

論文の内容の要旨

論文題目 Mg^{2+} チャネル MgtE の開閉機構の解明

氏 名 丸山 達朗

1. 序論

細胞内のマグネシウムイオン(Mg^{2+})は、酵素の補因子や、細胞膜、核酸などの安定化因子として働く重要なイオンである。その細胞内総濃度は約 20 mM であり、 Mg^{2+} を選択的に膜透過させる Mg^{2+} チャネルによって適切に調節されている。その機能異常は心筋梗塞などの虚血性心疾患の一因となることから、 Mg^{2+} チャネルによる細胞内 Mg^{2+} 濃度の調節機構を理解することで、これら疾患の治療薬の創製へと繋がることが期待される。

近年、真核生物の Mg^{2+} チャネルのホモログである、高度好熱菌由来の MgtE が同定され、その機能および結晶構造が明らかとなった。電気生理学的解析により、MgtE は細胞内 Mg^{2+} 濃度が 5~10 mM を境に低濃度では Mg^{2+} を膜透過させる開状態を、高濃度では膜透過させない閉状態を取ることが示された。したがって、MgtE は、細胞内 Mg^{2+} 濃度の低下を感知して開口し Mg^{2+} を細胞外から細胞内へ取り込むことにより、細胞内 Mg^{2+} の恒常性を維持する、という生理的機能を有する。

構造については、 Mg^{2+} 結合型の結晶構造が解明されている(Fig.1)。MgtE は対称な二量体を形成し、各サブユニットは膜貫通領域と、N ドメイン、CBS ドメイン、plug helix から成る細胞質領域から構成される。膜貫通領域中央にイオン透過路を有するが、この構造ではその細胞質側が閉塞しており、閉状態を反映している。また、7 種類の Mg^{2+} 結合部位 Mg1~Mg7 が同定された。Mg1 はイオン透過路内の二回対称軸上に位置し、Mg2, Mg3 は plug helix の近傍に、Mg4~Mg7 は N ドメイン、CBS ドメイン、plug helix の界面付近にそれぞれ二回対称に 2 個ずつ位置する。各 Mg^{2+} 結合部位の変異体を用いた電気生理学的解析により、Mg1 はイオン透過に必須であること、Mg2~Mg7 の全ての部位が閉状態の形成に必須であり、これらの部位へ Mg^{2+} は段階的に結合することが示唆されている。

MgtE の開閉機構の解明の最初のステップである、 Mg^{2+} 依存的な構造変化について、全長では Mg^{2+} 非結合型の立体構造は未だ明らかでないが、細胞質領域のみのコンストラクトでは Mg^{2+} 結合型および非結合型の結晶構造が解明されている。両者の比較から、 Mg^{2+} の結合解離によって細胞質領域の各ドメインの相対配置が変化することが示唆された。以上より、 Mg^{2+} 非結合型では細胞質領域の各ドメインが互いに離れた配向

を取りイオン透過路が開いているが、 Mg^{2+} が結合すると各ドメインが互いに近接した配向を取りイオン透過路が閉口するという開閉機構が提唱されている。しかしながら、閉状態の形成に必要な $Mg2 \sim Mg7$ への Mg^{2+} 結合は同時に起こらず、段階的に生じることから、最も高濃度で Mg^{2+} が結合する部位が MgtE を開状態から閉状態へと完全に移行させるはずである。そこで本研究は、最も高い Mg^{2+} 濃度で構造変化する部位および、その構造変化を引き起こす Mg^{2+} 結合部位を同定することによって、MgtE の開閉機構を解明することを目的とした。

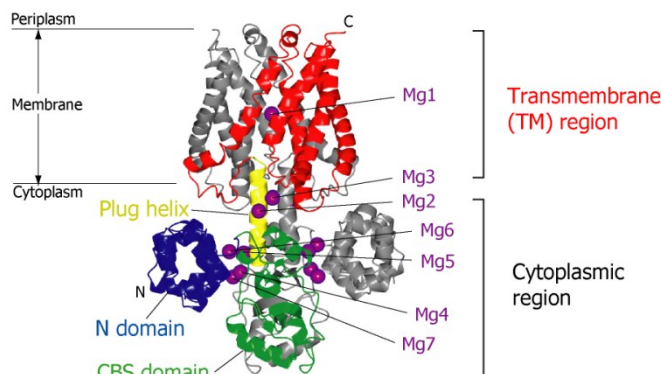


Fig.1 Mg^{2+} 結合型 MgtE の結晶構造
MgtE はホモ二量体を形成する。一方のサブユニットを灰色、他方をドメイン毎に色づけた。紫の球は Mg^{2+} を表し、その結合部位 $Mg1 \sim Mg7$ を示した。

2. 結果

2-1. サンプル調製および Mg^{2+} 結合能の確認

高度好熱菌由来 MgtE は大腸菌にて発現させ、ドデシルマルトシド(DDM)にて可溶化後、精製を行い、DDM ミセル中で MgtE は二量体を形成することを SEC により確認した。調製した MgtE は見かけの分子量が約 160kDa であるが、このような高分子量でも高感度・高分解能な NMR シグナルを与える Ile81 メチル基を NMR 解析のプロープとした。全 15 残基存在する Ile は MgtE 構造全体に分布し、いずれの Ile も各 Mg^{2+} 結合部位から 8 Å 以上離れていることから、Ile81 メチルシグナルの Mg^{2+} 依存的な変化は Mg^{2+} の直接結合ではなく、 Mg^{2+} 結合に伴う各部位での構造変化を反映する。

まず、調製した MgtE の Mg^{2+} 結合能を確認した。 Mg^{2+} 非存在下で調製した $\{u\text{-}^2H, \text{Ile}81\text{-}[^{13}CH_3]\}$ MgtE へ Mg^{2+} を加え、methyl-TROSY スペクトルを測定したところ、 Mg^{2+} の添加に伴い化学シフト変化やシグナルの強度変化が観測され、これらの変化は Mg^{2+} 濃度が 5 mM にて飽和した(Fig.2)。このことから、調製した MgtE が Mg^{2+} 結合能を有し、 Mg^{2+} 依存的に構造変化することを確認した。観測された Ile81 メチルシグナルを、変異体を用いて帰属した結果、 Mg^{2+} 非結合型では 15 残基中 12 残基を、 Mg^{2+} 結合型では全 15 残基を帰属することに成功した。

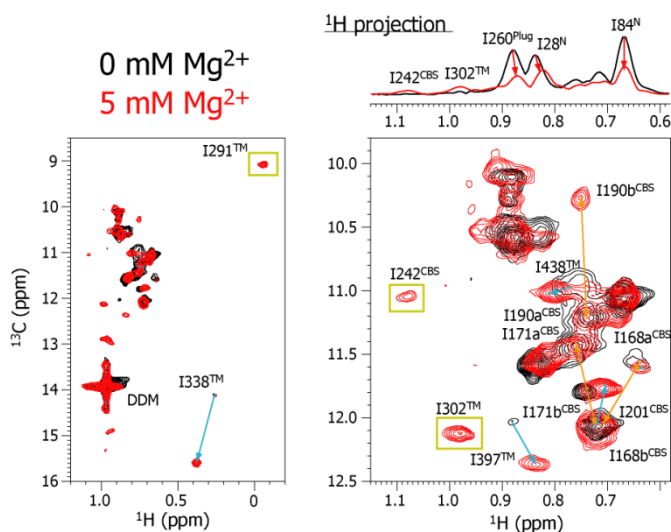


Fig.2 MgtE の Mg^{2+} 依存的なスペクトル変化
 Mg^{2+} 濃度 0 mM を黒、5 mM を赤にて重ね合わせた。 Mg^{2+} の結合によって、化学シフト変化したシグナルに青矢印を、観測されるようになるシグナルに黄色枠を、2 つ観測されるようになったシグナルに橙矢印を、広幅化したシグナルに赤矢印を付した。また、複数のシグナルを与える Ile には便宜的に残基名の末尾に a, b を記した。

2-2. 細胞質領域のコンストラクトを用いた、 Mg^{2+} 非存在下の N ドメインの配向の解析

Mg^{2+} 非存在下の N ドメインの I28, I84 のシグナル強度は顕著に強いことから、N ドメインは運動性が高いことが示唆される。一方で、細胞質領域の Mg^{2+} 非結合型の結晶構造では N ドメインは特定の配向を取っており、溶液中における高い運動性と整合していない。前述したように、MgtE の開閉機構を理解するためには、最初のステップである Mg^{2+} 依存的な構造変化を明らかにする必要がある。そこで溶液中の N ドメインの配向を調べるため、細胞質領域のみのコンストラクトを用いて常磁性緩和促進解析を行った。その結果から、溶液中での N ドメインは、結晶中とは異なり、複数の配向を取ることが明らかになった。そこで、N ドメインが取りうる配向をアンサンブルとして表現し、定法に従ってそのアンサンブル構造を計算したところ、N ドメインは広い空間に分布可能であることが明らかになった。

2-3. 開閉を担う構造変化部位の解析

次に、最も高い Mg^{2+} 濃度で構造変化する部位を調べるため、 Mg^{2+} 滴定に伴う MgtE の Ile81 メチルシグナルの変化を解析した。その結果、 Mg^{2+} の滴定に伴う変化はシグナル毎に異なっており、以下の 4 種類の変化が観測された(Fig.2)。(1)化学シフト変化：この変化は CBS ドメインの I201, 膜貫通領域の I338, I397, I438 に観測された。(2)先鋭化： Mg^{2+} 非結合型において観測されなかったシグナルが Mg^{2+} 結合により観測されるようになるという変化は、CBS ドメインの I242, 膜貫通領域の I291, I302 に観測された。(3)分裂： Mg^{2+} 非結合型において 1 つのシグナルを与えていたが、 Mg^{2+} の結合によって Mg^{2+} 結合型と非結合型の計 2 つのシグナルを与えるようになるという変化であり、この変化は CBS ドメインの I168, I171, I190 に観測された。(4)広幅化： Mg^{2+} 非結合型において顕著に強度の強かったシグナルが、 Mg^{2+} 結合によって他のシグナルと同程度となるまで広幅化するという変化であり、この変化は N ドメインの I28, I84, plug helix の I260 に観測された。以上の変化をそれぞれ Mg^{2+} 濃度に対してプロットし、 Mg^{2+} 結合型の構造へ移行する Mg^{2+} 濃度を調べたところ、膜貫通領域の Ile では 2~3 mM、細胞質領域の N ドメイン、CBS ドメイン、plug helix の Ile では 3~5 mM であることが分かった(Fig.3)。この結果から、高濃度域で構造変化する細胞質領域の部位がチャネルの開閉を担う構造変化部位であることが明らかになった。

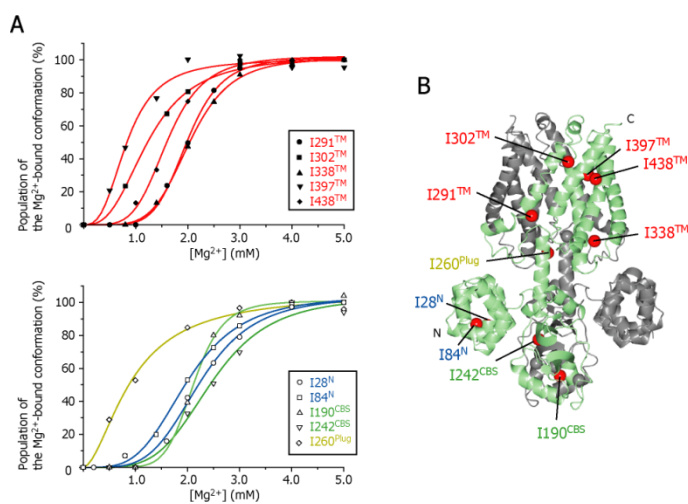


Fig.3 シグナルの変化の Mg^{2+} 濃度依存性
(A) Mg^{2+} 結合型の構造の割合の変化。Hill 式にてフィッティングを行った。上は膜貫通領域の Ile の結果を、下は細胞質領域の Ile の結果を表す。ドメイン毎に Ile を色分けした。
(B) (A)にて解析した Ile の構造上の位置。

2-4. 開閉を担う構造変化を引き起こす Mg^{2+} 結合部位の解析

このような開閉を担う細胞質領域の部位の構造変化を引き起こす Mg^{2+} 結合部位を調べるため、Mg1~Mg7 の部位ごとに Mg^{2+} 結合能を欠失させる変異を導入し、それらの変異体の Mg^{2+} 依存的なスペクトル変化を野生型と比較した。その結果から、膜貫通領域の Mg^{2+} 依存的な構造変化は Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 により制御され、Mg4, Mg5, Mg7 の影響を受けないのに対し、細胞質領域の Mg^{2+} 依存的な構造変化を引き起こすのは Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 に加えて、N ドメインでは Mg4, Mg5, Mg7、CBS ドメインでは Mg4, Mg5, plug helix では Mg5 であることが明らかになった(Fig.4)。

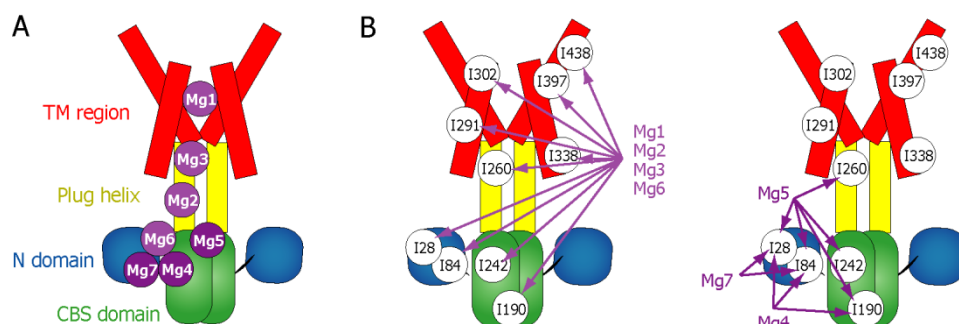


Fig.4 Mg^{2+} 結合部位の変異体解析結果のまとめ
MgtE の構造および Mg^{2+} 結合部位を模式図にて表した。
(A) Mg^{2+} 結合部位の位置。(B)変異により Mg^{2+} 依存的な構造変化が阻害された Ile の位置。

3. 考察

3-1. MgtE の Mg^{2+} 依存的な構造変化

2-3 の Mg^{2+} 滴定実験において、 Mg^{2+} の滴定に伴う Ile61 メチルシグナルの変化は4種類観測されていた。(1)化学シフト変化は、 Mg^{2+} の結合による構造変化を示している。(2)シグナルの先鋭化は、 Mg^{2+} 非結合型においては異なる構造間を交換することでシグナルが広幅化している一方、その交換が Mg^{2+} の結合により抑制され単一の構造を取ったことを示唆している。(3)シグナルの分裂は、2つ目の変化とは逆に、 Mg^{2+} 非結合型においては単一の構造を取っているが、 Mg^{2+} 結合型では異なる構造間を交換していることを示唆している。(4)シグナルの広幅化は、 Mg^{2+} 非結合型において顕著に高い運動性を有しているが、その運動性が Mg^{2+} の結合によって他の部位と同程度となるまで低下したことを示唆している。以上より、 Mg^{2+} 非結合型では膜貫通領域と CBS ドメインが異なる構造間を交換し、N ドメインと plug helix は高い運動性を有した動的な状態にあることが示唆された。一方で、 Mg^{2+} の結合によって MgtE は構造変化すると共に、 Mg^{2+} 非結合型における膜貫通領域の構造平衡と、N ドメインおよび plug helix の運動性が抑制されるが、 Mg^{2+} 結合型においても CBS ドメインには依然として構造平衡が存在することが示唆された。

3-2. 開閉を担う細胞質領域の構造変化を引き起こす Mg^{2+} 結合部位

2-3 の Mg^{2+} 滴定実験より、 Mg^{2+} 結合型の構造へ移行する Mg^{2+} 濃度が、膜貫通領域では2~3 mM、細胞質領域では3~5 mM であることが分かった(Fig.3A)。2-4 の Mg^{2+} 結合部位の変異体解析より、膜貫通領域の Mg^{2+} 依存的な構造変化は Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 により制御され、Mg4, Mg5, Mg7 の影響を受けない(Fig.4)ことから、Mg1, Mg2, Mg3, Mg6 への Mg^{2+} 結合は3 mM で飽和することが示唆される。一方、Mg4, Mg5, Mg7 は膜貫通領域には影響せず、細胞質領域のみの Mg^{2+} 依存的な構造変化を引き起こす(Fig.4)ことから、これらの結合部位は3~5 mM で飽和することが分かった。このことから、最も高濃度で Mg^{2+} が結合する Mg4, Mg5, Mg7 がチャネルの開閉を担う細胞質領域の構造変化を引き起こす Mg^{2+} 結合部位であることが明らかになった。

3-3. Mg4, Mg5, Mg7 による MgtE の開閉機構

Mg^{2+} 結合型の結晶構造においてイオン透過路は膜貫通ヘリックスと plug helix により塞がれている。したがって、この領域は Mg^{2+} の透過・非透過を決定するゲートとして機能し、その開閉は plug helix により制御されることが想定される。本研究により、MgtE のゲートは Mg4, Mg5, Mg7 への Mg^{2+} 結合による細胞質領域の構造変化によって完全に閉口することを明らかにした。Mg4 に結合した Mg^{2+} は N ドメインと plug helix 間を、Mg5 に結合した Mg^{2+} はサブユニット間の CBS ドメインと plug helix を、Mg7 に結合した Mg^{2+} はサブユニット間の N ドメインと CBS ドメインをそれぞれ架橋することで、各ドメインの相対配置を安定化することが示唆された。特に、Mg5 はゲートの開閉を制御する plug helix の構造変化を引き起こす(Fig.4)ことから、この Mg5 と plug helix の共役を通じてゲートが完全に閉口することが示唆された。