

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580126

研究課題名（和文） 植物葉緑体のマグネシウムイオン膜輸送タンパク質の分子機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of magnesium transport proteins in plant chloroplasts

研究代表者

石 嶋 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物葉緑体タンパク質の Mg^{2+} 膜輸送機能を分子的に解析した。植物タンパク質を大腸菌で発現後、適当な界面活性剤を用いて単一なタンパク質を得た。得られたシロイヌナズナタンパク質 AtMRS2-10 を人工脂質二重層膜に組み込み、 Mg^{2+} 輸送活性を測定した。 Mg^{2+} 輸送活性の測定は、蛍光色素および原子吸光分析法を用いた。この系により、植物タンパク質の Mg^{2+} 膜輸送機能を世界ではじめて測定した。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed the Mg^{2+} transport function of plant chloroplast protein molecules in this study. Plant proteins were expressed in *Escherichia coli*, and purified using an appropriate detergent. Isolated AtMRS2-10 from *Arabidopsis thaliana* was reconstituted into liposomes, and Mg^{2+} transport activity into liposomes was assayed using a fluorescent dye and with atomic absorption spectroscopy. This system allows first measurement of Mg^{2+} transport activity of plant protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・「生物生産化学・生物有機化学」

キーワード：マグネシウムイオン、膜輸送タンパク質、葉緑体、リポソーム、シロイヌナズナ

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。この重要性を反映して、イオン輸送系タンパク質—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^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Cl^{-} 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

ムの解析がこれらのイオンに比べ非常に遅れているものが、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) である。

動物細胞における Mg^{2+} 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。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^{2+} 膜輸送システムの分子的解明は、真核細胞における Mg^{2+} 動態調節メカニズムを探る上での鍵となっていた。

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は、 Mg^{2+} によって調節されている。すなわち、葉緑体内の Mg^{2+} 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^{2+} 膜輸送システムの分子的解明は、植物の Mg^{2+} 濃度コントロールシステムの解明につながり、 Mg^{2+} 濃度のコントロールを通じて炭酸固定酵素の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ある。

Mg^{2+} 膜輸送タンパク質としては、微生物の CorA タンパク質が、分子的解析が最も進んでいる。ところが、本研究課題申請時は、CorA タンパク質一種類のみで Mg^{2+} 膜輸送タンパク質を構成し、 Mg^{2+} 膜輸送機能をもつかどうか、さえ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、植物の Mg^{2+} 膜輸送システム、特に、光合成の場となる葉緑体の Mg^{2+} 膜輸送システムに焦点を絞って、その機能および調節機構を分子的に解明することを目的とした。 Mg^{2+} は、高等植物 葉緑体での光合成反応において、クロロフィル分子の中心原子であるのみならず、光合成反応代謝酵素の葉緑体内での活性調節に中心的な役割を果たしている。本研究は、植物の炭酸固定能増強の基盤研究と位置付けられるものである。

外部刺激に応答するシグナリング物質として、 Ca^{2+} 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^{2+} は Ca^{2+} とリガンドを共有するものが多く (たとえば ATP)、 Ca^{2+} の動員に対しても Mg^{2+} の動態が鍵となる。現に、 Mg^{2+} は Ca^{2+} 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。

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は Mg^{2+} によって調節されている。本研究は、植物細胞の炭酸固定能

増強の基盤研究と位置付けられる。エネルギーおよび CO_2 増加の両面の問題から植物の炭酸固定能の増強が各方面から活発に取り組みれていたが、細胞内 Mg^{2+} 濃度の調節を通じての炭酸固定能増強の試みは未だ行われていなかった。

ヒトにおいて、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。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^{2+}/H^+ 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 CorA 相同タンパク質である。シロイヌナズナでは、CorA 相同タンパク質である AtMRS2-1 が Mg^{2+} を輸送する、あるいは Mg^{2+} 輸送を調節している可能性が示唆された。しかし、その後、AtMRS2-1 を含めて植物の Mg^{2+} 輸送タンパク質の同定、機能解析は報告されていなかった。

このような状況のなか、本研究は、世界で始めて、 Mg^{2+} 膜輸送タンパク質を単離精製し、その機能を解析することを目的とした。イオン輸送タンパク質の機能測定においては、活性測定系の確立が一つの目的となる。イオン輸送活性の測定では、たとえば ^{45}Ca のように RI を用いることが多い。ところが、放射性 ^{28}Mg は実用上使用不可能 (高価 (> \$20,000/mCi)、短半減期 (21 h)) である。そこで、本研究では、蛍光色素もしくは、原子吸光分析法を用いた Mg 輸送活性測定システムの確立をまず第一の目的とした。この系により、植物の Mg^{2+} 膜輸送タンパク質の機能解析がはじめて可能となった。最終的には、 Mg^{2+} 膜輸送タンパク質の結晶化、立体構造解析の足がかりも得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物 Mg^{2+} 輸送体タンパク質 recombinant protein の調製

Mg^{2+} 輸送体タンパク質としてその遺伝子あるいは cDNA がクローニングされ、 Mg^{2+} 輸送能が証明されているのは、原核微生物の Mg^{2+} 輸送体のみであった。しかし、原核微生物の Mg^{2+} 輸送体の研究は、分子的解析とは言い難い。大腸菌やサルモネラ菌の Mg^{2+} 輸送体欠失変異株は、生育するために、培地に高濃度の Mg^{2+} を添加することを必要とする。この欠失変異株に、 Mg^{2+} 輸送体遺伝子を導入すると、通常の Mg^{2+} 濃度の培地でも生育できるようになる。この細菌の生育を指標として、 Mg^{2+} 輸送体タンパク質の機能部位や必須ア

ミノ酸残基の解析が行われてきた。しかし Mg^{2+} 輸送体タンパク質が単離、精製されたことはなかったため、導入した遺伝子産物のみで Mg^{2+} 輸送体を構成し、機能するか、は明らかではなかった。一方、真核生物タンパク質では、「 Mg^{2+} 輸送体」候補がいくつかあげられているが、それらが実際に Mg^{2+} 輸送体として機能しているかどうかさえ明らかになっていなかった。このような状況は、 Mg^{2+} 膜輸送体タンパク質の生理的な重要性とは裏腹に、その単離精製の難しさを表わしていた。

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の Mg^{2+} 膜輸送タンパク質 CorA 相同タンパク質 cDNA を材料として、本タンパク質を大腸菌で発現し、単離精製を行った。このシロイヌナズナ CorA 相同タンパク質は、サルモネラ菌欠変異株の Mg^{2+} 要求性を相補することが報告されていた。本研究以前に、アラビノース誘導性プロモーターの下流に cDNA を組み込んだ大腸菌発現ベクターを構築したもの (pBAD ベクター)、発現量が低く、数段階の精製操作ののちに、電気泳動にてタンパク質バンドを確認することができるのみであった。本研究では、より強力な発現が期待できる pET システムを用いた (pET28)。

(2) Mg^{2+} 膜輸送タンパク質活性測定システムの構築

放射性の ^{28}Mg が実用上使用できないため、 Mg^{2+} 輸送活性測定システムの構築が本研究の鍵となった。本研究以前には、真核細胞や、葉緑体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官、細菌細胞内の遊離 Mg^{2+} 濃度変化や、Mg 含量の変化は測定されたことはあるが、*in vitro* (リポソーム)での Mg^{2+} 膜輸送活性測定の報告はなかった。Recombinant タンパク質をリポソームに組み込み、リポソーム内の遊離 Mg^{2+} 濃度もしくは Mg 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。

(3) Mg^{2+} 膜輸送タンパク質のキャラクタリゼーション

Recombinant タンパク質をリポソームに組み込み、リポソーム内の遊離 Mg^{2+} 濃度もしくは Mg 含量を測定した。微生物の相同タンパク質 CorA の先行研究を参考に、輸送活性に必須なアミノ酸残基や、特異的阻害剤の解析を行った。

(4) Mg^{2+} 要求性大腸菌 Mg^{2+} 膜輸送多重変異株の作成

大腸菌において Mg^{2+} 輸送に関与すると考えられる 4 つの遺伝子に注目し、P1 フェージ変異形質導入法を用いて、それらの多重変異株を作成した。

4. 研究成果

(1) 植物 Mg^{2+} 輸送体タンパク質 recombinant protein の調製

シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* 由来の CorA ファミリータンパク質 AtMRS2-10 を大腸菌で発現し、精製した。使用頻度の低いコドンに対する tRNA 過剰発現大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL をホストとし、TB 培地で培養することにより、従来の LB 培地で等容量培養した場合に比べ、約 2.4 倍の菌体量が得られ、約 2.5 倍の recombinant タンパク質を得ることができた。大腸菌を破碎後、界面活性剤サルコシルを用いて可溶化し、アフィニティクロマトグラフィーにより、世界で初めて、均一な植物 Mg^{2+} 膜輸送 recombinant タンパク質を得ることができた。

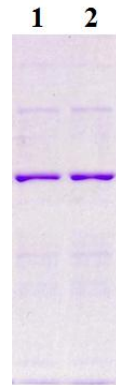


図 精製したシロイヌナズナ AtMRS2-10 recombinant タンパク質 (1) と、GMN モチーフの Met 残基を変異させた AtMRS2-10 (2) の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

(2) Mg^{2+} 膜輸送タンパク質活性測定システムの構築

得られた精製 recombinant タンパク質をリポソームに組み込み、外液に Mg^{2+} を加えて一定時間インキュベーションしたのち、リポソーム内の Mg 含量を原子吸光分析法を用いて、また、遊離 Mg^{2+} 濃度を蛍光指示薬 mag-fura-2 を用いて測定した。あらかじめ、リポソーム内外に正電荷イオンの濃度勾配をつくることにより、有意な Mg の取り込みを観測することに成功した。

(3) Mg^{2+} 膜輸送タンパク質のキャラクタリゼーション

Recombinant タンパク質は、N 末端に His タグを融合して大腸菌で発現した。リポソームに再構成した AtMRS2-10 は、N 末端に His タグを保持したままのもの、および His タグを切断したものともに Mg^{2+} 輸送活性を示した。AtMRS2-10 の Mg^{2+} 輸送活性は、微生物 CorA タンパク質の特異的阻害剤であるヘキサニコバルトによって阻害された。したが

って、シロイヌナズナ AtMRS2-10 は、細菌の CorA タンパク質と共通の性質をもつことが示された。また、リポソーム外液に Mg^{2+} と Co^{2+} を共存させたとき、リポソーム内への Mg^{2+} 輸送量は大きく減少し、AtMRS2-10 は、 Mg^{2+} とともに Co^{2+} を輸送する可能性が示唆された。CorA ファミリータンパク質に保存されている GMN モチーフの Met 残基を変異させた AtMRS2-10 は、活性を失うことが示され、AtMRS2-10 における GMN モチーフの Met 残基の重要性が示された。

(4) Mg^{2+} 要求性大腸菌 Mg^{2+} 膜輸送多重変異株の作成

大腸菌において Mg^{2+} 輸送に関与すると考えられる 4 つの遺伝子に注目し、それらの二重変異株を作成した。*corA*、*mgtA* 遺伝子を欠失させた二重変異株は、 Mg^{2+} 要求性を示した。この変異株の生育には、外液に 10 mM Mg^{2+} が必要であり、CorA、MgtA の 2 種類のタンパク質が、大腸菌では主要な Mg^{2+} 輸送タンパク質としてはたらいっていることが示された。

本研究期間に前後して、 Mg^{2+} 輸送タンパク質としてははじめて、好熱菌 *Thermotoga maritima* の CorA タンパク質の結晶解析立体構造が発表され (2006 年)、次いで、同じく *T. maritima* CorA タンパク質のリポソームを用いた分子機能解析結果が発表された (2008 年)。しかし、真核細胞、ましてや、植物の Mg^{2+} 輸送タンパク質の分子機能については、これまでその解析結果の報告はなく、本研究がその先鞭となるものである。本研究の結果によれば、シロイヌナズナ AtMRS2-10 Mg^{2+} 輸送タンパク質は、微生物 CorA タンパク質と類似の性質をもつ、と考えられる。シロイヌナズナは、AtMRS2-10 以外にも、合計 10 種類の CorA ファミリータンパク質をもっている。今後は、分子機能解析の対象に他の CorA ファミリータンパク質も加え、植物 (シロイヌナズナ) における Mg^{2+} 輸送系と Mg^{2+} ホメオスタシスの調節機構を明らかにしていく計画である。

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 1 件)

Ishijima, S., Takashima, T., Ikemura, T. and Izutani, Y., Gymnemic acid interacts with mammalian glycerol-3-phosphate dehydrogenase, 査読有, *Mol. Cell. Biochem.* 310 (2008) 203-208

[学会発表] (計 12 件)

① 重見善平、石嶋純男、佐上郁子、CorA

family タンパク質 *Arabidopsis thaliana* MRS2-10 の Mg^{2+} 輸送機能と GMN モチーフ Met 残基の重要性、日本生物高分子学会 2009 年度大会、平成 21 年 11 月 20 日、広島大学理学部

② 重見善平、石嶋純男、佐上郁子、シロイヌナズナの CorA family タンパク質 AtMRS2-10 の Mg^{2+} 輸送活性における GMN モチーフ Met 残基の重要性、第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年 10 月 24 日、神戸ポートアイランド

③ 石嶋純男、重見善平、岸 優、足立 紘朗、佐上郁子、Reconstituted AtMRS2-10, a member of CorA family from *Arabidopsis thaliana*, mediates Mg^{2+} flux, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、平成 20 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

④ 重見善平、石嶋純男、岸 優、足立 紘朗、佐上郁子、植物の Mg^{2+} 輸送タンパク質 AtMRS2-10 の輸送能解析、日本生物高分子学会 2008 年度大会、平成 20 年 11 月 15 日、京都学園大学

⑤ 柴田真喜子、佐上郁子、石嶋純男、大腸菌の Mg^{2+} 輸送システム- Mg^{2+} 要求性変異株の取得-、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、平成 19 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

⑥ 柴田真喜子、佐上郁子、石嶋純男、 Mg^{2+} 要求性変異株の取得-動植物の Mg^{2+} 輸送システムの解明を目指して-、日本生物高分子学会 2007 年度大会、平成 19 年 10 月 19 日、海峡メッセ下関国際貿易ビル

[その他]

ホームページ

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/cell_macromol_chem/ishijima.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石嶋 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：