

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21381

研究課題名（和文）細胞内Mgイオン恒常性の維持機構と遺伝子発現を繋ぐ分子ネットワークの解明

研究課題名（英文）Study of gene regulatory network for cellular magnesium ion homeostasis.

研究代表者

伊藤 耕一（ITO, KOICHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：10262073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Mg<sup>2+</sup>は、核酸やタンパク質の機能発現から、触媒機能の実現など、極めて広範囲な細胞内プロセスに関わり、とりわけ重要な金属カチオンであり、その細胞内濃度の恒常性維持の分子機構の多くは未解明である。本研究は、大腸菌高濃度Mg<sup>2+</sup>要求株から多数の抑圧変異を分離し、NGSを活用した全ゲノム解析を実施することで、Mg<sup>2+</sup>の恒常性に関わる多数の新規因子の同定および機能ネットワークを明らかにした。これにより今まで不明だった細胞内Mg<sup>2+</sup>の恒常性に寄与する分子機構ネットワークの全体像が明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マグネシウムイオン（Mg<sup>2+</sup>）は、生命機能維持に必須となる特別な金属イオンです。生物は細胞内のMg<sup>2+</sup>を一定に保つ仕組みを備えていますが、その仕組みは未解明でした。本研究は大腸菌を用いた解析により多数の新規因子の同定に成功しました。この研究成果は生命機能に密接な役割をもつMg<sup>2+</sup>に関する原始生命の起源解明やさらにはMg<sup>2+</sup>の恒常性に関する疾患に対処する創薬戦略の基盤になることが期待できます。

研究成果の概要（英文）：Magnesium (Mg<sup>2+</sup>) is a particularly important divalent metal cation involved in a wide range of intracellular processes, from the functional expression of nucleic acids and proteins to the realization of catalytic functions. However, many of the molecular mechanisms underlying the maintenance of its intracellular concentration homeostasis remain unknown. This study identified a large number of suppressor mutants from a high-Mg<sup>2+</sup> requirement strain of *Escherichia coli* and performed whole-genome analysis using NGS, revealing a large number of novel factors involved in Mg<sup>2+</sup> homeostasis and their functional networks. This has revealed the overall picture of the molecular mechanism network that contributes to intracellular Mg<sup>2+</sup> homeostasis, which was previously unknown.

研究分野：分子生物学

キーワード：マグネシウムイオン 恒常性維持機構 細胞内ネットワーク 大腸菌遺伝学 膜輸送体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

金属カチオンは細胞の生命活動維持のために数々の重要な役割を演じている。とりわけ、マグネシウムイオン（以下、 $Mg^{2+}$ ）は細胞中に最も多く存在する 2 価金属カチオンであり、酵素タンパク質や、RNA ポリメラーゼ・リボソームなどのセントラルドグマの中心的分子装置の機能に必須である。そのため、他の金属カチオンとは異なり、細胞内での濃度変動を厳密に押さえるために高度に発達した分子ネットワークが想定されている。近年、 $Mg^{2+}$ の細胞内恒常性に関するトランスポーター膜蛋白質群について、細胞内  $Mg^{2+}$ 濃度に応じてフィードバック制御するセンサー機能構造や遺伝子発現制御機構の解明が進展した。しかしながら、細胞内の  $Mg^{2+}$ 濃度の維持は、他の金属カチオンとは異なり、細胞内のエネルギー共通通貨である ATP をはじめとする NTP（ヌクレオチド 3リン酸）濃度や総リボソーム分子数など、 $Mg^{2+}$ と強い親和性を示す「 $Mg^{2+}$ 貯蔵体」の動態とも密接に連動することが知られており、現時点では細胞内  $Mg^{2+}$ 濃度を維持する仕組みの全容解明にはほど遠い状況である

### 2. 研究の目的

申請者は、直近までの先行研究によりこれまで積極的アプローチが困難であった課題（=申請タイトル）に対して、モデル生物である大腸菌（*Escherichia coli*）での人為的  $Mg^{2+}$ 濃度制御基盤、分子遺伝学的探索ツールを確立した。本研究計画は、分子遺伝学手法と各種解析手法との連携により、【1】 $Mg^{2+}$ 濃度恒常性維持に関わる分子群の網羅的探索、【2】 $Mg^{2+}$ 濃度と各種分子装置の合成・活性制御における動態解析を実施し膠着した状況から突破口を開く。

### 3. 研究の方法

1.  $Mg^{2+}$ 恒常性維持に関わる分子群の網羅的探索：申請者が系統的に作出した大腸菌（*Escherichia coli*） $Mg^{2+}$ -要求性株（= *mgtA*, *corA*, *yhiD3* 重欠損遺伝背景株、以後 *Mg-3K0* 株）は、主要トランスポーター遺伝子（*mgtA*, *corA*）の欠損に加え、未知の制御性膜タンパク質（*yhiD*）欠損により高濃度（100mM） $Mg^{2+}$ -要求生育性を示すことが報告されている唯一のモデル生物系統株である（Hattori M et al. EMBO J. 28: 3602-3612: 遺伝学解析担当, 責任著者）。大腸菌 *YhiD* タンパク質は一定の相同性を示す異種タンパク質とは機能性の関連性が見出されず（Cell 154: 146-156 (2013)）新規な機能性をもつ膜蛋白質であることが想定される。そのため、*Mg-3K0* 株を用いたサプレッサー遺伝子探索と解析により未知の  $Mg$  恒常性維持制御因子の手がかりを与える。

*Mg-3K0* 株の  $Mg^{2+}$ 非要求性サプレッサー株における遺伝子同定。単一遺伝子座に対しては遺伝学的マッピングを行い、次世代シーケンサーによる全ゲノム DNA 解析も併用する。明らかになった、因子の細胞内発現の増減による各種プロファイル解析・評価（ $Mg^{2+}$ 取り込み、全 mRNA 発現解析、RNA ポリメラーゼやリボソームの各種基本機能）をおこなう。

2.  $Mg^{2+}$ 濃度と各種分子装置の合成・活性制御における動態解析：これまで細胞内フリー $Mg^{2+}$ 濃度は培地中  $Mg^{2+}$ 濃度の増減に対しても多重の恒常性機構に阻まれ人為的変更を行うことが困難であった。しかし、*Mg-3K0* 株に細胞内  $Mg$  濃度センサー機能の欠損した  $Mg^{2+}$ トランスポーターを発現させ、外部  $Mg^{2+}$ 濃度に依存した取り込みが実現できることが期待できる。

*MgtE*, *CorA* などの細胞質  $Mg^{2+}$ 濃度センサードメインが解明されている変異体タンパク質を *Mg-3K0* 株内で発現させ強制的に細胞内  $Mg^{2+}$ 濃度制御下での各種プロファイル解析・評価（ $Mg^{2+}$ 取り込み、全 mRNA 発現解析、RNA ポリメラーゼやリボソームの各種基本機能）を行う。網羅的遺伝子欠損株ライブラリー等も活用し、RNA ポリメラーゼやリボソームの活性変異体や制御因子の欠損株を用い、タンパク質・mRNA 発現 array パネルなどを作り  $Mg^{2+}$ 濃度と遺伝子発現ネットワークの相関性を検証する。

### 4. 研究成果

$Mg^{2+}$ 恒常性維持に関わる分子群の網羅的探索： $Mg^{2+}$ 要求性から多数のサプレッサー株を樹立するための条件・分離された株の評価アッセイ方法を確立した。中規模数の独立サプレッサー株を表現型（培地特性、 $Mg^{2+}$ 要求性、高濃度感受性等々）でクラス分けを行い、パイロット実験としてそれぞれのクラスを代表するサプレッサー株のゲノム調整を行い NGS（ショートリード）および NANOPORE（ロングリード）シーケンサーでの分析を行った。これらのデータをもとに、ゲノム変異を効率よくマッピングするための、解析パイプラインを確立した。確立した変異体分離条件下で、 $Mg^{2+}$ 要求性から独立に多数（200 系統以上）のサプレッサー株を分離し、変異体のクラス分けを行った。パイロットラウンドにて明らかになった遺伝子座・遺伝子変異について事前にサプレッサー株から PCR で増幅した当該遺伝子領域 DNA をサンガーシーケンス法で解析し、その遺伝子の変異を確認した。その他の、既知遺伝子に変異が見いだされないサプレッサー株について NGS 解析による全ゲノム配列解析を実施した。 $Mg^{2+}$ 恒常性維持に関わる分子群の網羅的探索： $Mg^{2+}$ 要求性株から 200 余りのサプレッサー株のゲノム NGS 解析を完了した。その内、特に重複して変異が検出される 因子に重点を置いた機能因子同定を進めた。

その結果、新規な機能因子カテゴリーに属する因子が Mg<sup>2+</sup>恒常性に関わることが明らかにされた。Mg<sup>2+</sup>とは異なる別の 2 価カチオン膜輸送体を始めとする細胞膜上のタンパク質 (ATP 合成系、トランスロコン、ポア形成因子) さらには、タンパク質合成系因子 (リボソーム因子、翻訳伸長因子、mRNA 分解因子等) が含まれた。野生型および、サプレッサー変異型遺伝子の発現プラスミドなどの構築を行い、当該変異が実際に抑圧の原因であることなど、また、その作用がドミナンスかレセッシブであるかなど機能推定に必要な一連の情報を解析した。

変異体が分離された遺伝子の産物は、その活性発現において、Mg<sup>2+</sup>との関連性も高いものが見いだされ、細胞の状況を検知し膜タンパク質との連携により細胞内 Mg<sup>2+</sup>恒常性を実現するためのネットワークを形成しているものと判断された。一方、ネットワークの情報を受け最終的に膜を介した Mg<sup>2+</sup>濃度調整を行うと考えられる立体構造が未知のチャネル膜タンパク質については Alpha Fold などを用いた構造予測と変異部位 の機能推定も平行して進め、構造上の変異体部位に基づく機能推定も行った。また、Mg<sup>2+</sup>応答性蛍光分子による細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度変動を検出する簡易アッセイ系を確立することで機能実証を行った。これまでに網羅解析の手法の確立を学会発表で行い、現在、個別解析を集成した論文の改訂作業を進めている。

本研究は、NGS を使った細胞内 Mg<sup>2+</sup>の恒常性維持に関与する因子の初めての網羅的な解析であり、研究成果は、バクテリアなどの単細胞生物の Mg<sup>2+</sup>の恒常性維持分子機構の解明に貢献するだけでなく、生命機能に密接な役割をもつ Mg<sup>2+</sup>に関する原始生命の起源解明や、さらには Mg<sup>2+</sup>の恒常性に関する疾患に対応するための創薬戦略の基盤になることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wang Mengqi, Zhao Yimeng, Hayashi Yoshiki, Ito Koichi, Hattori Motoyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel Mg <sup>2+</sup> binding sites in the cytoplasmic domain of the MgtE Mg <sup>2+</sup> channels revealed by X-ray crystal structures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Biochimica et Biophysica Sinica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3724/abbs.2023067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yang Xiaoyu, Kobayashi Natsuko I, Hayashi Yoshiki, Ito Koichi, Moriwaki Yoshitaka, Terada Tohru, Shimizu Kentaro, Hattori Motoyuki, Iwata Ren, Suzuki Hisashi, Nakanishi Tomoko M, Tanoi Keitaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Mutagenesis Analysis of GMN Motif in Arabidopsis thaliana Mg <sup>2+</sup> Transporter MRS2-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xiaoyu Yang, Natsuko I Kobayashi, Yoshiki Hayashi, Koichi Ito, Yoshitaka Moriwaki, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, Motoyuki Hattori, Ren Iwata, Hisashi Suzuki, Tomoko M Nakanishi, Keitaro Tanoi	4. 巻 NA
2. 論文標題 Mutagenesis Analysis of GMN Motif in Arabidopsis thaliana Mg <sup>2+</sup> Transporter MRS2-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistr	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 良樹, 遠藤 慧, 伊藤 耕一
2. 発表標題 NGSを用いた細胞内Mg 恒常性分子ネットワークを構成する新規因子の網羅的な探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------