

グルタミン酸放出体機械受容チャネル MscCG のクライオ電子顕微鏡単粒子観察による構造解析

Structural studies of the glutamate exporter mechanosensitive channel MscCG by cryoEM single-particle analysis

ビクターチャン心臓病研究所

派遣期間

研究機関

研究指導者

中山 義敬

2017年4月20日-2019年5月2日

Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Chicago, GCIS W426, 929 East 57th Street, Chicago, IL 60637, United States

Prof. Eduardo Perozo

Corynebacterium glutamicum is utilized worldwide for industrial glutamate production, especially for UMAMI taste enhancer. Recently, the long-elusive glutamate exporter mechanosensitive channel MscCG was identified serendipitously during the screening of glutamate-overproducing strains, and it is now expected to improve the industrial production via transporter engineering of the MscCG channel. In this study, we aimed to elucidate the 3D structure of MscCG by cryo-electron microscopy (cryoEM) single-particle analysis. The N-terminal FLAG-tagged MscCG was expressed in the native *Corynebacterium glutamicum* system and purified with affinity columns. The oligomerized MscCG protein was collected by size-exclusion chromatography, and then the protein particles were observed by cryoEM. MscCG protein particles were heterogeneous in shape and size, suggesting that some of the particles are functional protein. However, they need to be stabilized more to obtain a high-resolution structure.

研究目的

2050年に世界人口は未曾有の数に達することが予想されており、食料問題への対応が求められている。日本は微生物を用いた工業的アミノ酸生産をはじめとしたバイオテクノロジー分野で世界を牽引してきた。特にヒトの基本味覚の一つである旨味が Monosodium glutamate (MSG) によって引き起こされることが発見されてからコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) を用いたグルタミン酸発酵生産は60年以上もの間、世界中で行われている。

コリネ型細菌は機械受容チャネルが開口した時のみ大量のグルタミン酸を細胞外に放出する。このグルタミン酸の放出機構を解明できれば更なるグルタミン酸の工業生産の向上が期待できるがその分子機構はよく分かっていない。根本的な問題はコリネ型

細菌の機械受容チャネルが細胞膜上でどのように活性化するのか、すなわち開閉機構の分子メカニズムが明らかになっていないことにある。

近年のクライオ電子顕微鏡観察技術の進歩により、従来のX線結晶構造解析法では解くことが出来なかった膜タンパク質の構造が数多く解明できるようになった。大腸菌の機械受容チャネル MscS は X 線結晶構造解析により、その立体構造が高解像度で解明された。しかし、そのホモログであるコリネ型細菌の MscCG は同様の手法で構造を解くことができていない。そこで本研究では複雑な結晶の作製を必要としないクライオ電子顕微鏡観察によって MscCG の立体構造の解明を目指した。

MscCG の立体構造を明らかにすることでコリネ型細菌のグルタミン酸放出体機械受容チャネルの構造機能相関を明らかにすることが可能となる。これに

よりコリネ型細菌のグルタミン酸放出の分子メカニズムの解明に迫ることが可能となり、工業的グルタミン酸発酵生産の新たなブレークスルーを生み出せる。

研究経過

本研究ではシカゴ大学の Eduardo Perozo 教授のもとでクライオ電子顕微鏡による単粒子観察法を学び、その技術を機械受容チャネル MscCG に適用した。すなわち、MscCG を細菌細胞に大量発現させた後、精製したタンパク質をクライオ電子顕微鏡で観察し、タンパク質粒子の画像を出来るだけ多く取得することで高い解像度の構造を得ることを目指した。具体的な手順は下記の通りである。1) MscCG を大腸菌もしくはコリネ型細菌で発現させ、細胞膜を界面活性剤で可溶化する、2) 可溶化した細胞膜から MscCG タンパク質をアフィニティーカラムを用いて精製する、3) 限界ろ過クロマトグラフィーを用いて生来の形を保った機能的な MscCG タンパク質のみを選び出す、4) ネガティブ染色を用いてタンパク質粒子の形状を確認する、5) ネガティブ染色で粒子の観察ができた場合はクライオ電子顕微鏡下で MscCG のタンパク質粒子の画像を取得する、6) タンパク質を粒子の画像をできるだけ多く取得し、立体構造をモデルから構築する。

まずコリネ型細菌に FLAG タグのついた MscCG を大量に発現させて構造と機能を保った状態のタンパク質を精製することを試みた。また実験のコントロールとして大腸菌の機械受容チャネル MscS の精製も行った。まず膜タンパク質の可溶化によく用いられている界面活性剤をいくつか試すことで精製条件の検討を行った。その結果、界面活性剤 DDM (n -Dodecyl β -D-maltoside) で MscCG、そして、MscS を十分に可溶化できることが明らかになった。FLAG M2 樹脂カラムでタンパク質を精製後、限界ろ過カラムで正しい多量体のサイズを持ったタンパク質を選び出した。このタンパク質をネガティブ染色、そして、クライオ電子顕微鏡下で観察することでタンパク質の単粒子を観察することに成功した (図 1)。この単粒子の

画像を多数撮影し、手動と自動で約 1,000 の粒子を選択し、粒子の形状を 2D classification にかけた。その結果、複数の異なった形状の粒子が分類され、MscCG の大まかな構造が明らかになったが残念ながら、今回観察されたタンパク質粒子は予想される MscCG の粒子サイズよりも小さく、観察までの過程で分解されてしまっている可能性があることが明らかになった。

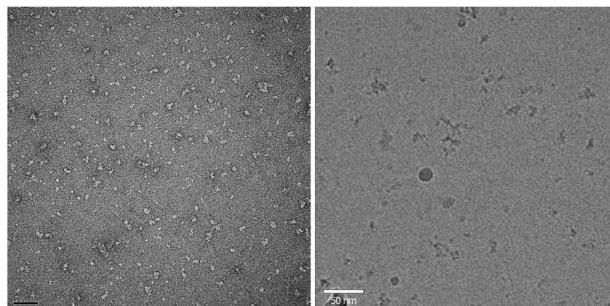


図 1 MscCG タンパク質粒子の電子顕微鏡観察結果
左：ネガティブ染色、右：クライオ電子顕微鏡観察
スケールバー：50 nm

考察

MscCG の立体構造を高解像度で取得するためには生来の形を保った状態の均一なタンパク質を高濃度で精製することが必要不可欠がある。この問題をクリアできればクライオ電子顕微鏡下で粒子の画像撮影を自動で行うことで高解像度の構造の取得できる。コリネ型細菌を用いた MscCG タンパク質の発現系ではタンパク質粒子の「不均一性」が観察された。コリネ型細菌は大腸菌に比べてプロテアーゼ活性が低いため、タンパク質の分解を避けられることが期待できる。しかし、それでもタンパク質の「不均一性」が観察されたことから MscCG が生来、不安定なタンパク質である可能性がある。今後の予定として、コリネ型細菌からより生理的条件下で MscCG を精製することで MscCG をより安定に精製する条件を見つけ出すことを計画している。

研究の発表

口頭発表

1. Nakayama Y, “Evolutionary specialization of

Corynebacterium glutamicum MscCG, an MscS-like mechanosensitive channel, in glutamate export”, Baltimore, March 2-6, 2019

2. Nakayama Y, “Force-From-Lipids gating of *Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channels specialized in glutamate export”, Melbourne, December 2-6, 2018

誌上発表

1. Nakayama Y, Hashimoto KI, Kawasaki H, Martinac B. "Force-From-Lipids" mechanosensation in *Corynebacterium glutamicum*. *Biophys Rev.* **2019**, doi:10.1007/s12551-019-00524-3.

2. Nakayama Y, Hashimoto KI, Sawada Y, Sokabe M, Kawasaki H, Martinac B. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensitive channels: towards unpuzzling "glutamate efflux" for amino acid production. *Biophys Rev.* **2018**, 10(5):1359-1369. doi: 10.1007/s12551-018-0452-1.
3. Nakayama Y, Komazawa K, Bavi N, Hashimoto KI, Kawasaki H, Martinac B. Evolutionary specialization of MscCG, an MscS-like mechanosensitive channel, in amino acid transport in *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Rep.* **2018**, 8(1):12893. doi: 10.1038/s41598-018-31219-6.