

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580123

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チャネルファミリータンパク質の分子機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of magnesium channel family 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）：シロイヌナズナの Mg^{2+} 膜輸送を担うと考えられるタンパク質 AtMRS2-1、10 および 11 を大腸菌で発現し、界面活性剤を用いて単一に精製し、人工脂質二重層膜に組込んだ。リポソームに再構成した AtMRS2-10 は、 Mg^{2+} をリポソーム内に輸送し、その輸送は、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Al^{3+} によって阻害された。AtMRS2-1 および 11 による Mg^{2+} 輸送も、リポソーム再構成系で、世界ではじめて観察された。

研究成果の概要（英文）：*Arabidopsis thaliana* AtMRS2-1, 10 and 11 proteins may play a role in Mg^{2+} transport. These proteins were expressed in *Escherichia coli*, purified using an appropriate detergent, and reconstituted into liposomes. The reconstituted AtMRS2-10 transported Mg^{2+} into liposomes, and its Mg^{2+} transport was inhibited by Co^{2+} , Ni^{2+} and Al^{3+} . The Mg^{2+} transport through AtMRS2-1 and 11 was also observed with the reconstituted proteoliposomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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^{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^{2+}) であった。

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。我々は、単一細胞レベルで細胞内の Mg^{2+} 濃度を測定し、増殖刺激により Mg^{2+} 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^{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。

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。実際、我々は、細胞内 Mg^{2+} 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^{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^{2+} 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。本研究は、この植物 MRS2 ファミリータンパク質 cDNA を大腸菌で発現させ、精製したタンパク質をリポソームに組込んだプロテオリポソームを用いて、本 Mg^{2+} 膜輸送ファミリータンパク質の Mg^{2+} 輸送能およびその調節能を測定しようとしたものである。

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^{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 MRS2 タンパク質である。シロイヌナズナでは、MRS2 タンパク質の一員である AtMRS2-1、10 および 11 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ている。しかし、AtMRS2 ファミリータンパク質を含めて植物の Mg^{2+} 輸送タンパク質の機能解析は報告されていなかった。

Mg^{2+} 膜輸送タンパク質として、分子的解析が最も進んでいるのが、微生物の CorA タンパク質である。サルモネラでは、変異株の金属イオン要求性の解析から、 Mg^{2+} 膜輸送機能タンパク質の遺伝子座として、*corA*、*mgtA*、*mgtB* が同定されている。Maguire らのグループは *corA⁻*、*mgtA⁻*、*mgtB⁻* 三重変異株 (生育には、培地に高濃度の Mg^{2+} を添加する必要がある) に外来遺伝子を導入する手法を用いて、CorA タンパク質の機能解析を行ってきた。このような状況のなか、好熱菌 CorA タンパク質の立体構造が 2006 年 Nature 誌に報告され、さらに、リポソームを用いた活性解析が報告された。しかし、基本的には、変異株に外来遺伝子を導入し、培地に添加する Mg^{2+} の菌の生育に及ぼす影響を指標として Mg^{2+} 膜輸送タンパク質の機能を解析する手法が用いられてきた。したがって、MRS2 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

本研究は、世界で始めて、植物の Mg^{2+} 膜輸送タンパク質を単離精製し、その機能を解析しよう、とした。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 (約 \$ 10,000/10 MBq)、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て Mg 輸送活性を測定することとした。シロイヌナズナにおいて、Mg²⁺ を輸送する可能性が示唆されていた AtMRS2-1、10 および 11 の cDNA を発現後、タンパク質を適当な界面活性剤を用いて可溶化し、単離精製した。得られたタンパク質をリポソームに組み込み、Mg²⁺ 輸送活性を測定した。

3. 研究の方法

(1) 植物 Mg²⁺ 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 Mg²⁺ 膜輸送 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、単離精製した。このシロイヌナズナ CorA 相同タンパク質は、サルモネラ欠失変異株の Mg²⁺ 要求性を相補することが報告されていた。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) Mg²⁺ 膜輸送活性測定

Recombinant タンパク質を組み込んだリポソーム外液に Mg²⁺ を加え、リポソーム内の遊離 Mg²⁺ 濃度もしくは Mg 含量を測定した。遊離 Mg²⁺ 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、Mg²⁺ 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 Mg²⁺ 濃度変化を蛍光分光光度計によって測定した。

(3) Mg²⁺ 膜輸送タンパク質のキャラクタリゼーション

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、共存する金属イオンの Mg²⁺ 膜輸送に対する効果の解析を行った。

(4) Mg²⁺ 要求性大腸菌 Mg²⁺ 膜輸送多重変異株の作成

大腸菌において Mg²⁺ 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) AtMRS2-10 のリポソームへの再構成と Mg²⁺ 輸送活性測定

① シロイヌナズナ AtMRS2-10 をほぼ均一に精製し、リポソームへ再構成した。リポソーム外液に加えたプロテアーゼに対する感受性から、組み込まれた AtMRS2-10 の大部分は、

リポソーム内部にあり、配向性はほぼ均一である、と判断された。

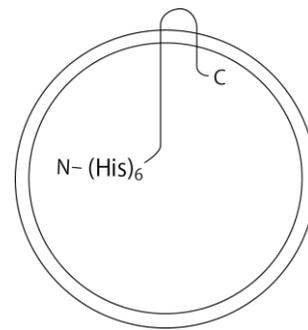


図 1 AtMRS2-10 のリポソームへの配向性

② AtMRS2-10 によって輸送されたリポソーム内の Mg²⁺ 量を原子吸光法によって測定した。外液に加えた Mg²⁺ 濃度に依存した Mg²⁺ 輸送が観察された。

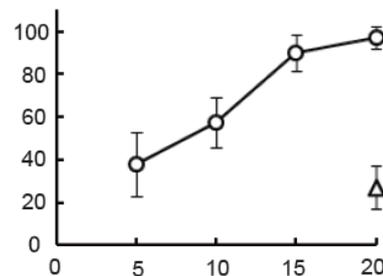


図 2 AtMRS2-10 によるリポソーム内への Mg²⁺ 輸送 (○)。△は、AtMRS2-10 を組み込んでいないリポソームを表す。縦軸は、リポソーム内 Mg²⁺ 量 (最高値に対する%)、横軸は、外液に加えた Mg²⁺ 濃度 (mM) を表す。

③ 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 Ile 残基に変異させた AtMRS2-10 は、Mg²⁺ 輸送活性をほぼ失うことが示され、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 AtMRS2-10 によるリポソーム内への Mg²⁺ の取り込みは、pH 5-9 の範囲では外液の pH に依存しなかった。Mg²⁺ の取り込みは、外液の Co²⁺、Ni²⁺、Al³⁺ によって阻害され、AtMRS2-10 は、これらの金属イオンを輸送する可能性が示唆された。

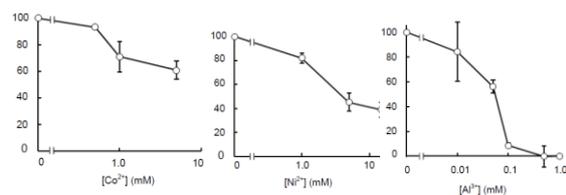


図 3 Co²⁺ (左)、Ni²⁺ (中)、Al³⁺ (右) による AtMRS2-10 の Mg²⁺ 輸送阻害。縦軸は、Mg²⁺ 輸送活性 (%) を表す。

⑤ リポソーム内の Mg^{2+} 濃度変化を、蛍光指示薬 mag-fura-2 を用いて測定した。上記とほぼ同様な結果が得られ、AtMRS2-10 は、外液 Mg^{2+} 濃度に依存してリポソーム内に Mg^{2+} を取り込んだ。輸送反応は、外液に Mg^{2+} を添加後 20 秒以内に停止したが、さらに Mg^{2+} を加えると再び輸送反応が起こり、プロテオリポソーム内部の Mg^{2+} 濃度は、外液に Mg^{2+} を添加する毎に、階段状に上昇した。一方、 Co^{2+} の輸送が観察され、AtMRS2-10 は、比較的幅広い陽イオン輸送タンパク質である可能性が示された。

以上、AtMRS2-10 をリポソームに再構成し、その Mg^{2+} 輸送活性を測定することに、植物の Mg^{2+} 膜輸送タンパク質として、世界で始めて成功した。

(2) AtMRS2-1 および 11 のリポソームへの再構成と Mg^{2+} 輸送活性測定

シロイヌナズナの CorA ファミリータンパク質であり、AtMRS2-10 と相同性が高い (89%) AtMRS2-1、および、AtMRS2-10 と相同性が低く (19%) 葉緑体に局在する AtMRS2-11 を、それぞれ大腸菌で発現、精製し、 Mg^{2+} 輸送活性を mag-fura-2 を用いて測定した。共に、単独でリポソーム内部に Mg^{2+} を輸送することが示された。 Mg^{2+} 輸送反応は、相同性が低い AtMRS2-11 であっても、AtMRS2-10 と同様な時間経過を示し、外液に Mg^{2+} を添加後、輸送反応はいったん停止し、 Mg^{2+} を添加すると再び Mg^{2+} 輸送が観察された。 Mg^{2+} 添加前に、リポソームの外液中に Co^{2+} あるいは Al^{3+} をあらかじめ添加しておくこと、リポソーム内部への Mg^{2+} 輸送は阻害され、AtMRS2 ファミリータンパク質は、これらの金属イオンを輸送する可能性が示唆された。

(3) Mg^{2+} 要求性を示す大腸菌 Mg^{2+} 膜輸送タンパク質遺伝子多重変異株の作成

corA、*mgta*、*yhiD* の三つの遺伝子を欠失させた Mg^{2+} 要求性を示す大腸菌多重変異株を作成した。この変異株の生育には、外液に 100 mM Mg^{2+} が必要であり、今後、この三重変異大腸菌株は、植物の Mg^{2+} 膜輸送タンパク質を発現させることにより、膜輸送活性解析ツールとして活用することが期待できる。

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 2 件)

- ① Ishijima, S., Shigemi, Z., Adachi, H., Makinouchi, N., Sagami, I., Functional reconstitution and characterization of the Arabidopsis Mg^{2+} transporter AtMRS2-10 in proteoliposomes, *Biochim.*

Biophys. Acta, 査読有, 1818, 2012, 2202-2208

DOI: 10.1016/j.bbame.2012.04.015

- ② Sanae, R., Kurokawa, F., Oda, M., Ishijima, S., Sagami, I., Thermodynamic Analysis of Interactions between Cofactor and Neuronal Nitric Oxide Synthase, *Biochemistry*, 査読有, 50, 2011, 1714-1722
DOI: 10.1021/bi101575u

[学会発表] (計 24 件)

- ① 真鍋佑里、シロイヌナズナ由来 CorA family タンパク質 AtMRS2-1 の二価カチオン輸送能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場
- ② 池田尚美、シロイヌナズナ由来 CorA family 葉緑体タンパク質 AtMRS2-11 の二価カチオン輸送能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場
- ③ 牧野内奈那、シロイヌナズナのマグネシウム輸送タンパク質 AtMRS2-10 の蛍光測定法を用いたマグネシウム輸送能解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都国際会館
- ④ 牧野内奈那、シロイヌナズナのマグネシウム輸送タンパク質 AtMRS2-10 の蛍光測定法による二価カチオン輸送能の解析、日本生物高分子学会 2011 年度大会、2011 年 9 月 16 日、金沢工業大学扇が丘キャンパス
- ⑤ 重見善平、リポソーム再構成系によるシロイヌナズナの CorA family タンパク質 AtMRS2-10 の Mg^{2+} 輸送能解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- ⑥ 平田智大、 Mg^{2+} 要求性変異株の取得による大腸菌 Mg^{2+} 輸送系の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石寫 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

(3) 連携研究者