

# 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

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者 奈良先端科学技術大学院大学 塚崎 智也 NAIST Tomoya TSUKAZAKI

In eubacteria, the Sec translocon complex consisting of membrane proteins SecY, SecE, and SecG (SecYEG) functions as a passive channel for protein translocation from the cytoplasm to the periplasm. A motor SecA ATPase for the protein translocation pushes pre-proteins into the SecYEG. The detailed dynamics of how the conformational change of SecA ATPase functions in concert with protein translocation is unclear. In this study, we attempted to visualize the structural dynamics of the SecYEG-SecA complex in protein translocation using high-speed atomic force microscopy. We were able to observe the binding of unfolded substrate proteins to the SecYEG complex reconstituted into nanodiscs and the transport of the substrate proteins in real-time. In addition, nucleotide-dependent conformational changes of a domain of the SecA ATPase were visualized.

### 研究目的

タンパク質の合成は細胞質でリボソームによって行われ、多くのタンパク質は膜を超えて輸送される。このタンパク質の膜透過は普遍的な生命現象の一つである。Sec パスウェイと呼ばれるしくみは、バクテリアからヒトまで保存されている。タンパク質の通り道となるのが膜タンパク質複合体 Sec トランスロコンであり、タンパク質膜透過チャンネルを形成する。バクテリアでは Sec トランスロコンは SecY, SecE, SecG からなる複合体 (SecYEG) である。真核細胞においては、Sec61 複合体とよばれる。SecA ATPase は、輸送されるタンパク質 (基質タンパク質) をアンフォールドの状態を保ったまま SecYEG にリクルートし、ATP の加水分解のエネルギーを利用して Sec トランスロコンの中に基質タンパク質を繰り返し押し込むことで、細胞内から基質タンパク質を段階的に膜透過させている (図 1)。この反応機構を理解するためには生化学的な解析だけでなく、高分解能の 3 次元構造情報が必要であり、2000 年代から Sec タンパク質の X 線結晶構造解析や電子顕微鏡単粒子解析が進められた。しかしながら、未だ、時間に依存したダイナミックな構造変化ともなうタンパク質の膜透過反応を測定するところまでは至っていない。

SecA はいくつかのドメインから構成されており、そのうちのひとつで基質タンパク質と相互作用するとされている PPXD ドメインの配置が変化することによって、SecA は少なくとも Open 型と Closed 型とよばれる 2 つの状態をとるとされている。しかしながら、どのタイミングで、この構造遷移が起こっているのかについては不明のままである。

研究を困難としている要因として、SecA がモノマーとダイマーのオリゴマー状態の変化を起こすことがあげられる。さらに、基質タンパク質がアンフォールドした不安定な状態であることに加え、SecY と SecA が結合解離することなども提唱されており、未だ、これら複合体の状態すら解明されていない。そのため、過去の解析例や解釈にも問題点が多い状況にある。具体的には、SecA のモノマーとダイマーの平衡状態や SecYEG との結合乖離が制御されていないことが起因して、精緻な解析が阻まれて誤った解釈となっていると思われる例も少なくないため、Sec のタンパク質膜透過の理解を大きく妨げているのが現状である。これらを解決するために、海外のグループがタンパク質膜透過反応のダイナミクスを可視化させるために原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた解析を進めている。タンパク質の膜透過の時空間分解

能を考えると実際に膜透過を活写するには、高速 AFM でモニターできるはずである。しかしながら、必須因子の SecYEG と SecA を含んだ状況のものである、ヌクレオチドや基質によってオリゴマー状態の変化などが示されているが、リアルタイムでのドメインの構造変化を追うまでには至っておらずさらなる高分解能解析が待たれている。SecYEG と SecA の複合体の測定も行われたが、上記の通り SecA のオリゴマー状態の制御が困難であること、また分解能の問題から決定的な画像を得られていない状況にある。詳細に解析するには、系の純化をし高分解能で観測することが極めて重要である。すなわち、厳密に SecA-SecYEG のストイキオメトリーを合わせるとこと、タンパク質膜透過に必要な膜環境が与えられていること、1 ユニットを完全に単離することが必要である。

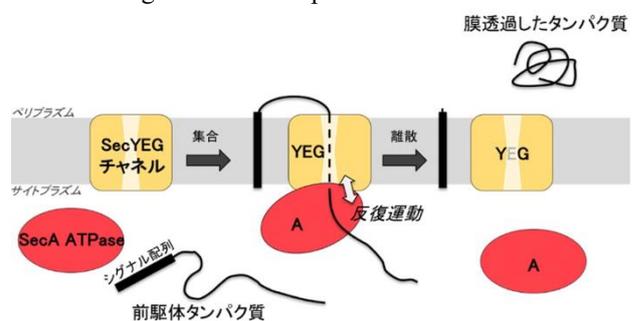
従来の 1 分子観察で、1 ユニットの SecYEG が基質タンパク質を透過させることが示されたが、SecA のオリゴマー状態については制御ができていなかった。私たちは、安定な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のタンパク質に着目して Sec タンパク質の解析を進めてきた。系の純化のため SecY と SecA をペプチドリンカーで繋いだ融合タンパク質を構築した。これにより間違いなく SecYEG-SecA のストイキオメトリーが 1 : 1 となる。この融合タンパク質 (SecYAEG) を精製した再構成リポソームはタンパク質膜透過活性を示した<sup>1</sup>。この状況下において、活性化するときリポソーム上で SecY、SecA がオリゴマー状態をとるということを排除できていないという懸念事項があった。膜環境かつ 1 ユニットを同時に達成させる方法として、ナノディスクがある。ナノディスクは、膜骨格タンパク質と脂質から構成されるディスク状のナノ粒子である。脂質は 2 重層構造となっている。この脂質層の中に膜タンパク質を埋め込むことができるため、近年さまざまな膜タンパク質の解析に用いられている。ナノディスクに埋め込むことで、界面活性剤を使わなくても膜タンパク質が安定に存在でき、膜環境を維持しているということが利点である。SecYEG の電子顕微鏡構造解析にも、1 ユニット解析にもナノディスクは用いられた実績がある。

これまでに、純化した均一な 1 ユニットのシステム構築のため、SecYAEG を大腸菌のリン脂質と一緒に、ナノディスクに再構成し、SecYAEG-ナノディス

ク (SecYAEG-ND) を作成し、これを、高速 AFM で観察することにより、均一な粒子であることを確認した。さらに、SecY をラベルして検証することで、可溶性の SecA の領域と膜タンパク質である SecYEG ナノディスクの領域が、高速 AFM で明確に区別できることを示した<sup>2</sup>。本研究では、SecYAEG ナノディスクと基質タンパク質を加えた条件に、さらに ATP を加えて 1 ユニットの SecYAEG でタンパク質の膜透過反応を開始させ、タンパク質膜透過の動態観察を進め、タンパク質輸送のリアルタイム動的探査をすることが目的である。

図 1 バクテリアのタンパク質の膜透過

Fig. 1 Bacterial protein translocation



## 研究経過

本研究では、タンパク質の膜透過のダイナミクスを解明すべく研究を進めているが、高速 AFM でその詳細を可視化するためには、上述の 1 ユニットの観察だけでは、詳細な議論が不可能であった。なぜなら、粒子が雪だるま状に見えており、どの領域で基盤に結合しているのが不明であったからである (図 2)。詳細な解析のためには、SecYAEG-ND がどの向きで基盤に結合しているのかを決定する必要があった。そこで、SecA に特徴的な独立した一つのドメインを欠失させた YAEG 複合体 (SecYA $\Delta$ EG) を作製し、SecYAEG-ND の基盤への結合する向きを決定すべく観察を進めた。

SecYAEG-ND の高速 AFM 画像では SecA の領域は楕円状に観察された一方で、SecYA $\Delta$ EG-ND の観察像では、SecA の部分の一部が三日月のように欠けたような形で、観察できた。観察されるどの粒子においても、同じ部分が欠けていたため、SecYAEG-ND は同一面で基盤に結合していると考えられる。さらに精緻な解析を行うためには、次に具体的に SecA のどの領域が結合しているのかを明らかとする必要があった。そこで、近年急激に精度の上昇した AI に

よるタンパク質の構造予測プログラム AlphaFold2 を用いて SecYAEG と、SecYA $\Delta$ EG の構造予測を行い、それらをナノディスクに再構成した構造モデルを準備した。その構造をもとに、高速 AFM による観測される像の推定モデルを作成することができる。構造モデルを 360 度回転させながら、各角度における推定モデルを作成した。これら推定モデルと実際の高速 AFM の SecYAEG と SecYA $\Delta$ EG の観察像とを比較し、各角度における類似相関を調べたところ、ある特定の角度において類似相関が高くなることとが判明した。ここまでの準備実験で、SecYAEG-ND の基盤への結合配向が明らかとなった。

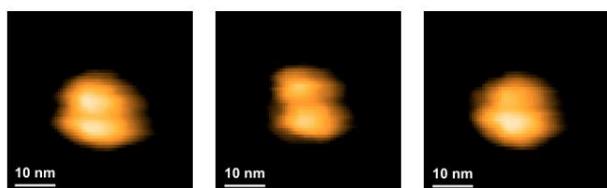


図2 SecYAEG-ND の高速 AFM 画像

Fig. 2 High-speed AFM images of SecYAEG-ND

次に、SecYAEG-ND 溶液に、変性状態のアムフォールドした基質タンパク質と ATP を混合することでタンパク質の膜透過反応を開始させ、高速 AFM で観察を進めた。測定された多くの粒子で、SecYAEG-ND の単独粒子では観察できなかった、紐状の物体が SecYAEG-ND から生えているような像が確認された。基質は 3 種類準備して観測を行ったが、どれも同じ傾向が見られた。これらは、タンパク質輸送過程途中の基質タンパク質であると考えられる。一方、基質タンパク質のシグナル配列に、その機能を失う変異を導入したところ、SecYAEG-ND の粒子から見られる紐状の像が確認されなかった。また、SecYA $\Delta$ EG-ND を用いたときにも、紐状の像が確認されなかったため、欠失させた SecA の領域は機能に必須であることが判明した。

SecYAEG-ND が起こすタンパク質膜透過反応の像を精査しているときに周期的に SecA の高さが変化することを確認した。この構造変化は、基質タンパク質が存在していないときには観察できなかったため、タンパク質膜透過反応と連動していることが強く示唆される。上記の準備実験で SecYAEG-ND の配向も決定できているため、SecA の構造変化をシミュレーションし高速 AFM 画像と比較検討したところ、

SecA は open 状態と closed 状態を繰り返していると考えられた。現在は、タンパク質膜透過反応が進む ATP の条件だけではなく、ATP の代わりに ADP や AMP-PNP などを使用した条件で、SecA の構造変化がどのように変化するのかを統計的に調査し、原著論文の準備を進めた。

## 考察

タンパク質膜透過反応中の SecA の構造変化を精密に測定した例は少ないが、2019 年に発表された SecA 分子内の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた解析がヌクレオチドに依存した構造変化を議論している。この論文では、ADP 存在下では SecA は open 型が多く、ATP 存在下では closed 型増加することを示している。この FRET の実験と現在解析中の高速 AFM の像が示す構造変化のパターンは類似しているように見られ、詳細な解析を進めてた。

F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase やダイニンなどは ATP の加水分解により、どのように作用しているのかが、かなり詳細にわかってきているが、それは多くの生物物理学的手法がこれらに適応されたことによる。本研究により、SecYEG-SecA の 1 ユニット系による測定が安定にできる状況となった。今後、さまざまな Sec タンパク質の精緻な生物物理学解析を行うことができるであろう。

膜タンパク質含有ナノディスクの高速 AFM による測定は、本研究課題の Sec だけでなく、別の膜タンパク質の解析にも極めて有用である。実際、マグネシウムトランスポーター MgtE の解析に適応した際は、マグネシウムの濃度と依存した構造変化をリアルタイムで追跡ができた<sup>2</sup>。

本稿でふれなかったが、Sec トランスロコンは膜タンパク質 SecDF, YfgM, PpiD などと複合体を形成して膜組み込み過程にも関わる。将来的には、Sec トランスロコンを含む巨大な複合体が生きて働く姿を捉えたい。

## 参考文献

1. Sugano Y, Furukawa A, Nureki O, Tanaka Y, and Tsukazaki T. SecY-SecA fusion protein retains the ability to mediate protein transport. *PLoS One*, 18, e0183434, (2017).
2. Haruyama T, Sugano Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, Konno H, and 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).

3. Catipovic MA, Bauer BW, Loparo JJ, and Rapoport TA. Protein translocation by the SecA ATPase occurs by a power-stroke mechanism. *EMBO J.*, 38, e101140. (2019).

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 塚崎智也. タンパク質の膜透過に関わるプロトン駆動型モーター SecDF の構造生命科学, 第95回日本細菌学会総会, オンライン, 2022年3月.
2. 甲賀栄貴, 田中 良樹, 吉海江国仁, 谷口勝英, 藤本圭, Tanja Schneider, 塚崎智也. ペプチドグリカン合成に必須な脂質フリッパーゼの X 線結晶構造解析, 第95回日本細菌学会総会, オンライン, 2022年3月.
3. 板家成良, 長池航, 春山隆充, 市川宗巖, 菅野泰功, 宮崎亮次, 内橋貴之, 塚崎 智也. 高速 AFM によるタンパク質膜透過装置 Sec 複合体の動的構造解析, 第17回 21世紀大腸菌研究会, オンライン, 2021年8月.
4. 長池航, 板家成良, 春山隆充, 塚崎智也, 内橋貴之. 高速原子間力顕微鏡によるタンパク質膜輸送装置 Sec の動態観察. 令和2年度生物物理学会中部支部講演会, オンライン, 2021年3月
5. 長池航, 板家成良, 春山隆充, 塚崎智也, 内橋貴之. 高速原子間顕微鏡による膜輸送装置 Sec

の動態観察. 日本生体エネルギー研究会第46回討論会, 金沢, 2020年12月.

### 誌上発表

1. Miyazaki R, Ai M, Tanaka N, Suzuki T, Dhomaie N, Tsukazaki T, Akiyama Y, and Mori H. Inner membrane YfgM-PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation. *J. Biol. Chem.*, 298, 102572, (2022).
2. Kohga H, Mori T, Tanaka Y, Yoshikaie K, Taniguchi K, Fujimoto K, Fritz L, Schneider T, and Tsukazaki T. Crystal structure of the lipid flippase MurJ in a "squeezed" form distinct from its inward- and outward-facing forms. *Structure*, 30, 1088-1097, (2022).
3. Tanaka Y, Iwaki S, Sasaki A, and Tsukazaki T. Crystal structures of a nicotine MATE transporter provide insight into its mechanism of substrate transport. *FEBS Lett.*, 595, 1902-1913, (2021).
4. Daimon Y, Narita SI, Miyazaki R, Hizukuri Y, Mori H, Tanaka Y, and Tsukazaki T, Akiyama Y. Reversible autoinhibitory regulation of Escherichia coli metalloproteinase BepA for selective  $\beta$ -barrel protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10, 27989-27996, (2020)
5. 塚崎智也. 構造解析からみえてきたタンパク質膜透過駆動モーター膜タンパク質 SecDF の仕組み. *生化学*, 92, 717-721, (2020).