

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

マグネシウムトランスポーターによる
細胞内マグネシウムバランス調節機構

濡 木 理, 服 部 素 之, 石 谷 隆 一 郎

マグネシウムイオン (Mg^{2+}) は、細胞内において最も豊富に存在する二価陽イオンであり、酵素活性、リボソームや生体膜、ゲノムの安定化など、極めて多様な生理的役割を担っている。我々は、細胞外から内へのマグネシウムの取り込みを担う輸送体 MgtE の Mg^{2+} 存在下における立体構造を X 線結晶構造解析により 3.5 Å 分解能で決定した。その結果、輸送体 MgtE の膜貫通ドメイン中に、 Mg^{2+} を透過させるための「イオン透過孔」が生体膜を横切る形で存在していることが明らかになった。この「イオン透過孔」には、輸送途中にあると考えられる Mg^{2+} 様の電子密度が観測された。また、 Mg^{2+} 過剰条件下における MgtE の構造では、5 番目の膜貫通ヘリックスによって Mg^{2+} の透過孔がふさがれていることが分かった。さらに、各ドメインの境界には、多くの酸性アミノ酸残基が存在し、多くの Mg^{2+} がこれに結合して電荷を中和していることが判明した。さらに我々は、MgtE の構造中で「 Mg^{2+} センサー」として機能すると考えられる細胞質ドメインについて、 Mg^{2+} 過剰条件下、欠乏条件下それぞれにおける立体構造の決定を行った。その結果、 Mg^{2+} 欠乏条件下の細胞質ドメインの構造では大きな構造変化がみられた。この構造変化が MgtE の膜貫通ドメインの構造変化を誘起し、イオン透過孔を開閉して Mg^{2+} 透過を制御すると推測される。さらに Mg^{2+} に依存した細胞質ドメインの構造変化を計算機内で再現することに成功し、その結果これまで明確でなかった N 末端ドメインのクランプとしての働きが明らかになった。したがって、MgtE の細胞質ドメインがセンサーとして生体内のマグネシウムの濃度を感知することで、 Mg^{2+} が過剰な時には輸送体による Mg^{2+} 取り込みを阻害し、欠乏している場合には輸送体による Mg^{2+} 取り込みを促進させるという、 Mg^{2+} バランス維持のメカニズムが示唆された。

1. はじめに—金属イオン輸送体—

生命を恒常的に維持するために、 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} など必須の金属イオンの細胞内濃度は一定に保

東京大学医科学研究所基礎医学部門 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

Mechanism of cellular magnesium balance regulation by a magnesium transporter

Osamu Nureki, Motoyuki Hattori and Ryuichiro Ishitani
(Department of Basic Medical Sciences, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan)

たれている。そのために、細胞は、これらの金属イオンの周囲環境からの取り込みおよび排出を厳密に制御している。これらの機能は、生体膜に埋め込まれ高度に機能制御された、チャンネルやトランスポーターと呼ばれる輸送体タンパク質によって担われている¹⁾。トランスポーターには、輸送基質の化学ポテンシャルに沿って受動輸送するものと、輸送基質以外の物質の化学ポテンシャルを利用して能動輸送するものがある。能動輸送するトランスポーターには、ATP の加水分解のエネルギーを利用する primary ATPase と H^+ , Na^+ , K^+ などの濃度勾配 (化学ポテンシャル $\Delta\psi$) を利用してこれと共役輸送する secondary active trans-

porterがある。このように輸送のメカニズムはトランスポーターごとに異なっているが、基質を特異的に認識しその輸送が厳密に制御されている点が共通している。輸送体タンパク質は、原核生物および真核生物のゲノムにコードされる全タンパク質の10%にも上る。その生物学的重要性にも関わらず、輸送体タンパク質を含む膜タンパク質は、試料調製などの問題から、一般的に立体構造決定は困難とされ、輸送体タンパク質による輸送メカニズムの詳細な理解は、長年、限られた状況にあった。90年代後半から、ゲノムプロジェクトの進展やシンクロトロン放射光および解析用ソフトウェアの進歩等により、構造決定されたタンパク質の数は指数関数的に増加し、従来非常に困難とされてきた膜タンパク質の立体構造決定も増加傾向にある。そのような状況下においても、今なお、金属イオン輸送体の立体構造解析例は少なく、金属イオンの生理的機能の重要性と比べ、その輸送メカニズムの詳細な理解は限られている。

例えばカリウムチャンネルは、原子半径のより大きな K^+ (1.51Å)を選択的に輸送し、同族のアルカリ金属で原子半径のより小さな Na^+ (1.16Å)は通さない。この選択的輸送のメカニズムは長い間謎であった。2001年MacKinnonらは、カリウムチャンネルKcsAの結晶構造を2.0Å分解能で決定した結果²⁾、 K^+ の8個の水和水のうち、4個が脱水和し、代わりにKcsAのイオン透過孔内に露出したカルボニル酸素によって配位されていた。すなわち、このイオン選択性フィルターによって、特異的な輸送基質である K^+ は脱水和し、透過孔を選択的に輸送されるわけである。 Na^+ ではイオン半径が小さく、このイオン選択性フィルターにはまらないため、脱水和が起きず、透過孔を通ることができないと考えられる。本業績により、2003年MacKinnonはノーベル化学賞を受賞している。

2. MgtE トランスポーター

Mg^{2+} は、細胞内において最も豊富に存在する二価陽イオンの一つであり、極めて多様な生理的役割を担っている。ルイス酸として様々な酵素の活性に必要とされるだけでなく、リボソームや生体膜、ゲノムの安定化にも必須である。ヒトにおいて、 Mg^{2+} の欠乏は虚血性疾患へとつながることが知られている。 Mg^{2+} は、脱水和された状態でのイオン半径は0.72Åと生体内の陽イオンの中で最小であるにもかかわらず、水和半径は5.3Åと生体内陽イオンの中で最大であるという特徴を持つ。同族のアルカリ土類金属である Ca^{2+} では、イオン半径は1.12Å、水和半径は2.9Åである。このように Mg^{2+} は、水との親和性が高く安定な水和物を形成するため、特にATPの加水分解を伴う化学反応を触媒する酵素(ポリメラーゼ、キナーゼ、Gタンパク質など)ではコファクターとして用いられている。

このような特徴を持つ Mg^{2+} を、マグネシウム輸送体はどのような水合状態で特異的に認識し、輸送しているのかは未だ明らかでない³⁾。

マグネシウム輸送体には、主に真正細菌に広く保存されたMgtA/B、真核細胞にのみ存在するTRPM6/7とともに、真正細菌から哺乳類にまで広く保存されマグネシウムの取り込みに働くMgtEおよびCorAがある³⁾。MgtAおよびMgtBは、輸送サイクルの各ステージの結晶構造が報告されている筋小胞体カルシウムポンプ⁴⁻⁶⁾と同様に、P型ATPaseスーパーファミリーに属するマグネシウム輸送体である。また、CorAに関しては、最近になって複数のグループが五量体を形成するCorAの結晶構造を発表した⁷⁻⁹⁾。CorA五量体は漏斗型をしており、大きな細胞質ドメインに Mg^{2+} が結合することにより、その構造変化が長い膜貫通ヘリックスである「ストークスヘリックス」を介して、イオン透過孔を開閉することが推測されており、 Mg^{2+} チャンネルであると考えられている。

一方、米国のMichael E. Maguireは、CorAおよびMgtA/Bの遺伝子を欠損させた*Salmonella typhimurium* MM281株(100 mM $MgCl_2$ を培地に加えないと増殖しない)を相補する*Bacillus firmus* OF4由来の遺伝子断片から、MgtE遺伝子を最初にクローニングし、⁵⁷Co²⁺の取り込みと二価陽イオンによる阻害実験から、MgtEを新規のマグネシウムトランスポーターとして同定した¹⁰⁾。MgtEは、N端側に100-250アミノ酸残基からなる細胞質ドメインを持ち、C端側に5回膜貫通ドメインを持つ。N端側の細胞質ドメインは、シスタチオニンβシンターゼ(CBS)ドメインを含んでおり、同ドメインは、ヒトのCl⁻チャンネルや浸透圧感受性ABCトランスポーターであるOpuAなどで輸送制御に働くことが知られている構造モチーフである。また、MgtEのヒトホモログであるSLC41A1, A2は、最近、 Mg^{2+} の取り込みに働いており、マグネシウムホメオスタシスに機能していることが報告されている¹¹⁾。さらに最近、マグネシウム感受性のリボスイッチによって、MgtE遺伝子の発現制御が行われていることが明らかになった¹²⁾。しかし、MgtEがどのような機構で Mg^{2+} を特異的に認識し、どのような駆動力で Mg^{2+} を輸送しているのか、またその輸送が Mg^{2+} によってどのように制御されているのかは、全くわかっていなかった。本稿では、最近の我々のMgtEのX線結晶構造解析および計算機シミュレーションの結果と、そこから示唆された Mg^{2+} 認識機構、輸送調節機構について述べる。

3. MgtE の立体構造とイオン透過孔

我々は、高度好熱菌由来MgtEの Mg^{2+} 存在下における立体構造をX線結晶構造解析により3.5Å分解能で決定した(図1)¹³⁾。MgtEのN端側半分は細胞質ドメインであり、

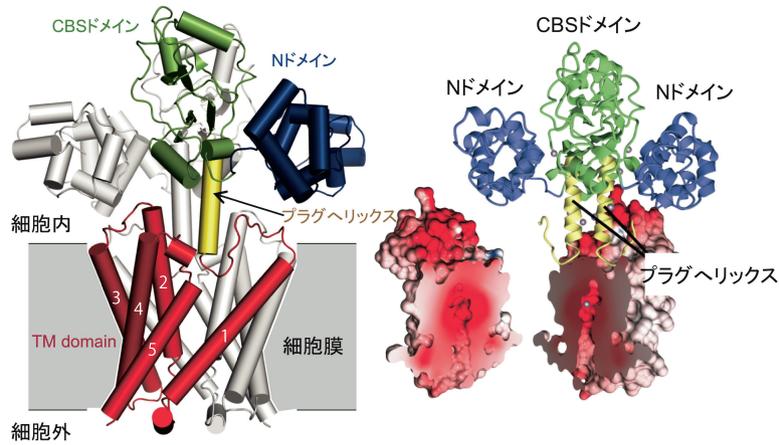


図1 MgtE マグネシウム輸送体の結晶構造

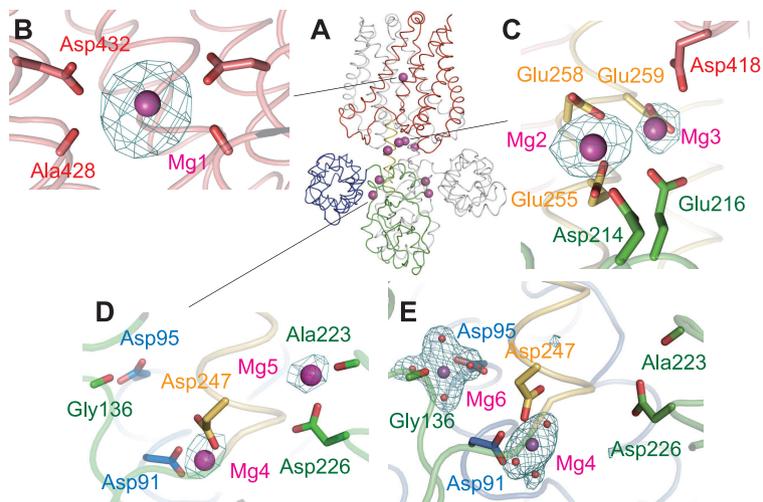


図2 MgtEの結晶構造に見られたマグネシウムイオン全体図 (A). (B) 輸送過程にあると考えられる Mg1. (C), (D) MgtEの輸送制御に働くと考えられる結合 Mg²⁺. (E) 細胞質ドメインの高分解能結晶構造に見られる結合 Mg²⁺.

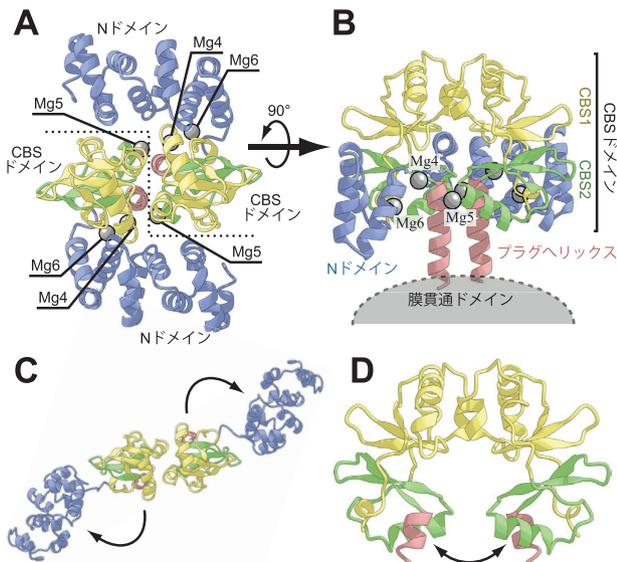


図3 MgtEの細胞質ドメインのマグネシウムイオン依存的な構造変化

MgtEの細胞質ドメインに結合している輸送制御に働くと考えられるマグネシウムイオン (A, B). (C, D) Mg²⁺依存的なMgtE細胞質ドメインの構造変化.

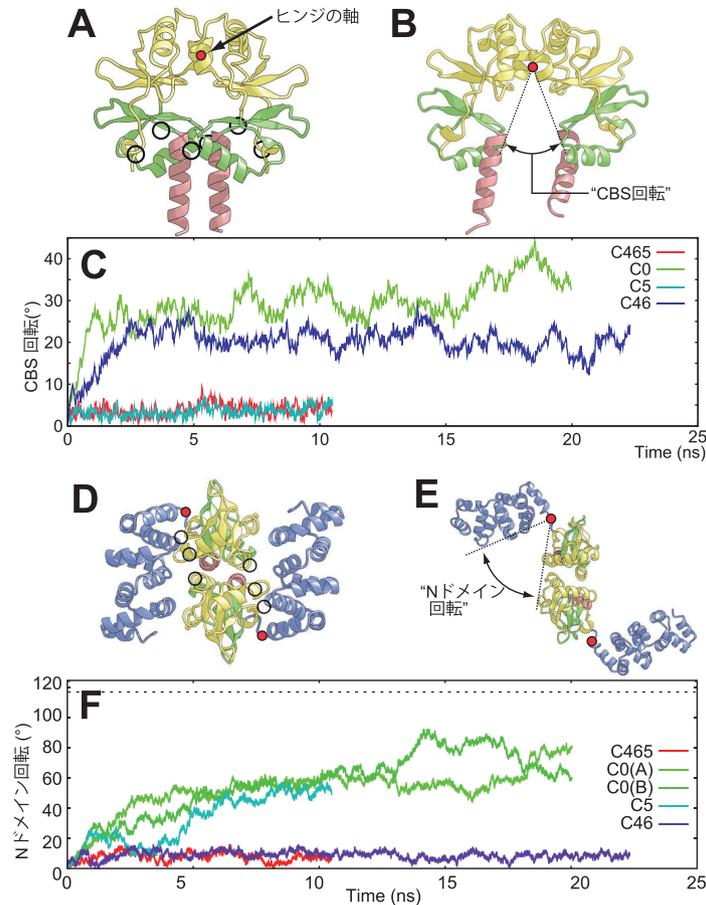


図4 閉構造から開構造への分子動力学シミュレーション
(A-C) CBS ドメイン二量体の構造変化。(D-F) N ドメインと CBS
ドメインの間の構造変化。

N 末端のスーパーヘリカル構造を持つ N ドメインと、二つ連続した CBS ドメインから構成されていた。C 端側半分は、TM1~TM5 の 5 本の膜貫通ヘリックスからなる膜貫通 (TM) ドメインであった。5 本の膜貫通ヘリックスは新規の膜トポロジーを呈していた。そして、細胞質ドメインと膜貫通ドメインは、“プラグヘリックス”と命名した長い α ヘリックスで連結されていた。MgtE は二量体を形成しており、細胞質ドメインも膜貫通ドメインもそれぞれ相手のサブユニットと結合し、二量体化に寄与していた。2 本の“プラグヘリックス”は、お互いに平行に並び、膜表面に直交していた。

MgtE には、ペリプラズム側に開いた、溶媒接触が可能な孔が開いていた (図 1)。この孔は、主に TM2 と TM5 の 2 本の膜貫通ヘリックスから構成されており、直径約 6 Å、長さ約 30 Å であった。この孔の中には、球状の強い電子密度が観察され (図 2B)、我々は、これが輸送過程の Mg^{2+} に相当すると推測した。したがって、この孔はイオン透過孔であると考えられる。この Mg^{2+} は、イオン透過孔の表面から突き出した二つの Asp432 の側鎖カルボキシ

ル基と Ala428 の主鎖カルボニル基によって配位されていた (図 2B)。過去に、金属に配位している第 1 層の水を脱水する際の速度定数が分光学的に計測されており、それによると、 Mg^{2+} や Co^{2+} の第 1 層の水の脱水速度は、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} に比べて 10^3 倍も遅い。すなわち、 Mg^{2+} や Co^{2+} は水との親和性が極めて高く、通常安定な全配位型で存在していると考えられる。このことから、我々は、MgtE においても Mg^{2+} は $Mg(OH)_6^{2+}$ として輸送されており、上記の部位がカリウムチャンネルで見出された、金属イオンの識別を行う、イオン選択性フィルターではないかと考えている。しかし、現段階の分解能 (3.5 Å) では、 Mg^{2+} の水和様式も明らかでなく結論が出せないため、現在さらに高分解能での MgtE 全長の構造解析を推進している。

このイオン透過孔は、ペリプラズム側には開いているが、途中で閉じており、膜を貫通していない。その原因は、2 本の TM5 が交わるように配置して孔を塞いだ状態にしているためであり、その TM5 の配置は、“プラグヘリックス”が van der Waals 相互作用などで固定しているためであると考えられる (図 1)。したがって、 Mg^{2+} 存在

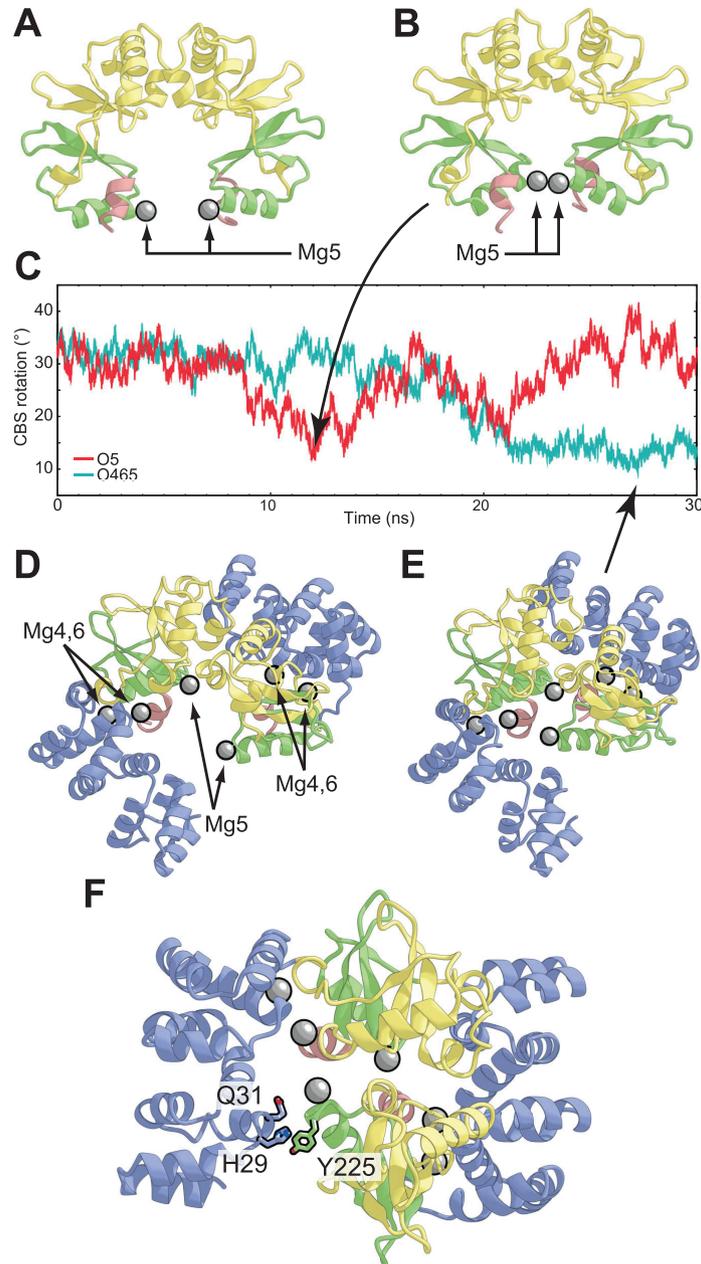


図5 開構造から閉構造への分子動力学シミュレーション
 (A, B) CBS ドメイン二量体のみを用いたシミュレーション. シミュレーションの結果 (C). (D, E) 細胞質ドメイン全体を用いたシミュレーション. (F) 閉構造における N ドメインと CBS ドメインの相互作用.

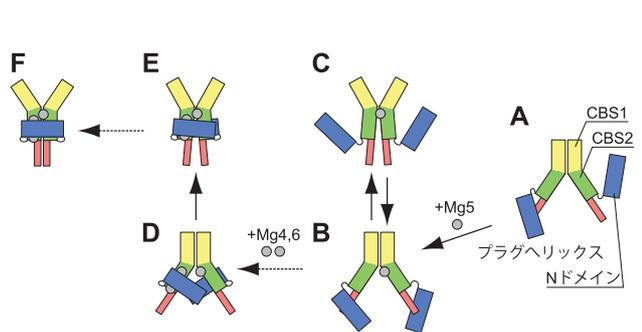


図6 マグネシウム結合による MgtE 細胞質ドメインの段階的な構造変化 (開構造→閉構造)

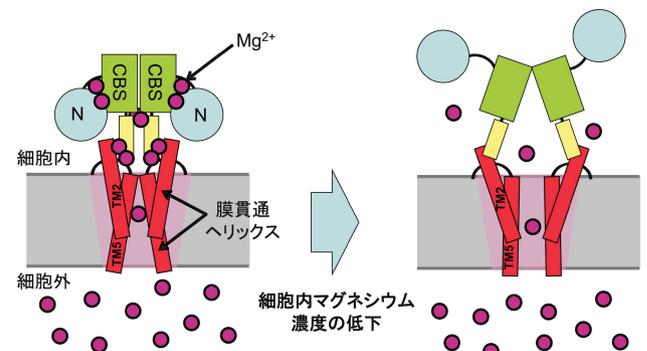


図7 MgtE によるマグネシウムホメオスタシス機構

下では、イオン透過孔は閉状態にあると考えられる。

4. MgtEのドメイン配置を安定化する Mg²⁺

MgtEの結晶構造では、イオン透過孔内の Mg²⁺を除いて、一量体あたり四つの強い電子密度が観測され、これらは Mg²⁺であると考えられる(図2, 図3)。Mg2とMg3は、“プラグヘリックス”から伸びるGlu255, Glu258, Glu259, TMドメインのL4ループから伸びるAsp418, CBSドメインから伸びるAsp214, Glu216によって配位されていた(図2C)。換言するなら、Mg2とMg3は、“プラグヘリックス”, TMドメイン, CBSドメインの相対的な配置を固定していると考えられる。また、Mg4とMg5は、“プラグヘリックス”から伸びるAsp247, CBSドメインから伸びるAsp226とAla223のカルボニル酸素, Nドメインから伸びるAsp91によって配位されており(図2D)、“プラグヘリックス”, CBSドメイン, Nドメインの相対配置を固定していると考えられる。さらに高分解能で構造決定を行った細胞質ドメインでは、Mg²⁺の六つの水と水のうち、いくつかがカルボキシル基やカルボニル酸素に取って代わられた様子も明らかになった(図2E)。一方、MgtEの表面電荷を計算してみると、ドメインの境界に負電荷が集中しており、八つのMg²⁺は、これらドメイン境界に結合して、その負電荷を中和していると考えられる。したがって、Mg²⁺が外れた場合、各ドメインは負電荷の反発により、お互いに離れ、MgtEは開いた構造をとると考えられる。

そこで、我々は、細胞質ドメインのMg²⁺存在、非存在下での結晶構造を解析した。驚くべきことに、Mg²⁺非存在下では、Mg²⁺存在下に比べて大きな構造変化があった¹³⁾。まず、N末端ドメインがCBSドメインから離れ、120°も回転していた(図3C)。さらに、二量化していたCBSドメイン同士は離れ、それに伴って“プラグヘリックス”はそれぞれ20°回転して開いていた(図3D)。結晶中で“プラグヘリックス”には分子間接触は見られず、この回転は本質的なものであると考えられる。したがって、Mg²⁺が外れることで、N末端ドメイン, CBSドメイン, “プラグヘリックス”は負電荷の反発により、お互いに離れ、開いた構造をとることがわかった。

5. 分子動力学シミュレーションによる 開閉構造変化の再現と新たな知見

MgtEの細胞質ドメインに関し、水溶液中でも(結晶構造と同様に)マグネシウム濃度依存的な構造変化を起こすかどうかを検証するために、分子動力学(MD)シミュレーションを行った¹⁴⁾。まず、マグネシウム存在下の閉構造から出発し、マグネシウムを結合させたままの状態からスタートし、10nsのMDシミュレーションを行ったところ、

構造は安定なままであった(図4C, FのC465)。次に、閉構造において、マグネシウムを取り除いて同様のMDシミュレーションを行った。その際、二つのCBSドメイン間に結合しているMg5を残してMg4, Mg6を除いた場合(C5), NドメインとCBSドメインの間に結合しているMg4, Mg6を残してMg5のみ除いた場合(C46), Mg4, Mg5, Mg6すべて除いた場合(C0)それぞれに関して、MD解析を行った。その結果、C46およびC0ではCBSドメインは開き、2本の“プラグヘリックス”はそれぞれ約20°回転していた(図4C, 図4B)。これはマグネシウム非存在下での結晶構造と極めてよく一致していた(図3D)。これに対し、C5およびC0では、20ナノ秒の間にN末端ドメインはCBSドメインから離れてしまった(図4F)。しかし、図3Cに示された結晶構造のように120°は回転していなかった(図4E)。N末端ドメインは、結晶内では隣の分子と接触していたため、実質的にはMg²⁺が外れることでN末端ドメインは固定がはずれ、自由に運動できると考えられる。以上のことから、マグネシウムが外れることで、MgtEの細胞質ドメインは開構造をとること、さらに、CBSドメイン同士を結合させているMg5の効果とNドメインとCBSドメインをつなぎ合わせているMg4, Mg6の効果はお互いに独立であることが示唆された。

次に、マグネシウム非存在下の開構造から出発し、マグネシウムを結合させてMDシミュレーションを行い、開構造から閉構造に戻るかどうかを検証した。その際、CBSドメイン二量体のみにはMg5を与えた場合(図5A)とNドメインも含めた細胞質ドメイン全体にMg4, Mg5, Mg6を結合させた場合(図5D, 図5CのO465)に関して、解析を行った。その結果、大変興味深いことに、CBSドメイン二量体のみでは開構造と閉構造の間を振動し、閉構造に収束することはなかったのに対し(図5CのO5)、細胞質ドメイン全体に3対のマグネシウムを結合させた場合は30ナノ秒で閉構造に収束した(図5CのO465, 図5E)。したがって、MgtEはNドメインがあつて初めて複数のマグネシウムと結合し、しっかりと閉構造をとりうるということが、MDシミュレーション解析を行って初めて明らかになった。閉構造では、NドメインからのびるHis29, Gln31が相手側サブユニットのCBSドメインからのびるTyr225とvan der Waals相互作用で繋留されており(図5F)、この相互作用によってNドメインは閉構造を安定化するクランプとして働くことができると考えられる。

以上のことから、MgtEの細胞質ドメインには複数のマグネシウムイオンが段階的に結合することによって、開構造から閉構造に変化すると考えられる(図6)。すなわち、まず開構造のCBSドメイン間にMg5が結合することによって、一時的な擬閉構造をとるが、この構造は不安定であり、速い速度で閉構造と開構造を振動する(図6B, C)。

しかし、さらに CBS ドメインと N ドメインの境界に Mg⁴, Mg⁶ が結合すると、N ドメインが CBS ドメインを引きつけて安定な閉構造に収束させると考えられる (図 6D→F)。

6. Mg²⁺ 依存的な構造変化と MgtE による マグネシウムホメオスタシス機構

“プラグヘリックス”の末端は、膜貫通ヘリックス TM5 の先端と多くの van der Waals 相互作用をしており、かつこの2本のヘリックスは細胞膜界面で双極子・双極子相互作用により固定されていると考えられる (図 1)。“プラグヘリックス”はまた、Mg³によって、TM ドメイン、CBS ドメインに固定されている。したがって、MgtE から Mg²⁺ が外れると、“プラグヘリックス”はお互いに離れる方向に開き、その結果、抑えのなくなった TM5 も開き、イオン透過孔は開くのではないかと予測される (図 1)。このことから、MgtE による細胞内のマグネシウムバランス維持 (マグネシウムホメオスタシス) への寄与を説明できる (図 7)。すなわち、細胞内マグネシウム濃度が高い場合は、ドメイン境界に Mg²⁺ が結合し、MgtE は閉じた構造をとり、イオン透過孔も閉じているため、細胞外から Mg²⁺ が輸送されることはない。細胞内のマグネシウム濃度が下がってくると、Mg²⁺ はドメイン境界から外れ、静電反発により MgtE は開いた構造をとり、イオン透過孔も開くため、細胞外から Mg²⁺ が供給されると考えられる。

7. 結 語

膜輸送体は、細胞を外環境から隔離する細胞膜を介した物質輸送の「関所」の役割を果たし、生命を維持している。

本研究は、輸送基質自身が、その輸送制御に働いていることを明瞭に示した例である。膜輸送体は、糖尿病や胃潰瘍をはじめ様々な疾病に関連するだけでなく、直接的な原因となっているケースも多い。そのため、膜輸送体の構造機能解析は、科学的に意義が大きいだけでなく、創薬など医療応用を通じた一般社会への還元が大きく期待される。

文 献

- 1) Gouaux, E. & MacKinnon, R. (2005) *Science*, **310**, 1461–1465.
- 2) Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., & MacKinnon, R. (2001) *Nature*, **414**, 43–48.
- 3) Maguire, M.E. (2006) *Front. Biosci.*, **11**, 3149–3163.
- 4) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647–655.
- 5) Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) *Nature*, **430**, 529–535.
- 6) Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) *Nature*, **432**, 361–368.
- 7) Lunin, V.V., Dobrovetsky, E., Khutoreskaya, G., Zhang, R., Joachimiak, A., Doyle, D.A., Bochkarev, A., Maguire, M.E., Edwards, A.M., & Koth, C.M. (2006) *Nature*, **440**, 833–837.
- 8) Eshaghi, S., Niegowski, D., Kohl, A., Molina, D.M., Lesley, S. A., & Nordlund, P. (2006) *Science*, **313**, 354–357.
- 9) Payandeh, J. & Pai, F.F. (2006) *EMBO J.*, **25**, 3762–3773.
- 10) Smith, R.L., Thompson, L.J., & Maguire, M.E. (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 1233–1238.
- 11) Goytain, A. & Quamme, G.A. (2005) *Physiol. Genomics*, **21**, 337–342.
- 12) Dann, C.E., Wakeman, C.A., Sieling, C.L., Baker, S.C., Irnov, I., & Winkler, W.C. (2007) *Cell*, **130**, 878–892.
- 13) Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R., & Nureki, O. (2007) *Nature*, **448**, 1072–1075.
- 14) Ishitani, R., Sugita, Y., Dohmae, N., Furuya, N., Hattori, M., & Nureki, O. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.