

## 「口腔病原菌バイオフィームに関わる特殊な分泌装置の基盤」

奈良先端科学技術大学院大学 教授

塚崎 智也

### 要旨

歯周病などの口腔内感染症は、身体全体の免疫や代謝機能の低下などに関連があります。これらの感染症の原因の一つには、病原性細菌があります。多くの病原性細菌は外毒素のような特殊なタンパク質の分泌に特化したシステムを持っています。また、中には特殊な糖タンパク質を分泌し微生物叢であるバイオフィームを形成するものもあります。*Streptococcus*属には、一般的なタンパク質輸送チャネル(SecYからなる複合体)に加え、特殊糖タンパク質に特化したタンパク質輸送チャネルとして「SecY2」があります。しかし、SecY2がどのように機能するかは不明です。本研究では、構造生物学的手法を用いてSecY2とその関連因子の単体や複合体の構造を解明し、これらの因子の構造基盤を確立することを試みました。さらに、SecY2の活性を調べるための機能解析系を立ち上げました。本研究により、SecY2の構造生物学的解析の基盤が構築され、SecY2が特殊な糖タンパク質の輸送にどのように関与しているかを解明することが可能となりました。

### 背景・目的

細菌のタンパク質分泌の基盤研究領域において、感染症の原因とな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す。この分野では、*Nature Reviews Microbiology* 誌などでレビュー記事が掲載され、注目を集めています<sup>[1],[2]</sup>。

口腔には多種多様な細菌が共存しており、その中には口内感染症の原因となるものも含まれます。特に、ある特定の種の病原性細菌は、細胞内で特殊な糖タンパク質を合成し、それらを分泌します。これらのタンパク質は唾液中の物質と相互作用し、口腔内のバイオフィーム形成に関与することがあります。病原性細菌の持つ特殊な機構の分子メカニズムを解明することは、基質特異性の理解につながり、学術的にも意義深いです。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開発や、高齢者の生活の質向上に貢献する口腔ケアの提供に役立つことが期待されます。

特に、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、特定の病原性糖タンパク質の分泌を担っています<sup>[3]</sup>。SecY2 は、既に研究が進んでいる一般的なタンパク質膜透過チャネルである SecY と相同性が高いですが、輸送される基質が異なります。SecY は 1983 年に発見され、これまで多くの遺伝学的、生化学的、構造生物学的解析が行われてきました。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ちながら細胞外へ分泌します。この反応は細胞質の SecA ATPase によって駆動されますが、糖鎖修飾を受けたタンパク質の透過は制限されます。一方、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します。この反応では SecA2 ATPase がタンパク質の分泌を駆動するとされていますが、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

分泌するメカニズムの詳細はまだ解明されていません。

本研究の最も重要な目的は、さまざまな状態の SecA2 と SecY2 の複合体の詳細構造を決定することで、それらの構造基盤を確立し、糖タンパク質特異的分泌機構という生命現象を解明することです。さらに、SecY2 の機能を簡便に評価する機能解析系を構築する必要があります。

## 方法

### 1. SecY2 複合体の精製

C 末端に His タグを導入した形で、各種 *Streptococcus* 属由来 SecY2 が大腸菌で発現するように設計されたプラスミドを用いて、大腸菌を形質転換しました。免疫ブロット法にて大腸菌内に蓄積しやすい *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) SecY2 を、構造解析のターゲットとしました。

SecY2 は、Asp4 と Asp5 とともに SecY2 複合体を形成し、コアとなるチャンネルを構成します。SecY2-His, Asp4, Asp5 を同時に大腸菌内で発現させ、大腸菌膜画分を調製しました。その後、膜画分を界面活性剤ドデシルマルトシドで可溶化して、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーによって、SecY2, Asp4, Asp5 複合体を精製しました。

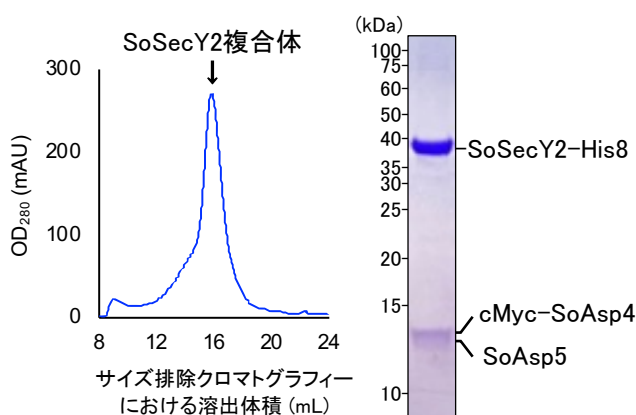
### 2. SecY2-SecA2 複合体のクライオ電子顕微鏡による単粒子観察の試み

上記、精製手法にさらに SecA2 が発現するようにプラスミドを改変し、同様に精製しました。次に、界面活性剤に可溶化している SecY2, SecA2, Asp4, Asp5 複合体と、膜骨格タンパク質、大腸菌リン脂質を混合し、SM2 ビーズで界面活性剤を除去することで、この複合体が再構成されたナノディスクを準備しました。調製したナノディスクを用いて、JEOL CRYO ARM 300 にて電子顕微鏡の画像の収集を行いました。

## 結果

### 1. SecY2 複合体の精製

図1左に、サイズ排除クロマトグラフィーからの溶出のパターンを示しました。また、ピークの画分を SDS-PAGE を行って CBB 染色したものが右図になります。SecY2, Asp4, Asp5 が同じ画分に含まれることがわかります。ピークの形状は単分散性を示しており、安定なサンプルであることが確認できました。



## 2. SecY2-SecA2 複合体のクライオ電子顕微鏡による単粒子観察の試み

クライオ電子顕微鏡による粒子の撮影により、170 万粒子を選別し、2D classification を行いました。(図2)。その結果、ナノディスク様の楕円構造の中に、タンパク質のアルファヘリックスが確認されたため、さらに良質な粒子を選別し、三次元マップの構築を行い約 3.5 Å 分解能のデータを得ることができました。マップの情報をもとに、予備的に SecY2 タンパク質のモデルの構築を行いました。

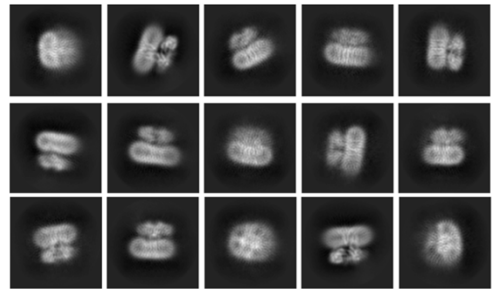


図2 SecY2-SecA2ナノディスクの 2D classification

## 考察

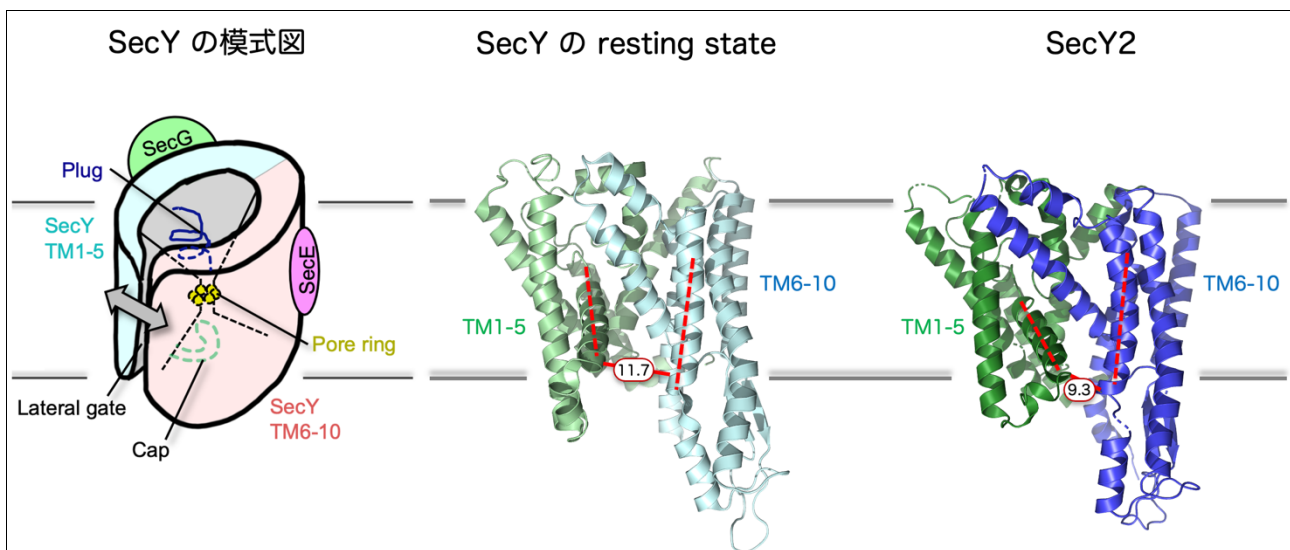


図3 SecY (PDB ID 5CH4)と SecY2 の構造比較

SecY2 のモデルの精密化を今後進めていく必要があるが、現時点でタンパク質の主鎖を明確に認識できるため、既存の SecY のモデルと比較を行いました(図3)。SecY は10回の膜貫通ヘリックス(TM)をもつタンパク質で、1番目から5番目の膜間通領域(TM1-5)とTM6-10が擬似2回対象となっています。中心部にはタンパク質が透過するためのチャンネルを形成する領域があり、それらは通常閉ざされています。タンパク質が輸送される際には、plug や cap 構造が取り除かれ、lateral gate 部分が広がり、SecY の中心にチャンネルが形成されます。SecY2 の構造モデルは、SecY の休止状態(resting state)と似ていたため、ここで SecY の resting state との比較を行った。図中、赤の点線で示した TM2 と TM8 は、lateral gate の接合部を形成します。これらの膜貫通領域の細胞質側に注目すると SecY では、11.7 Å 離れていましたが、SecY2 の場合は 9.3 Å しか離れていませんでした。

SecY2 を透過するタンパク質には糖鎖が付加しているため、SecY よりも SecY2 のほうが内部空間が広がる必要があります。しかしながら、resting state では、より強く lateral gate が閉ざされています。大きなチャンネルを構築すると考えられる SecY2 のほうがダイナミックな構造変化が起こると予測され、その構造は柔軟性に富んでいる可能性があります。膜透過障壁を維持するために、resting state はより強く閉ざされる必要があると思われます。

今後は SecY2 複合体の構造モデルを構築し、機能解析も進め、病原性にも関わる *Streptococcus* 属の糖タンパク質分泌の分子メカニズムを明らかとしていきます。

## 共同研究者

奈良先端科学技術大学院大学 甲賀 栄貴  
奈良先端科学技術大学院大学 宮崎 亮次

## 引用論文

- [1] Feltcher ME and Braunstein M. Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012. 10:779–89
- [2] Bensing BA, Seepersaud R, Yen YT, et al. Selective transport by SecA2: an expanding family of customized motor proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. 1843:1674–86.
- [3] Cinar MS, Niyas A and Avci FY. Serine-rich repeat proteins: well-known yet little-understood bacterial adhesins. *J. Bacteriol.* 2024. 206:e0024123

## 助成研究に関連した発表論文

Kohga H, Lertpreedakorn N, Miyazaki R, et al. Critical residues of the antibiotic peptide LysM that inhibits lipid II flipping. *bioRxiv.* 2023. 541694  
Kohga H, Mori T, Tanaka Y, et al. Crystal structure of the lipid flippase MurJ in a "squeezed" form distinct from its inward- and outward-facing forms. *Structure.* 2022. 30:1088–1097