

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 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

2. 課題番号 18KK0197

3. 研究課題名 病原性大腸菌等の細菌における膜環境の変化と連動した膜タンパク質形成機構の解明

4. 補助事業期間 平成30年度～令和2年度

## 5. 研究実績の概要

本研究では病原性大腸菌等の細菌の膜タンパク質形成過程を解明すべく研究を進めている。大腸菌内膜へのタンパク質膜挿入には糖脂質MPLaseと膜タンパク質YidCが重要な役割を担う。MPLaseの解析においては、無秩序な自発的膜挿入を完全に排除したタンパク質膜挿入反応の再構成系を確立し、膜挿入には糖脂質MPLaseが必須でYidCタンパク質は膜挿入反応を加速することを明らかにした。YidCの解析においては、前年度に報告したYidCの高分解能構造解析と過去のYidCの構造解析とを比較し詳細な考察を行い、総説として発表した。また、YidCの分子メカニズムをより詳細と明らかとすべく基質タンパク質やMPLaseとの共結晶化を試みた。

グラム陰性菌の外膜の形成機構、特に外膜に存在する様々な役割を持つ多種多様な「外膜タンパク質」の正しい立体構造形成を伴った膜組込み「アセンブリー」について解析してきた。アセンブリーは外膜に存在するBAM複合体等の分子装置により行われる。塩田らは、アセンブリー解析のためのin vitro再構築実験としてEMMアセンブリーアッセイを開発した。これまでEMMアセンブリーアッセイを改変したスクリーニング系を開発し、BAM複合体に対する阻害ペプチドを4種類単離することに成功した。また、阻害ペプチドに含まれている配列を解析することにより、パレル型膜タンパク質の構造上に高度に保存されているプロリン残基とタイロシン残基があり、これがアセンブリーに必須であることを突き止めた。

6. キーワード  
膜タンパク質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 おおむね順調に研究が進行した結果、国際的に原著論文、レビュー論文、解説記事を発表した。

## 8. 今後の研究の推進方策

生体膜には多くの膜タンパク質が存在し、様々な役割を果たしている。新規に合成された膜タンパク質は膜へと組み込まれアッセンブリーをするなどして機能的な複合体を形成するが、その過程の詳細は不明である。大腸菌などの膜タンパク質の膜組み込みやアッセンブリーには、膜タンパク質SecYEG、SecDF、YidC、BAM複合体や糖脂質MPlaseなどが複雑に連携すると考えられている。BAM複合体は外膜タンパク質の形成、それ以外は内膜タンパク質の形成に関わる。これらの分子メカニズムには未だ不明な点が多く、今後も継続してさらなる解析を続ける。構造解析ではSecYEG、YidC、SecDF、MPlase、BAM複合体を含む2者、3者複合体の構造をX線結晶構造解析で明らかとすべく研究を進める。同時に、基質との構造解析を進める。取得した構造情報に基づく分子メカニズムの解明には生物物理学的な手法やコンピューターシミュレーションによる解析を新たな国際共同研究で進める。また、特にMPlaseの解析において、MPlaseとYidCとの機能的な連携を詳細に調べるために、MPlaseの化学修飾体や部分合成標品を用い、YidC変異体がタンパク質の膜挿入活性に及ぼす影響を再構成系で評価する。さらに、YidCやSecYEGにタグを付加し、MPlaseが共精製されるかどうか調べ、これらの直接的な相互作用を示す。また、BAM複合体の動的な分子メカニズムの解明のため、シグナル認識時のBAM複合体の立体構造を中性子反射率法をもちいて評価する。中性子反射率法はJ-Parcにて実施し、国際共同研究者のShen研究室からスタッフを派遣してもらい解析を進める。さらに、生化学的手法および、部位特異的光架橋法をもちいて、シグナルを認識するBAM複合体のサブユニットと部位を決定する。これらの解析を通して、膜タンパク質のアッセンブリーの分子機構の解明と膜形成機構の解明を目指す。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

国際的な活動が新型コロナウイルスのため一部研究活動が制限され、実験が計画通り進まなかつたため。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

[雑誌論文] 計18件 (うち査読付論文 17件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 16件)

1. 著者名 Araiso Yuhei, Tsutsumi Akihisa, Qiu Jian, Imai Kenichiro, Shiota Takuya, Song Jiayao, Lindau Caroline, Wenz Lena-Sophie, Sakaue Haruka, Yunoki Kaori, Kawano Shin, Suzuki Junko, Wischnewski Marilena, Schutze Conny, Ariyama Hirotaka, Ando Toshio, Becker Thomas, Lithgow Trevor, Wiedemann Nils, Pfanner Nikolaus, 他2人	4. 卷 575
2. 論文標題 Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 395 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1680-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue Michio、Sakuta Nanami、Watanabe Satoshi、Zhang Yuxia、Yoshikae Kunihito、Tanaka Yoshiki、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 Ca2+-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.巻 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, Matsabayashi 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 -

1.著者名 沢里克宏, 藤川紘樹, 島本啓子, 西山賢一	4.巻 58
2.論文標題 大腸菌におけるタンパク質膜輸送に関与する糖脂質MPlase の発現制御機構~酵素様機能をもつ糖脂質MPlase~	5.発行年 2020年
3.雑誌名 化学と生物	6.最初と最後の頁 223 ~ 230
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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1.著者名 Kamemoto Yuki, Funaba Nanaka, Kawakami Mayu, Sawasato Katsuhiro, Kanno Kotoka, Suzuki Sonomi, Nishikawa Hanako, Sato Ryo, Nishiyama Ken-ichi	4.巻 -
2.論文標題 Biosynthesis of glycolipid MPlase (membrane protein integrase) is independent of the genes for ECA (enterobacterial common antigen)	5.発行年 2019年
3.雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6.最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.05.001	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 Fujikawa Kohki, Nomura Kaoru, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4.巻 77
2.論文標題 Novel Glycolipid Involved in Membrane Protein Integration: Structure and Mode of Action	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6.最初と最後の頁 1096 ~ 1105
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.77.1096	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 Fujikawa Kohki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4.巻 31
2.論文標題 Enzyme-like Glycolipids MPlase Involved in Membrane Protein Integration of <i>E. coli</i>	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6.最初と最後の頁 E151 ~ E158
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1705.1E	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 Fujikawa Kohki、Nishiyama Ken-ichi、Shimamoto Keiko	4.巻 31
2.論文標題 Enzyme-like Glycolipids MPlase Involved in Membrane Protein Integration of E. coli	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6.最初と最後の頁 J149～J155
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1705.1J	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 Saito Hiroaki、Morishita Tetsuya、Mizukami Taku、Nishiyama Ken-ichi、Kawaguchi Kazutomo、Nagao Hidemi	4.巻 1290
2.論文標題 Free energy profiles of lipid translocation across pure POPC and POPC/CHOL bilayer: all-atom molecular dynamics study	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Journal of Physics: Conference Series	6.最初と最後の頁 012020～012020
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-6596/1290/1/012020	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 Nomura Kaoru、Yamaguchi Toshiyuki、Mori Shoko、Fujikawa Kohki、Nishiyama Ken-ichi、Shimanouchi Toshinori、Tanimoto Yasushi、Morigaki Kenichi、Shimamoto Keiko	4.巻 117
2.論文標題 Alteration of Membrane Physicochemical Properties by Two Factors for Membrane Protein Integration	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Biophysical Journal	6.最初と最後の頁 99～110
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.05.014	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 Sawasato Katsuhiro、Sekiya Yusei、Nishiyama Ken ichi	4.巻 593
2.論文標題 Two step induction of <i>cdsA</i> promoters leads to upregulation of the glycolipid MPlase at cold temperature	5.発行年 2019年
3.雑誌名 FEBS Letters	6.最初と最後の頁 1711～1723
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13460	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 Matsumura Kenji、Yamada Miwa、Yamashita Takeshi、Muto Hitomi、Nishiyama Ken-ichi、Shimoi Hitoshi、Isobe Kimiyasu	4.巻 128
2.論文標題 Expression of alcohol oxidase gene from <i>Ochrobactrum</i> sp. AIU 033 in recombinant <i>Escherichia coli</i> through the twin-arginine translocation pathway	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6.最初と最後の頁 13~21
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.12.012	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 Sawasato Katsuhiro、Suzuki Sonomi、Nishiyama Ken-ichi	4.巻 294
2.論文標題 Increased expression of the bacterial glycolipid MPlase is required for efficient protein translocation across membranes in cold conditions	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6.最初と最後の頁 8403~8411
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008457	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 Sato Ryo、Sawasato Katsuhiro、Nishiyama Ken-ichi	4.巻 510
2.論文標題 YnbB is a CdsA paralogue dedicated to biosynthesis of glycolipid MPlase involved in membrane protein integration	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6.最初と最後の頁 636~642
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.145	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 Sawasato Katsuhiro、Sato Ryo、Nishikawa Hanako、Iimura Naoki、Kamemoto Yuki、Fujikawa Kohki、Yamaguchi Toshiyuki、Kuruma Yutetsu、Tamura Yasushi、Endo Toshiya、Ueda Takuya、Shimamoto Keiko、Nishiyama Ken-ichi	4.巻 9
2.論文標題 CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPlase essential for membrane protein integration in vivo	5.発行年 2019年
3.雑誌名 Scientific Reports	6.最初と最後の頁 1372
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37809-8	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 -

[学会発表] 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名  
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  
塩田拓也

2. 発表標題  
大腸菌外膜 バレル型膜タンパク質輸送阻害ペプチドの探索

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  
塩田拓也

2. 発表標題  
バクテリア外膜タンパク質アセンブリー解析の新手法「EMMアセンブリーアッセイ」

3. 学会等名  
第93回 日本細菌学会総会（招待講演）

4. 発表年  
2020年

1. 発表者名  
西山賢一

2. 発表標題  
タンパク質膜挿入・膜透過反応に関与する「糖脂質酵素(Glycolipozyme)」MPLaseの構造と機能

3. 学会等名  
新潟薬科大学学術講演会（招待講演）

4. 発表年  
2020年

1. 発表者名  
西山賢一

2. 発表標題  
大腸菌のタンパク質膜挿入・膜透過にかかる糖脂質MPLaseの構造と機能

3. 学会等名  
遺伝研研究会「単細胞システムにおける細胞内装置の動的相互作用」（招待講演）

4. 発表年  
2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 監修 津本浩平・浜窪隆雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 538(307-315)
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

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

## 13. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
	モナシュ大学 Shen研究室	モナシュ大学 Lithgow研究室	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

## 14. 備考

ミトコンドリアへのタンパク質搬入口TOM複合体の精密構造と働く仕組みを解明  
[https://www.kyoto-su.ac.jp/news/20191015\\_345\\_ki01.html](https://www.kyoto-su.ac.jp/news/20191015_345_ki01.html)  
タンパク質膜挿入反応に必要な糖脂質 MPIase の生合成遺伝子を発見  
<https://www.iwate-u.ac.jp/upload/images/0204pressrelease.pdf>