

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）（令和元年度）

所属研究機関名称	奈良先端科学技術大学院大学		機関番号	14603
研究代表者	部局	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	塚崎 智也		

1. 研究種目名 挑戦的研究（萌芽）

2. 課題番号 19K22395

3. 研究課題名 新しい膜蛋白質含有ナノ粒子の構築と蛋白質膜組過程の精密探査

4. 補助事業期間 令和元年度～令和2年度

## 5. 研究実績の概要

タンパク質の動態をより詳細に解析するためには、これらの静止状態の構造だけでなく1ユニット(反応最小単位)での動的な解析が欠かせない。膜タンパク質は細胞膜に存在し、シグナル伝達、エネルギー変換、イオンやタンパク質の輸送といった細胞内の重要な機能を担っている。膜タンパク質の機能や構造は、脂質二重膜中に存在することで維持され、膜タンパク質が構造変化することでこれらの機能を発揮する。膜タンパク質の機能を明らかにするためには、脂質二重膜中で膜タンパク質の構造変化を観察する必要がある。従来法(例:細胞膜の状態;リボソーム再構成;平面膜再構成など)では、膜の占める領域が広く、膜の流動性なども問題となり、詳細な解析の妨げとなっている。そこで、我々はナノディスクと呼ばれるリン脂質が膜骨格タンパク質に囲まれたディスク状の脂質二重膜と高速原子間力顯微鏡(高速AFM)を用いて、膜タンパク質の構造変化を観察する系を構築した。高速AFMは高い時間分解能と空間分解能を持ち、タンパク質を支持基板に固定することでそのダイナミクスをリアルタイムで観察することができる。一方で、ナノディスクは膜タンパク質を細胞膜に近い環境で保持でき、膜タンパク質1分子を溶液中で扱うことを可能にする。典型的な膜タンパク質としてSecYEGなどをナノディスクに再構成し、支持基板に固定して高速AFM観察したところ、ナノディスクと膜タンパク質の可溶性ドメインの構造を確認できた。条件をととのえ、いくつかの反応中間体の動態観察に成功した。
--

## 6. キーワード

タンパク質
-------

## 7. 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 タンパク質輸送過程の解明にむけて適切なナノディスクを選定し、準備を進めることができた。今後は、精密探査へと研究を展開することができる。

## 8. 今後の研究の推進方策

本研究では高速AFMによりタンパク質含有ナノディスクを観察する条件を最適化してきた。最適化した条件にて，SecYEG再構成ナノディスクを用いて縦向きまたは横向きでタンパク質の透過反応を開始させ，高速AFMでその動態を観察する。高速AFMでの観察は100ミリ秒程度の時間分解能で測定可能である。タンパク質の透過反応は，数分で完了する反応であり，十分測定可能な時間である。高速AFM解析では，パッファーの状態によりタンパク質の挙動が大きく異なる。明瞭にタンパク質の透過反応を観察する為に，様々な条件で観察を進める必要がある。試行錯誤のうえ，最終的に観測データとX線結晶構造の情報を組み合わせどのようにタンパク質が構造変化しながらタンパク質膜透過が起こっているのかを解明する。より詳細な情報を得るため，共同研究により結晶構造を本研究で得られる高速AFMの画像にフィットさせる。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

新型コロナなどの影響により、年度の後半で予定通り研究を進められないところがあったため次年度使用額が生じた。遅れた研究と合わせて、次年度に研究を進めていく。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

[雑誌論文] 計5件 (うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件)

1. 著者名 Inoue Michio、Sakuta Nanami、Watanabe Satoshi、Zhang Yuxia、Yoshikae Kunihiro、Tanaka Yoshiaki、Ushioda Ryo、Kato Yukinari、Takagi Junichi、Tsukazaki Tomoya、Nagata Kazuhiro、Inaba Kenji	4. 卷 27
2. 論文標題 Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.03.106	査読の有無 有
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）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsukazaki Tomoya	4. 卷 38
2. 論文標題 Structural Basis of the Sec Translocon and YidC Revealed Through X-ray Crystallography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Protein Journal	6. 最初と最後の頁 249 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s10930-019-09830-x	査読の有無 有
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）	国際共著 -

1.著者名 Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya	4.巻 20
2.論文標題 A snapshot of membrane protein insertion	5.発行年 2019年
3.雑誌名 EMBO reports	6.最初と最後の頁 e49034
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.15252/embr.201949034	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1.著者名 Sasaki Masaru, Nishikawa Hanako, Suzuki Sonomi, Moser Michael, Huber Maria, Sawasato Katsuhiro, Matsubayashi Hideaki T., Kumazaki Kaoru, Tsukazaki Tomoya, Kuruma Yutetsu, Nureki Osamu, Ueda Takuya, Nishiyama Ken-ichi	4.巻 294
2.論文標題 The bacterial protein YidC accelerates MPlase-dependent integration of membrane proteins	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6.最初と最後の頁 18898 ~ 18908
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011248	査読の有無 有
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)	国際共著 -

1.著者名 Takamitsu Haruyama, Tomoya Tsukazaki	4.巻 62
2.論文標題 Real-time observation of membrane protein-embedded nanodiscs by high-speed atomic force microscopy	5.発行年 2019年
3.雑誌名 野口研究所時報	6.最初と最後の頁 42 ~ 49
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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)	国際共著 -

## 〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1.発表者名 田中良樹, 吉海江国仁, 内野清香, 塚崎智也
2.発表標題 硫黄トランスポーターの結晶構造解析
3.学会等名 第16回21世紀大腸菌研究会
4.発表年 2019年

1. 発表者名  
塚崎智也

2. 発表標題  
タンパク質膜透過チャネルSecトランスロコンを経由するタンパク質輸送のメカニズム

3. 学会等名  
岩手大学放射光利用セミナー（招待講演）

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
竹内梓, 田中良樹, 吉海江国仁, 内野清香, 高木博史, 塚崎智也

2. 発表標題  
新奇硫黄系トランスポーターの構造と機能

3. 学会等名  
第42回日本分子生物学会年会

4. 発表年  
2019年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件（うち出願0件／うち取得0件）

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

1 4. 備考

奈良先端大 構造生命科学 研究業績  
<https://bsw3.naist.jp/tsukazaki/publication.html>