

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07399

研究課題名(和文)植物のマグネシウムチャンネルMRS2におけるアルミニウム阻害と輸送の分子機能的解明

研究課題名(英文)Molecular functional analysis of aluminum inhibition and transport of plant magnesium channel MRS2

研究代表者

石島 純男(Ishijima, Sumio)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70184520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物のマグネシウム膜輸送を担うと考えられていた MRS2 タンパク質について、シロイヌナズナ 3種 およびイネ 2種類の MRS2 タンパク質のMg<sup>2+</sup>の輸送とAlによる阻害効果およびAl 輸送を、人工脂質二重層膜に再構成した精製タンパク質および変異大腸菌における機能相補実験により、解析した。その結果、MRS2 タンパク質は、Mg<sup>2+</sup>輸送能をもつMg<sup>2+</sup>輸送タンパク質であるが、そのAl感受性は、MRS2 タンパク質によって大きく異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant MRS2 proteins may play a role in Mg<sup>2+</sup> transport. Magnesium and aluminum transport activity and Al inhibition of Mg<sup>2+</sup> transport of 3 *Arabidopsis thaliana* MRS2 proteins and 2 *Oryza sativa* MRS2 proteins were analyzed using purified MRS2 proteins reconstituted into liposomes and functional complementation assay with *Escherichia coli* mutants. The results showed that these MRS2 proteins could transport Mg<sup>2+</sup>, but their Al sensitivity was much different among the MRS2 proteins.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：マグネシウムイオン 膜輸送タンパク質 アルミニウム シロイヌナズナ イネ リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

生物細胞にとって、細胞内外のイオン環境の調節が非常に重要であることは言うまでもない。この細胞内外のイオン環境の保持、調節に決定的な役割を果たしているのが、細胞膜あるいは細胞内小器官膜系に存在するイオン輸送タンパク質である。この重要性を反映して、イオン輸送系タンパク質、すなわち、ポンプ、チャネル、トランスポーターが、世界的に非常に活発に研究されていた。Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> の膜輸送を担うイオンポンプあるいはチャネルが生物膜より精製され、遺伝子が次々とクローニングされ、X線回折により構造が決定されて、発現実験によりその機能および調節様式が解析されていた。これらは、いずれも生理的に非常に重要なイオンであるが、このほかに、生理的に非常に重要ではありながら、その輸送システムの解析や、濃度保持・調節の機構の解析がこれらのイオンに比べ非常に遅れていたものが、マグネシウムイオン (Mg<sup>2+</sup>) であった。

動物細胞における Mg<sup>2+</sup> の動態解析は、医学的重要性の見地から、いくつかの研究室で行われてきた。我々は、単一細胞レベルで細胞内の Mg<sup>2+</sup> 濃度を測定し、増殖刺激により Mg<sup>2+</sup> 濃度変化が起こることを世界ではじめて報告した。しかし、植物細胞における細胞レベルの解析は、その重要性にもかかわらず、ほとんど行われていなかった。また、分子レベルでの解析は、動物細胞、植物細胞を問わず、真核生物ではすすんでいなかった。したがって、真核生物における Mg<sup>2+</sup> 膜輸送システムの分子的解明は、真核細胞における Mg<sup>2+</sup> 動態調節メカニズムを探る上での鍵となっていた。

外部刺激に応答するシグナリング物質として、Ca<sup>2+</sup> とその動員機構が注目されて久しく、多くの研究者によってその解析が精力的にすすめられてきた。生化学的にみると Mg<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> とリガンドを共有するものが多く (たとえば ATP)、Ca<sup>2+</sup> の動員に対しても Mg<sup>2+</sup> の動態が鍵となる。現に、Mg<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> の天然の拮抗薬として作用する。Mg をリガンドとする酵素、タンパク質は 300 以上にも及び、その種類と数を考えると、生体における Mg の意義、役割は極めて重要と考えられる。実際、我々は、細胞内 Mg<sup>2+</sup> 濃度が、ヌクレオチド合成の基本的な調節因子としてはたらいっていることを、動物細胞において、世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、植物においては、光合成反応にはたらく炭酸固定酵素系の活性が Mg<sup>2+</sup> によって調節されている。すなわち、葉緑体内の Mg<sup>2+</sup> 濃度の上昇によって、炭酸固定系酵素の活性は S 字的に上昇する。したがって、植物における Mg<sup>2+</sup> 膜輸送システムの分子的解明は、植物の Mg<sup>2+</sup> 濃度コントロールシステムの解明につながり、Mg<sup>2+</sup> 濃度のコントロールを通じて、炭酸固定酵素の細胞内活性レベルの上昇によって炭酸固定能の増強につながる可能性が考えら

れた。

微生物においては、MgtE と CorA と名付けられたタンパク質が主要な Mg<sup>2+</sup> 膜輸送タンパク質として機能していると考えられている。このうち CorA タンパク質は、C 末端近くに 2 つの膜貫通ヘリックスをもち、そのうちの一つのヘリックスにある 4 つのアミノ酸残基からなる (Y/F)GMN モチーフは、生物種を通じて非常によく保存されている。植物にもこのような構造的特徴をもつタンパク質が、一次構造をもとに見出され、MRS2 タンパク質と名付けられている。

ヒトにおいては、家族性低マグネシウム血症患者の遺伝子解析により、Mg ホメオスタシスを調節する膜イオンチャネルとして、TRPM6 および TRPM7 タンパク質が浮かび上がってきた。しかし、相同なタンパク質は、植物では見出されず、植物では、動物とは異なった機構によって、Mg ホメオスタシスが調節されている、と考えられる。現在、植物において、Mg ホメオスタシスを調節するタンパク質として、二つのタンパク質が考えられている。一つは、液胞に存在する Mg<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> 逆輸送タンパク質であり、もう一方が、本研究で対象とする MRS2 タンパク質である。しかし、植物の Mg<sup>2+</sup> 輸送タンパク質の機能解析は、我々が行ったシロイヌナズナの MRS2 タンパク質、AtMRS2-10 の機能解析以外、報告されていなかった。

現在、分子的解析が最も進んでいる Mg<sup>2+</sup> 膜輸送タンパク質は、微生物の CorA タンパク質である。好熱菌 CorA タンパク質はホモ五量体から成り、各モノマーの C 末端近くの 2 つのヘリックスが膜を貫通し、その 2 つの膜貫通ヘリックスをつなぐ約 10 残基から成るループ部分のみが細胞外に露出している。植物の MRS2 タンパク質も、一次構造の比較から、ほぼ同じトポロジーをもっているものと予想されている。

可溶性アルミニウムは、酸性土壌における植物の生育不良の主要因である。すなわち、pH が下がることにより土壌中の Al が、植物の根に障害を与え、生育障害を引き起こす。この Al による生育障害をマグネシウムの施肥が緩和する。また、シロイヌナズナの AtMRS2-10 を実験的に過剰発現させたタバコは、Al 耐性能を示すことが報告されている。このように、Al 耐性機構において、Mg<sup>2+</sup> が重要な役割を果たしている可能性が高い。

植物では、シロイヌナズナに比べて、イネは Al 耐性植物であり、その Al 耐性機構が活発に研究されている。我が国において主食であるイネは、シロイヌナズナと同じように MRS2 がファミリータンパク質を形成している。しかし、イネの MRS2 タンパク質が精製され、その Mg<sup>2+</sup> 膜輸送活性および Al によるその障害が測定されたことはなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかにすること

を目的とした。

(1) シロイヌナズナの AtMRS2 タンパク質の  $Mg^{2+}$  膜輸送が、AI によって阻害されるとい報告はあったが、AI そのものの膜輸送の知見はなかった。そこで、AtMRS2 が AI を膜輸送するかどうか、を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、AtMRS2 ファミリータンパク質には、細胞内局在が異なる 9 種類のメンバーが存在する。それらのメンバー間で、AI 輸送能にちがいがどうか、を明らかにすることを目的とした。

(2) AI が MRS2 の  $Mg^{2+}$  膜輸送を阻害する際、AI の作用点として、AI が最初に結合する細胞外ループ領域か、あるいは、それ以降のチャンネル孔、細胞内領域のいずれかが考えられた。シロイヌナズナの AtMRS2 タンパク質への AI 作用点がこのうちのいずれであるか、を明らかにすることを目的とした。

(3) イネの MRS2 ファミリータンパク質の  $Mg^{2+}$  膜輸送活性を測定することとした。シロイヌナズナ AtMRS2 との AI 阻害能あるいは AI 輸送能のちがいを分子的に比較して、イネの AI 耐性機構における MRS2 タンパク質の役割の重要性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 植物  $Mg^{2+}$  膜輸送タンパク質 recombinant protein の調製

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の 3 種類の AtMRS2 タンパク質およびイネ *Oryza sativa* 由来の 1 種類の OsMRS2 タンパク質の cDNA を材料として、これらのタンパク質を大腸菌で発現し、単離精製した。大腸菌での発現は、強力な発現が期待できる pET システム (pET28) を用いた。

(2)  $Mg^{2+}$  および AI 膜輸送活性測定

Recombinant タンパク質をリポソームに再構成し、リポソーム外液に  $Mg^{2+}$  もしくは AI を加え、リポソーム内の遊離  $Mg^{2+}$  濃度もしくは AI 含量を測定した。遊離  $Mg^{2+}$  濃度の測定には蛍光指示薬 mag-fura-2 を用いた。mag-fura-2 は、遊離型と Mg 結合型とで励起スペクトルが異なるため、二つの励起波長における蛍光強度の比が、 $Mg^{2+}$  濃度に依存して変化する。蛍光指示薬 mag-fura-2 存在下にリポソームを作成し、recombinant タンパク質を導入した。一定時間インキュベーション後に、リポソーム内の  $Mg^{2+}$  濃度変化を蛍光分光光度計によって測定した。AI の測定には蛍光指示薬 morin を用いた。morin 存在下にリポソームを作成し、recombinant タンパク質を導入した。一定時間インキュベーション後に、リポソーム内の AI 濃度変化を蛍光分光光度計によって測定した。

(3) AtMRS2 タンパク質の機能部位の解析

微生物の相同タンパク質 CorA の先行研究を参考に、輸送活性に影響を与えらるアミノ酸残基を変異させた変異タンパク質や、異なる AtMRS2 タンパク質を相同する領域で組み替えたキメラタンパク質を作成し、その機能の解析を行った。

(4)  $Mg^{2+}$  要求性大腸菌  $Mg^{2+}$  膜輸送多重変異株を用いた機能相補実験

本研究室で作成した、大腸菌において  $Mg^{2+}$  輸送に関与すると考えられる 3 つの遺伝子を欠失させた  $Mg^{2+}$  要求性大腸菌  $Mg^{2+}$  膜輸送多重変異株に、3 種類の AtMRS2 タンパク質および 2 種類の OsMRS2 タンパク質の cDNA を導入し、その  $Mg^{2+}$  要求性の相補能を解析した。

### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ  $Mg^{2+}$  膜輸送ファミリータンパク質 AtMRS2 の調製とカチオン輸送活性測定

シロイヌナズナの細胞膜に存在する AtMRS2-10、液胞膜に存在する AtMRS2-1 および葉緑体膜に存在する AtMRS2-11 を大腸菌で発現し、単離精製した。精製した AtMRS2 タンパク質をリポソームに組み込み、リポソーム内のカチオン濃度を、蛍光指示薬を用いて測定した。これまで、シロイヌナズナの細胞膜に存在する AtMRS2-10 の  $Mg^{2+}$  膜輸送活性が、AI によって阻害されることを明らかにしてきたが、AtMRS2-10 は、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  はほとんど輸送せず、AtMRS2-10 は、 $Mg^{2+}$  を主に輸送するタンパク質であることが明らかとなった。一方、AtMRS2-10 と相同性の高い AtMRS2-1 の  $Mg^{2+}$  膜輸送活性は、AI によって阻害されず、AI に対する感受性に大きな違いがあることが明らかとなった。

(2) 大腸菌  $Mg^{2+}$  膜輸送多重変異株によるシロイヌナズナ AtMRS2 タンパク質の機能解析

生育に  $Mg^{2+}$  要求性を示す大腸菌  $Mg^{2+}$  膜輸送多重変異株 (corA、mgtA、yhiD) に、シロイヌナズナ AtMRS2-10、AtMRS2-1 および AtMRS2-11 を発現させて、AtMRS2 タンパク質の機能解析を行った。AtMRS2-10 と AtMRS2-11 はともに、変異株の  $Mg^{2+}$  要求性を相補して低濃度の  $Mg^{2+}$  でも生育が可能となり、培養外液の AI がその生育を阻害した (図)。この方法によって MRS2 の  $Mg^{2+}$  膜輸送活性と AI によるその阻害が解析可能となった。

AtMRS2-1 は、変異株の  $Mg^{2+}$  要求性を相補して低濃度の  $Mg^{2+}$  でも生育が可能となり、一方で、AtMRS2-1 を発現させた大腸菌変異株の生育は、AI によって大きく阻害されず、AtMRS2-1 は、AtMRS2-10 よりも低い  $AI^{3+}$  感受性を持つことが示された。

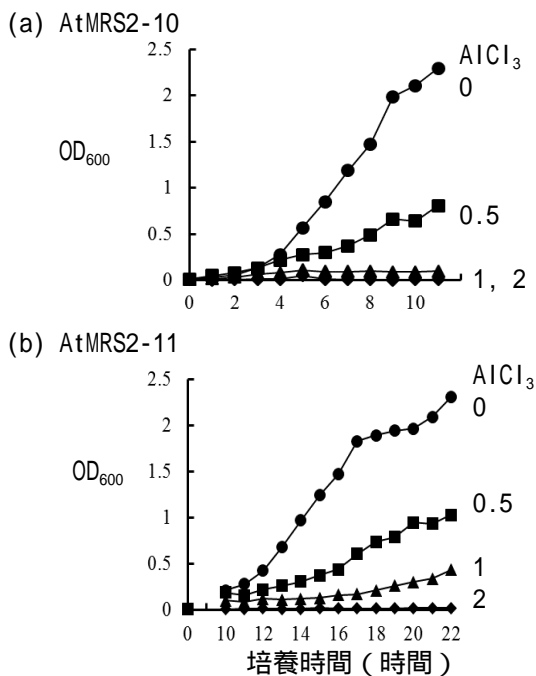


図 大腸菌 Mg<sup>2+</sup>膜輸送多重変異株による AtMRS2-10 および AtMRS2-11 の機能解析  
 大腸菌 Mg<sup>2+</sup>膜輸送多重変異株に、AtMRS2-10 (a) および AtMRS2-11 (b) を発現させ、LB 培地に、さらに 1 mM Mg<sup>2+</sup> を加え (a) もしくは Mg<sup>2+</sup> を加えず (b)、さらに、0、0.5、1、2 mM AlCl<sub>3</sub> を加えて大腸菌を培養し、菌の成長を、OD<sub>600</sub> を測定して追跡した。

### (3) シロイヌナズナ Mg<sup>2+</sup> 膜輸送ファミリータンパク質 AtMRS2 間のキメラタンパク質の作成

相同性は非常に高いものの Al 感受性が大きく異なる AtMRS2-10 と AtMRS2-1 に着目した。AtMRS2-10 と AtMRS2-1 に唯一存在する細胞外領域は、アミノ酸 2 残基のみが異なる。細胞外領域を互いに交換した細胞外領域をもつキメラタンパク質を作製し、それぞれのキメラタンパク質の Mg<sup>2+</sup>輸送能と Al<sup>3+</sup>の阻害効果を、精製したタンパク質を組み込んだリポソームおよび大腸菌 Mg<sup>2+</sup>膜輸送多重変異株を用いて解析した。その結果、AtMRS2-1 と AtMRS2-10 の Mg<sup>2+</sup>輸送に対する Al<sup>3+</sup>の効果の違いに寄与するのは細胞外領域ではない事が示された。

### (4) イネ MRS2 タンパク質の調製と Mg<sup>2+</sup>輸送活性測定

イネはシロイヌナズナに比べて、Al 耐性である。精製した OsMRS2-1 を組み込んだリポソームを用いて Mg<sup>2+</sup>の輸送と Al による阻害効果を解析した。その結果、OsMRS2-1 は Al を輸送せず、Al 耐性の Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質であることが示された。

### (5) 大腸菌 Mg<sup>2+</sup>膜輸送多重変異株によるイネ OsMRS2 タンパク質の機能解析

イネの MRS2 タンパク質 OsMRS2-1 および OsMRS2-6 を大腸菌 Mg<sup>2+</sup>膜輸送多重変異株に発現させた。OsMRS2-1 および OsMRS2-6 はともに、大腸菌変異株の Mg<sup>2+</sup>要求性を相補したが、両者の Mg<sup>2+</sup>輸送の Al<sup>3+</sup>感受性には大きな違いがあることが、示された。

補助事業期間全体を通じて、シロイヌナズナ 3 種 およびイネ 2 種類の MRS2 タンパク質の Mg<sup>2+</sup>の輸送と Al による阻害効果、および Al 輸送を解析した。その結果、MRS2 タンパク質は、植物における Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質であるが、その Al 感受性は、MRS2 タンパク質によって大きく異なることを明らかにした。今後、MRS2 タンパク質分子内の Al 感受性部位を特定することにより、世界規模で問題となっている Al による植物の生育阻害に対する分子育種に貢献できる可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ishijima, S., Uda, M., Hirata, T., Shibata, M., Kitagawa, N. and Sagami, I., Magnesium uptake of Arabidopsis transporters, AtMRS2-10 and AtMRS2-11, expressed in *Escherichia coli* mutants: Complementation and growth inhibition by aluminum, *Biochim. Biophys. Acta* 査読有, 1848, 2015, 1376-1382

DOI: 10.1016/j.bbame.2015.03.005

Yoshii, K., Tajima, F., Ishijima, S. and Sagami, I., Changes in pH and NADPH Regulate the DNA Binding Activity of Neuronal PAS Domain Protein 2, a Mammalian Circadian Transcription Factor, *Biochemistry* 査読有, 54, 2015, 250-259  
 DOI: 10.1021/bi5008518

[学会発表](計 28 件)

居田 萌 他、イネ由来 Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質 OsMRS2-1 は Al<sup>3+</sup>存在下でも Mg<sup>2+</sup>を輸送する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017

徳増慧乃 他、Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質 AtMRS2-1、AtMRS2-10 の細胞外 loop 領域がもたらす Al<sup>3+</sup>阻害効果への影響、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017

津守雄太 他、細菌の Zn<sup>2+</sup>輸送タンパク質 ZntB に構造類似のイネ由来機能未知膜タンパク質 OsZntB-like は Zn<sup>2+</sup>輸送する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017

居田 萌 他、大腸菌 Mg<sup>2+</sup>要求性変異株の生育を相補するイネ由来 Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質 OsMRS2-1 および OsMRS2-6 の Al<sup>3+</sup>による生育阻害効果、第 89 回日本生化学会大会、2016

堀田あゆみ 他、大腸菌 Mg 要求性変異株を用いた、シロイヌナズナ由来 CorA family タンパク質 AtMRS2-1 の機能解析、第 89 回日本生化学会大会、2016

徳増慧乃 他、シロイヌナズナの Mg<sup>2+</sup>輸送タンパク質 AtMRS2-10 の二価カチオン輸送能解析、第 89 回日本生化学会大会、2016

堀田あゆみ 他、シロイヌナズナの液胞膜に局在する Mg イオン輸送タンパク質 AtMRS2-1 に対する Al イオンの効果の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015

塩見里佳子 他、シロイヌナズナの葉緑体タンパク質 AtMRS2-11 の GMN 保存モチーフ変異体の Mg<sup>2+</sup>輸送能解析、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015

〔その他〕

ホームページ等

[http://www2.kpu.ac.jp/life\\_environment/cell\\_macromol\\_chem/ishijima.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environment/cell_macromol_chem/ishijima.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石蔭 純男 (ISHIJIMA SUMIO)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70184520