

様 式 Z - 7

平成 2 6 年度科学研究費助成事業 実績報告書 (研究実績報告書)

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(B) 4. 研究期間 平成 2 6 年度 ~ 平成 2 8 年度
5. 課題番号

2	6	2	9	1	0	2	3
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 すべての生物に共通する膜タンパク質形成過程の構造生命科学

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
8 0 4 3 6 7 1 6	ツカザキ トモヤ 塚崎 智也	バイオサイエンス研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

生体膜には、生命活動に不可欠な多くの膜タンパク質が埋め込まれ機能している。YidCは、細菌からミトコンドリアまで広く保存された膜タンパク質で、新規に合成されるタンパク質の膜組み込みに関与する。YidCは2つの機能を持つ。YidCはタンパク質の膜組み込みを行うほか、膜タンパク質の正しいフォールディングを促進するシャペロンとして働く。その基質として呼吸鎖複合体のサブユニットなどが含まれているため、細菌の生育に必須である。しかしながら、YidCの膜貫通領域を含んだ構造情報は得られておらず、YidCがどのように基質と相互作用し膜へと組み込むのかなど、その分子機構は明らかとなっていない。我々は、Bacillus halodurans 由来のYidCと大腸菌由来YidCの結晶構造をそれぞれ2.4、3.2 オングストローム分解能で決定した。YidCは新規フォールドを持つ5回膜貫通型タンパク質であり、膜貫通ヘリックスの内側に、多くの親水的なアミノ酸残基を含んだ親水的な溝を持っていた。この溝は、細胞内側と膜側に開いている一方で、細胞外側には閉じていた。構造情報に基づいた枯草菌を用いた遺伝学的な解析と光クロスリンク実験の結果、基質はYidCの親水的な溝と相互作用すること、溝の内側に存在する保存されたArgがYidCの機能に重要であることが明らかとなった。これらの知見から、YidCが親水的な溝によって疎水的な膜内に親水的な環境を形成し、基質の細胞外領域と膜内で相互作用することで基質を膜内に引き込み、タンパク質膜組み込みを達成するという分子機構を提唱した。

10. キーワード

- (1) YidC (2) Sec (3) 膜タンパク質 (4) 組込み
 (5) 蛋白質輸送 (6) SecYEG (7) X線結晶構造解析 (8) 構造生命科学

(注) ・印刷に当たっては、A 4 判 (縦長) ・両面印刷すること。

(1 / 9)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の予定通り, YidCの構造の報告を行った。研究計画にそって順調に進めている。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

昨年度構造を決定したYidCの構造情報に基づく機能解析と, YidCを含む複合体の構造解析を進める。

YidCの機能解析: YidCによる膜組込みや膜シャペロンとして機能する分子メカニズムの解明を目指し, YidC単独の構造情報を基盤とした機能解析を開始させる。申請者らは同一生物種*T. t.* のSecY複合体, SecA, SecDFの構造を決定し, 機能解析の系を組んでいる。*T. t.*

YidCの精巧なホモジーマデルを作製し, 機能解析へと進める。構造情報は機能解析が進んでいる大腸菌のYidCや枯草菌YidCの解析にも適用させる。構造に基づき種々の変異体を作製し, 遺伝学的・生化学的解析ならびに分子動力的解析を進め, YidCが介助するタンパク質膜組込み機構を解明する。YidCは他のSecタンパク質などと複合体を形成するが, その詳細な相互作用とメカニズムについては不明であるため, Secタンパク質との複合体の構造情報が必要である。

YidCとSecタンパク質複合体の精製, 結晶化: YidCは, SecYEGやSecDFと相互作用していることが示されている(Nouwen and Driessen et al., 2002; Sachelaru et al., JBC 2013)。YidCの分子メカニズムの完全理解の為には, これら巨大な複合体の解析が欠かせない。

大腸菌 SecYEG, SecDF, YidC は同時に過剰発現させることができ(Bieniossek et al., Nat. Methods 2009), 大腸菌 SecYEG-SecDF-YidC 複合体は, 適切な界面活性剤を選択すれば単離できる(Duong & Wickner, 1997, EMBOJ.). 同様の手法により*T. t.* 由来YidCと, Secタンパク質を同時に大腸菌に過剰発現させ, 精製する系を組む。様々な界面活性剤を検討し, 安定に複合体を精製できる条件を探索する。状況に応じて, それぞれの構造情報と生化学的なデータに基づき, ジスルフィド結合などによる架橋によって複合体を安定化させ結晶化する手法(Inaba et al., Cell 2006; Saitoh et al., EMBO J 2007)も用いる。安定に複合体を単離できれば, 結晶構造解析を進める。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

273円のみ次年度とした。大きな変更はなく, おおむね予定通り進行している。

(使用計画)

273円のみ次年度とした。大きな変更はなく, おおむね予定通り進行している。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(4)件 うち査読付論文 計(4)件

著者名		論文標題			
Kaoru Kumazaki, Shinobu Chiba, Mizuki Takemoto, Arata Furukawa, Ken-ichi Nishiyama, Yasunori Sugano, Takaharu Mori, Naoshi Dohmae, Kunio Hirata, Yoshiko Nakada-Nakura, Andres D. Maturana, Yoshiki Tanaka, Hiroyuki Mori, Yuji Sugita, Fumio Arisaka, Koreaki Ito, Ryuichiro Ishitani, Tomoya Tsukazaki and Osamu Nureki		Structural basis for Sec-independent membrane protein insertion by YidC			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Nature	有	509	2 0 1 4	516-520	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/nature13167					

著者名		論文標題			
Kaoru Kumazaki, Tomoya Tsukazaki, Tomohiro Nishizawa, Yoshiki Tanaka, Hideaki E. Kato, Yoshiko Nakada-Nakura, Kunio Hirata, Yoshihiro Mori, Hiroaki Suga, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki		Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from Bacillus halodurans			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Acta Crystallographica Section F	有	70	2 0 1 4	1056-1060	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1107/S2053230X14012540					

著者名		論文標題			
Kaoru Kumazaki, Toshiki Kishimoto, Arata Furukawa, Hiroyuki Mori, Yoshiki Tanaka, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Tomoya Tsukazaki, Osamu Nureki		Crystal structure of Escherichia coli YidC, a membrane protein chaperone and insertase			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Scientific Reports 4	有	4	2 0 1 4	7299-7299	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1038/srep07299					

著者名		論文標題【掲載確定】			
Naomi Shimokawa-Chiba, Kaoru Kumazaki, Tomoya Tsukazaki, Osamu Nureki, Koreaki Ito, Shinobu Chiba		Hydrophilic microenvironment required for the channel-independent insertase function of YidC protein.			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Proc. Natl. Acad. Sci. USA		有	印刷中	2 0 1 5	印刷中
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
なし					

(学会発表) 計(17)件 うち招待講演 計(10)件

発表者名		発表標題	
千葉志信, 熊崎薫, 塚崎智也, 濡木理, 伊藤維昭		YidCによるタンパク質膜組込機構	
学会等名		発表年月日	発表場所
第61回日本生化学会近畿支部例会		2014年05月17日	京都産業大学(京都府・京都市)

発表者名		発表標題	
古川 新, 熊崎 薫, 田中良樹, 濡木 理, 塚崎 智也		バクテリア膜タンパク質挿入装置YidCの相互作用解析、機能解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第11回 21世紀大腸菌研究会		2014年06月05日～2014年06月06日	ホテル大観(岩手県・盛岡市)

発表者名		発表標題	
菅野 泰功, 春山 隆充, 田中 良樹, 紺野 宏記, 塚崎 智也		Secマシーナリーによるタンパク質膜透過の活写にむけて	
学会等名		発表年月日	発表場所
第11回 21世紀大腸菌研究会		2014年06月05日～2014年06月06日	ホテル大観(岩手県・盛岡市)

発表者名		発表標題	
塚崎 智也, 春山 隆充, 菅野 泰功, 田中 良樹, 紺野 宏記		Secタンパク質膜透過装置の活写にむけて	
学会等名		発表年月日	発表場所
第14回日本蛋白質科学会年会(招待講演)		2014年06月25日~2014年06月27日	ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(神奈川県・横浜市)

発表者名		発表標題	
熊崎 薫, 千葉 志信, 武本 瑞貴, 古川 新, 菅野 泰功, 森 貴治, 田中 良樹, 杉田 有治, 伊藤 維昭, 石谷 隆一郎, 塚崎 智也, 濡木 理		膜タンパク質YidCによるタンパク質膜組み込み機構の構造基盤	
学会等名		発表年月日	発表場所
第14回日本蛋白質科学会年会(招待講演)		2014年06月25日~2014年06月27日	ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(神奈川県・横浜市)

発表者名		発表標題	
塚崎智也		タンパク質を膜へと組み込むYidCの立体構造とその機能	
学会等名		発表年月日	発表場所
日本化学会 会員増強のための講演会 一細胞機能を制御するタンパク質分子の構造と物性-(招待講演)		2014年08月08日	山形大学(山形県・山形市)

発表者名		発表標題	
千葉志信, 熊崎薫, 塚崎智也, 濡木理, 伊藤維昭		YidCによるチャネルに依存しない蛋白質膜組込機構	
学会等名		発表年月日	発表場所
第87回日本生化学会学会年会		2014年10月15日~2014年10月18日	国立京都国際会館/グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)

発表者名	発表標題	
熊崎薫, 千葉志信, 武本瑞貴, 古川新, 伊藤維昭, 石谷隆一郎, 塚崎智也, 濡木理	タンパク質膜組み込みに関わる膜タンパク質YidCのX線結晶構造解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
平成26年度日本結晶学会年会	2014年11月01日～2014年11月03日	東京大学(東京都・文京区)

発表者名	発表標題	
塚崎智也, 熊崎薫, 千葉志信, 武本瑞貴, 古川新, 伊藤維昭, 石谷隆一郎, 濡木理	タンパク質の膜への組み込みに関わる膜タンパク質YidCの結晶構造と作業機序	
学会等名	発表年月日	発表場所
平成26年度日本結晶学会年会(招待講演)	2014年11月01日～2014年11月03日	東京大学(東京都・文京区)

発表者名	発表標題	
塚崎智也	細菌における外膜蛋白質を形成させる分子装置の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
アステラス病態代謝研究会 第45回研究報告会(招待講演)	2014年10月18日	日本工業倶楽部(東京都・千代田区)

発表者名	発表標題	
塚崎智也	タンパク質のかたちを知ること	
学会等名	発表年月日	発表場所
奈良先端科学技術大学院大学 公開講座2014	2014年10月25日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)

発表者名	発表標題	
Tomoya Tsukazaki	Structure of YidC reveals a mechanism of Sec-independent membrane protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
2014 Joint Symposium, Integrative Microbiology (招待講演)	2014年10月06日	ミネソタ(アメリカ合衆国)

発表者名	発表標題	
千葉志信, 熊崎薫, 塚崎智也, 濡木理, 伊藤維昭	YidCによるタンパク質膜組込機構の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
第37回 日本分子生物学会年会 (招待講演)	2014年11月25日 ~ 2014年11月27日	パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

発表者名	発表標題	
塚崎智也	タンパク質を膜へと組み込む膜タンパク質YidCの立体構造とその機能	
学会等名	発表年月日	発表場所
第1197回ウイルス研究所セミナー/共同利用・共同研究拠点セミナー (招待講演)	2014年12月10日	京都大学(京都府・京都市)

発表者名	発表標題	
Yasunori Sugano, Takamitsu Haruyama, Yoshiki Tanaka, Hiroki Konno, Tomoya Tsukazaki	Approach for Visualization of Sec Translocon Machinery	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「動的秩序と機能」第3回公開国際シンポジウム	2015年01月10日 ~ 2015年01月11日	合歓の郷(三重県・志摩市)

発表者名	発表標題	
塚崎智也, 熊崎薫, 千葉志信, 武本瑞貴, 古川新, 伊藤維昭, 石谷隆一郎, 濡木理	タンパク質膜組込み insertase YidC の立体構造と分子機構	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本化学会第95春季年会(招待講演)	2015年03月26日~2015年03月29日	日本大学(千葉県・船橋市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
塚崎智也	プロトン駆動型タンパク質分泌モーター SecDF	
学会等名	発表年月日	発表場所
分子研研究会「膜タンパク質内部のプロトンの透過を考える」(招待講演)	2015年04月20日~2015年04月21日	岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)

(図書) 計(2)件

著者名	出版社		
編集=田中啓二, 若槻壮市	羊土社		
書名	発行年	総ページ数	
実験医学(増刊「構造生命科学で何がわかるのか, 何ができるのか」)	2014	230(113-117)	

著者名	出版社		
熊崎薫, 千葉志信, 塚崎智也, 濡木理	膜組み込み酵素YidCによるタンパク質の細胞膜への組み込みの分子機構		
書名	発行年	総ページ数	
新着論文レビュー 8680	2014	-	

14.研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

<p>タンパク質を細胞膜に組み込むメカニズムを解明 - バクテリアから人まで共通した基本的な生命現象の理解 - http://www.naist.jp/pressrelease/detail_j/topics/1752/ タンパク質膜組込装置YidCの機能に重要な性質を発見 ~ 細胞の基本的なしくみの解明に向けて ~ http://www.naist.jp/pressrelease/detail_j/topics/2012/ 膜組み込み酵素YidCによるタンパク質の細胞膜への組み込みの分子機構 http://first.lifesciencedb.jp/archives/8680 塚崎准教授らの論文がScientific Reportsに注目の論文として取り上げられました。 http://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=1185</p>
--