

高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質膜透過のリアルタイム動的探査

Elucidation of protein translocation across the membrane by high-speed AFM

奈良先端科学技術大学院大学 塚崎智也

生体膜は小分子やイオンなどを自由に透過させない性質を持つが、生体膜に存在する様々なトランスポーターなどによってこれらの輸送を可能とする。細胞質でリボソームにより合成された多くのタンパク質もまた生体膜を越えて輸送される。生体内における Sec 複合体を経由する新規に合成されたタンパク質の膜透過は、必須の生命現象である。バクテリアでは、膜タンパク質 SecY, SecE, SecG からなる複合体（タンパク質膜透過チャネル）と SecA ATPase（タンパク質膜透過駆動モーター）が細胞質からペリプラズムへのタンパク質輸送のほとんどを担っている。この際、細胞質で新規に合成されたタンパク質がアンフォールドした状態のまま、SecA が ATP の加水分解のエネルギーを利用した構造変化を繰り返すことで、膜透過を起こすとされているが、どのような構造変化を起こし機能しているのかについては不明である。この基本的な分子メカニズムを詳細に理解することは、学術的に意義深い。

SecYEG と SecA の機能的なオリゴマー状態については、統一見解が得られていなかった。また、SecYEG と SecA は結合と乖離を繰り返しており精密な解析が困難であった。そこで、私たちは SecY の C 末端と SecA の N 末端とを融合させ、SecY-A/E/G 複合体を作成したところ、安定に精製することができた。その精製 SecY-A/E/G 複合体を、膜へと再構成させたリポソームはタンパク質輸送活性を保持していた。このタンパク質膜透過活性の測定には、基質タンパク質として、アンフォールドの状態を保ったまま調製した外膜タンパク質前駆体 proOmpA を用いた。恒常的に SecYEG : SecA = 1 : 1 の状態となっている SecY-A/E/G 複合体は、タンパク質輸送の精緻な解析に適している。

Sec タンパク質によるタンパク質の輸送過程は、数分程度と見積もられており、その構造解析をリアルタイムで追跡するには高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）が適切だと判断した。1 ユニットの SecY-A/E/G 複合体をナノディスクに再構成したものを利用し、基質タンパク質の輸送過程を、高速 AFM で追跡している。ナノディスクは脂質と膜骨格タンパク質で構成されるナノ粒子であり、条件を整えば膜タンパク質を含有することができ、膜タンパク質の解析に広く利用されている。高速 AFM による測定を進めた結果、SecA 側に大きく構造変化する領域が確認された。各種ヌクレオチド存在下での構造変化とこの領域の同定を進めている。これらの測定結果をもとに、最新の Sec タンパク質によるタンパク質膜透過機構のモデルを紹介する。

【参考文献】

- Haruyama T, Sugano Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, Konno H, Tsukazaki T. Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Structure* 27, 152-160 (2019)
- Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLoS One* 12, e0183434 (2017)