

様 式 C - 7 - 1

平成 2 8 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 2 6 年度～平成 3 0 年度

5. 課 題 番 号

2

6

1

1

9

0

0

7

6. 研究課題名

タンパク質分泌システムの活写

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

本研究では、生育に必須のメカニズムであるSecトランスロコンを介したタンパク質の分泌過程に焦点をあてている。タンパク質の分泌過程において、タンパク質という巨大なものを輸送させるためSecタンパク質は大きな構造変化が予測されている。大腸菌などの真正細菌では、タンパク質分泌反応時にSecタンパク質が、基質タンパク質を伴った大きな構造変化を繰り返し、段階的にタンパク質の輸送が達成されるとされている。これらSecタンパク質の立体構造の情報は得られつつあるが、未だその作動メカニズムには不明な点が多い。本年度は、新たに構造を決定したSec因子の一つである膜タンパク質SecDFの動的なメカニズムを明らかにすべく、特にSecDFの解析に集中して取り組んだ。変異体を用いたタンパク質の分泌活性の測定やプロトンの透過活性の測定から、最終的にSecDFがどのようにプロトンの濃度勾配のエネルギーを利用し、どのようにタンパク質と相互作用するのかについて知見が得られたため、SecDFの機能モデルを提唱した。また、タンパク質分泌反応の時間依存的な変化を見出すため、Secタンパク質と脂質をディスク状に再構成したナノディスクの高速原子間力顕微鏡を用いた観察を進めた。より安定なナノディスクを構築することに成功し、ナノディスクに再構成されたSecタンパク質の観察は、Secタンパク質のドメイン構造の変化が見出せる分解能の動画を得た。今後、条件検討を行い具体的にどのような変化が起きているのかを検証する。

## 10. キーワード

- |            |          |            |             |
|------------|----------|------------|-------------|
| (1) 蛋白質    | (2) 膜透過  | (3) SecYEG | (4) トランスロコン |
| (5) 構造生命科学 | (6) 膜蛋白質 | (7) Sec    | (8) 蛋白質膜透過  |

## 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 )

研究計画にそって順調に進めている。本年度は、SecDFタンパク質の高分解能の構造決定を行い動的メカニズムを提唱した。

## 12. 今後の研究の推進方策

( 今後の推進方策 )

タンパク質の分泌反応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。その緻密なメカニズム解明のために、バクテリア由来のSecタンパク質の動態観察を今後、進めていく。タンパク質分泌チャネルであるSecYEGとモータータンパク質を同時にナノディスクに再構成することに成功し、高速原子間力顕微鏡の基盤の上に特異的に結合させ、その状態を観察することを可能とした。条件検討の結果、Sec因子のドメイン構造が見える分解能での解析が可能となった。今後は、ATP駆動型のモータータンパク質の動態を明らかとすべく、ATPやADPやアナログ分子を用いてSecタンパク質による分泌反応の動きを時間依存的に追跡していく。タンパク質分泌反応の動態を観察するためには、基質として用いるアンフォールドしたタンパク質も一つの重要なファクターである。これまではproOmpAを用いてきたが、近年他の研究グループが用いている別の基質タンパク質の利用も進める。本年度、SecDFの構造解析が予想以上に進展したため、SecDFもどのように基質を認識し、基質を伴った構造変化をしているのかについて高速原子間力顕微鏡等を用いた解析を進める。

また、研究を進める上で安定にナノディスクを形成させるのが困難であり、多くのサンプルを消費する。同様なナノディスク様粒子を形成させるポリマーなどの開発なども進展しており、新規ポリマーを用いた解析も当研究に取り入れ動態観察を進める計画である。

## 13. 研究発表（平成 28 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 【掲載確定】				
Arata Furukawa, Kunihiro Yoshikawa, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki		Tunnel formation inferred from the I form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF				
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	印刷中	2017	印刷中	-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）						
なし						
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（19）件／うち招待講演 計（5）件／うち国際学会 計（8）件

発 表 者 名		発 表 標 題	
吉海江 国仁, 菅野 泰功, 田中 良樹, 塚崎 智也		SecDFの構造変化	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第13回 21世紀大腸菌研究会		2016年06月02日 ~ 2016年06月03日	グリーンピア南阿蘇（熊本県・南阿蘇村）

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		蛋白質分泌マシーナリーの動的精密探索に向けて	
学 会 等 名		発表年月日	発 表 場 所
第13回 21世紀大腸菌研究会		2016年06月02日 ~ 2016年06月03日	グリーンピア南阿蘇（熊本県・南阿蘇村）

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	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会 年会	2016年06月06日 ~ 2016年06月09日	福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
森 貴治, 塚崎 智也, 杉田 有治	タンパク質膜透過チャネルSecYE6におけるSecGの役割-分子動力学計算によるアプローチ-	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会 年会	2016年06月06日 ~ 2016年06月09日	福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
田中 良樹, 菅野 泰功, 武本 瑞貴, 森 貴治, 古川 新, 吉海江 国仁, 草木迫 司, 熊崎 薫, 鹿島 絢子, 石谷 隆一郎, 杉田 有治, 濡木 理, 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	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会 年会 (招待講演)	2016年06月06日 ~ 2016年06月09日	福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yoshiki Tanaka, Yasunori Sugano, Mizuki Takemoto, Takaharu Mori, Arata Furukawa, Tsukasa Kusakizako, Ryuichiro Ishitani, Yuji Sugita, Osamu Nureki, Tomoya Tsukazaki	Complete and Peptide-bound Structures of the Sec translocon	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Nascent Chain Biology Meeting 2016 (国際学会)	2016年09月01日 ~ 2016年09月03日	富士レークホテル (山梨県・富士河口湖町)

発 表 者 名	発 表 標 題	
森 貴治, 塚崎 智也, 杉田 有治	分子シミュレーションによるタンパク質透過チャネル因子 SecE の構造揺らぎの解析	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
日本物理学会 2016年秋季大会	2016年09月13日 ~ 2016年09月16日	金沢大学角間キャンパス (石川県・金沢市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Tomoya Tsukazaki, Kunihiro Yoshikawa, Arata Furukawa, Yasunori Sugano, Yoshiaki Tanaka	Snapshots of a proton-driven protein translocation motor	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The 42nd Naito Conference on In the Vanguard of Structural Biology: Revolutionizing Life Sciences (招待講演) (国際学会)	2016年10月04日 ~ 2016年10月07日	シャトレーズ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Arata Furukawa, Yasunori Sugano, Yoshiaki Tanaka, Tomoya Tsukazaki	Cytoplasmic insights of protein-conducting channel implied from the crystal structures of SecYEG	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference 2016 (国際学会)	2016年11月09日 ~ 2016年11月12日	Sirata Beach Resort Tampa, Florida. USA

発 表 者 名	発 表 標 題	
Arata Furukawa, Kunihiro Yoshikawa, Yasunori Sugano, Yoshiaki Tanaka, Tomoya Tsukazaki	Snapshots of the proton-driven protein translocation motor	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Zing conferences: Protein Secretion in Bacteria Conference 2016 (国際学会)	2016年11月09日 ~ 2016年11月12日	Sirata Beach Resort Tampa, Florida. USA

発 表 者 名	発 表 標 題	
古川 新, 吉海江 国仁, 森 貴治, 森 博幸, 森本 雄祐, 菅野 泰功, 岩木 薫大, 南野 徹, 杉田 有治, 田中 良樹, 塚崎 智也	Snapshots of a protein translocation motor	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第 5 4 回日本生物物理学会年会（招待講演）（国際学会）	2016年11月25日 ~ 2016年11月27日	つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
Takaharu Mori, Yoshiki Tanaka, Kunihiro Yoshikawa, Tomoya Tsukazaki, Yuji Sugita	Molecular mechanisms underlying proton transport in SecDF	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第 5 4 回日本生物物理学会年会（国際学会）	2016年11月25日 ~ 2016年11月27日	つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
古川 新, 吉海江 国仁, 森 貴治, 森 博幸, 森本 雄祐, 菅野 泰功, 岩木 薫大, 南野 徹, 杉田 有治, 田中 良樹, 塚崎 智也	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	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
2017年 生体運動研究合同班会議	2017年01月06日 ~ 2017年01月08日	神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
春山 隆充, 菅野 泰功, 田中 良樹, 紺野 宏記, 塚崎 智也	Secトランスロコンを介した膜透過の高速AFM観察	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
平成28年度 生物物理学会中部支部 講演会	2017年03月06日	名古屋大学（愛知県・名古屋市）

発 表 者 名	発 表 標 題	
大門 康志, 舛井 千草, 宮崎 亮次, 櫻田 洋人, 田中 良樹, 鈴木 健裕, 堂前 直, 森 博幸, 塚崎 智也, 成田 新一郎, 秋山 芳展	大腸菌のペリプラズムプロテアーゼBepAは、TPR domainを介した タンパク質間相互作用により外膜機能を維持する	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
日本農芸化学会2017年度大会	2017年03月17日 ~ 2017年03月20日	ウェスティン都ホテル (京都府・京都市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
谷口 勝英, 藤本 圭, 田中 良樹, 塚崎 智也	共生細菌由来MATE様多剤排出トランスポーターの結晶化	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第 9 0 回 日本細菌学会総会	2017年03月19日 ~ 2017年03月21日	仙台国際センター (宮城県・仙台市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
田中 良樹, 古川 新, 森 貴治, 森 博幸, 森本 雄祐, 菅野 泰功, 岩木 薫大, 南野 徹, 杉田 有治, 塚崎 智也	膜輸送装置の構造と機能	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第 9 0 回 日本細菌学会総会 (招待講演)	2017年03月19日 ~ 2017年03月21日	仙台国際センター (宮城県・仙台市)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Arata Furukawa, Kunihiro Yoshikawa, Takaharu Mori, Hiroyuki Mori, Yusuke V. Morimoto, Yasunori Sugano, Shigehiro Iwaki, Tohru Minamino, Yuji Sugita, Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki	Snapshots of the proton-driven protein translocation motor	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
EMBO conference   Protein translocation and cellular homeostasis (招待講演) (国際学会)	2017年03月18日 ~ 2017年03月22日	Hotel Valamar Lacroma (クロアチア・ドブロブニク)

発 表 者 名	発 表 標 題	
Yasunori Sugano, Arata Furukawa, Yoshiki Tanaka, Tomoya Tsukazaki	Cytoplasmic insights of protein-conducting channel implied from the crystal structures of SecYEG	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
EMBO conference   Protein translocation and cellular homeostasis (国際学会)	2017年03月18日 ~ 2017年03月22日	Hotel Valamar Lacroma (クロアチア・ドブロブニク)

〔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

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 研究業績  
<http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/publication.html>