

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880011

研究課題名(和文)有用物質生産の基礎となるアミノ酸排出機構に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文)Structural studies on mechanism of amino acid exporting system in *Corynebacterium glutamicum*

研究代表者

吉田 彩子 (Yoshida, Ayako)

東京大学・生物生産工学研究センター・特任助教

研究者番号：90633686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Corynebacterium glutamicumはグルタミン酸発酵菌として知られており、近年メカノセンシティブチャネルであるNCgl1221がグルタミン酸生産の誘導条件でグルタミン酸排出を担うトランスポーターであることが明らかとなってきた。その排出機構の詳細を明らかにするためNCgl1221のX線結晶構造解析を試みた。大腸菌におけるNCgl1221組換タンパク質の生産系および精製系を確立し、結晶化スクリーニングを行った。その結果、いくつかの条件でタンパク質結晶の生成が確認され、条件の最適化を行い、分解能は悪いながら反射の質の良い結晶化条件を見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：Corynebacterium glutamicum is a bacterium for glutamate fermentation. Recently, the mechanosensitive channel, NCgl1221 is uncovered to be responsible for the export of glutamate and is important for the glutamate fermentation. To elucidate the mechanism of glutamate exporting system in *C. glutamicum* structurally, we performed the crystallographic analysis of NCgl1221. We constructed the expression system of NCgl1221 in *Escherichia coli* and we could successfully obtain purified NCgl1221. After crystallization screening, protein crystals appeared in several conditions. Although the resolution was poor, we could observe the good diffraction patterns from the crystals obtained in the optimized crystallization condition.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：メカノセンシティブチャネル グルタミン酸発酵 コリネバクテリウム グルタミカム 膜タンパク質
X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

日本ではグルタミン酸の発酵生産法の開発を皮切りに、アミノ酸をはじめとする様々な有用物質が発酵生産されてきた。フィードバック阻害の解除などの代謝フラックスの改変により、より効率的な生産系の確立がされてきたが、近年ではその排出系の強化も重要であると言われている。一方で、このような有用物質生産法の開発の過程で明らかになった代謝制御機構や排出機構の詳細な全容は明らかにされていない場合が多い。グルタミン酸発酵菌である *Corynebacterium glutamicum* におけるグルタミン酸排出機構も長い間謎であったが、近年、膜張力等の変化に応じて構造変化するメカノセンシティブチャネルと相同性を持つ NCgl1221 がグルタミン酸排出を担うことが示唆されている。グルタミン酸生産は、界面活性剤の添加やビオチン制限などにより誘導されるが、このような条件下では膜構造が変化する。メカノセンシティブチャネルである NCgl1221 がこの膜構造の変化に応じて構造変化することでグルタミン酸が排出されるといわれている (図1)。

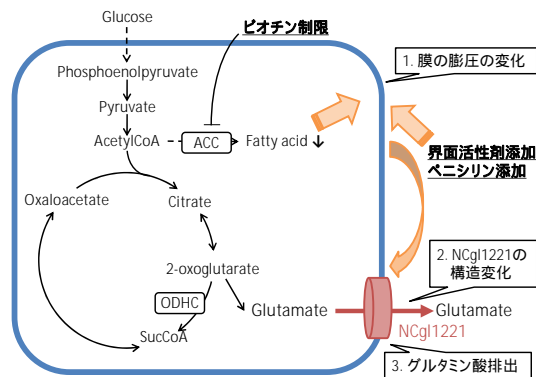


図1: NCgl1221によるグルタミン酸排出 (参考文献[1]改変)

メカノセンシティブチャネルとしては大腸菌のメカノセンシティブチャネルである MscS の結晶構造が決定されており、3本の膜貫通ヘリックスと sheet からなるドメインと C 末ドメインから構成され、7 量体構造をとっている。一方で、NCgl1221 は他のバクテリアのメカノセンシティブチャネルとは異なり、*C. glutamicum* 特異的な他のタンパク質と相同性を持たない機能未知ドメインを C 末端側に持っている (図2)。

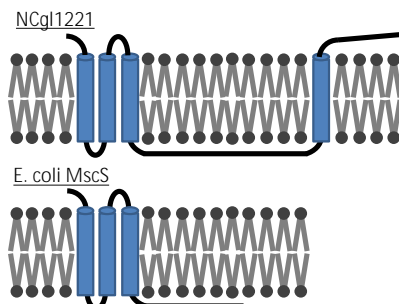


図2: NCgl1221とE. coli MscS

この機能未知ドメインがグルタミン酸排出機構や排出の制御などにかかわっている可能性も考えられ、その機能に興味を持たれるが、膜タンパク質でありその機能解析の困難さなどから NCgl1221 によるグルタミン酸排出機構の全容は解明されていない。

2. 研究の目的

NCgl1221 は *C. glutamicum* におけるグルタミン酸発酵の鍵となるステップであるグルタミン酸の細胞外への排出を担うことが示唆されているが、その機能解析の難しさから排出機構の全容は解明されていない。そこで本研究では、効率的な有用物質生産を可能にする排出系の構築の構造的なベースを提示することができる考え、主として構造生物学的手法を用いて NCgl1221 の構造-機能相関を明らかにし、グルタミン酸発酵における基礎的なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NCgl1221 の大量調製

NCgl1221 の結晶構造解析を行うにあたり、大量の精製タンパク質を調整する必要があった。そこで大腸菌を用いた異種発現系を構築することにした。pET26b(+) ベクターや pET28b(+) をもとに改変された pHis8 ベクターに、それぞれ C 末と N 末に (His)₆-tag を付加した形で NCgl1221 をコードする遺伝子を挿入した発現ベクターを作製した。作製した plasmid で大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を形質転換し、培養温度・IPTG (isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside) 濃度などを変化させ発現条件の検討を行った。また、さらなる発現量の増加を見込み、毒性タンパク質の発現に向くとされる大腸菌 C43(DE3) を発現宿主として用いたり、フラスコでの培養だけでなくジャーファーメンターを用いたりした。

C. glutamicum の膜構造がミコール酸を含む特徴的な構造となっており、大腸菌とは異なることから、NCgl1221 が大腸菌内できちんと folding しない可能性も考え、*C. glutamicum* での発現系の構築も行った。

(2) 組換 NCgl1221 の精製系の構築

大腸菌にて発現させた NCgl1221 の組換タンパク質の精製は、まず NCgl1221 を発現する大腸菌から膜画分を調整し、界面活性剤である *n*-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) を添加して可溶化した。この可溶性画分を NCgl1221 に付加した (His)₆-tag を利用し、Ni²⁺-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにて精製し、引き続きゲル濾過クロマトグラフィーを行った。可溶化後の精製の際にも界面活性剤を添加したが、この界面活性剤の検討も DDM や *n*-decyl- β -D-maltoside、*n*-octyl- β -glucoside といった各種界面活性剤を用いて行い、ゲル濾過ク

ロマトグラフィーにおいて多量体ではなく7量体を形成しているかどうかで、界面活性剤の適性を判断した。

また NCgI1221 の精製度の改善を目的とし、(His)₆-tag だけでなく (His)₁₂-tag や Strep-tag などを付加した組換えタンパク質でも精製条件の検討を行った。

(3) NCgI1221 の結晶化

精製された NCgI1221 を濃縮し、5-10 mg/ml に調整し結晶化条件のスクリーニングに供した。結晶化スクリーニングには濃縮した NCgI1221 のそのままの条件と、NCgI1221 が排出する基質であるグルタミン酸を添加した条件の2条件で行った。微結晶が見られた条件ではその沈殿剤濃度や pH を変化させて条件の最適化を行った。また、結晶化のリザーバー溶液にも界面活性剤を添加した条件でのスクリーニングも行った。

(4) NCgI1221 がアシル化修飾を受ける可能性の検討

近年、タンパク質の翻訳後修飾のうちアセチル化などに代表される短鎖アシル化修飾が、バクテリアにも存在することが見いだされ、代謝調節にかかわることが示唆されている。研究代表者の所属する研究室において、最近 *C. glutamicum* がグルタミン酸生産誘導時と非誘導時で異なるアシル化修飾パターンを示すことが明らかになりつつある。そこで、グルタミン酸の排出を担う NCgI1221 もアシル化修飾によってその排出能が調節されている可能性が考えられた。His-tag 及び FLAG-tag を付加した NCgI1221 を *C. glutamicum* と大腸菌のシャトルベクターに組み込み、*C. glutamicum* に導入した。*C. glutamicum* をグルタミン酸生産誘導条件と非誘導条件で培養し、それぞれのライセートに対して、抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で Ngl1221 が発現しているかどうかを確認した。さらに Ni²⁺-NTA カラムで精製した NCgI1221 を抗アセチルリジン抗体や抗スクシニルリジン抗体を用いて、NCgI1221 がアセチル化やスクシニル化を受けているかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) NCgI1221 の発現・精製系の構築

pET26b(+) や pHis8 ベクターでの発現 plasmid を用いて、大腸菌において発現条件検討を行ったところ、pET26b(+) ベクターにて C 末端に (His)₆-tag を付加した NCgI1221 が可溶性タンパク質および膜画分に観察された。これは NCgI1221 の大部分 (特に C 末側) が細胞質に存在すると予想されるためだと考えられる。

NCgI1221 の発現が確認された条件にてフラスコでの培養を行い、Ni²⁺-NTA でのアフィニティー精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーにて各種界面活性剤の検討を行った。その

結果、DDM を添加した条件で一番多く NCgI1221 が7量体を形成していた (図3)。

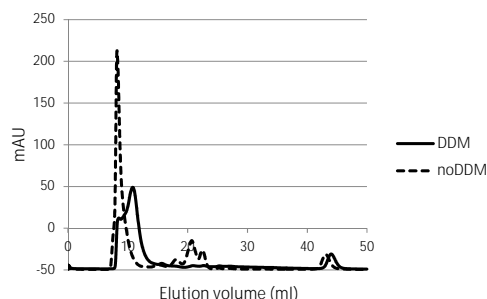


図3: DDM添加時のゲル濾過クロマトグラフィー

加えて DDM の濃度検討も行い、0.03 % (w/v) DDM で精製を行うことにした。また、精製度改善のために、His-tag の数を 12 まで増加させたものや His-tag よりも特異性の高い Strep-tag を付加した NCgI1221 の発現・精製も試みたが、効果は見られなかった。

大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に加えて、より毒性タンパク質に耐性を持つ C43(DE3) での発現条件の検討も行った。その結果、フラスコでの 1.6 L の培養から最終的に約 3 mg の精製タンパク質が取得できた。BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 株での発現系においてはジャーファーマーターでの培養検討も行い、培地に高濃度で Glucose を添加することで菌体量を増加させて NCgI1221 の収量を確保することを目指した。しかし、扱う菌体量の多さから効率的にタンパク質を調整することが困難であり、結果的にフラスコでの培養時と同等の精製 NCgI1221 しか得られなかった。

野生型の NCgI1221 の発現系に加えて、既に報告のあるグルタミン酸生産条件下でなくてもグルタミン酸を細胞外に排出することができる変異体についても発現系を構築していた。また、C 末にある機能未知ドメイン単独での発現系も構築したが、大腸菌において発現は確認されなかった。

さらに *C. glutamicum* での発現系の構築を試みたが、タンパク質の生産は確認されたものの、後述するように plasmid の安定性が悪く、継続的に NCgI1221 の発現を行うには向いていないと考えられる。

(2) NCgI1221 の結晶化

0.03 % (w/v) DDM を含む buffer で精製された NCgI1221 を濃縮し、5-10 mg/ml にて、各種結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、PEG (Polyethylene glycol) を沈殿剤に用いた条件で、オイル状に近い、あまり形がよくない結晶が得られた。高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory にて得られた結晶に X 線を照射したところ、分解能は 20 Å 程度であり、回折像も流れており、質はよくなかったがタンパク質の結晶であることが確認された。

結晶が得られた条件の沈殿剤濃度や pH を

変化させより良い質の結晶が出る条件を探したが、改善しなかった。そこで、結晶化スクリーニングの際にもリザーバー溶液にDDMを終濃度0.03%となるように加えてスクリーニングを行った。その結果、それまで見られてきたオイル状の結晶に加えて、小さいながらもエッジの立った結晶が得られた(図4)。



図4: NCgl1221の結晶

得られた結晶のX線回折像を取ったところ、分解能は15 Å程度とデータ収集を行うには至らなかったが、これまで流れていた反射がきちんと並んでいた(図5)。

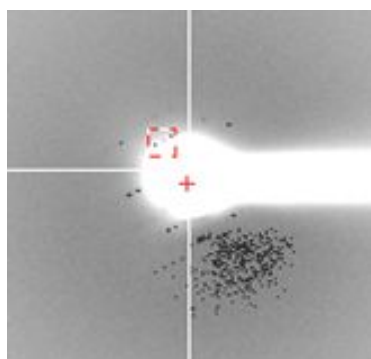


図5: X線回折像

今後、界面活性剤の濃度や結晶化条件の最適化を行っていくことで、より大きな結晶が得られれば、分解能の改善が期待でき、X線回折データが収集できると考えている。

(3)NCgl1221 がアシル化修飾を受ける可能性の検討

C. glutamicum において、グルタミン酸生産誘導条件下において、細胞内タンパク質のアセチル化やスクシニル化のアシル化パターンがグルタミン酸生産非誘導条件とは異なることが示唆されている。NCgl1221 はグルタミン酸生産における鍵である排出を担うため、NCgl1221 もアシル化修飾によりその活性が制御される可能性を考え、*C. glutamicum* における NCgl1221 の発現系を利用して、アシル化修飾されているかどうかを調べた。

C. glutamicum 内での発現を NCgl1221 に付加した FLAG-tag を Western blotting にて検出することで確認した。さらに、抗アセチルリジンおよびスクシニルリジン抗体を用い

て Ni²⁺-NTA カラムで精製した NCgl1221 がアセチル化・スクシニル化されているかどうかを調べたところ、そのような修飾タンパク質は検出されなかった。

この実験の過程で、グルタミン酸誘導条件と非誘導条件では、NCgl1221 の検出量に差があり、NCgl1221 はグルタミン酸生産誘導条件でより多く観察された。このことから NCgl1221 がアシル化修飾とは関係なく、グルタミン酸生産誘導条件下で安定化されることにより細胞内に多く存在することができ、グルタミン酸をより多く細胞外に排出できているという仮説が考えられる。しかしながら、NCgl1221 の発現 plasmid が *C. glutamicum* 内で不安定であり、培養時に抗生物質を入れていても抜け落ちてしまうという事象が発生するため、再現性は取れておらず、この仮説の検証はできていない。今後は、結晶構造解析とこのような *in vitro*, *in vivo* での機能解析とを組み合わせることで NCgl1221 によるグルタミン酸排出機構の全容を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biotec-research/MBT/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 彩子 (YOSHIDA AYAKO)
東京大学生物生産工学研究センター・特任助教
研究者番号：90633686

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし