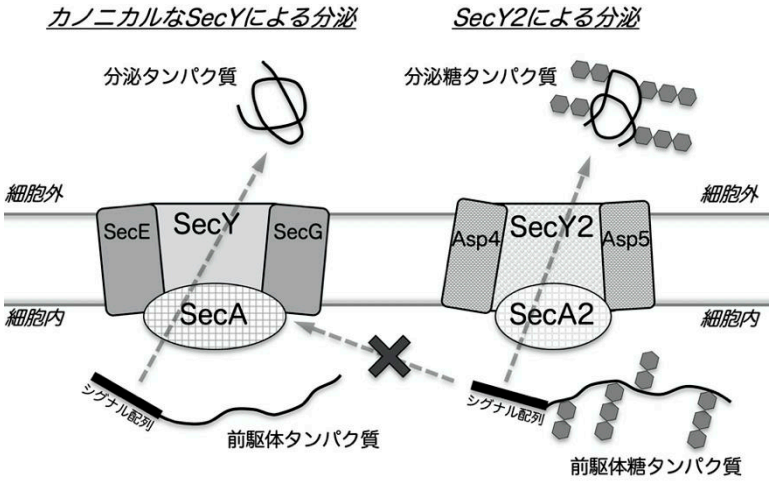
| 213　口腔病原菌バイオフィルムに関わる特殊な分泌装置の基盤 | 塚崎　智也 |
|---|---|

**【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ルム、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



# 213. 口腔病原菌バイオフィルムに関わる特殊な分泌装置の基盤

塚崎　智也

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 構造生命科学研究室

Key words：膜タンパク質，SecY，構造解析，膜透過

## 緒　言

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ルム、いわゆる歯垢を形成するものもある。細菌のタンパク質排出の基盤研究領域において、感染症などとの関連もある特殊なタンパク質に特化した輸送システムの理解は極めて重要な課題であり、影響力の高い科学雑誌などでレビュー記事が掲載されるなど注目されている。病原性細菌が持つ特殊な機構の分子メカニズムの解明は、基質特異性の解明につながるなど学術的に意義深い。このような研究成果が基盤となり、新しいタイプの抗生物質の発見や、高齢者の QOL 向上へ貢献する口腔ケアの提供へと応用展開が期待される。病原性の *Streptococcus* 属などには、特殊糖タンパク質を膜透過させるチャネルとして SecY2 からなる複合体が存在し、病原性を示す特定の糖タンパク質の排出を担っている。SecY2 は、既に研究が進んでいるカノニカルなタンパク質の通り道（チャネル）となる SecY と相同性が高いにもかかわらず、輸送される基質が異なっている。1983 年に発見されたカノニカルなタンパク質膜透過チャネルである SecY は、これまで多くの遺伝学的・生化学的・構造生物学的解析がなされてきた。SecY は SecE, SecG と複合体を形成し細胞質で合成されたタンパク質をアンフォールドの状態を保ったまま、細胞外へと分泌させる。この反応は細胞質の SecA ATPase によって駆動される。一方、糖鎖修飾をうけたタンパク質の透過は制限されている。SecY2 は Asp4, Asp5 と複合体を形成し病原性に関わる糖タンパク質を選択的に輸送する。この反応では SecA2 ATPase がタンパク質の排出を駆動するとされる。どのように SecA2 が特殊な糖タンパク質を認識し、SecY2 がそれらを選択的に排出することができるのか詳細は不明である。そこで本研究は、SecY2 と関連因子の詳細な構造解析をすべく研究を進めた。並行して、カノニカルな SecY と SecA ATPase が行う分泌反応の詳細を理解すべく、高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）による解析を進めた［1］。

## 方　法

### 1. 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

SecY2 が関わる糖タンパク質排出の様子を図 1 に示す。細胞質で合成された基質タンパク質は、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。最終的にシグナル配列が切断され、細胞から排出された糖タンパク質はバイオフィルム形成に関わる。本研究では、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、精製サンプルの準備を進めた。

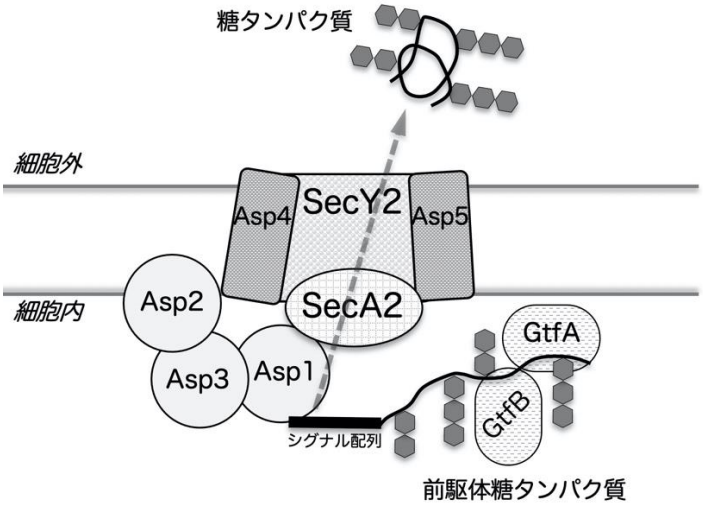



図 1. 特殊糖タンパク質の分泌

シグナル配列が付加されたある特定の前駆体タンパク質は、糖鎖修飾を受けたのち SecY2 関連因子を経由して細胞外へ輸送される。

**2. Sec 複合体の高速 AFM 観察**

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）でのリタルタイム解析が必要な段階となっている。SecY などの膜タンパク質は、脂質二重層に埋め込まれている状態で機能する。このような膜タンパク質の解析では、細胞膜の状態をそのまま用いたり、リポソームや平面膜に再構成したりして解析を行うが、これらの方法では、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、脂質と膜タンパク質とポリマーで形成される膜タンパク質含有ナノ粒子を用いた 1 ユニット解析を計画した。そこで本研究では、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（図 2）。これを用いることで膜の流動性を最小限に膜の両側を一度に観察することができる。MSP のサイズを変更することで、ナノディスクのサイズは直径約 70Åから 500Åまで変化し、さまざまな大きさの膜タンパク質の測定に利用できる。本研究ではモデル膜タンパク質として、タンパク質膜透過チャネルとなる SecYEG-SecA 複合体を高速 AFM で観測を行った。

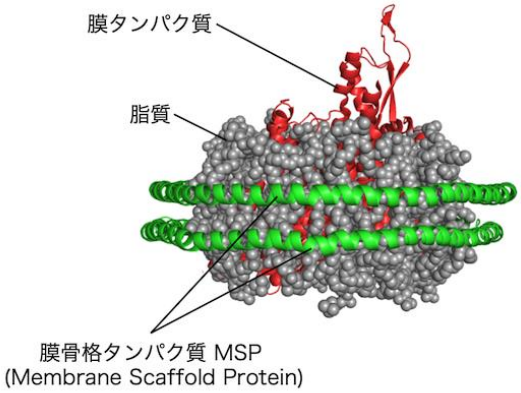



図 2. 膜タンパク質含有ナノディスク

膜タンパク質、膜骨格タンパク質(MSP)、脂質(灰色)から構成されるナノ粒子である。

## 結果および考察

### 1. 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

はじめに、*Streptococcus* 属由来の Asp1/2/3 複合体の精製について報告する。Asp1/2/3 複合体が発現するように設計したプラスミドを用いて大腸菌でタンパク質を発現させた。Asp1/2/3 複合体を過剰発現させた大腸菌を破砕したのち、Asp2 に付加させたポリヒスチジンタグをもちいて、Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを行った。続いて、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、精製標品を得た（図 3）。カラムからの溶出画分を SDS-PAGE で確認したところ、Asp1/2/3 複合体と Asp1/3 複合体のピークに分かれていた。どちらの複合体もゲルろ過カラムの波形をみる限り安定に存在しているようである。Asp1/2/3 複合体は、10 mg/ml 以上に濃縮して結晶化スクリーニングを進めた。また、Asp1/2/3 複合体、Asp1/3 複合体共に電子顕微鏡単粒子解析での構造決定を目指して予備的に負染色法による観察を行った（図 4）。アグリゲーションと思われるものも見られたため、試料のバッファー条件や電子顕微鏡による測定条件を詰める必要がある。

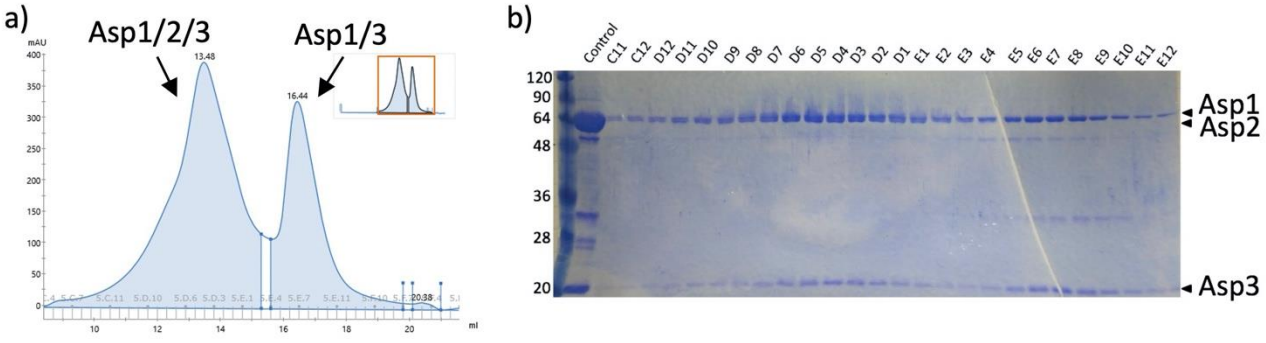



図 3. Asp1/2/3 複合体の精製

精製の最終段階であるゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果を示した。バッファーには、80 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl（pH 8.0）を用いた。

a）カラムからの溶出パターン。280 nm の吸光でモニター。

b）各溶出画分の SDS-PAGE の結果。

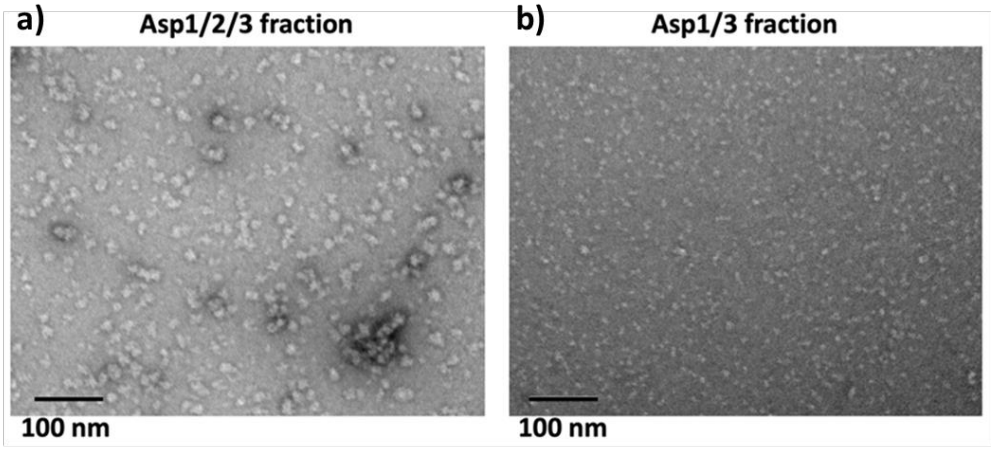



図 4. 電子顕微鏡の負染色法による Asp1/2/3, Asp1/3 複合体の観察

a）Asp1/2/3 複合体。

b）Asp1/3 複合体。

次に、*Streptococcus* 属由来の SecY2/Asp4/Asp5 複合体の精製の試みについて報告する。*Streptococcus* 属のゲノム情報を確認し、SecY2/Asp4/Asp5 複合体を持っていると思われる種を 5 種類ピックアップした。多くの場合、SecY2、Asp4、Asp5 の各タンパク質は、バイオフィルムに関連する糖タンパク質のコード領域付近にコードされており、オペロンとして発現していることが考えられる。SecY2/Asp4/Asp5 複合体を発現させるためのプラスミド構築を行い、大腸菌を用いてこれらタンパク質の発現と蓄積をウエスタンブロッティング法にて確認をした。発現は確認できたが、蓄積量が十分でなかったため、精製のために付加しているポリヒスチジンタグの位置を変化させたり、発現プラスミドのベクターを変更したり、各タンパク質の不安定領域の除去を試みたりした。今後、構造解析が可能となる数百マイクログラム以上の精製標品を得るべく研究を継続させる。

**2. Sec 複合体の高速 AFM 観察**

細胞質で合成された特定の新生ポリペプチド鎖はシャペロンなどによりアンフォールドの構造を保ったまま、SecYEG-SecA 複合体へと受け渡される。その後、ATP の加水分解のエネルギーを利用して SecA が大きな構造変化を繰り返すことで、この新生ポリペプチドを SecYEG チャネルへと押し込み、タンパク質を分泌する。この反応系は、SecY2 と共通するが、どちらもリアルタイムで分泌を追跡した例はない。本研究では、これを達成すべく研究を進めた［1]。SecYEG と SecA の複合体を安定に形成させるため、融合タンパク質を用い、ナノディスクに再構成させた。SecYEG を含むナノディスクを 2 種類の特定基盤（ストレプトアビジン 2 次元結晶表面とマイカ表面）上で高速 AFM 観察を行った。ストレプトアビジン 2 次元結晶上では、ナノディスクの膜表面が測定基盤に対して水平な上向きで固定されていた。高速 AFM 観察により、高さ約 11 nm の球状の粒子が確認された（図 5a)。対照的に、マイカ表面上ではナノディスクの膜表面が測定基盤に対して垂直な横向きで固定されていた。雲母基板上への吸着は非特異的に起こるため、ランダムな配向になる可能性もあったが、バッファーの条件を検討した結果、均一な雪だるま状の粒子が確認できた。この粒子はナノディスクの膜表面が基板に対して垂直となり SecYEG が「横向き」であると考えられた（図 5b)。さらに、ストレプトアビジン溶液を添加して調製したナノディスクを同様に観察したところ、雪だるま状の粒子に二つのタンパク質が結合していることが認識できた。ストレプトアビジンが結合している領域がペリプラズム側（細胞外側）に相当するので、間違いなくナノディスクを「横向き」に固定できたと考えられる（図 5b)。これらの観察結果は測定基盤を変更するなど観測条件が整えば、選択的に膜タンパク質を含むナノディスクを真上からと横向きからの 2 方向から高速 AFM で観測できることを実証したものである。さらに基質を加えて、高速 AFM で測定を行なったところ、タンパク質の分泌中間体のような構造が確認された。高速 AFM の像は、針先の質によって解像度が大きく変わってしまう。タンパク質の分泌を世界で初めて可視化すべく、さらなる測定条件や基質の最適化を進めている。アイデアの一つとしては、基質の C 末端側に大きなドメインを付加して基質を見やすくさせることである。また、基質の変異体を用いることで、基板へ基質をやや強く相互作用させることで基質の動きを制限し、より見やすくする方法も模索している。本研究により、タンパク質分泌反応のリアルタイム観察への準備がほぼ整った。また、これらのタンパク質の輸送に関わるシャペロン兼プロテアーゼである BepA と、タンパク質の硫黄源を取り込むチオ硫酸トランスポーターYeeE の構造機能解析も達成した［2，3］。

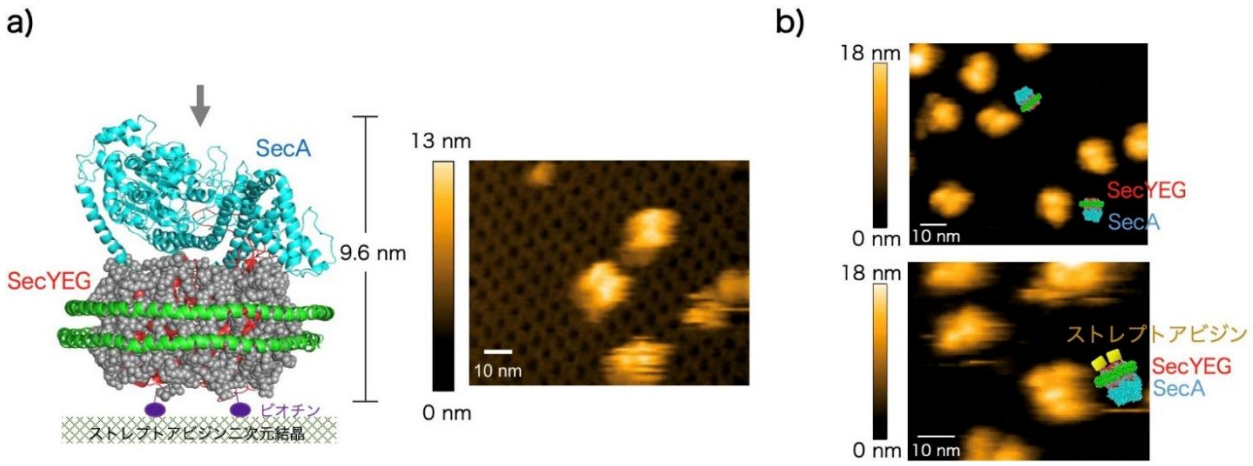



図 5. 高速 AFM による SecYEG 含有ナノディスクの解析

a) ストレプトアビジン二次元結晶基板上での SecYEG-SecA 含有ナノディスクの観察。SecYEG-SecA 含有ナノディスクを「上向き」に固定し（左）、高速 AFM で観察（右）。

b) 雲母基板上での SecYEG-SecA 含有ナノディスクの観察. SecYEG-SecA 含有ナノディスクを「横向き」に固定し高速 AFM で観察。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学ナノ生命科学研究所の紺野宏記准教授、安藤敏夫教授、古寺哲幸教授、名古屋大学大学院理学研究科の内橋貴之教授、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科（当時）の春山隆充博士、菅野泰功博士、田中良樹博士である。

## 文　献

1) Haruyama T, Sugano Y, Kodera N, Uchihashi T, Ando T, Tanaka Y, Konno H, Tsukazaki T. Single-Unit Imaging of Membrane Protein-Embedded Nanodiscs from Two Oriented Sides by High-Speed Atomic Force Microscopy. Structure. 2019 Jan 2;27(1):152-160.e3. doi: 10.1016/j.str.2018.09.005. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30318467.

2) Tanaka Y, Yoshikaie K, Takeuchi A, Ichikawa M, Mori T, Uchino S, Sugano Y, Hakoshima T, Takagi H, Nonaka G, Tsukazaki T. Crystal structure of a YeeE/YedE family protein engaged in thiosulfate uptake. Sci Adv. 2020 Aug 26;6(35):eaba7637. doi: 10.1126/sciadv.aba7637. PMID: 32923628; PMCID: PMC7449682.

3) Shahrizal M, Daimon Y, Tanaka Y, Hayashi Y, Nakayama S, Iwaki S, Narita SI, Kamikubo H, Akiyama Y, Tsukazaki T. Structural Basis for the Function of the β-Barrel Assembly-Enhancing Protease BepA. J Mol Biol. 2019 Feb 1;431(3):625-635. doi: 10.1016/j.jmb.2018.11.024. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30521812.