

論文の内容の要旨

Mg²⁺チャネル MgtE におけるイオン認識メカニズムの構造基盤

(Structural basis for ion recognition revealed by high-resolution structure of Mg²⁺ channel MgtE)

氏名: 竹田 弘法

マグネシウムイオン (Mg²⁺) は細胞内で最も豊富な二価金属イオンであり、様々な生理的役割を担っている。Mg²⁺はゲノム情報の複製・転写・翻訳における補酵素であり、リボソーム・脂質二重膜・ゲノム・核酸の安定化に重要である。それゆえ細胞内における Mg²⁺濃度の恒常性は生命活動に極めて重要であると言える。Mg²⁺恒常性は生体膜を隔てて Mg²⁺を選択的に輸送するトランスポーターやチャネルといった膜輸送タンパク質によって管理される。Mg²⁺と同様に、Na⁺・K⁺・Ca²⁺などの金属イオンもまた種々の膜輸送タンパク質による選択的な輸送によって濃度が一定に保たれている。K⁺チャネルは結晶構造に基づいたイオン選択性が明らかとなったイオンチャネルであり、主鎖のカルボニル酸素により K⁺の水和水を脱水することで K⁺を選択的に認識する。対照的に、二価金属イオンはアミノ酸残基によって認識されることが二価金属イオ

ンチャネルの結晶構造から提唱されている。しかし、分解能が不十分なため、詳細な二価金属イオンに対する認識メカニズムは未だ不明である。二価金属イオンは脱水に必要なエネルギーが極めて高く、安定な水和状態を形成するため、二価金属イオンチャネルのイオン認識には二価金属イオンの水和水が関与すると考えられる。これを解明するためには、側鎖酸素原子から水分子に由来する酸素原子までの距離 2.5 \AA を下回る分解能で結晶構造を決定する必要がある。本研究において、我々は分解能 2.2 \AA で好度高熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 Mg^{2+} チャネル MgtE (TtMgtE) の膜貫通ドメインの高分解能構造を決定し、MgtE Asp432 の側鎖は水と Mg^{2+} を認識することを明らかにした。さらに我々は、本構造から二つの金属イオン結合部位を新たに発見し、リポソームを用いた基質取り込み実験により、これらが MgtE のイオン認識に寄与することを実証した。

Asp432 による Mg^{2+} 認識メカニズム

イオン透過孔の M1 site に存在する Asp432 は、原核生物から真核生物まで厳密に保存されていた Mg^{2+} 選択フィルターである。Asp432 が形成する空間は幅 $\sim 5 \text{ \AA}$ と非常に広いことから、Asp432 は完全水和状態にある Mg^{2+} を認識すると考えられる。しかし、分解能が不十分なため詳細な Mg^{2+} 認識機構は未だ不明である。我々は、TtMgtE の膜貫通ドメイン (MgtE-TMD) を脂質二重膜中で Mg^{2+} と共結晶化させることにより、 2.3 \AA の高分解能構造を決定することに成功した (図.1 A)。Asp432 と相互作用する Mg^{2+} は六水和状態の正八面体構造を取り、四つの水和水が Asp432 の側鎖酸素原子と水素結合を形成していた (図.1 B)。 Mg^{2+} は安定な水和状態を形成することを考えると、水和状態の Mg^{2+} を認識することはエネルギー的に合理的である。そのため、MgtE は Mg^{2+} を水和状態のまま輸送すると考えられる。本研究は、二価金属イオンチャネルのイオン認識メカニズムを明らかにした最初の報告である。

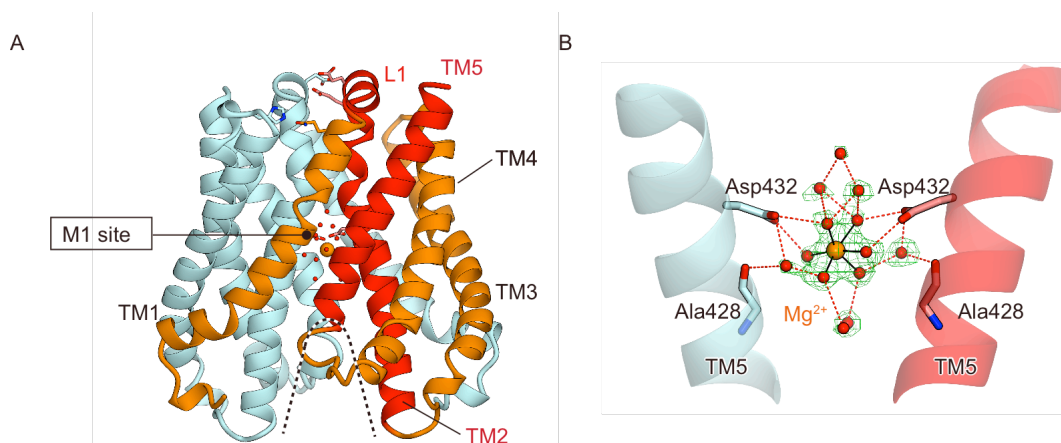


図.1 Mg^{2+} 結合型 MgtE-TMD の構造

(A) Mg^{2+} 結合型 MgtE-TMD の全体構造。(B) M1 site の拡大図。

M2 site 及び M3 site によるイオン選択メカニズムへの寄与

電気生理学的解析により、TtMgtE は Mg^{2+} 及び Co^{2+} に対しては透過性を示すが、その他の二価金属イオン (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} など) には透過性を示さないことが報告されている。それゆえ、TtMgtE は厳密なイオン選択メカニズムを保持していると考えられる。そこで我々は、 Mn^{2+} 存在下における MgtE-TMD の結晶構造決定を試みた。その結果、分解能 2.2 Å の Mn^{2+} 結合型 MgtE-TMD の高分解能構造を決定することに成功した。 Mg^{2+} と同様に、 Mn^{2+} は六水和状態の八面体構造を形成し、水和水が Asp432 の側鎖酸素原子と水素結合を形成していた。さらに、 Mn^{2+} は細胞外側にあるイオン透過孔の入り口 (M2 site)、そして細胞外側の各サブユニットの境界 (M3 site) に結合していた。これらの Mn^{2+} 結合部位のイオン選択性における役割を検証するため、リポソームを用いた二価金属イオン取り込み実験を行ったところ、これらの Mn^{2+} 結合部位がイオン選択性に寄与することが明らかとなった。 Mn^{2+} 結合型 MgtE-TMD は閉状態であったことから、これらの Mn^{2+} 結合部位は Mn^{2+} と結合することで構造を閉状態に安定化し、 Mn^{2+} の輸送を制限すると考えられる。MgtE のイオン選択性は Asp432 のみならず、いくつかの二価金属イオン

結合部位により選択性が規定されることを明らかにした。

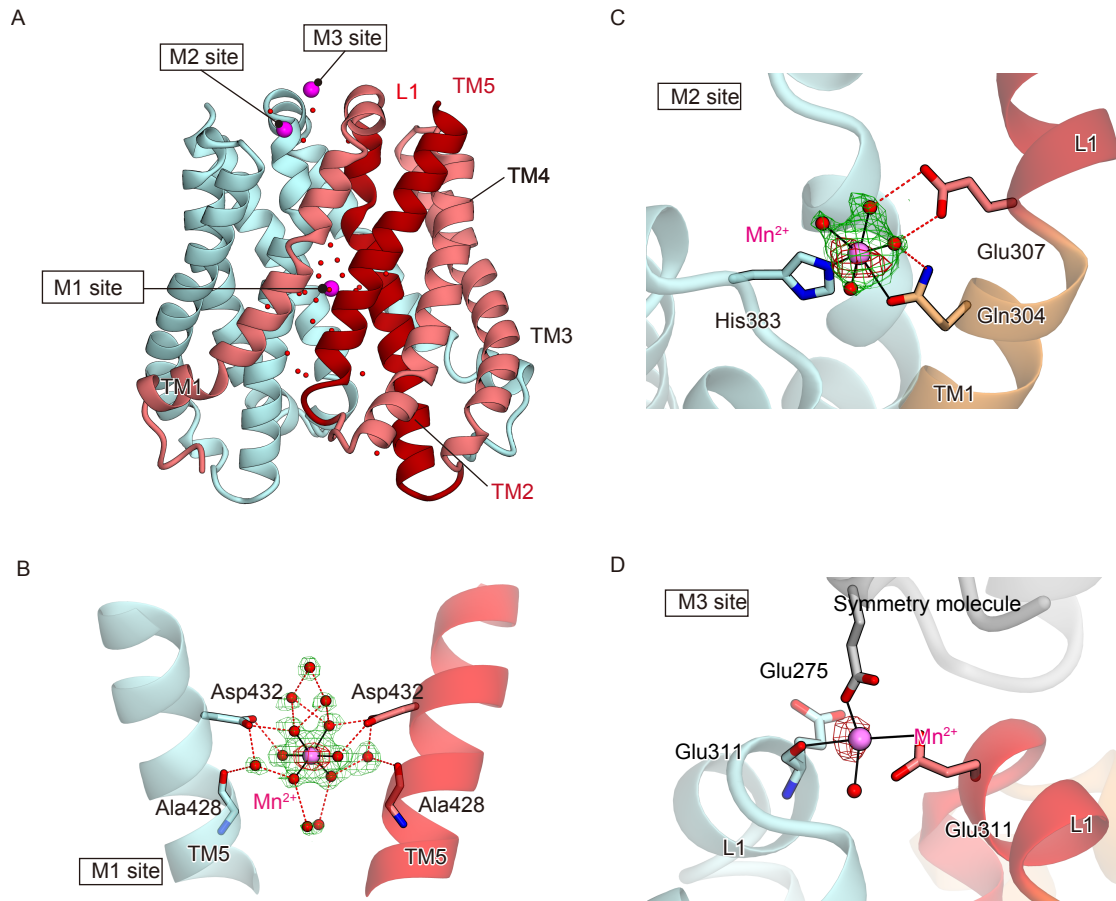


図.2 Mn^{2+} 結合型 MgtE-TMD の構造

(A) Mn^{2+} 結合型 MgtE-TMD の全体構造。(B) M1 site, (C) M2 site, (D) M3 site の拡大図。