

【目的】口腔内病原性細菌の多くは外毒素のような特殊なタンパク質の排出に特化したシステムを持っている。中には、特殊な糖タンパク質を排出し微生物叢であるバイオフィーム、いわゆる歯垢を形成するものもある。病原性の *Streptococcus* 属には、必須のカノニカルなタンパク質膜透過チャネル (SecY) に加え、特殊な糖タンパク質に特化したタンパク質膜透過チャネルとして SecY2 (特化型 Sec トランスロコン) がある (下図)。SecY2 はいくつかのタンパク質と相互作用して機能するが、どうして SecY2 が基質特異性を示すのかなど、その分子メカニズムは不明であるため、構造生物学的な解析が必要である。

【方法】細胞質で合成された特定の基質タンパク質は、典型的な糖修飾酵素である GtfA、GtfB によって糖鎖が付加される。その後、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 Asp1/2/3 複合体によって膜へとターゲットされる。その後 SecY2 チャネルとモータータンパク質である SecA2 ATPase が相互作用しながらタンパク質を排出させていると考えられている。構造生物学的な解析によって、これら因子の構造を高分解能で解き明かすべく、サンプルの準備を進めた。また、タンパク質分泌反応の詳細を理解するためには、1 ユニット (反応最小単位) でのリアルタイム解析が必要な段階となっている。そのため、本研究では、MSP ナノディスクと呼ばれる粒子を用いた。このナノディスクは脂質と膜骨格タンパク質 (MSP : membrane scaffold protein) から構成されるナノ粒子である。ナノディスク構成時に膜タンパク質が存在している場合に、膜タンパク質がナノディスク内に取り込まれ、膜タンパク質含有ナノディスクが構築される。SecYEG 含有ナノディスクを高速原子間力顕微鏡で測定を行った。

【結果】特殊糖タンパク質分泌に関わる因子の構造決定にむけたサンプル調製を進めた。Asp1/2/3 複合体については、純度の高いサンプルを mg オーダーで精製できる系を組み、構造生物学的な解析に向けて適切なサンプルとするために条件検討を重ねた。また、SecY2/Asp4/Asp5 複合体については、SecY2 の安定な発現を大腸菌内で確認し、精製の条件検討を行った。今後は、X 線結晶構造解析ならびにクライオ電子顕微鏡による構造決定をすべく研究を継続する。高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質分泌過程の観測に向け、ナノディスクに再構成した Sec タンパク質の測定を行った。条件を最適化することで、制御された二つの方向からナノディスクに再構成したタンパク質の分子動態をリアルタイムで直接観測することに成功した。

タンパク質の分泌

