

様 式 C - 7 - 1

平成 27 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究 期 間 平成 27 年度～平成 28 年度
5. 課 題 番 号

1	5	H	0	1	5	3	7
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 新生膜タンパク質の膜組込み過程の構造生物学

7. 研究代表者

研究 者 番 号	研究 代 表 者 名	所 属 部 局 名	職 名
1 0 6 3 2 3 3 3	タナカ ヨシキ 田中 良樹	バイオサイエンス研究科	助教

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

本研究では生育に必須の「新生膜タンパク質の膜組込み過程」に注目して、構造機能解析を行っていく。タンパク質膜組込み過程には、Sec経路とYidC経路が存在する。どちらの経路においても、タンパク質の認識機構や組み込みに関わるタンパク質の動きに関しての詳細は解明されていない。平成27年度には、Sec経路を構成する輸送体膜タンパク質の構造解析を行い、SecYEG複合体完全長を含む構造について論文にまとめ発表した。構造解析対象のタンパク質は既に立体構造を決定したものであるが、以前とは結晶化における条件を変化させることで分解能の向上および別形態構造決定に至った。得られた新規の構造情報を用いて、分子動力学シミュレーションや変異体解析を現在進行中である。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|-----------|--------------|------------|
| (1) タンパク質 | (2) YidC | (3) Sec | (4) 膜タンパク質 |
| (5) タンパク質輸送 | (6) 膜組み込み | (7) X線結晶構造解析 | (8) 構造生物学 |

11. 現在までの進捗状況

(区分) (2) おおむね順調に進展している。

(理由)

Sec経路を構成する輸送体膜タンパク質について結晶構造解析を中心とした機能解析を進めている。SecYEG (細菌型Secトランスロコン) の高分解能 (2.7 Å) の構造を決定。この構造情報に基づき機能解析し、タンパク質膜透過しない (閉状態) のチャネル (透過孔) が、複合体を形成する膜タンパク質 (SecE) の一部によって「キャップ (蓋)」がされていることを明らかにした。引き続き、シグナル配列との複合体での解析のため、複数の結合候補ペプチドを合成し、混同状態での結晶化を行っている。しかし、これまでのところシグナル配列を含む構造は得られていない。一方、新たに立体構造を決定したSecタンパク質に関して、分解能向上や他状態の構造決定のために、以前とは結晶化における条件を変化させて結晶化、構造決定を行った。得られた新規の構造情報を用いて、分子動力学シミュレーションや変異体解析を現在進行中である。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

研究成果を論文にまとめ発表するため、構造情報に基づく各種機能解析を進めていく。ペプチドの認識状態を結晶構造で明らかにするために、共結晶化が必要である。これまでに試したアミノ酸配列では結合が弱いと考えられるため、配列の再検討やスパーサーを介して融合タンパク質として発現させる等して、より結合状態が安定する方法を試みる。

YidC シグナル配列の構造解析: YidC については申請者のグループが2種類のYidCの構造決定を行った。SecYEG複合体と同様に、YidCがどのように膜組み込み基質タンパク質を認識して機能しているのかについての詳細は未だ不明な点が多い。相互作用の詳細を明らかとすべく基質タンパク質との共結晶化を試みる。基質タンパク質には、YidCの基質と判明しているシグナル領域を用いる。YidCは基質の膜貫通領域付近の負電荷を認識していることが提案されているため、負電荷が存在する膜貫通領域付近の配列をもったポリペプチドとの共結晶化をLCP法によって進める。X線回折データの収集は、SPring-8 BL32XUの高輝度X線マイクロフォーカスビームラインを用いる。位相の決定は、まず分子置換法を試みるが、構造が大きく変化し、分子置換法で位相の決定が困難な場合は、以前の研究同様に重原子置換法を用いた異常分散法を用いて構造を決定する。

YidC再構成Nanodiscを用いた機能解析: 基質認識についての構造情報が得られた場合、基質のどこを認識して、基質膜タンパク質を組み込んでいるのかの情報を得る。この解析手法が機能すれば、続いてSecYEG複合体を用いて多数の膜貫通領域をもつタンパク質の膜組み込み解析への応用を進める。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件/うち査読付論文 計(1)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著 者 名		論 文 標 題				
Tanaka Y, Sugano Y, Takemoto M, Mori T, Furukawa A, Kusakizako T, Kumazaki K, Kashima A, Ishitani R, Sugita Y, Nureki O and Tsukazaki T		Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State.				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Cell Reports		有	13	2015	1561-1568	-
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1016						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

(学会発表) 計(12)件/うち招待講演 計(0)件/うち国際学会 計(2)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki		Complete and peptide-bound structures of the Sec translocon	
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4回公開国際シンポジウム(国際学会)		2015年11月22日 ~ 2015年11月23日	九州大学西新プラザ(福岡県福岡市)

発 表 者 名		発 表 標 題	
田中 良樹		新生膜タンパク質の膜組込み過程の構造生物学	
学 会 等 名		発表年月日	発表場所
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第2回班会議		2015年11月13日 ~ 2015年11月15日	ほほえみの宿(山形県天童市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
田中 良樹	新生膜タンパク質の膜組み込み過程の構造生物学	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第1回班会議	2015年06月13日	東京工業大学キャンパスイノベーションセンター(東京都港区)

発 表 者 名	発 表 標 題	
菅野 泰功, 田中 良樹, 武本 瑞貴, 森 貴治, 春山 隆充, 古川 新, 草木 迫司, 熊崎 薫, 鹿島 絢子, 石谷 隆一郎, 紺野 宏記, 杉田 有治, 瀧木 理, 塚崎 智也	タンパク質分泌マシーナリーの動的精密探査に向けて	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第2回班会議	2015年11月13日 ~ 2015年11月15日	ほほえみの宿(山形県天童市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
古川新, 田中 良樹	Secトランスロコンの相互作用解析	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成27年度第2回班会議	2015年11月13日 ~ 2015年11月15日	ほほえみの宿(山形県天童市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Tomoya Tsukazaki, Kaoru Kumazaki, Shinobu Chiba, Mizuki Takemoto, Arata Furukawa, Toshiki Kishimoto, Yasunori Sugano, Takaharu Mori, Yoshiki Tanaka, Yuji Sugita, Koreaki Ito, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki	Structures of Membrane Protein Insertase YidC	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Structural Biological Dynamics: From Molecules to Life with 60 trillion Cells(国際学会)	2015年11月05日	東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yoshiki Tanaka, Yasunori Sugano, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Takamitsu Haruyama, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Kaoru Kumazaki, Ayako Kashima, Ryuichiro Ishitani, Hiroki Konno, Yuji Sugita, Osamu Nureki and Tomoya Tsukazaki	Cytoplasmic conformational transition of Sec translocon	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月13日 ~ 2015年09月15日	金沢大学(石川県金沢市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yasunori Sugano, Yoshiki Tanaka*, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Takamitsu Haruyama, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Kaoru Kumazaki, Ayako Kashima, Ryuichiro Ishitani, Hiroki Konno, Yuji Sugita, Osamu Nureki and Tomoya Tsukazaki	Structure and dynamics of Sec protein-conducting channel	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月13日 ~ 2015年09月15日	金沢大学(石川県金沢市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
塚崎 智也, 田中 良樹, 紺野 宏紀	Sec トランスロコンの高分解構造	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
新学術領域「動的秩序と機能」全体班会議2015	2015年08月05日	兵庫県立淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
菅野 泰功, 春山 隆充, 田中 良樹, 紺野 宏紀, 塚崎 智也	タンパク質分泌マシーナリーの動的精密探査に向けて	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第12回21世紀大腸菌研究会	2015年06月04日	琵琶湖グランド ホテル・京近江(滋賀県大津市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
古川 新, 田中 良樹, 塚崎 智也	部位特異的光架橋による YidC-Sec 複合体の 4 次構造決定にむけて	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第12回21世紀大腸菌研究会	2015年06月04日	琵琶湖グランド ホテル・京近江(滋賀県大津市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
塚崎 智也, 田中 良樹	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
新学術領域「動的構造生命」第1回班会議	2015年06月02日	九州大学(福岡県福岡市)

(図書) 計(0)件

著 者 名	出 版 社		
書 名	発行年	総ページ数	

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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究: -

17. 備考

細胞膜を越えるたんぱく質輸送の新たな機構を解明
http://www.naist.jp/pressrelease/detail_j/topics/2162/