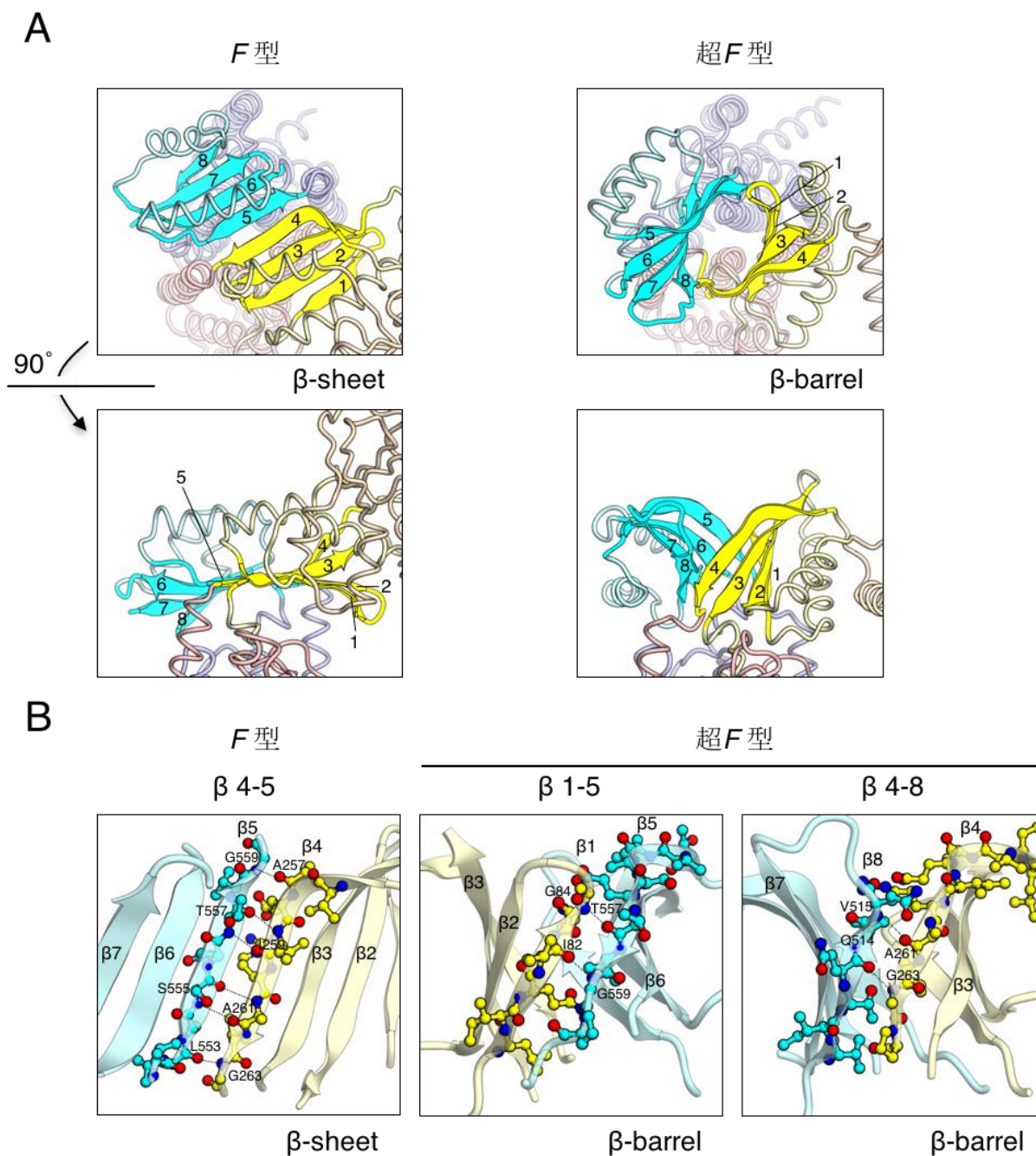


図2-18. 超*F*型と*F*型SecDFのP1-baseとP4領域の詳細な構造比較

A. *F*型 (左)と超*F*型 (右)の構造比較. 細胞外側 (上)と細胞膜側 (下)から見た図. 構造変化が大きいP1-baseとP4のβストランド部分を強調して示した. P1-baseとP4を構成するβストランドの任意の番号を示した. *F*型構造ではP1-baseとP4はβシート4, 5により繋がっていたが、超*F*型ではこの水素結合が開裂し、βシート1, 5及び4, 8間で新たに水素結合が形成されていた.

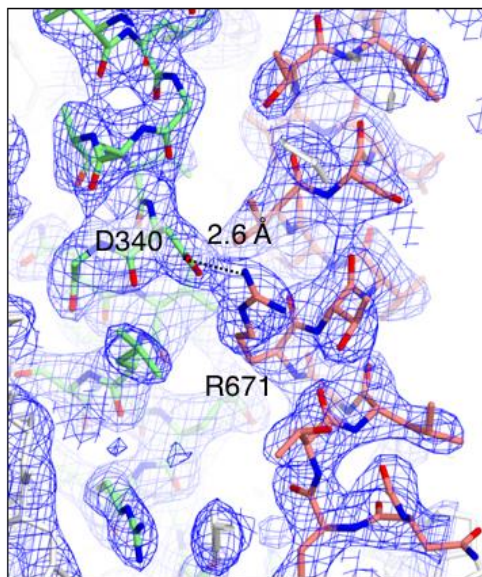
B. P1-baseとP4の結合部位の拡大図. 境界に位置するアミノ酸側鎖をボールアンドスティックモデルで示した. 水素結合を形成していると考えられるアミノ酸側鎖を黒点線で示した.

2.3.15 P1-base及びP4のダイナミックな構造変化の考察

次に、P1-base及びP4のダイナミックな β -シートから β -バレルへの構造変化をもたらす要因を検討した。SecDFに保存されているアミノ酸の中で、構造比較によりF型と超F型で配向が異なるものを探索した。そして、TM11に存在するR671に注目した。R671は生物種間で高度に保存されており(図2-2)、以前の研究でSecDFのタンパク質膜透過活性及びプロトン透過活性に必須であることが示されており、SecDFの活性に重要なアミノ酸であることは認識されていたが(Tsukazaki *et al.* , 2011)、その役割は不明であった。R671の側鎖はこれまでに報告されたすべてのSecDFの構造では細胞質側に伸びていたが、超F型では膜貫通領域の中心方向へ伸び、プロトン透過の制御に関わることが本研究で示唆されたTtSecDFのD340 (DrSecDFのD365)と相互作用していた(図2-19, 2-20)。D340とR671が相互作用することにより膜内での電荷が打ち消され疎水性が向上することが超F型への構造変化のトリガーとなるのかもしれない。この相互作用により、超F型ではTM4は膜貫通領域の中心方向に引き寄せられ、TM10に接近していた(図2-20A)。このTM4とTM10は、膜貫通領域で特に保存性が高い領域である。TM4とTM10が接近することにより同じく保存性の高い領域であるD1, F1 (Eichler *et al.* , 2003)と呼ばれる領域が膜貫通領域へと引っ張られる構造変化が起こっていた。その結果、P1-baseと膜貫通領域の結合部も分子の中心に引っ張られる形となる。このような構造変化が連続することで、P1領域が立つような構造変化が起こるように見えた。同様の効果によってP4領域も立ち上がる変化が起こることが予想された。このときP1-baseとP4の間 β -シート間の結合が切断されるのだろう。そして、立ち上がったP1-baseとP4は互いに β -ストランドを組み上げる形になり、P1-headがさらに膜面方向へと移動することが考えられた。

A

超F型 (PDB ID : 5YHF)

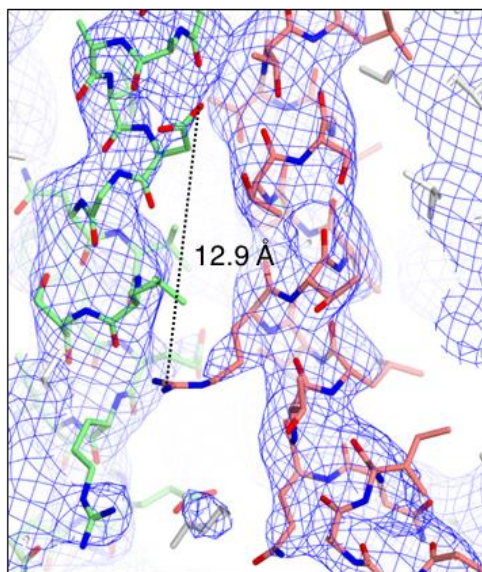


TM4

TM11

B

F型 (PDB ID : 3AQP)

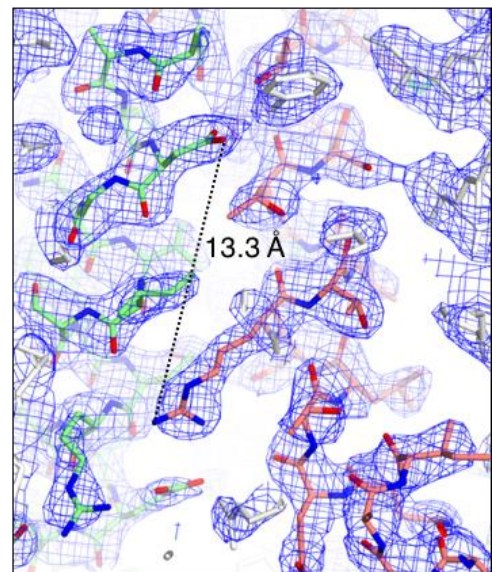


TM4

TM11

C

I型 (PDB ID : 5XAN)



TM4

TM11

図2-19. D340とR671付近の2Fo-Fcマップ ($\sigma=1.5$)

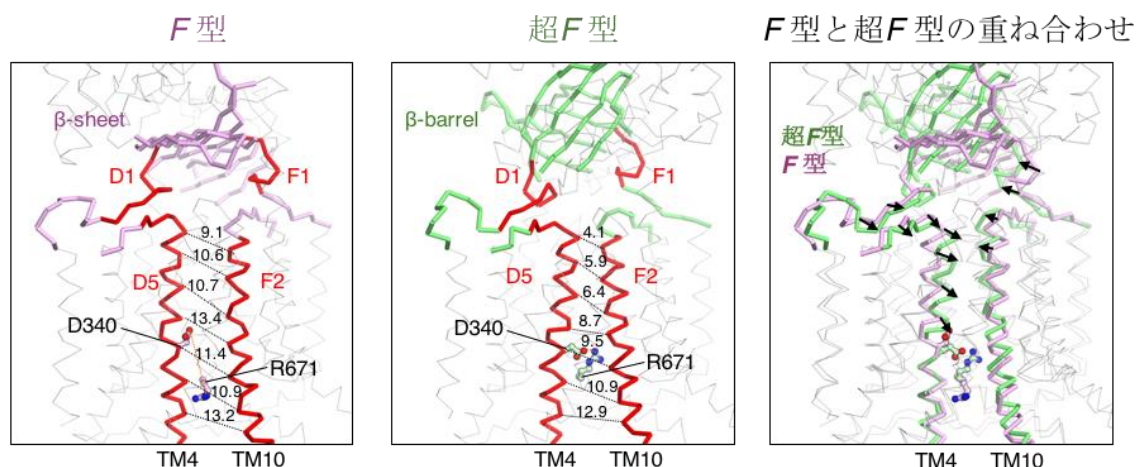
構造精密化後のTM4とTM11の構造の拡大図. 超F型とF型, I型で側鎖の向きが大きく変わっているR671付近を示したD340とR671のOD₂間の距離を示した. 超F型構造でのみD340とR671は相互作用していた.

A. 超F型TtSecDF

B. F型TtSecDF

C. I型DrSecDF

A



B

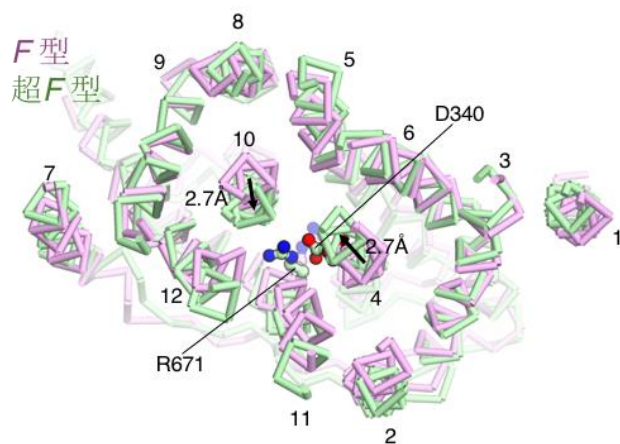


図2-20. 膜貫通領域から細胞外ドメインへとつながる構造変化

A. 膜方向から見たF型 (左, ピンク)と超F型 (中央, 緑)の構造比較. 膜貫通領域 (TM4, TM10)とP1-base及びP4の, F型と超F型間で構造変化が大きい領域を太い線で示した. SecDFの高度に保存された領域(D1, D5, F1, F2)を赤で示した. TM4とTM10のC α 間の距離を黒点線で示した. F型から超F型への構造変化を黒い矢印で示した.

B. 細胞外側から見たF型 (ピンク)と超F型 (緑)の構造比較. 膜貫通ヘリックスの番号を示した. 保存されたD340とR671をボールアンドスティックモデルで示した. TM4とTM10のF型から超F型への構造変化を黒い矢印で示した.

2.3.16 リモートカップリングによる超F型へのSecDFの構造変化の制御

次に、この超F型構造が生体内で存在するかを検証するために、分子内ジスルフィド結合実験を行った。I型構造やF型構造では離れており、超F型TtSecDFでのみ接近しているアミノ酸に相当する大腸菌SecD, SecFの部位をシステインに置換した3種類の変異体を作製し(図2-21A)、生体内でジスルフィド結合が形成されるかを検出した。その結果、3か所の異なる部位でジスルフィド結合の形成が確認された(図2-21B)。それぞれのクロスリンク産物と思われるシグナルはわずかに流動度が異なっているが、異なる部位でのクロスリンクであることが原因であると考えられる。また、ジスルフィド結合の形成効率が高くないのは、生体内でSecDFがI型やF型でも存在することが原因であると考えられる。これらの結果から、超F型のコンフォメーションが生体内でも存在することが明らかとなった。また、これらの変異体を用いて生育試験を行ったところ、二重システイン変異体でのみ生育相補活性の低下が認められ、予想通りコンフォメーションの固定はSecDFの活性を不活化することが示された。

続いて、超F型への構造変化へのR671とD340の重要性を検証するため、これらの二重システイン変異体にさらにTtSecDFのR671MあるいはD340Nに相当するアミノ酸変異(EcSecD D519, EcSecF R247)を加えた大腸菌SecD, SecF三重変異体を作成し、超F型特有のジスルフィド結合の形成が見られるかを検証した。その結果、アルギニンあるいはアスパラギン酸を置換したすべての三重変異体でジスルフィド結合形成効率の著しい低下が認められた(図2-21B)。これらの結果から、R671側鎖の向きを変えるトリガーは不明であるが、R671とD340の相互作用に起因して、膜貫通領域と直接はつながっていないP1-baseとP4領域の結合様式が遠隔制御により組み変わり、P1-headがより膜に面した超F型コンフォメーションを取るようになるという「リモートカップリングモデル」が強く支持された。

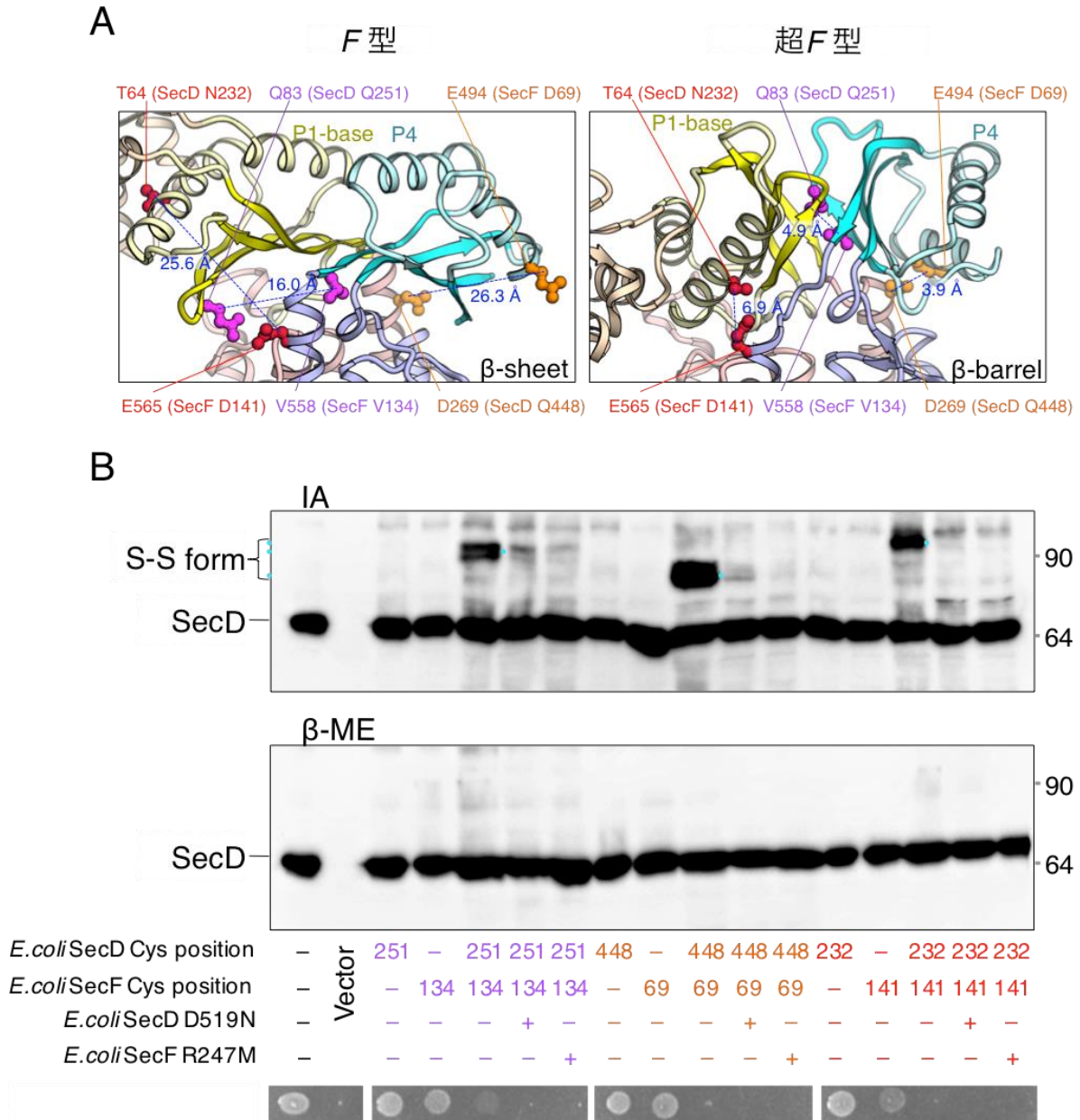


図2-21. R671とD340による細胞外ドメイン構造の遠隔制御

A. F型 (左)と超F型 (右)のP1-base及びP4の拡大図. システインを導入した部位のアミノ酸をボールアンドスティックモデルで示し, 3種類のダブルシステイン変異体をペアごとに色分けした. それぞれのペアのCβ間の距離を青点線で示した. 相当するEcSecD, Fのアミノ酸番号を括弧内に示した.

B. EcSecD, Fを用いたジスルフィド結合の確認. SecDに付加したHAタグを検出した. 非還元状態 (上)と還元状態 (中央). 非還元状態では, 3種類の異なる二重システイン変異体ペアでジスルフィド結合の形成が認められた. このジスルフィド結合に由来するバンドは, D519NあるいはR247M変異を追加すると消失した. 大腸菌の生育相補実験 (下). 二重システイン変異体及び三重システイン変異体では生育相補活性が低下した.

2.3.17 P1-headへの小分子の結合

続いて、タンパク質を引っ張る役割を持つと考えられている SecDF の P1-head に注目した。これまでに報告された SecDF の P1-head の構造を図 2-22 にまとめた。この P1-head にはくぼみが存在し、膜貫通領域にトンネルを持つ I 型構造である分子 B と超 F 型において、このくぼみ構造の中心に、SecDF には由来しない追加の電子密度が認められた(図 2-22A, D, 2-23)。このくぼみは両親媒性のアミノ酸から構成されており、小分子を包み込むような形状をしていた。この小分子は、断定はできないもののその電子密度の形状から、結晶化時に沈殿剤として添加したポリエチレングリコール (PEG)の一部ではないかと考えられた。ポリエチレングリコールは炭素骨格を基本とした構造をしており、タンパク質と性質が似ている。また、超 F 型ではこのくぼみは膜方向を向いており SecYEG から膜透過タンパク質を受け取りやすいように見られた。これらのことから、この PEG は P1-head のくぼみに結合した膜透過タンパク質を模しており、このくぼみが SecYEG から出てきた膜透過タンパク質との相互作用部位ではないかと考えた。そこで P1-head のくぼみと、膜透過タンパク質との相互作用解析を、UV 光架橋の手法を用いて行った。

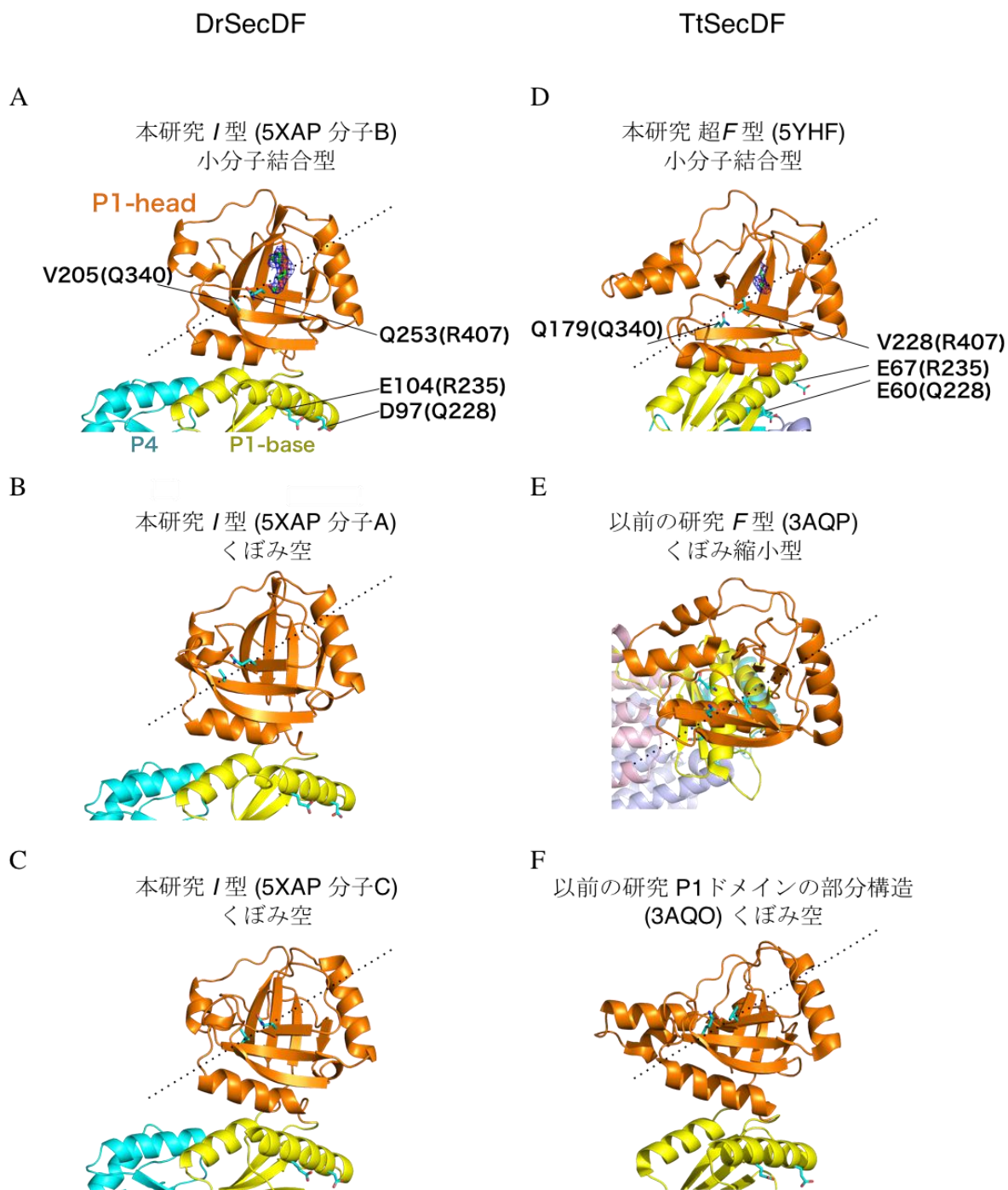
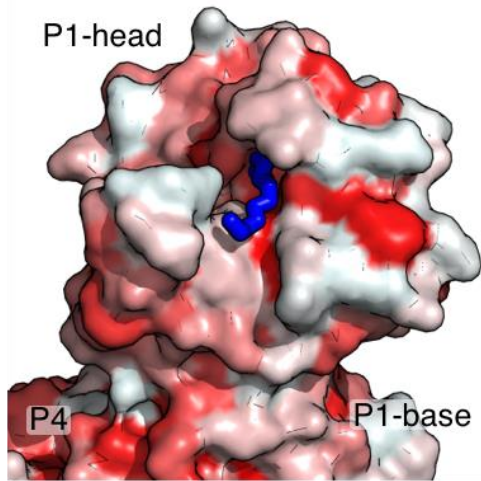


図 2-22. 各 SecDF 分子の P1-head の構造

P1-head の拡大図. A-C は DrSecDF, D-F は TtSecDF の構造. くぼみの中心付近に見られる Fo-Fc 電子密度マップ (3.0σ)を青で示した. 図 2-24 で pBPA を導入したアミノ酸部位を水色のスティックモデルで示した. 対応する EcSecD のアミノ酸番号を A 及び D の括弧内に示した.

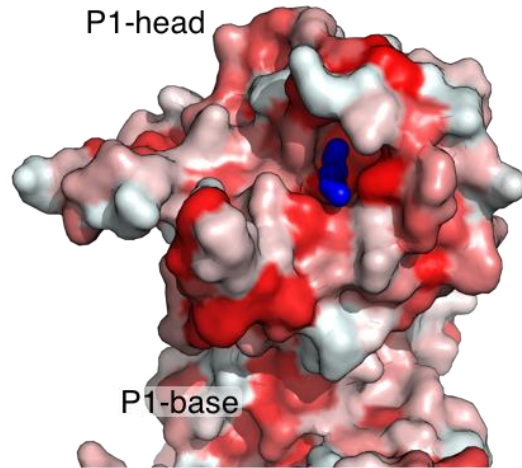
A

I 型 (5XAP 分子B)



B

超F型 (5YHF)



親水的  疎水的

図 2-23. 表面モデルで示した P1-head のくぼみへの小分子の結合. 分子の疎水親水度で色分けした. 小分子を青で示した. P1-head のくぼみは小分子を包むように配置されている.

A. I 型 (分子 B).

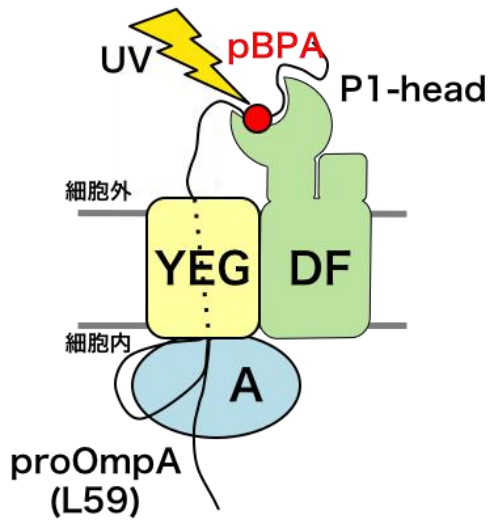
B. 超 F 型.

2.3.18 P1-head のくぼみと膜透過タンパク質との相互作用

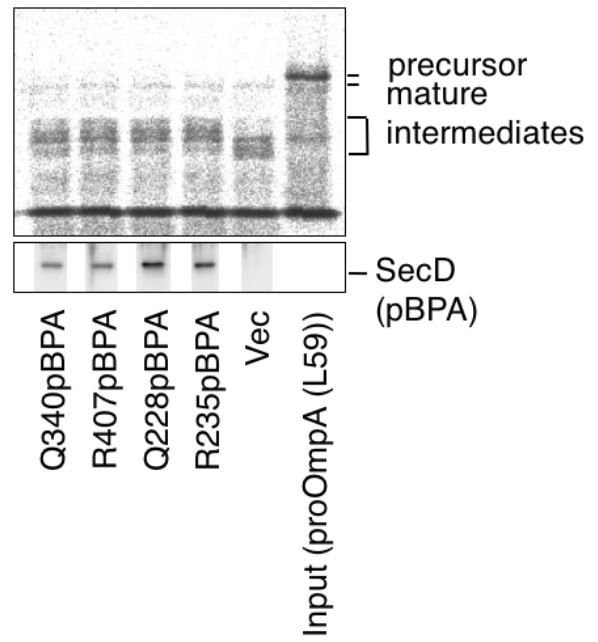
相互作用解析は、UV 光架橋の手法を用いて行なった (図 2-24). 本実験では、IMV の内部に膜透過途中の proOmpA と SecD の相互作用を捉える必要があるため、膜透過の中間状態で膜透過反応がストップする変異体 proOmpA(L59)を用いた. proOmpA(L59)は、分子の内部に S-S 結合を導入した基質であり、この領域がループとなって膜透過完了を妨げ、タンパク質膜透過中間体を形成することがアイソトープを用いた手法により確かめられている (Uchida *et al.* , 1995)(図 2-24A). この実験では SecDF 結晶構造をもとに、大腸菌 SecD に UV 反応性アミノ酸誘導体である pBPA を P1-head のくぼみやそれ以外のいくつかの部位に導入した変異体を作製した(図 2-22A). pBPA は UV 照射により、近傍の分子と共有結合を形成する. まず pBPA 導入 SecD 変異体が大腸菌内で安定に蓄積していることを確認した (図 2-24B 下). 次に反転膜小胞 (IMV)を調整し、³⁵S で標識された膜透過タンパク質である proOmpA を用いて膜透過反応の再現を試みた. 各 pBPA 導入 SecD を発現する大腸菌から IMV を調整し、proteinaseK で IMV 外部に露出している領域を分解した結果、安定な proOmpA 膜透過中間体が形成されていることを確認できた(図 2-24B 上). SecDF 存在下では、vector に比べて分子量の大きな膜透過中間体が観察された. これは、SecDF が P1-head で膜透過中間体を捉え、バックスライドが妨げられることが原因かもしれない.

この IMVproOmpA 膜透過中間体を用いて、pBPA 導入 SecD と proOmpA との UV 光架橋を試みた. その結果、くぼみの中心に存在する R407 を pBPA に置換した変異体でのみ UV 依存的に出現するシグナルが確認された (図 2-24C). さらに、UV 光架橋後に α -SecD 抗体による免疫沈降を行なった場合においても、同様のシグナルが検出された(図 2-24D). SecD と proOmpA の架橋産物が 1 本の濃いシグナルではなく、複数のスメアなシグナルとして検出された原因は幾つか考えられる. 1 つ目は、膜透過中間体は 1 種類ではなく、複数の状態で存在しているため、異なる位置で架橋された混合物として検出された可能性である. 2 つ目は、架橋産物が内在性のプロテアーゼなどで部分的に分解された可能性である. 本実験からではこれらの可能性についてさらに考察することは困難であるが、くぼみの末端やペリプラズム領域の他の部位に pBPA を導入した変異体では UV 依存的なシグナルは検出されなかったことから、少なくとも P1-head のくぼみが膜透過タンパク質との相互作用部位の一部を提供していることが示唆された.

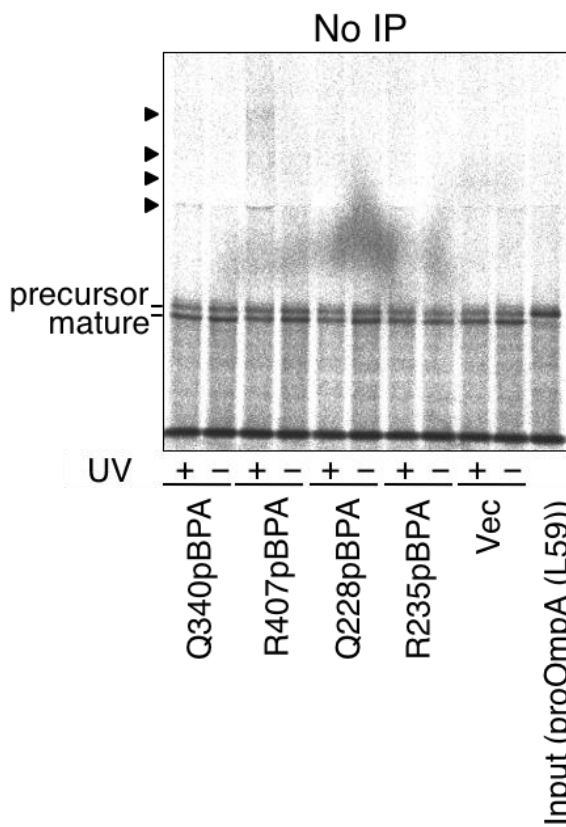
A



B



C



D

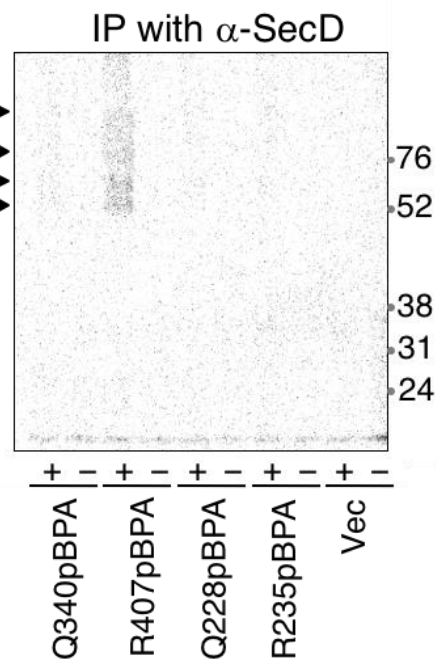


図 2-24. P1-head のくぼみと膜透過基質タンパク質との相互作用

- A. SecDF と膜透過基質タンパク質である proOmpA の光架橋実験の模式図. proOmpA(L59)は、分子の内部に S-S 結合を導入した基質であり、この領域がループとなって膜透過完了を妨げ、タンパク質膜透過中間体を形成する。UV 照射により pBPA を活性化させ、近傍の分子との共有結合形成を誘導する。
- B. ³⁵S でラベルした膜透過タンパク質 OmpA の膜透過中間体の形成 (上). SecDF 存在下では、vector に比べて分子量の大きな膜透過中間体が形成される。pBPA を取り込んだ SecD の蓄積 (下)。
- C. ³⁵S 標識された光架橋後産物の検出. R407pBPA の条件でのみ UV 依存性のシグナルが検出された。
- D. α -SecD 抗体で免疫沈降した後の ³⁵S 標識された光架橋後産物の検出. R407pBPA の条件でのみ UV 依存性のシグナルが検出された。

2.3.19 P1-head のくぼみの構造変化

P1-head を図 2-22 で示した点線に沿って切断した断面図を図 2-25 に示した。同一生物種で比較すると、DrSecDF では小分子の有無にかかわらず、くぼみの大きさや形状の変化は認められなかった。一方、TtSecDF では超 F 型と I 型部分構造では形状が類似しており小分子を捉えることができそうであったが、F 型構造ではくぼみの形状が変化して縮小しており、小分子が入れない大きさに変化していた (図 2-25D-E)。このくぼみの形状変化は、くぼみ内の β シートが移動することにより起こっていた (図 2-22D-E)。くぼみが収縮した状態は F 型でしか確認されていないため、この構造変化のトリガーや機能的な重要性は今のところ不明であるが、P1-head のコンフォメーション変化と同時に P1-head のくぼみの形状変化も起こり、膜透過タンパク質との結合-乖離に関与しているのかもしれない。

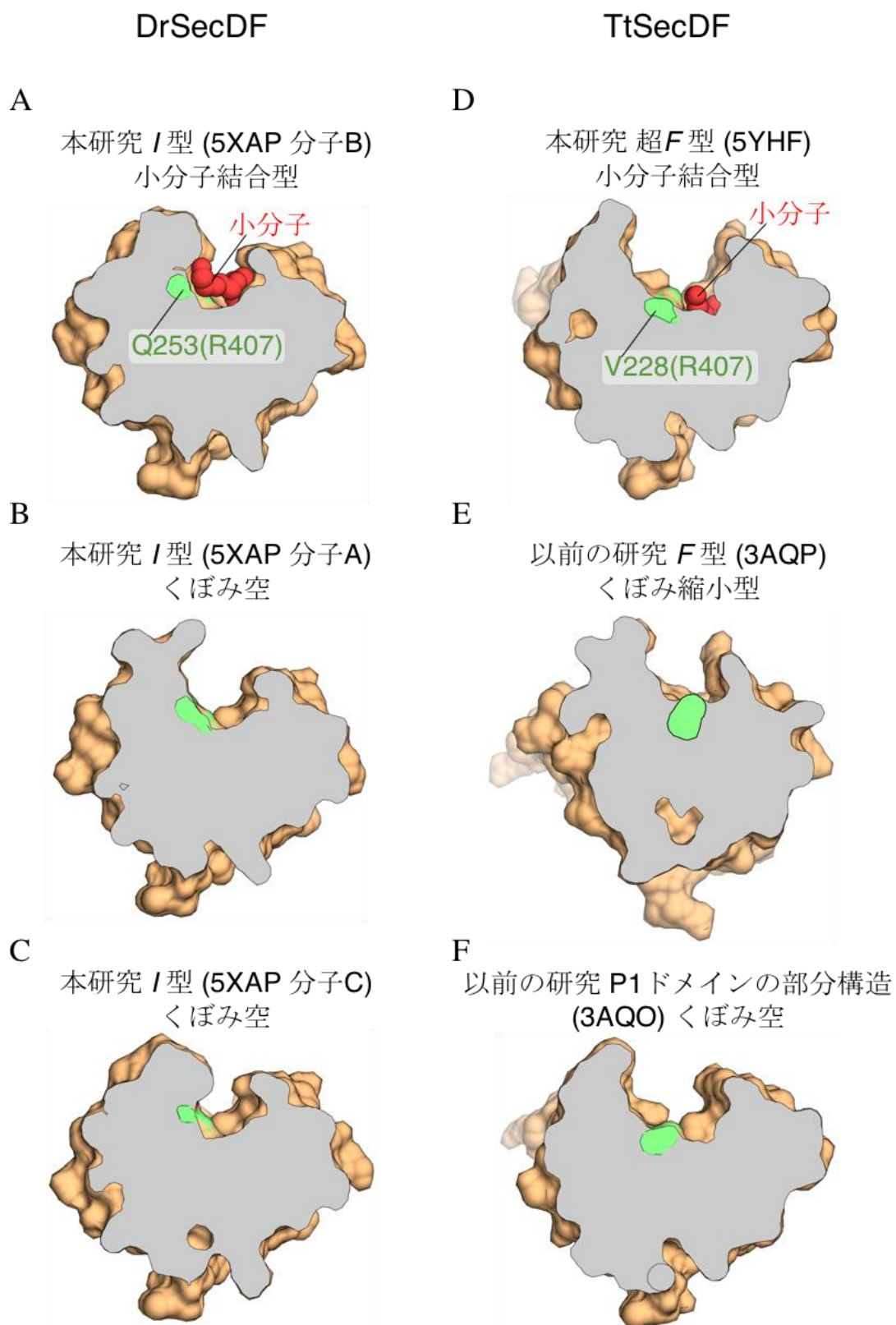


図 2-25. P1-head のくぼみの断面図

図 2-22 の点線に沿って切断した P1-head のくぼみの断面図. くぼみ内の小分子を赤, 図 2-24 で膜透過タンパク質と光架橋した EcSecD R407 に相当するアミノ酸を緑で示した.

2.3.20 SecDF 結晶構造のまとめ

これまでに報告されたSecDFの結晶構造とその特徴を図2-26にまとめた。SecDFはP1-headで膜透過タンパク質を捉えて引き抜くと考えられることから、P1-headが最も膜に接近している超F型 (PDB ID : 5YHF)がSecDFの機能サイクルの最初の状態に近いと考えられる。超F型では膜貫通領域の保存されたアスパラギン酸とアルギニンが相互作用することでTM4とTM10が接近し、この構造変化が伝播されることで膜貫通領域とP1-headをつなぐbase領域が β バレル構造をとっていた (図2-20A)。膜透過タンパク質との相互作用部位であることが示されたP1-headの小分子結合部位は細胞膜側を向いており、SecYEGから膜透過タンパク質を受け取る状態に近いのかもしれない。

超F型に比べ、P1-headが膜から離れた状態であるのがF型 (PDB ID : 5YHF)である。P1-headは超F型から単純に膜と反対方向へ動くのではなく、約90°回転することにより膜透過タンパク質結合部位が膜から遠ざかっていた (図2-16A)。F型では他の構造とは異なり、P1-headのくぼみの β シートが移動することにより、くぼみが収縮している様子が観察された (図2-25E)。くぼみの形状変化については、今後さらなる検証が必要である。F型では超F型で認められたアスパラギン酸とアルギニンの相互作用は認められず、base領域は β バレルではなく β シート構造をとっていた。アスパラギン酸とアルギニンの相互作用が切れることが構造遷移のきっかけとなるのかもしれない。

P1-headが最も膜から離れている状態がI型 (PDB ID : 5XAN, 5XAP)である。I型ではF型からP1-headが約100°回転することによりさらに膜から遠ざかり、base領域の真上に位置していた。超F型からF型への構造変化とはP1-headの回転軸が異なっている。SecDF機能サイクルの中でP1-headが反復運動をするのか、回転運動をするのかという点については今後検証が必要である。今回の研究では、複数の異なるI型SecDFの構造を決定することができた。このうち、PDB ID : 5XANの分子Bでは膜貫通領域に細胞膜を貫通するトンネル構造が認められ、プロトンの透過経路となりうることが示された。このトンネルは中心に存在するアスパラギン酸のプロトン化状態により開閉が制御される可能性が示唆された。さらに、P1-headのくぼみには超F型と類似した位置に小分子の結合が見られた。一方、類似したI型構造ではあるが、PDB ID : 5XANの分子A及び5XAPの分子Cでは膜貫通領域にトンネルは見られず、P1-headのくぼみへの小分子の結合も認められなかった。以前の研究で、ペリプラズム領域に変性タンパク質が存在するとSecDFのプロトン透過活性が上昇する (Tsukazaki *et al.* , 2011)ことが示されていることから、P1-headへの分子の結合がトンネルの開状態を促進しているのかもしれない。分子Bは膜透過タンパク質がP1-headのくぼみに結合しトンネルが開いた状態を、分子A及び分子Cは膜透過タンパク質が乖離しトンネルが閉じた状態を模していることが考えられる。

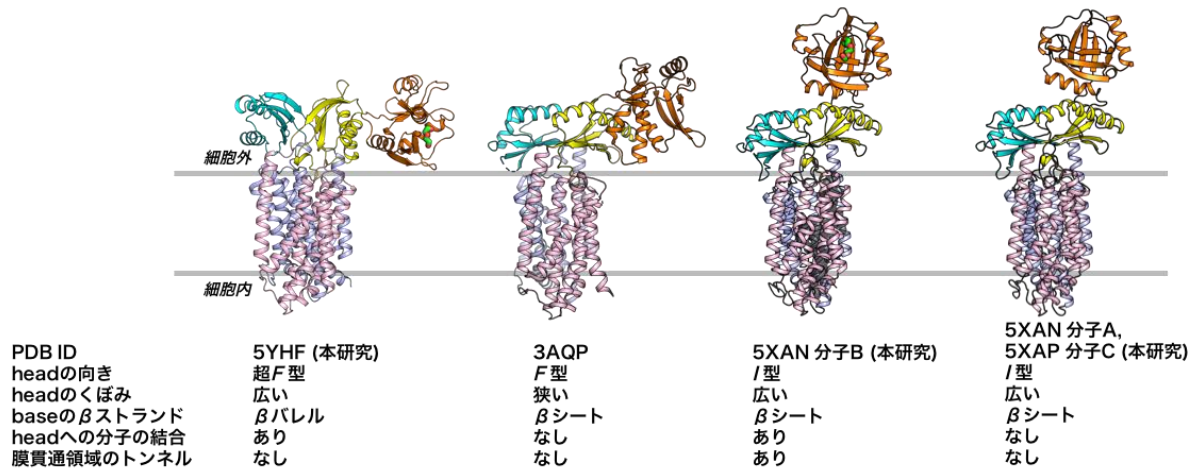


図2-26. SecDFの結晶構造のまとめ

これまでに報告されたSecDFを膜方向から見た結晶構造. P1-headの向き, P1-headのくぼみ, P1-baseとP4の構造, P1-headへの分子の結合の有無及び膜貫通領域のトンネル構造の有無についてまとめた. 超F型およびI型 (5XAN 分子B)SecDFのP1-headに結合した小分子をスティックモデルで示した. I型 (5XAN 分子B)SecDFの膜貫通領域に存在するトンネルを黒で示した.

2.3.21 SecDFによる新たなタンパク質膜透過の作業仮説

本研究により決定した結晶構造とそれに基づく機能解析の結果をふまえ、SecDFの新たな作業仮説を以下に提案する (図 2-27).

このモデルでは、まず細胞内でリボソームにより翻訳された、N 末端側にシグナル配列を持つ膜透過タンパク質は、内膜へとターゲットされる。次に、SecA が ATP 加水分解に伴うエネルギーを利用し、膜透過タンパク質を連続的に SecYEG へと押し込む。

次にペリプラズム側で、SecDF が SecYEG から出てきた膜透過タンパク質を、超 F 型の状態で、P1-head のくぼみで捉える。その後、トリガーは不明であるが、TM4 のアスパラギン酸と相互作用していたアルギニン側鎖が細胞内側を向くことによりアスパラギン酸との相互作用が失われ、膜貫通領域が構造変化を起こす。この構造変化がリモートカップリングによりペリプラズム側に伝達され、 β バレルが β シートへと組み変わり、P1-head が超 F 型から F 型へと移行する。このコンフォメーション変化により、膜透過タンパク質が牽引される。さらに P1-head はコンフォメーション変化を続け、F 型から I 型へと移行することでさらに膜透過タンパク質を牽引する。厳密なタイミングは不明であるが、P1-head が I 型コンフォメーションの状態では膜貫通領域のアスパラギン酸が脱プロトン化し、膜貫通領域にトンネルが形成される。このトンネル内へと水分子が流入し、プロトン透過が誘導される。その後、P1-head から膜透過タンパク質が乖離し、トンネルは閉状態となる。最後に中間過程は不明であるが、I 型から超 F 型への構造変化がおこり、SecDF は再び膜透過タンパク質と結合できるようになるのだろう。プロトンの流入に伴うエネルギーは、トンネルが開く状態である I 型への構造遷移過程か、その直後の I 型から超 F 型への構造遷移過程に利用されるのかもしれない。このサイクルを繰り返すことにより、タンパク質膜透過が促進されることが考えられる。

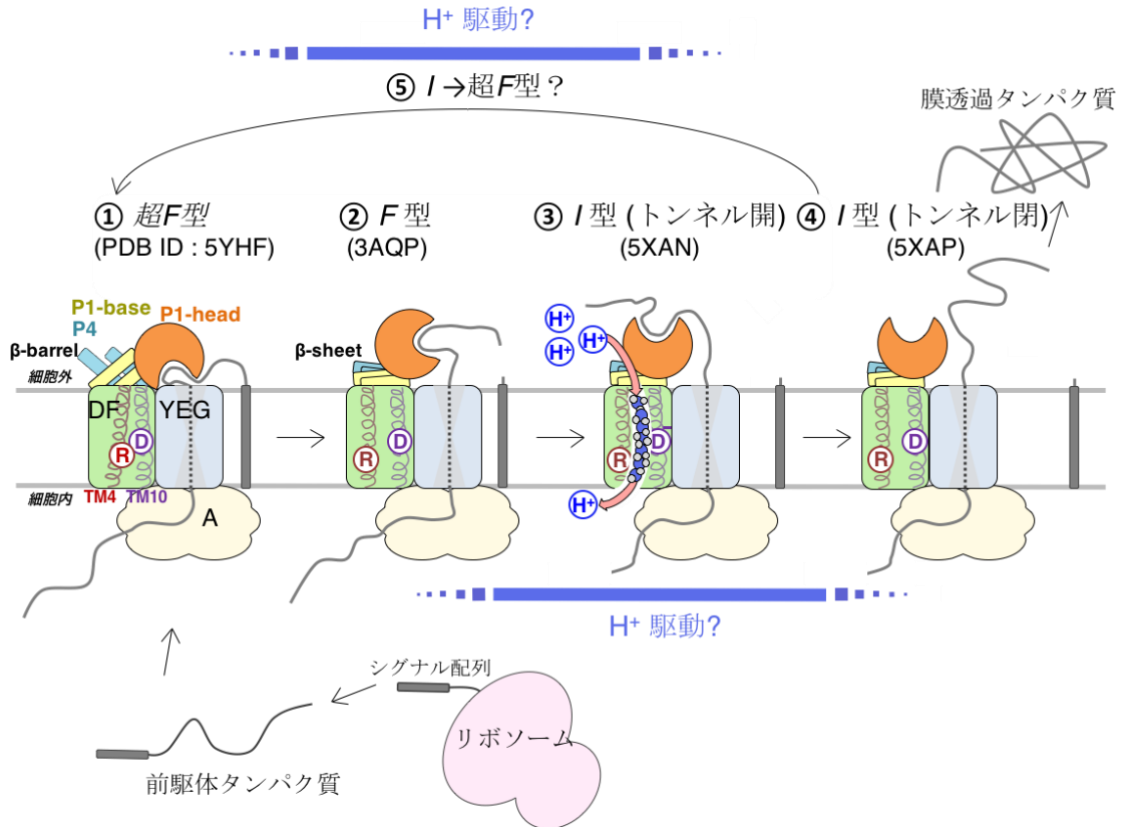


図 2-27. SecDF による新たなタンパク質膜透過の作業仮説

リボソームにより翻訳された N 末端にシグナル配列を持つ膜透過タンパク質は、内膜へとターゲットされる。次に、SecA が ATP 加水分解に伴うエネルギーを利用し、膜透過タンパク質を連続的に SecYEG へと押し込む。その後細胞外側で、SecDF が SecYEG から出てきた膜透過タンパク質を超 F 型の状態で、P1-head のくぼみで捉える (①, PDB ID :5YHF)。アスパラギン酸とアルギニンの相互作用がきれ、膜貫通領域が構造変化を起こす。この構造変化が細胞外側に伝達され、βバレルがβシートへと組み変わり、P1-head が超 F 型から F 型へと移行する。このコンフォメーション変化により、膜透過タンパク質が牽引される。さらに P1-head はコンフォメーション変化を続け、F 型から I 型へと移行することでさらに膜透過タンパク質を牽引する (②, PDB ID :3AQP)。P1-head が I 型コンフォメーションの状態では膜貫通領域のアスパラギン酸が脱プロトン化し、水分子のトンネル内への流入を促進し、プロトン透過トンネルの開状態を誘導する (③, PDB ID :5XAN)。P1-head から膜透過タンパク質が乖離し、トンネルは閉状態となる (④, PDB ID :5XAP)。続いて

I型から超F型への構造変化がおこる (⑤). このサイクルを繰り返すことにより, タンパク質膜透過が促進される. プロトンの流入に伴うエネルギーは, トンネルが開く状態であるI型への構造遷移過程か, 直後のI型から超F型への構造遷移過程に利用されるのかもしれない.

2.3.22 本研究の総括と今後の課題

本研究ではまず、これまで不明であったSecDFの全長I型結晶構造を、3 Åを超える分解能で決定することができた。この構造から、これまで不明であったSecDFと膜透過タンパク質との相互作用部位やプロトンの透過経路を明らかとすることができた。続く構造情報に基づく生化学的・遺伝学的な実験やMDシミュレーションにより、プロトン透過トンネルの開閉制御メカニズムやP1-headのダイナミズムとプロトン透過の相関についての初めての知見を得ることができた。また、これまで報告されていなかった超F型の結晶構造を決定することができ、膜貫通領域と細胞外領域のダイナミックなりモートカップリング機構を明らかにすることができた。これらの成果をまとめることで、SecDFによるより詳細なタンパク質膜透過の作業仮説を提唱することができた。

一方で、SecDFのメカニズムを理解する上で未だ明らかとなっていない点が幾つか存在する。

まず1つめとして、膜透過タンパク質を引き抜く際にP1-headが回転運動をしているのか反復運動をしているのかという点が挙げられる。超F型からF型とF型からI型への構造遷移ではP1-headの構造変化軸が異なっており、実際はもっとスムーズに遷移していることが予想される。この中間状態の構造は不明であるが、現在ある情報からでは、超F型→F型→I型→F型→超F型というふうに反復運動を繰り返す機構と、超F型→F型→I型→超F型というふうに回転運動を繰り返す機構が考えられる。これらの機構は、高速AFMによる一分子動態観察により判別できるかもしれない。P1-headは直径約3 nmの球体である。近年の高速AFMの空間分解能は1 nm程度まで改良されており、技術的には可能な領域まできていることから、直接的な一分子観察による動態解析が期待される。

2つめとして、膜透過タンパク質がどのようにP1-headに結合、乖離するのかという点が挙げられる。SecYEGがほぼ全てのタンパク質膜透過を行うと考えられていることから、SecDFが結合するタンパク質も多岐にわたると予想される。そのため、P1-headが認識する配列の特異性は低く、弱い疎水親水的な相互作用による部分が大きいことが考えられる。P1-headのくぼみが両親媒性のアミノ酸から構成されていることもこの可能性を支持している。しかし、タンパク質の主鎖が認識されているのか大きめの側鎖が認識されているのかは明らかとなっていない。現在、SecDFと膜透過タンパク質を模したペプチドとの共結晶化を目指しており、これが達成できれば結合様式を明らかにすることが可能である。さらに、共結晶化によりP1-headのくぼみの構造変化が確認できれば、これまでの構造との比較によりタンパク質乖離に関する情報も得られるかもしれない。

3つめとして、プロトン流入によるエネルギーがSecDFの構造変化をどのように駆動しているのか不明である点が挙げられる。本研究で明らかとしたように、SecDFは全てのドメインがダイナミックな構造変化を起こして機能する。これらの複雑な構造変化をプロトン流入のエネルギーと合わせて完全に説明するのは現在のところ困難であるが、MDシミュレーションにより各構造のエネルギー状態の評価を行い、各構造のエネルギー的な安定性を評価することができれば、何らかの手がかりを得ることができるかもしれない。

最後に4つめとして、SecYEGやSecAを含むSec複合体内でのSecDFの位置が不明である点が挙げられる。これまでにSecA-SecYEG複合体の結晶構造は分解能4 Å程度で報告されている。また、SecDFとYidC、そしてSecA、SecYEGを含む複合体の構造が電子顕微鏡解析により報告されているが、分解能が15 Å程度と低いため、SecDFの方向はうまく規定できていない。電子顕微鏡解析で分解能向上が達成されていない理由として、P1-headが柔軟にコンフォメーションを変化させるため均一な分子の取得が困難であることが考えられる。本研究において、ダブルシステイン変異体を作製し、分子内ジスルフィド結合によりP1-headの動きを制限することにより分子の均一性を高め、分解能を向上できることを証明した。これを利用することで、より安定な複合体を取得することができれば、より高い分解能での複合体構造決定へとつながると考えている。

以上で述べてきたように、SecDFのメカニズムを完全に理解する上で不明な点は多く残されている。しかし本研究を通して、本研究開始以前は1例にとどまっていたSecDFの全長構造を、新たに5例報告することができた。これらから得られた知見は、今後さらなる詳細な解析を行っていく上での構造基盤となることが期待される。

第3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.
- Anghel SA, McGilvray PT, Hegde RS, Keenan RJ. (2017). Identification of Oxal Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep*. 21: 3708-37.
- Beck K, Eisner G, Trescher D, Dalbey RE, Brunner J, Müller M. (2001). YidC, an assembly site for polytopic Escherichia coli membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep*. 2: 709-714.
- Benz M, Bals T, Gügel IL, Piotrowski M, Kuhn A, Schünemann D, Soll J, Ankele E. (2009). Alb4 of Arabidopsis promotes assembly and stabilization of a non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF1CF0-ATP synthase. *Mol Plant*. 2 1410-1424.
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M. & MacKerell, A. D. (2012). Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone phi, psi and side-chain chi(1) and chi(2) dihedral angles. *J. Chem. Theory Comput*. 8, 3257-3273.
- Botte M, Zaccai NR, Nijeholt JL, Martin R, Knoop K, Papai G, Zou J, Deniaud A, Karuppasamy M, Jiang Q, Roy AS, Schulten K, Schultz P, Rappsilber J, Zaccai G, Berger I, Collinson I, Schaffitzel C. (2016). A central cavity within the holo-translocon suggests a mechanism for membrane protein insertion. *Sci Rep*. 6: 38399
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *125*: 443-51.
- 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.
- Chen Y, Capponi S, Zhu L, Gellenbeck P, Freitas JA, White SH, Dalbey RE. (2017). YidC Insertase of Escherichia coli: Water Accessibility and Membrane Shaping. *Structure* 25: 1403-1414.
- Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG. (2002). Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of Escherichiacoli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 11020-11024.

- Czarnocki-Cieciura M, Nowotny M. (2016). Introduction to high-resolution cryo-electron microscopy. *Postepy Biochem.* 3:383-394.
- Dalbey RE, Kuhn A, Zhu L, Kiefer D. (2014). The membrane insertase YidC. *Biochim Biophys Acta.* 1843: 1489-1496.
- 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.
- 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.
- Eichler J. (2003). Evolution of the prokaryotic protein translocation complex: a comparison of archaeal and bacterial versions of SecDF. *Mol Phylogenet Evol.* 27: 504-509.
- 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.
- Evans. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 62: 72-82
- Facey SJ, Neugebauer SA, Krauss S, Kuhn A. (2007). The mechanosensitive channel protein MscL is targeted by the SRP to the novel YidC membrane insertion pathway of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 365: 995-1004.
- Gogala M, Becker T, Beatrix B, Armache JP, Barrio-Garcia C, Berninghausen O, Beckmann R. (2014). Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature* 506: 107-110.
- 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.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* 177: 4121-4130.
- Hell K, Neupert W, Stuart RA. (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20: 1281-1288.
- Harris CR, Silhavy TJ. (1999). Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J Bacteriol* 181:

3438–3444.

- Henne A, Bruggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, Johann A, Lienard T, Gohl O, Martinez-Arias R, et al. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 547-553.
- Hennon SW, Soman R, Zhu L, Dalbey RE. (2015). YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases. *J Biol Chem*. 290: 14866-14874.
- 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. *J Biol Chem*. 277:2018-2026.
- Jiang F, Yi L, Moore M, Chen M, Rohl T, Van Wijk KJ, De Gier JW, Henry R, Dalbey RE. (2002). Chloroplast YidC homolog Albino3 can functionally complement the bacterial YidC depletion strain and promote membrane insertion of both bacterial and chloroplast thylakoid proteins. *J Biol Chem*. 277: 19281-19288.
- 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.
- Kedrov A, Kusters I, Driessen AJ. (2013). Single-molecule studies of bacterial protein translocation. *Biochemistry* 52: 6740-6754.
- Kedrov A, Wickles S, Crevenna AH, van der Sluis EO, Buschauer R, Berninghausen O, Lamb DC, Beckmann R. (2016). Structural Dynamics of the YidC:Ribosome Complex during Membrane Protein Biogenesis. *Cell Rep*. 17: 2943-2954.
- Kihara A, Ito K. (1998). Translocation, folding, and stability of the HflKC complex with signal anchor topogenic sequences. *J Biol Chem*. 273: 29770-29775.
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D. & Pastor, R. W. (2010). Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: Validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B* 114, 7830-7843.
- Klenner C, Kuhn A. (2012). Dynamic disulfide scanning of the membrane-inserting Pf3 coat protein reveals multiple YidC substrate contacts. *J Biol Chem*. 287: 3769-3776.
- 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.

- Kohler R, Boehringer D, Greber B, Bingel-Erlenmeyer R, Collinson I, Schaffitzel C, Ban N. (2009). YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol Cell*. 34: 344-353.
- 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 Y, Arisaka F, Ito K, Ishitani R, Tsukazaki T, Nureki O. (2014a). Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature* 509: 516-520.
- Kumazaki K, Kishimoto T, Furukawa A, Mori H, Tanaka Y, Dohmae N, Ishitani R, Tsukazaki T, Nureki O. (2014b). *Sci Rep*. 4:7299.
- Landau EM, Rosenbusch JP. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. (1996). *Proc Natl Acad Sci* 93: 14532-5.
- Lemaire C, Guibet-Grandmougin F, Angles D, Dujardin G, Bonnefoy N. (2004). A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like protein can compensate for oxa1 mutations. *J Biol Chem*. 279: 47464-47472.
- Li, H., Robertson, A. D. & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* 61, 704-721.
- Li W, Schulman S, Boyd D, Erlandson K, Beckwith J, Rapoport TA. (2007). The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *26*: 511-521.
- 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.
- 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.

- Matsuyama S, Fujita Y, Mizushima S. (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12: 265-270.
- Menetret, J. F. Hegde, R. S. Aguiar, M. Gygi, S. P. Park, E. Rapoport, T. A. Akey, C. W. (2008) Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure* 16 1126-1137
- Mio K, Tsukazaki T, Mori H, Kawata M, Moriya T, Sasaki Y, Ishitani R, Ito K, Nureki O, Sato C. (2014). Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF. *J Struct Funct Genomics*. 3: 107-115.
- 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.
- Moore M, Harrison MS, Peterson EC, Henry R. (2000). Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem*. 275: 1529-1532.
- 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.
- Morimoto, Y. V., Kojima, S., Namba, K. & Minamino, T. (2011). M153R mutation in a pH-sensitive green fluorescent protein stabilizes its fusion proteins. *PLoS One* 6, e19598.
- Nagamori S, Smirnova IN, Kaback HR. (2004). Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J Cell Biol*. 165: 53-62.
- Nakamura S, Morimoto YV, Kami-ike N, Minamino T, Namba K. (2009). Role of a conserved prolyl residue (Pro173) of MotA in the mechanochemical reaction cycle of the proton-driven flagellar motor of *Salmonella*. *J Mol Biol*. 393: 300-307.
- 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.
- Nouwen N, Piwowarek M, Berrelkamp G, Driessen AJ. (2005). The large first periplasmic loop of SecD and SecF plays an important role in SecDF functioning. *J Bacteriol* 187: 5857-5860.

- Pfeffer S, Burbaum L, Unverdorben P, Pech M, Chen Y, Zimmermann R, Beckmann R, Förster F. (2015). Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat Commun.* 6: 8403.
- Pfeffer S, Dudek J, Schaffer M, Ng BG, Albert S, Plitzko JM, Baumeister W, Zimmermann R, Freeze HH, Engel BD, Förster F. (2017). Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat Commun.* 8: 14516.
- Plessis DJ, Nouwen N, Driessen AJ. (2011). The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta.* 1808: 851-865.
- Pogliano JA, Beckwith J. (1994). SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J* 13: 554–561.
- Preuss M, Ott M, Funes S, Luirink J, Herrmann JM. (2005). Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC. Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J Biol Chem.* 280: 13004-13011.
- Price CE, Driessen AJ. (2010). Conserved negative charges in the transmembrane segments of subunit K of the NADH:ubiquinone oxidoreductase determine its dependence on YidC for membrane insertion. *J Biol Chem.* 285: 3575-81.
- Robinson PJ, Woolhead CA. (2013). Post-translational membrane insertion of an endogenous YidC substrate. *Biochim Biophys Acta.* 1833: 2781-2788.
- Russell DR, Bennett GN. Construction and analysis of in vivo activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. (1982) *Gene* 20: 231-243.
- Saier MH Jr, Paulesen IT, Sliwinski MK, Pao SS, Skurray RA, Nikaido H. (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J* 12: 265-274.
- Sachelaru I, Petriman NA, Kudva R, Kuhn P, Welte T, Knapp B, Drepper F, Warscheid B, Koch HG. (2013). YidC occupies the lateral gate of the SecYEG translocon and is sequentially displaced by a nascent membrane protein. *J Biol Chem.* 288: 16295-16307.
- Sachelaru I, Winter L, Knyazev DG, Zimmermann M, Vogt A, Kuttner R, Ollinger N, Siligan C, Pohl P, Koch HG. (2017). YidC and SecYEG form a heterotetrameric protein translocation channel. *Sci Rep.* 1:101.
- Saraogi I and Shan SO. (2014). Co-translational protein targeting to the bacterial membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1843: 1433-1441.
- Samuelson JC, Chen M, Jiang F, Möller I, Wiedmann M, Kuhn A, Phillips GJ, Dalbey RE. (2000). YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406: 637-641.

- Selzer G, Som T, Itoh T, Tomizawa J. (1983). The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell* 32:119-129
- Shimokawa-Chiba N, Kumazaki K, Tsukazaki T, Nureki O, Ito K, Chiba S. (2015). Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112: 5063-5068.
- Song, Y. F., Mao, J. J. & Gunner, M. R. (2009). MCCE2: Improving Protein pK(a) Calculations with Extensive Side Chain Rotamer Sampling. *J Comput Chem* 30, 2231-2247.
- Spann D, Pross E, Chen Y, Dalbey RE, Kuhn A. (2018). Each protomer of a dimeric YidC functions as a single membrane insertase. *Sci Rep.* 8, 589.
- Tam PC, Maillard AP, Chan KK, Duong F. (2005). Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J.* 19, 3380-3388.
- Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O, Tsukazaki T. (2015). Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell Rep.* 8: 1561-1568.
- Tsirigotaki A, Elzen RV, Veken PV, Lambeir AM, Economou A. (2017). Dynamics and ligand-induced conformational changes in human prolyl oligopeptidase analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Sci Rep.* 7:2456.
- 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.
- Tsukazaki T, Mori H, Fukai S, Numata T, Perederina A, Adachi H, Matsumura H, Takano K, Murakami S, Inoue T, Mori Y, Sasaki T, Vassylyev DG, Nureki O, Ito K. (2006). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of SecDF, a translocon-associated membrane protein, from *Thermus thermophilus*.
- 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. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 62:376-380.
- Van Bloois E, Nagamori S, Koningstein G, Ullers RS, Preuss M, Oudega B, Harms N, Kaback HR, Herrmann JM, Luirink J. (2005). *J Biol Chem.* 280: 12996-3003.

- Van der Laan M, Bechtluft P, Kol S, Nouwen N, Driessen AJ. (2004). F1F0 ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J Cell Biol.* 165: 213-222.
- 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.
- 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.
- Wickles S, Singharoy A, Andreani J, Seemayer S, Bischoff L, Berninghausen O, Soeding J, Schulten K, van der Sluis EO, Beckmann R. (2014). A structural model of the active ribosome-bound membrane protein insertase YidC. *Elife* 3: e03035.
- Yi L, Celebi N, Chen M, Dalbey RE. (2004). Sec/SRP requirements and energetics of membrane insertion of subunits a, b, and c of the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.*, 279:39260-7.
- Xin Y, Zhao Y, Zheng J, Zhou H, Zhang XC, Tian C, Huang Y. (2018). Structure of YidC from *Thermotoga maritima* and its implications for YidC-mediated membrane protein insertion. 201700893RR
- Zhang, L., and Hermans, J. (1996). Hydrophilicity of cavities in proteins. *Proteins* 24: 433-438.
- Zhu L, Wasey A, White SH, Dalbey RE. (2013). Charge composition features of model single-span membrane proteins that determine selection of YidC and SecYEG translocase pathways in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 288: 7704-7716.
- Zimmer J, Nam Y, Rapoport TA. (2008). Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455: 936–943.

第4章 謝辞

本研究は、指導教官である塚崎智也准教授の厳しくも温かいご指導により達成されたものです。素晴らしい研究環境と的確な助言をいただき、心から感謝いたします。また、構造決定を進める上で技術的に多大なご指導をいただいた田中良樹助教に感謝いたします。実験面でサポートしていただいた吉海江国仁研究員、小林久美技術員に感謝いたします。秘書の阿部香代さん、鈴木千裕さんには研究面のみならず生活面においてもご協力をいただき感謝いたします。SecDFの結晶構造解析でお世話になった河野能顕博士、平田邦生博士、山下恵太郎博士を始め、SPring-8のスタッフの皆様に感謝いたします。タンパク質膜透過実験でお世話になった京都大学の森博幸准教授に感謝いたします。プロトン透過実験でお世話になった大阪大学の南野徹准教授、理研の森本雄祐博士に感謝いたします。分子動力学計算でお世話になった理研の杉田有治博士、森貴治博士に感謝いたします。アドバイザーとして研究を進める上での助言をしてくださった箱嶋敏雄教授、塩崎一裕教授に感謝いたします。また、同期としてこれまでお互いに切磋琢磨してきた菅野泰功さんをはじめ、研究を共にしてきた膜分子複合機能学研究室の皆さんに感謝いたします。

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感謝いたします。

サブリ情報

ATGGGCCGTCCGAATCCGTGGACCGCATTACTGCTGCTGCTGACCCTGCTGG
GTAGCCTGCTGTATATCTGGCGTCCGTGGGAACATAAAAATGATCCGTGGTCA
CTGTGGAATGATCAGTATCAGTTTATGACCCTGGGTCTGGATCTGAAAGGTGG
TCTGCGTATTGAACTGGCACCGGAAAGCGGCACCGCAACCCGTGATGAACTG
GATCGTGTTAAAACCGTTATTGAAAATCGTATTAATGCCCTGGGTGTTGCAGAA
CCGACCGTTACCGTTAGCGGTGGTAAACGTGTTGTTGTTGAAATTCCGGGTGC
AACACCGGCAGTTCAGGATCGTGACGTCAGCATTATTCAGCAGACCGCACGT
CTGGAATTTGCTATTGTTAATAGTGATGCAAACCGGATCCTGCCGTTCTGTA
AAAAATCCGCGTAGCAGCGGTTATACCCTGGCACAGCTGGGTCCGGTTGTT
GCAACCGGTGAAACCATTGCAGATGCAACCAGCGGTACAGATCAGCGTAGCG
GTCAGTGGGTTGTTAACTTTAAAACCGGATGCCGGTGCAAAAACCTTTGGT
GATTTTACCGGCCAAAATGTGAATCGTCTGATGGCAGTTGTTCTGGATGATCA
GATTCAGAGCGTTGCAACCATTAATCAGCGTCTGTTTCGTGATATTCAGATTAG
CGGTAATTTACACCGGAAGAAGCAAGTCAGCTGGCACTGGTTCTGAAAAGC
GGTGCAGTCCGATTAAAATCGTTACCGCAGCAGAACGTAGTATTGGTCCGAG
CCTGGGTGCAGATGCCATTCGTAGCGGTGCAATTGCCGCACTGGTTGGTATT
GGTCTGGTTTTTTGTTATGCTGTTTGCCTATTATGGTCTGTGGTTTGGCCTGGTT
GGTGCAGTGGGTCTGCTGTTTAGCAGCATTATTATCCTGGGTATTCTGGGTGG
TTTTGGTGCAACCCTGACACTGCCTGGTATTGCCGGTCTGGTGCTGACCATTG
GTGCAGCAGTTGATGGTAATGTTATTAGCTTTGAACGCATCAAAGAAGAAGT
GCTCGCGGTAAAGGTATCAAAAATGCAATTGGTGCCGGTTATGAACATTCAAC
CGCAGCAATTCTGGATGTTAATGCAAGCCATCTGCTGAGCGCACTGGCACTGT
ATAACTATAGTACCGGTGCAGTTAAAGGTTTTGCAGTGACCCTGATTATTGGTG
TTATTGCAAGCACCTTTAGCAATCTGGTGTTTGCCAAATGGTTTATGCAGTGGC
TGGCCAGCGTCGTCCGAATATGAGCGCACCGCAGTGGATTAAACATAACCA
TTTCGACTTTATGAAACCTGCCAAAGTTATTACCACCCTGAGCGTGCTGCTGG
CGCTGGCAGGCGCAGCACTGGTGGCAACACGTGGTCTGAATTATGGTGTGTA
TTTTGCTCCGGGTACGACCCTGACCGCACGCGTTGATCGTCAGGTTACCACC
GAACAGCTGCGTAATAGCGTTATTGGTGCGGGTGTAGCAAAGTTACCGGTCA
GAGCGCAACCATTAGCGTGATACCACCCTGGTCAGCAGGGCCAGAATTTT
ACCGTTAAAGTGCCGGAAGTGAATGATGCCGAAGTTAAACAAATTGGCGCAGC
CATTGGTAAACTGCCTCAGGGTCAGGTTCTGGCAAGCGAAACCGTTGGTCCG
GCAGTTGGTAAAGAAGTACCCAGAAAACCATTTATGCGGTTCTGCTGGGCCT

GGGCCTGATTCTGGTTTATGTTGGTTTTTCGCTTTGATTTTCATTATGGGTCTGGG
TAGTATTATCGCAGCGATTCATGATGTTGCGATTGCAATGGGTCTGTTTTCACT
GCTGGGACTGGAATTTACCGTTGCAAGCGTTGCAGCACTGCTGACACTGATTG
GTTATAGCCTGAATGATAGCATTATCGTGAGCGATCGTATTCGCGAAAACATG
AAAACCATGCGTGGTCATAGCTATCGCGAAATTGTTAATGCCGCAATTAATCA
GACCCTGAGCCGTACCGTTATGACCAGCGTTAGCACCATGCTGCCGCTGATT
AGTCTGCTGATTTTTGGTGGTCCGGTTCTGCGTGATTTTAGTCTGATTCTGCTG
GTTGGCATTCTGGTGGGCACCTATAGCAGCATCTATATTGTTGCACCTCTGGT
GGTGTATTTTGAAGAATGGCGTGATAAAAATCGTGCAGCCAAACCGGTTACCA
CTAGTcatcatcaccaccatcaccatcatTAA

サプリー配列 1. *DrsecDF* の DNA 配列 (Gene ID : 1799461)

アミノ酸配列 Met-28-768 をコードする DNA 配列を大文字で、3'末端に付加したヒスチジン 8 タグをコードする DNA 配列を小文字で示した。

MGRPNPWTALLLLTLLGSLLYIWRPWEHKNDPWSLWNDQYQFMTLGLDLKGG
RIELAPESGTATRDELDRVKTVIENRINALGVAEPTVTVSGGKRVVVEIPGATPAVQ
DRARSIIQQTARLEFRIVNSDAKPDPVREKNPRSSGYTLAQLGPVVATGETIADA
TSGTDQRSGQWVNFKTTDAGAKTFGDFTGKNVNRLMAVVLDDQIQSVATINQR
LFRDIQISGNFTPEEASQLALVLKSGALPIKIVTAAERSIGPSLGADAIRSGAIAALVG
IGLVFVMLFAYYGLWFGLVGALGLLFSSIIILGILGGFGATLTLPGIAGLVLTIGA
AVDGNVISFERIKEELARGKGIKNAIGAGYEHSTAAILDVNASHLLSALALYNYSTGAVK
GFAVTLIIGVIASSTFVSNLVFAKWFMQWLAQRPNMSAPQWIKHTHFDFMKPAKVIT
TLVLLALAGAALVATRGLNYGVDFAPGTTLTARVDRQVTTEQLRNSVIGAGVSKV
TGQSATIQRDTPGQQGNFTVKVPELNDAEVKQIGAAIGKLPQGQVLASETVGP
AVGKELTQKTIYAVLLGLGLILVYVGFDFIMGLGSIIAIIHDVAIAMGLFSLLGLEF
TVASVAALLTLIGYSLNDSIIVSDRIRENMKTMRGHSYREIVNAAINQTLRSRTVM
TSTMLPLISLLIFGGPVLRFSLILLVILVGTYSYIYVAPLVVYFEEWRDKNRAAKPV
TTSHHHHHHHH

サプリー配列 2. 結晶化に用いた *DrSecDF* のアミノ酸配列

Met-28-768, 3'末端にヒスチジン 8 タグを付加した。

ATGGACCGGAAAAACCTCACCAGCCTGTTCCCTGCTCGGCGTGTTTCTTCTCGC
CCTCCTCTTCGTATGGAAGCCCTGGGCCCCCGAGGAGCCCAAGGTCCGCCTG
GGCCTGGACCTGAAGGGGGGTCTGAGGATCGTCCTCGAGGCCGACGTGGAG
AACCCACCCCTGGACGACCTGGAGAAGGCCAGGACCGTCCTGGAGAACCGG

ATCAACGCCCTCGGCGTGGCCGAGCCCCTCATCCAGATCCAGGGGCAGAAG
CGGATCGTGGTGGAGCTCCCCGGCCTCTCCCAGGCCGACCAGGACCGCGCC
CTCAAGCTCATTGGGCAGAGGGCGGTCTGGAGTTCCGCATCGTCAAGGAGG
GGGCCACGGGCACCACCGTGGCCCAGATCAACCAGGCCCTCCGGGAGAACC
CCAGGCTCAACCGGGAGGAGCTGGAGAAGGACCTGATCAAGCCGGAGGACC
TCGGCCCCGCCCTCCTCACCGGGGCGGACCTGGCCGACGCCCGGGCGGTCT
TTGACCAGTTCGGCCGTCCCCAGGTCTCCCTCACCTTCACCCCGGAAGGGGC
GAAGAAGTTTGAGGAGGTCACCCGGCAGAACATCGGCAAGCGGCTCGCCATC
GTCCTGGACGGCCGGTCTACACCGCCCCGTGATCCGCCAGGCCATCACC
GGAGGCCAGGCGGTATAGAGGGGCTTTCCAGCGTGGAGGAGGCGAGCGAG
ATCGCCCTCGTCTGCGCTCGGGCTCCCTGCCGTCCCCCTCAAGGTGGCG
GAGATCCGGGCCATCGGCCCCACCCTGGGCCAGGACGCCATCCAGGCGGGG
ATCCGCTCCGCCCTCATCGGCACCCTGGCCATCTTCCTCCTCATCTTCGCCTA
CTACGGCCCCACCTGGGGCTCGTGGCCTCCTTGGGCTCCTCTACACCTCG
GCCCTCATCCTGGGCCTCCTCTCGGGCCTCGGGGCCACCCTGACCCTCCCC
GGCATCGCCGGCCTCGTCCTCACCTGGGGGCGGCGGTGGACGGCAACGTC
CTCTCCTTTGAGCGCATCAAGGAGGAGCTCAGGGCCGGGAAGAAGCTCCGCC
AGGCCATCCCCGAGGGCTTCGGCCACTCCACCCTCACCATCATGGACGTGAA
CATCGCCCACCTCCTGGCGGCGGCCGCCCTCTACCAGTACGCCACCGGGCC
GGTGCGGGGCTTCGCCGTGATCCTGGCCATCGGCGTGGTGGCCAGCGTCTT
CTCCAACCTCGTCTTCAGCCGCCACCTCCTGGAGCGCCTGGCCGACCGGGG
CGAGATCCGCCCCCCATGTGGCTCGTGGACCCGCGGTTCAACTTCATGGGC
CCCGCCCGCTACGTACGGCGGCCACCCTCCTCCTCGCCGCTTTGGCGGCG
GGCGTGGTCTTCGCCAAGGGCTTCAACTACTCCATTGACTTCACCGGGGGGA
CAGCCTACACCCTGCGGGCCGAGCCCAACGTGGAGGTGGAGACGCTGAGGC
GTTTCCTCGAGGAGAAGGGCTTCCCCGGCAAGGAGGCGGTGATCACCCAGG
TCCAGGCCCCACGGCGGCCTACCGGGAGTTTCTGGTGAAGCTCCCGCCCC
TTTCCGACGAGAGGCGGCTTGAGCTGGAACGGCTTTTCGCCTCCGAGCTCAA
GGCCACGGTCCTGGCCTCGGAGACCGTGGGGCCGGCCATCGGGGAGGAGC
TGAGGCGCAACGCGGTGATGGCGGTCCTGGTGGGGCTTGGCCTCATCCTCC
TCTACGTGGCCTTCCGCTTTGACTGGACCTTCGGCGTGGCCAGCATCCTGGC
CGTGGCCCACGACGTGGCCATCGTGGCCGGGATGTACAGCCTCCTGGGCCT
GGAGTTCTCCATCCCCACCATCGCCGCCCTCCTCACCATCGTGGGCTACTCC
ATCAACGACTCCATCGTGGTCTCGGACCGCATCCGGGAGAACCAGAAGCTCC
TCCGGCACCTGCCCTACGCCGAGCTCGTCAACCGCTCCATCAACCAGACCCT

CTCCCGCACGGTGATGACGAGCCTCACCACCCTCCTTCCCATCCTCGCCCTC
CTCTTCCTGGGAGGGAGCGTCCTCAGGGACTTCGCCCTGGCCATCTTCGTGG
GCATCTTCGTGGGAACCTACAGCTCCATCTACGTGGTGAGCGCCTTGGTGGT
GGCCTGGAAAACCGCAGGAAGGCCCAAGAGGCCAGCAAGGCCcaccatcaccat
caccatcaccatcaccatTAG

サブリ配列 3. *DrsecDF* の DNA 配列 (Gene ID : 3168575)

アミノ酸配列 1-735 をコードする DNA 配列を大文字で, 3'末端に付加したヒスチジン 10 タグをコードする DNA 配列を小文字で示した.

DRKNLTSLFLLGVFLLALLFVWKPWAEPEPKVRLGLDLKGGLRIVLEADVENPTLD
DLEKARTVLENRINALGVAEPLIQGQKRIVVELPGLSQADQDRALKLIGQRAVLE
FRIVKEGATGTTVAQINQALRENPRLNREELEKDLIKPEDLGPPLLTGADLADARA
VFDQFGRPQVSLTFTPEGAKKFEEVTRQNIGKRLAIVLDGRVYTAPVIRQAITGGQ
AVIEGLSSVEEASEIALVLRSGSLPVPLKVAEIRAIGPTLGQDAIQAGIRSALIGTLAIF
LLIFAYYGPHLGLVASLGLLYTSALILGLLSGLGATLTLPGIAGLVTLGAAVDGNVL
SFERIKEELRAGKCLRQAIPEGFRHSTLTIMDVNIAHLLAAAALYQYATGPVRGFV
ILAIGVVASVFSNLVFSRHLLERLADRGEIRPPMWLVDPFRNFMGPARYVTAATLL
LAALAAGVVFAKGFNYSIDFTGGTAYTLRAEPNVEVETLRRFLEEKGFPGKEAVIT
QVQAPTAAYREFLVKLPPLSDERRLELERLFASELKATVLASETVGPAGEELRRN
AVMAVLVGLGLLILLYVAFRFDWTFGVASILAVAHDVAIVAGMYSLLGLEFSIPTIAAL
LTIVGYSINDSIVVSDRIRENQKLLRHLPYAELVNRSINQTLRSTVMTSLTLLPILAL
LFLGGSVLRDFALAIIFVGIFVGTYSYIYVVSALVVAWKNRRKAQEASKAHHHHHHH
HHH

サブリ配列 4. 結晶化に用いた *TtSecDF* のアミノ酸配列

1-735, 3'末端にヒスチジン 10 タグを付加した.