

## 様式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）(平成28年度)

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	挑戦的萌芽研究																										
4. 補助事業期間	平成28年度～平成29年度																										
5. 課題番号	1 6 K 1 4 7 1 3																										
6. 研究課題名	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																										
7. 研究代表者	<table border="1"> <thead> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究代表者名</th> <th>所属部局名</th> <th>職名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>8 0 4 3 6 7 1 6</td> <td>ツカザキ トモヤ 塙崎 智也</td> <td>バイオサイエンス研究科</td> <td>准教授</td> </tr> </tbody> </table>			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 塙崎 智也	バイオサイエンス研究科	准教授																
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 塙崎 智也	バイオサイエンス研究科	准教授																								
8. 研究分担者	<table border="1"> <thead> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究分担者名</th> <th>所属研究機関名・部局名</th> <th>職名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>			研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名																				
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	<p>細菌の生育に重要な役割をになうタンパク質としてプロトン駆動型モータータンパク質SecDFがある。このSecDFは、タンパク質膜透過チャネルであるトランスポンと相互作用して複合体を形成する膜タンパク質である。トランスポンを経由する生命必須の現象であるタンパク質の膜を超えた輸送に関わる。SecDFはプロトンの濃度勾配を利用して、大きな構造変化を伴ながらタンパク質の輸送に関わるとされている。本研究では、そのSecDFの可動性領域がどのように機能するかを明らかとすべく、高速原子間力顕微鏡を用いて1分子のSecDFをリアルタイムで解析した。その結果、SecDFの構造変化の平衡状態はバッファーのpHなどに依存する可能性があるとの予備的な結果を得た。また、SecDFのプロトン透過活性を詳細に調べるために、高いpH感受性のGFPと、SecDFを大腸菌内に発現させ、SecDFが過剰発現させた大腸菌がどの程度プロトンを通すのかについて検討を行った。プロトンの透過と、可動性領域が密接に関連していることを明らかとした。これらの動態観察と、SecDFの結晶構造解析の結果を統合し、SecDFの新規のモデルを提唱した。SecDFは、少なくとも2つの状態(I型、F型)構造をとり、膜透過の中間体の状態はI型構造であるとした。I型構造では基質と強く相互作用し、プロトンの力を使いながら、基質タンパク質を細胞外へ引っ張ると考えられた。SecDFはI型、F型の構造変化を繰り返し段階的にタンパク質の膜透過に関与していることが考えられる。</p>																										

## 10. キーワード

(1) 蛋白質	(2) タンパク質の膜透過	(3) トランスロコン	(4) 膜タンパク質
(5)	(6)	(7)	(8)

## 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)

計画にそって順調に進めている。本年度はSecDFの動態に関する知見をえて、構造解析の結果と統合してSecDFの分子メカニズムを提唱した。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

## (今後の推進方策)

SecDFの動的メカニズムに迫るため、今後はSecDFのリアルタイム動態観察を主軸とした実験と、プロトンの濃度勾配から運動へのエネルギー変換についての知見をえるためSecDFの変異体の機能解析等を進める。SecDFのリアルタイム動態観察には、高速原子間力顕微鏡ならびに蛍光1分子観察を進める。高速原子間力顕微鏡では外部の構造変化を、蛍光一分子では分子内部の構造変化を見出す。SecDFについては、反復運動を行なっているのか回転運動をおこなっているのか、未だ不明である。まずは、この変化を見出し、次に詳細なドメインの構造変化を追跡していく。エネルギー変換については、どれだけのプロトンがSecDFの構造変化に必要であるのかについては情報がない。これを明らかとするためには定量的な生物物理学的な手法でのアプローチする。1分子のタンパク質によるプロトンの流入を測定できるマクロ装置が開発されており、その装置を用いてSecDFによるプロトン透過の測定を行う。SecDFは膜へと再構成し、そのマイクロ装置に展開させる。SecDF 1分子による蛍光変化については、蛍光をもちいて定量的に観察する。系を組むことができれば、プロトン透過活性を失った変異体や、可動性を失った変異体を用いるなど、一連の変異体解析によって、SecDFのプロトン透過についての詳細な情報を得る。これら実験を通して、SecDFの作業機序を明らかとする。

## (次年度使用額が生じた理由と使用計画)

## (理由)

本実験計画では、タンパク質の精製と測定が主な実験手法である。特にタンパク質の精製過程に使用する界面活性剤などの金額が高価である。本年度は、予定よりも測定の予備実験である条件検討に多くの時間を費やしたため、タンパク質の精製の回数が予定より減少したため、次年度使用額を生じた。

## (使用計画)

今年度は、測定に適したサンプル調整のため、予定より多くの変異体のタンパク質を精製し測定に用いる。繰越分の予算はタンパク質精製のための消耗品に利用する。

## 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 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 Yoshikai, 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	2   0   1   7	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SecYEG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 純子, 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02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 SecG 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 Yoshikai, Arata Furukawa, Yasunori Sugano, Yoshiki 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	シャトレーゼ 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, 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
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 Yoshikai, Yasunori Sugano, 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
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54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, Kunihito Yoshiokaie, 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54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テ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, 犬井 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	名古屋大学（愛知県・名古屋市）

発表者名	発表標題	
谷口 勝英, 藤本 圭, 田中 良樹, 塚崎 智也	共生細菌由來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90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90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 Yoshikane, 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 Laczma (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		
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

## 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>