

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14713

研究課題名(和文) 1分子解析によるプロトン駆動型輸送モーターの動態探査

研究課題名(英文) Dynamism of a proton-driven protein translocation motor.

研究代表者

塚崎 智也 (Tsukazaki, Tomoya)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80436716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の膜透過反応はすべての生物に保存された基本的なメカニズムの一つである。その反応を達成させるためのプロトン駆動型のモーターSecDFがある。SecDFは膜タンパク質であり、膜貫通領域と可溶性領域を持つ。可溶性領域は非常に可動性に富んでいることが示されていたが、その詳細は明らかではなかった。本研究では、これまでの報告とは異なるかたちのSecDFの結晶構造解析を明らかとした。続く機能解析もあわせ、SecDFの機能モデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：The protein translocation across the membrane is one of the fundamental, conserved reactions in all cells. SecDF, a proton driven motor, drives the protein translocation. SecDF has transmembrane helices and soluble domains. Although the soluble region was shown to be highly mobile, the details were not clear. In this study, we have determined the crystal structures of SecDF that are different from the previous report. the data and the subsequent functional analyses, we propose a functional model of SecDF.

研究分野：構造生物学

キーワード：エックス線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質でリボソームにより合成されたタンパク質が膜を越えて輸送される過程は、すべての生物に保存されている基本的なメカニズムの一つである。タンパク質の膜を越えた輸送については、ノーベル賞の受賞にもつながった「シグナル仮説」(1975年)をはじめ数多くの研究成果が報告されている。2000年ごろから、代表者らのグループをはじめいくつかのグループによってタンパク質輸送に関わる Sec タンパク質群の X 線結晶構造解析が達成され、原子レベルでタンパク質輸送が議論できるようになってきた。しかしながら、X 線結晶構造解析では詳細な「静止像」は得られるものの、「動的な情報は得られない」。膜タンパク質 SecDF、SecA ATPase はそれぞれプロトン駆動型、ATP 駆動型のモータータンパク質であり Sec トランスロコンチャネル(膜タンパク質複合体 SecYEG)と複合体を形成し、機能する。SecA は細胞質で輸送するタンパク質を、Sec チャネルへと押し込む構造変化を繰り返す。一方、SecDF は Sec チャネルから輸送するタンパク質を細胞外側で段階的に引き抜く構造変化を繰り返していると考えられている。この2つのモーターの作用によって、基質タンパク質を細胞外へ送り出すと考えられているが、実際にどのようにプロトン透過のエネルギーや ATP の加水分解のエネルギーを運動エネルギーに変換しているのか不明な点が多く、さらなる解析が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では SecDF に着目して解析を進めた。SecDF はバクテリアに特有の膜タンパク質で膜貫通ドメインと細胞外ドメインから構成される。2011年に SecDF の全長構造(F型)が初めて報告され(Tsukazaki *et al.*, *Nature* 2011), SecDF は 12 本の  $\alpha$ ヘリックスから構成される膜貫通領域と可動性の細胞外のペリプラズム領域からなることが示された。この報告において、SecDF は膜貫通ドメインを介した水素イオンの細胞内への流入に伴い「F型」、「I型」と命名された2つの構造を繰り返すことにより、SecYEG から出てきたタンパク質を捕まえ細胞外へと牽引するとされている。しかし、以前に報告された SecDF の全長構造は F 型のみであり、さらなる詳細な議論を行うために高い解像度での I 型の構造情報が必要であった。そこで、本研

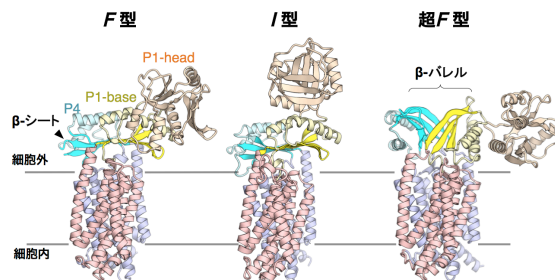
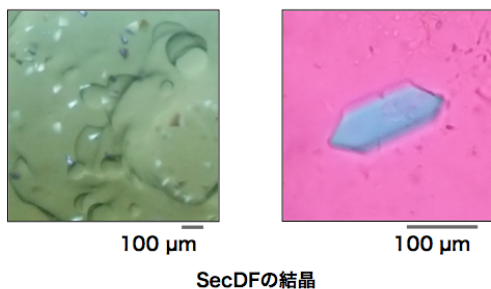
究では F 型ではない SecDF の全長構造を明らかとすべく研究を進めた。

### 3. 研究の方法

SecDF の I 型構造解析を達成すべく、安定に I 型構造をとる変異体を見出し、そのサンプルで結晶化を行った。また、F 型と I 型以外の構造を明らかとすべく、異なる生物種由来の SecDF の精製と結晶化を進めた。結晶化は脂質との共結晶化である脂質キュービク相法で行い、X 線回折実験は大型放射光施設 SPrigg-8 のビームライン BL32XU で行った。得られたデータセットから SecDF の I 型と新しく見出された超 F 型構造を明らかとした。これら新しい構造情報に基づき、機能解析や時間に依存した変化を知るために分子動力学シミュレーションを行った。

### 4. 研究成果

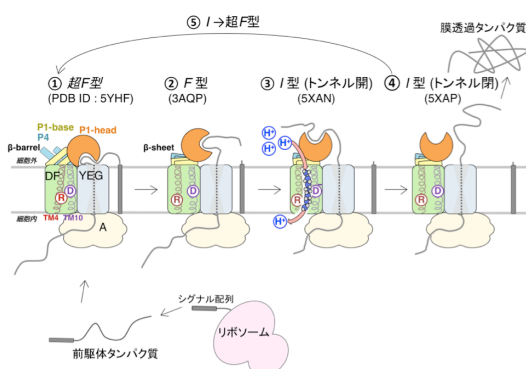
SecDF の I 型構造では、2 つの特筆すべき特徴があった。1 つめの特徴は、SecDF の細胞外ドメインの 1 つである「P1 ドメイン」の凹みにタンパク質の一部を模した小分子が結合していたことである。そこで、細胞外へと輸送されるタンパク質と SecDF の相互作用部位を生化学的な実験により確認した。凹みに UV 架橋剤であるアミノ酸アナログ pBPA を部位特異的に導入し、タンパク質膜透過反応中間体を作成し、UV 照射を行った。その結果、基質タンパク質との相互作用が認められた。これらの結果から、この凹みが輸送タンパク質の結合部位の一つであることが判明した。この領域以外に相互作用部位があると考えられたため、引き続き解析を進めている。2 つめの特徴として、SecDF の膜貫通領域ドメインに細胞内側から細胞外側まで貫通したトンネル構造が認められた。このトンネルの中心には、SecDF の機能(水素イオン透過とタンパク質輸送活性)に必須のアスパラギン酸が存在していたため、この領域が水素イオンの通り道であることが推測された。コンピュータを用いた SecDF の分子動力学計算を進めたところ、このアスパラギン酸の水素イオンの結合状態の変化によりトンネルの開閉が起こることが示唆された。トンネル内に水分子が入り込み水素結合を介して細胞質から細胞外まで一列に並ぶことが観察された。この解析によって、時間の経過に伴って一時的に水素イオンのためのチャネルが形成されることが判明した。結晶構造でみられたトン



ネルを利用して水素イオンが細胞外から細胞質へと流入すること考えられる。また、P1ドメインは可動性に富む領域であるが、この領域をジスルフィド結合によってI型に固定したSecDFは水素イオンの流入とタンパク質の膜透過活性が阻害されたため、P1ドメインの動きと水素イオンとの関連性がはじめて示された。

SecDFの超F型構造の解析では、これまで安定と考えられていたP1領域に含まれるベータシート構造がフォールディングチェンジして、ベータバレル構造に変化することが明らかとなった。その結果、可動性に富むP1領域はさらに膜側に近接するかたちとなっている。このドラスティックな構造変化が実際に生体内で起こるのかについては、システイン残基の導入による部位特異的架橋実験によって確認した。さらに、超F型構造ではこれまでの解析では相互作用していなかった膜貫通領域に存在する必須のアミノ酸であるアスパラギン酸残基とアルギニン残基が相互作用しており、その結果F型構造と変化していることが明らかとなった。実際に、これら必須のアミノ酸に変異を導入することで、超F型構造をとらなくなったため、F型構造形成には膜貫通領域の必須のアスパラギン酸残基とアルギニン残基が重要な役割を果たすことが生化学的な実験からも示された。

これら結果と過去の知見を組み合わせることで、「SecDFは超F型の状態でP1ドメインの凹みで輸送されるタンパク質と結合し、I型へと移行することで輸送タンパク質を細胞外へと牽引する。この構造変化は、膜貫通ドメインに形成されるトンネルに入り込んだ水分子を介した水素イオンの流入や、必須アミノ酸の相互作用変化に伴う。この超F型、F型I型のサイクルを繰り返すことによりタンパク質の輸送が達成される」という新規モデルを提唱した(下図)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件) すべて査読あり

- ① \*Tsukazaki T. Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiol. Lett.* (2018) in

press.

DOI: 10.1093/femsle/fny112

- ② Furukawa A, Nakayama S, Yoshikaie K, Tanaka Y, and \*Tsukazaki T. Remote Coupled Drastic  $\beta$ -Barrel to  $\beta$ -Sheet Transition of the Protein Translocation Motor. *Structure* 26, 485-489 (2018) DOI: 10.1016/j.str.2018.01.002
- ③ Daimon Y, Iwama-Masui C, Tanaka Y, Shiota T, Suzuki T, Miyazaki R, Sakurada H, Lithgow T, Dohmae N, Mori H, \*Tsukazaki T, \*Narita S, and \*Akiyama Y. The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the  $\beta$ -barrel assembly machinery complex. *Mol. Microbiol.* 106, 760-776 (2017) DOI: 10.1111/mmi.13844
- ④ Tanaka Y, Iwaki S, and \*Tsukazaki T. Crystal Structure of a Plant Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family Protein. *Structure* 25, 1455-1460 (2017) DOI: 10.1016/j.str.2017.07.009
- ⑤ Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, and \*Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLOS ONE* 12, e0183434 (2017) DOI: 10.1371/journal.pone.0183434
- ⑥ Furukawa A, Yoshikaie K, Mori T, Mori H, Morimoto VY, Sugano Y, Iwaki S, Minamino T, Sugita Y, Tanaka Y, and \*Tsukazaki T. Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF *Cell Rep.* 19, 895-901 (2017) DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.030

[学会発表] (計 24 件)

- ① 塚崎智也 「タンパク質を膜透過させる Sec タンパク質の構造生物学」平成 29 年度第 2 回生物構造学研究会 (2018)
- ② Tomoya Tsukazaki 「Structure-based working model of SecDF, a bacterial protein translocation motor」*Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes* (2018)
- ③ Yasunori Sugano 「Approach for visualizing Sec translocon machinery」*Gordon Research Conference: Protein Transport Across Cell Membranes* (2018)
- ④ 古川新 「極小モータータンパク質のトランスフォーム」奈良先端大学生募集シンポジウム (2018)
- ⑤ 古川新 「タンパク質膜透過を駆動するプロトン駆動型モータータンパク質 SecDF の驚くべき構造変化」2018 年 生体運動

- 研究合同班会議 (2018)
- ⑥ Tomoya Tsukazaki 「Protein Translocation Motor SecDF」 *New trends for Structural Life Science* (2017)
- ⑦ 塚崎智也 「タンパク質膜透過チャネル Sec トランスロコンを経由するタンパク質輸送のメカニズム」 *東京大学物性研究所機能物性セミナー* (2017)
- ⑧ 塚崎智也 「Snapshots of the proton-driven protein secretion motor」 *第17回日本蛋白質科学会年会* (2017)
- ⑨ 塚崎智也 「タンパク質膜透過駆動モータータンパク質 SecDF」 *第14回21世紀大腸菌研究会* (2017)
- ⑩ Tomoya Tsukazaki 「Protein translocation motor SecDF」 *International Symposium on Protein Quality Control* (2017)
- ⑪ Tomoya Tsukazaki 「Snapshots of the proton-driven protein translocation motor」 *EMBO Conference / Protein Translocation and cellular Homeostasis* (2017)
- ⑫ Tomoya Tsukazaki 「Cytoplasmic insights of protein-conducting channel implied from the crystal structures of SecYEG」 *EMBO Conference / Protein Translocation and cellular Homeostasis* (2017)
- ⑬ Tomoya Tsukazaki 「Protein Translocation Motor SecDF」 *New trends for Structural Life Science* (2017)
- ⑭ 田中良樹 「膜輸送装置の構造と機能」 *第90回日本細菌学会総会* (2017)
- ⑮ 古川新 「タンパク質膜透過を駆動するモータータンパク質のスナップショット」 *2017年 生体運動研究合同班会議* (2017)
- ⑯ Arata Furukawa 「Snapshots of a protein translocation motor」 *Dynamic structural biology by next-generation researchers* (2016)
- ⑰ Tomoya Tsukazaki 「Snapshots of a proton-driven protein translocation motor」 *The 42nd Naito Conference on in the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences* (2016)
- ⑱ Tomoya Tsukazaki 「Snapshots of a proton-driven protein translocation motor」 *Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference* (2016)
- ⑲ Arata Furukawa 「Cytoplasmic insights of protein-conducting channel implied from the crystal structures of SecYEG」 *Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference* (2016)

- ⑳ Yoshiki Tanaka 「Complete and Peptide-bound Structures of the Sec translocon」 *Nascent Chain Biology Meeting 2016* (2016)
- ㉑ 塚崎智也 「新生鎖を膜透過させる Sec 蛋白質のX線結晶構造解析」 *第16回日本蛋白質科学会年会* (2016)
- ㉒ 菅野泰功 「Sec トランスロコンの1ユニット再構成系の構築と動的探査」 *第16回日本蛋白質科学会年会* (2016)
- ㉓ 塚崎智也 「SecDFの構造変化」 *第13回21世紀大腸菌研究会* (2016)
- ㉔ 菅野泰功 「蛋白質分泌マシーナリーの動的精密探査に向けて」 *第13回21世紀大腸菌研究会* (2016)

[図書] (計 2件)

- ① 塚崎智也 [中西印刷] 生物物理 Vol. 58 No. 2 「タンパク質膜透過装置の構造生物学」 p67-122(p78-82) (2018)
- ② 塚崎智也 [医歯薬出版] 医学のあゆみ Vol. 262 No. 5 「タンパク質膜透過駆動モーター SecDF の分子機構」 p333-580(p367-372) (2017)

[その他]

ホームページ等

- ① 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・塚崎研  
<http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>
- ② プレスリリース「細胞膜を越えてタンパク質を輸送するモータータンパク質の詳細な作動原理を解明」  
<http://www.naist.jp/news/2017/05/003761.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
塚崎 智也 (TSUKAZAKI, Tomoya)  
奈良先端科学技術大学院大学・  
バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号： 80436716
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者  
田中 良樹 (TANAKA, Yoshiki)  
奈良先端科学技術大学院大学・  
バイオサイエンス研究科・助教  
研究者番号： 10632333
- (4) 研究協力者  
古川 新 (FURUKAWA, Arata)  
菅野 泰功 (SUGANO, Yasunori)