

## 構造解析からみえてきた タンパク質膜透過駆動モーター膜タンパク質 SecDF の仕組み

塚崎 智也

### 1. はじめに

多くのタンパク質は細胞質でリボソームによって合成されたのち、Sec トランスロコン（真核細胞では Sec61 $\alpha\gamma\beta$  複合体、細菌では SecYEG 複合体）を経由して膜を透過後、しかるべき場所へと輸送されていく。このタンパク質の膜透過経路には2種類ある。リボソームがSec トランスロコンと直接相互作用して起こる「翻訳と共役した膜透過（co-translational translocation）」と細胞質でタンパク質合成が完了したのち起こる「翻訳後膜透過（post-translational translocation）」であり、Sec トランスロコンは構造変化することによって、基質タンパク質を透過させるチャンネルを提供する<sup>1)</sup>。

細菌の翻訳後膜透過は、古くからモデルケースとして詳細な解析が進められてきた。基質タンパク質はシグナル配列を持った状態で合成され、シャペロンなどによりアンフォールドの状態が保たれたままシグナル配列の情報に基づき SecA へと受け渡される。その後、SecA は ATP の加水分解のエネルギーを利用して、基質タンパク質を Sec トランスロコン内に押し込む動作を繰り返すことで、タンパク質の膜透過を駆動するとされている。基質タンパク質のシグナル配列は膜透過反応中に切断を受け、最終的にペリプラズム空間に基質タンパク質が放出され、フォールディングし成熟体となる<sup>2)</sup> (図 1A)。SecA による駆動機構については、いくつかのグループから“パワーstroke モデル”や“ブラウニアンラatchet モデル”など魅力的なモデルがいくつか示されているが推測の域を出ておらず、議論が続いている<sup>3)</sup>。

本稿では、もう一つのタンパク質膜透過モータータンパク質 SecDF<sup>4)</sup> を取り上げる (図 1A)。SecDF は膜タンパ

ク質でペリプラズム側に領域を持つ。そのペリプラズム領域を認識する抗体を用いた阻害実験から、SecDF はタンパク質膜透過の後期過程すなわちペリプラズム空間への基質のリリースに関わるとされたが<sup>5)</sup>、その分子機構を詳細に議論するには SecDF の構造情報が必要であった。2011 年に報告された SecDF の構造解析と機能解析から、SecDF はペリプラズム側でタンパク質を引っばる働きをするプロトンまたはナトリウムイオン駆動型のモータータンパク質であることが提唱された<sup>6)</sup>。同時に、この報告では SecDF は SecA と独立して機能しうることも示された。さらに、2017 年、2018 年に発表された二つの異なる状態の SecDF の高分解能 X 線結晶構造解析と機能解析から、詳細に SecDF の動的な機構が議論できる段階となった<sup>7,8)</sup>。本稿では、これまで発表された SecDF の構造解析をまとめ、想定される SecDF の分子機構を概説する。

### 2. SecDF の構造

SecDF は真性細菌や古細菌に保存された約 800 アミノ酸残基からなる重要なタンパク質の一つである<sup>9)</sup>。大腸菌の SecDF 欠失株はタンパク質膜透過効率が低下しており生育に異常を来す。生体内で SecDF は SecYEG と相互作用をし、複合体を形成するとされているが、その詳細はいまだ明らかではない。生物によっては、SecDF が 12 回の膜貫通  $\alpha$  ヘリックス (TM1~12) を持つ一つの膜タンパク質として発現している場合、または SecD、SecF がそれぞれ 6 回膜貫通型のタンパク質として発現し SecDF 複合体を形成している場合がある。SecD が SecDF の TM1~6 領域に、SecF が SecDF の TM7~12 領域に相当し、TM1~6 と TM7~12 が擬似 2 回対称で配置している<sup>6)</sup> (図 1B, C)。SecDF の膜貫通領域の中心部は TM4 と TM10 から構成される。この中心付近に保存されたアスパラギン酸 (esAspIV) とアルギニン (esArgXI) が存在し、SecDF の活性に必須であることが示されている (図 1D)。TM1-TM2 と TM7-TM8 の間には、それぞれ P1 領域、P4 領域と名づけられたペリプラズム領域がある。P1 領域は構造解析から P1-head 領域と P1-base 領域がくびれたヒンジでつながっていることが明らかとなった。この構造的な特徴は P1-head がフレキシブルであることを示していた。変異体を用いてジスルフィド結合

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 (〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5)

**Proton-driven bacterial protein translocation motor SecDF**

**Tomoya Tsukazaki** (Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920717

© 2020 公益社団法人日本生化学会

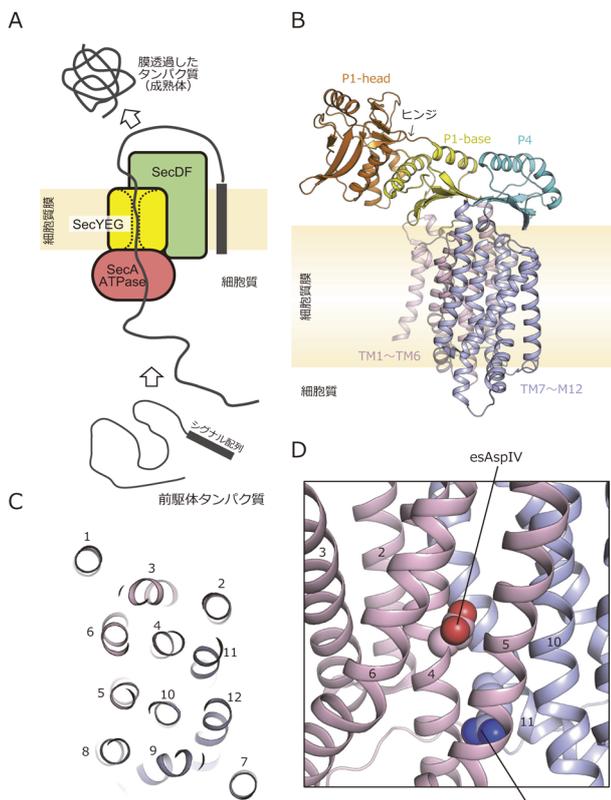


図1 SecDF

(A) 細菌のタンパク質の膜透過装置。SecYEGがタンパク質膜透過チャンネルを形成し、細胞質側ではSecA ATPase、ペリプラズム側ではSecDFが基質タンパク質と相互作用してタンパク質の膜透過を駆動する。(B) SecDFの結晶構造。SecDFの膜貫通領域(TM)は12本の $\alpha$ ヘリックスから構成される。ペリプラズム側はP1領域とP4領域から構成される。(C) SecDFの膜貫通領域の断面図。TM1~6とTM7~12が擬似二対称で配置する。(D) SecDFに必須の保存されたアミノ酸。TM4とTM11に必須のアミノ酸残基esAspIVとesArgXIが存在する。膜貫通領域の番号を図中に示す。

でP1-headを物理的に固定したところSecDFは活性を失ったため、P1-headの可動性はSecDFに重要であると考えられる。また、パッチクランプ解析からSecDFはプロトンを通すことが判明した。esAspIVまたはesArgXIに変異を導入するとプロトン透過がなくなり、生体内のタンパク質の膜透過反応も著しく減少した。これらの結果から、SecDFはプロトンの透過を駆動力とし、P1-head領域が動きながらタンパク質膜透過を駆動するというモデルを提唱した<sup>6)</sup>。

### 3. SecDFの構造変化

さらなるSecDFの構造解析から、SecDFの超F型と、I型構造が明らかとなった<sup>7,8)</sup>。上記の図1Bの構造をF型と呼ぶ。図2Aに示したように、それぞれの構造でP1-headの位

置が異なっていることが確認できる。I型構造ではP1-headがP1-baseの上に位置している。一方、超F型構造ではP1-head領域が最も膜に近接している。F型とI型ではP1-baseとP4領域にかけて8本の $\beta$ 構造からシートが形成されているが、超F型構造においては、この $\beta$ シート構造が $\beta$ バレル構造になるというフォールディング変化が起こっていた(動画1)。

超F型構造が生体内で存在することを示すべく、超F型構造で近接しF型、I型構造で遠ざかるアミノ酸のペアを選別し、システイン残基を導入し生体内でジスルフィド結合が形成することを明らかにした<sup>7)</sup>。この結果は、生体内で超F型が存在することを意味する。膜貫通領域に着目すると超F型構造のみ、既出の必須のesAspIVとesArgXIが相互作用をしていた(図2B)。これら必須のアミノ酸に変異を導入した場合、ジスルフィド結合を形成しなくなったことから、esAspIVとesArgXIが超F型をとるために重要であることが判明した。また、I型構造のうち一つの構造では、他のSecDFの構造にはない特徴としてペリプラズム側から細胞質へとつながるトンネル構造が確認できる。分子動力学計算によって、このトンネル構造にそって水分子が一列に配列したことから、I型構造において水を介したプロトンの移動の可能性が示唆された。このトンネルの中心部には保存されたesAspIVが存在しており、このプロトン濃度の変化がチャンネルの開閉に寄与していることも同時に分子動力学計算から示された<sup>8)</sup>。

可動性の高いP1領域には両親媒性の凹みがあり、いくつかの構造体で凹みの内部に電子密度がみられた。この電子密度は結晶化に用いたポリエチレングリコール(PEG)の一部であると考えられる(図2A)。このPEGが基質タンパク質を模倣していると考え、P1領域の凹みを基質との結合領域であると想定した。この凹みに光架橋剤の非天然アミノ酸であるpBPA(*p*-benzoyl-L-phenylalanine)を導入し、*in vivo*部位特異的光架橋実験を行うことで、この凹みが基質との相互作用領域の一つであることを見いだした<sup>8)</sup>。

SecDFでは、原動力となるプロトンの透過が起こる膜貫通領域と基質タンパク質が相互作用するペリプラズム領域が離れていることから、膜貫通領域からペリプラズム側へ何らかの構造変化の伝達が必要である。この機構はリモートカップリング機構とも呼ばれる。一連の結果から、これまで謎であったSecDFの細胞質側で起こる構造変化と、ペリプラズム側で起こる $\beta$ 構造の変化がカップルしているという手がかりを得た。ただし、これらの結果だけでは、I型とF型におけるP1領域の構造変化がどのようにして起こっているのかなど未解決の問題も多く残されている。P1領域の構造変化に寄与する要因は他にも存在すると考えられ、今後の解析結果を待ちたい。

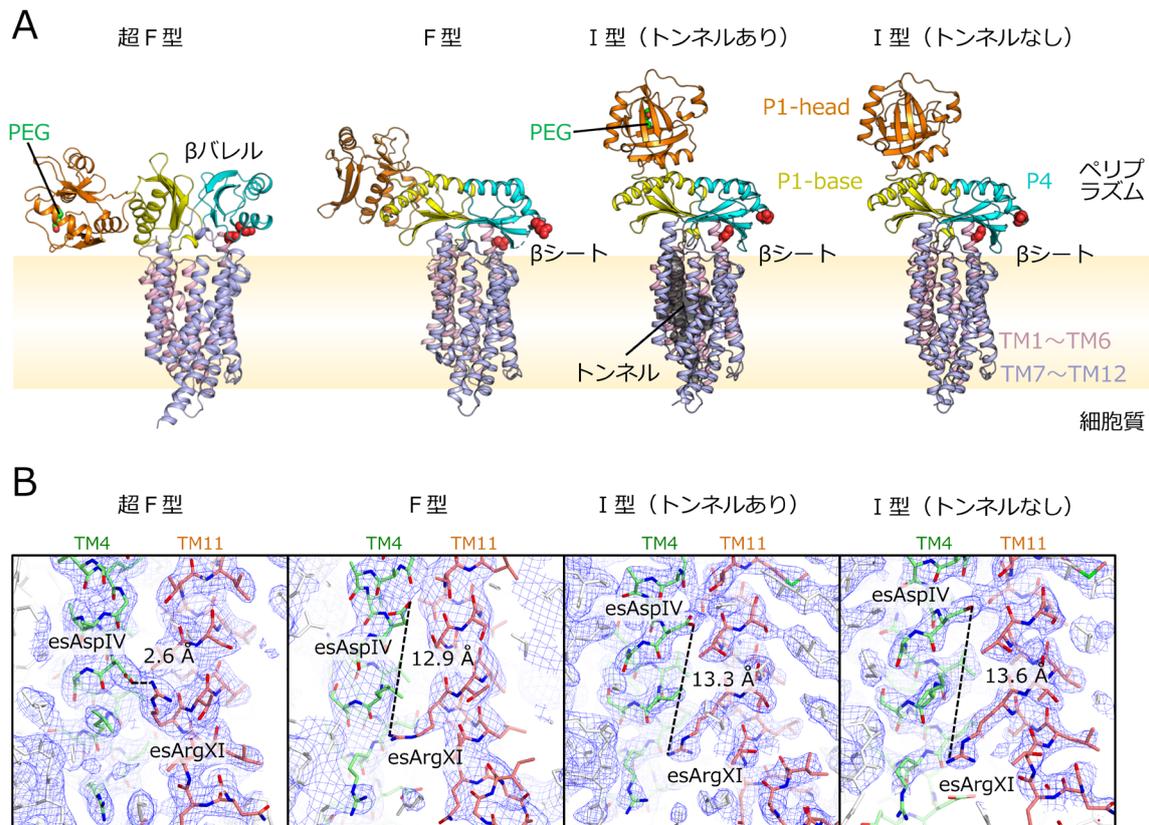


図2 SecDFの結晶構造

(A) 超F型, F型, I型 (トンネルあり), I型 (トンネルなし) はそれぞれPDB ID: 3AQP, 5YHF, 5XAN-Mol B, 5XAN-Mol Aに相当する. 本文で紹介したジスルフィド結合を形成したアミノ酸のペアの位置を赤で示した. (B) SecDFの電子マップ. 超F型はcontoured at  $1.0\sigma$ で表示, F型はcontoured at  $1.5\sigma$ で表示, I型はcontoured at  $1.5\sigma$ で表示した. 図中に保存された必須のesAspIVとesArgXIの残基間の距離を示した.

#### 4. SecDFによるタンパク質膜透過駆動モデル

これまで紹介したSecDFの超F型, F型, I型構造と機能解析から, 図3に示したモデルを提唱する. P1領域の凹みが基質と相互作用することが示されているため, P1-Head領域はSecYEGから出てきた基質を捕獲すると考えた. そのため, P1-headの傾いた側にSecYEGが形成するチャンネルが存在していると予測する. 図3のように配置すれば, 超F型のペリプラズム側の凹みは, SecYEGのペリプラズムの出口から連続的に続くこととなる. この配置であれば, SecYEGのチャンネルから出てきた基質タンパク質は, 直ちにSecDFのP1領域に捕獲されることが可能である. 最もP1-headが傾いた超F型構造が安定であり待機状態であるとする. まず, 超F型が基質と相互作用を行い(ステップ1), それがトリガーとなりその後 $\beta$ 構造のフォールディングチェンジとともにP1-headが立ち上がるような構造変化を起こし(ステップ2), 基質を捕まえたままF型構造を経てI型構造となる(ステップ3). I型構造では, プロトンの劇的な流入が起こり, 同時に基質をペリプラズム

へ手放すのかもしれない(ステップ4). SecDFはその後, 安定な超F型へと構造変化を起こし, 基質を再度捕獲し引っぱる動作を繰り返す. このような動作を繰り返すことによって, SecDFはタンパク質の膜透過をペリプラズム側で駆動しているモータータンパク質であると提唱した<sup>4)</sup>.

#### 5. 展望

SecDFは図3に示したような構造変化を繰り返すと提唱したが, これらの構造変化が反復運動のような直線的な動きをしているのか, またP1領域が回転運動しているのかなどについては不明である. SecDFのペリプラズム領域の動きを把握するには, 高速AFMや蛍光1分子観察などを用いたリアルタイム1分子動態観察が有効であろう. また, SecDFはSecYEG<sup>10)</sup>だけでなくYidC<sup>11)</sup>(タンパク質の膜への組込みに関与する膜タンパク質)とも相互作用しSecホロ複合体<sup>12)</sup>を形成して機能することが提唱されているが, このホロ複合体形成については情報が圧倒的に不足している. 細菌由来のSecDF, SecYEG, YidCの詳細構造情

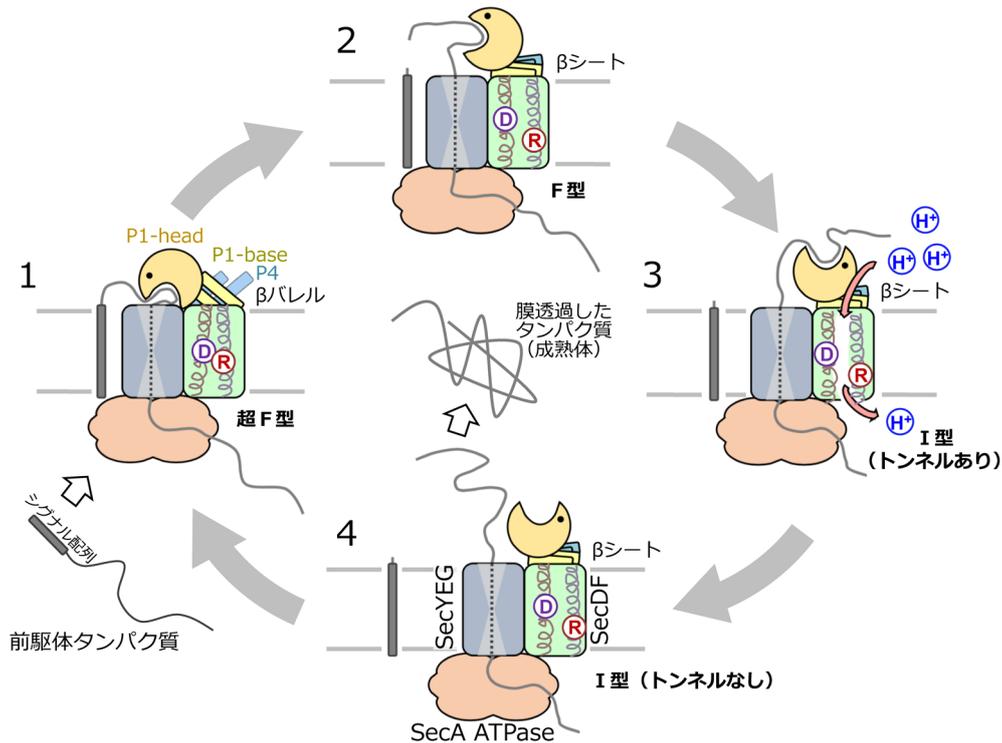


図3 SecDFによるタンパク質膜透過駆動モデル  
はじめにSecDFのP1-headと基質が相互作用し、超F型(1)、F型(2)、I型(3, 4)の一連の構造変化を繰り返し、タンパク質の膜透過を段階的に駆動すると考えられる。

報がそれぞれ最大で、2.6 Å, 2.7 Å, 2.4 Å分解能で解析されており<sup>8, 10, 11)</sup>、これら安定なタンパク質を用いた複合体の結晶化を進めるとともに、詳細な相互作用解析のためジスルフィド結合を用いた架橋実験や、部位特的光架橋実験で検証を進めていくことが可能である。さらに、強力な紫外線を用いた系<sup>13)</sup>では時間依存的な各因子の相互作用の追跡も可能であろう。

真核生物の小胞体膜Secトランスロコン複合体にはYidC, SecDFホモログが発見されていなかったが、YidCのホモログの存在が報告された<sup>14)</sup>。SecDFについては、依然としてホモログは見つかっていないが、Bipタンパク質がタンパク質の膜透過に関わっており、タンパク質をトランスロコンから引き抜くために働いている<sup>15)</sup>。また、小胞体Secトランスロコン複合体の電子顕微鏡観察では、SecDFのペリプラズム領域のような大きな張り出した可溶性領域を持つ構造体が確認されている<sup>16)</sup>。作動機構は異なるが、SecDFのように膜の外側で基質と相互作用する膜タンパク質が存在し、タンパク質の膜透過を促進させているのかもしれない。SecDFはプロトン駆動型モータータンパク質としては非常に小さい(約800アミノ酸残基の)タンパク質であり、SecDFの分子機構・基質タンパク質の解明は生命の基本原理の理解にもつながる。近年、抗生物質が効かない多剤耐性菌も多く出現していることが問題

となっている。SecDFは細菌が持っている生育に重要な因子であり、分子機構の解明は学術的に価値があるだけでなく、SecDFをターゲットにした新しい抗生物質の開発にも貢献できるかもしれない。

## 文 献

- 1) Rapoport, T.A., Li, L., & Park, E. (2017) Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **33**, 369–390.
- 2) Tsirigotaki, A., De Geyter, J., Sostaric, N., Economou, A., & Karamanou, S. (2017) Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat. Rev. Microbiol.*, **15**, 21–36.
- 3) Komarudin, A.G. & Driessen, A.J.M. (2019) SecA-Mediated Protein Translocation through the SecYEG Channel. in *Protein Secretion in Bacteria* (Sandkvist, M., Cascales, E., Christie, P. eds), pp. 13–28, ASM Press, Washington, DC.
- 4) Tsukazaki, T. (2018) Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny112.
- 5) Matsuyama, S., Fujita, Y., & Mizushima, S. (1993) SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **12**, 265–270.
- 6) Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D.G., Kohno, T., Matsumura, A.D., et al. (2011) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, **474**,

- 235–238.
- 7) Furukawa, A., Nakayama, S., Yoshikaie, K., Tanaka, Y., & Tsukazaki, T. (2018) Remote Coupled Drastic beta-Barrel to beta-Sheet Transition of the Protein Translocation Motor. *Structure*, **26**, 485–489.e2.
  - 8) Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, Y.V., Sugano, Y., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y., Tanaka, Y., et al. (2017) Tunnel Formation Inferred from the I-Form Structures of the Proton-Driven Protein Secretion Motor SecDF. *Cell Rep.*, **19**, 895–901.
  - 9) Eichler, J. (2003) Evolution of the prokaryotic protein translocation complex: a comparison of archaeal and bacterial versions of SecDF. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **27**, 504–509.
  - 10) Tanaka, Y., Sugano, Y., Takemoto, M., Mori, T., Furukawa, A., Kusakizako, T., Kumazaki, K., Kashima, A., Ishitani, R., Sugita, Y., et al. (2015) Crystal Structures of SecYEG in Lipidic Cubic Phase Elucidate a Precise Resting and a Peptide-Bound State. *Cell Rep.*, **13**, 1561–1568.
  - 11) Kumazaki, K., Chiba, S., Takemoto, M., Furukawa, A., Nishiyama, K., Sugano, Y., Mori, T., Dohmae, N., Hirata, K., Nakada-Nakura, Y., et al. (2014) Structural basis of Sec-independent membrane protein insertion by YidC. *Nature*, **509**, 516–520.
  - 12) Botte, M., Zaccari, N.R., Nijeholt, J.L., Martin, R., Knoops, K., Papai, G., Zou, J., Deniaud, A., Karuppusamy, M., Jiang, Q., et al. (2016) A central cavity within the holo-translocon suggests a mechanism for membrane protein insertion. *Sci. Rep.*, **6**, 38399.
  - 13) Miyazaki, R., Myougo, N., Mori, H., & Akiyama, Y. (2018) A photo-cross-linking approach to monitor folding and assembly of newly synthesized proteins in a living cell. *J. Biol. Chem.*, **293**, 677–686.
  - 14) Anghel, S.A., McGilvray, P.T., Hegde, R.S., & Keenan, R.J. (2017) Identification of Oxal Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep.*, **21**, 3708–3716.
  - 15) Dudek, J., Pfeffer, S., Lee, P.H., Jung, M., Cavalie, A., Helms, V., Forster, F., & Zimmermann, R. (2015) Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.*, **427**(6 Pt A), 1159–1175.
  - 16) Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B.G., Albert, S., Plitzko, J.M., Baumeister, W., Zimmermann, R., Freeze, H.H., Engel, B.D., et al. (2017) Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat. Commun.*, **8**, 14516.

#### 著者寸描

##### ●塚崎 智也 (つかざき ともや)

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科教授。博士(理学)。

■略歴 2006年京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程修了, 同年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士研究員, 08年東京大学医科学研究所助教, 10年東京大学大学院理学系研究科助教, 13年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科准教授を経て18年から現職。12~16年科学技術振興機構さきがけ研究者(兼任)。

■研究テーマと抱負 Secタンパク質膜透過装置の分子機構の解明。しっかりとした実験に基づき, 質の高い研究成果を発表していきたいです。

■ウェブサイト <http://bsw3.naist.jp/tsukazaki/>

■趣味 トレーニング。