

学位論文（要約）

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)

平成 26 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

竹田弘法

目次

記号、記号及び備考.....	2
第 1 章 序論	4
膜輸送タンパク質	4
Mg ²⁺ 輸送タンパク質を介した細胞内 Mg ²⁺ ホメオスタシス	6
Mg ²⁺ チャネル MgtE 及び CorA	7
第 2 章の概要	11
第 3 章の概要.....	12
第 2 章 Mg ²⁺ チャネル MgtE の Mg ²⁺ 認識メカニズムの解明	18
第 3 章 Mg ²⁺ チャネル MgtE の金属イオン選択機構の解明	19
第 4 章 総括	20
5. 引用文献	21
6. 外部発表	25
6. 謝辞	27

記号、記号及び備考

アミノ酸の略号

一文字略号	三文字略号	正式名称
A	Ala	alanine
C	Cys	cystein
D	Asp	aspartic acid
E	Glu	glutamic acid
F	Phe	phenylalanine
G	Gly	glysine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	methionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	serine
T	Thr	threonine

V	Val	valine
W	Trp	tryptophan
Y	Tyr	tyrosine

第1章 序論

膜輸送タンパク質

細胞はリン脂質で構成された脂質二重膜により外界から隔離されている。細胞が生命活動を維持するには、金属イオン・アミノ酸・脂肪酸など多岐にわたる物質を取り込み、また排出することが不可欠である。このような細胞内外における物質のやり取りは、脂質二重膜に埋め込まれた膜輸送タンパク質が担っている (図表 1.1)。膜輸送タンパク質は、物質を認識・輸送するポアドメインと、この機能を制御する調節ドメインで構成される (図表 1.1)。ポアドメインは単量体または多量体で形成された膜貫通領域であり、ポア内部に固有の基質結合部位を保持する。基質結合部位は特定の基質を認識し、濃度勾配に従ってあるいはポアドメインの構造変化に伴って脂質二重膜の反対側へと輸送される。基質認識部位は膜輸送タンパク質による輸送機能に、基質に対する正確性、つまり「選択性」を与える上で極めて重要である。この基質輸送は、調節ドメインにより制御される。調節ドメインは H^+ ・金属イオン・核酸などの化学物質と結合し、あるいは膜電位や温度などの物理的な刺激を感知する。構造変化によってこれをポアドメインに伝えることで基質輸送を開始、あるいは抑制する。このような「輸送制御」により、膜輸送タンパク質は輸送機質を環境に合わせて基質を取り込みあるいは排出する。細胞内における物質濃度の恒常性に必要な膜タンパク質のもう一つの重要な特徴は、基質輸送の「方向性」である。膜輸送

タンパク質は能動輸送と受動輸送と呼ばれる輸送様式を示す。能動輸送は、ATPや光エネルギーなどを駆動力としてリン脂質二重膜を隔てて形成される基質濃度勾配に逆らって基質を輸送する、ポンプと呼ばれる膜タンパク質が示す輸送様式である (図表 1.1)。一方、基質濃度勾配を駆動力とする輸送様式は受動輸送であり、多くの膜輸送タンパク質が示す輸送様式である。受動輸送を示す膜輸送タンパク質はトランスポーターそしてイオンチャネルに大別される (図表 1.1)。トランスポーターの場合、複雑な構造変化がいくつかのステップを経て基質を輸送する。それに対しイオンチャネルは、ポアドメインが開いた開口状態とそれが閉じた閉口状態という二つの構造変化を伴い、開状態のときのみ基質イオンを輸送する。さらに、トランスポーターの基質輸送速度は $10^3 \sim 10^4$ 個/sec、イオンチャネルのそれは $10^6 \sim 10^8$ 個/sec であり、基質輸送速度の観点からも区別される。

イオンチャネルの多くは細胞内に豊富に存在する $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+ \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{Ca}^{2+}$ といった金属イオンを輸送機質とし、細胞内における金属イオン濃度の恒常性に寄与する。イオンチャネルもまた、輸送制御を伴って基質イオンを選択的に輸送する。特に K^+ チャネルは最も研究が進んだイオンチャネルである。 K^+ チャネルのポアドメインは、セントラルキャビティと選択フィルターで構成されたイオン透過孔を形成する¹⁻³。選択フィルターは主鎖のカルボニル酸素によって形成され、様々な金属イオンのうちその径に適合する K^+ から水和水をはがし、これと結合する¹⁻³。セントラルキャビティは細胞質ドメイン及び膜電位センサードメインと呼ばれる調節ドメインにより輸送制御を受ける⁴。細胞質ドメインは $\text{H}^+ \cdot \text{Ca}^{2+} \cdot$ 核酸との結合、膜電位センサーは膜電位差の感知を構造変化として

変換する^{5,6}。この構造変化がセントラルキャビティに伝わることで、 K^+ 輸送が制御される。以上の「選択性」、そして「輸送制御」は個々の K^+ チャネルに固有である。 K^+ チャネルのみならず、生体膜には様々なイオンチャネルが存在する。これらは固有の選択性及び輸送制御を伴って金属イオンを輸送し、細胞内における金属イオン濃度を維持する。

Mg^{2+} 輸送タンパク質を介した細胞内 Mg^{2+} ホメオスタシス

Mg^{2+} は生体内に含まれる $Na^+ \cdot K^+ \cdot Ca^{2+}$ といった金属イオンの中で最もイオン半径が小さく、最も大きな相対水和イオン半径を示す。 Mg^{2+} は 6 つの水分子が配位し、結合角 ($O-Mg^{2+}-O$) が $\sim 90^\circ$ の正八面体構造をとる⁷。 Mg^{2+} の脱水和エネルギーは 1858 kJ mol^{-1} と極めて高く^{8,9}、その水和状態は非常に安定である。対照的に、 $Na^+ \cdot K^+$ は脱水されやすく⁷、 Ca^{2+} は様々な水和状態をとることが可能であり^{8,10,11}、それぞれが柔軟な化学的特徴を示す。 Mg^{2+} は生体内で様々な役割を担っているが、その根底には Mg^{2+} の特徴的な化学的性質が関係していると考えられる。

Mg^{2+} は細胞内で最も豊富な二価金属イオンである。細胞内では $\sim 20 \text{ mM}$ の Mg^{2+} が存在するが¹²、そのうち $0.5 \sim 1.0 \text{ mM}$ を遊離 Mg^{2+} が占める¹²。 Mg^{2+} は様々な生理的役割を担っている。 Mg^{2+} はゲノム情報の複製・転写・翻訳における補酵素であり¹³、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¹⁴⁻¹⁷。これまでヒトにおいて Mg^{2+} 欠乏が与える細胞への影響が報告されており、例え

ば、 Mg^{2+} 欠乏は心筋症・てんかん・偏頭痛・骨粗しょう症を引き起こす原因となる¹⁸。これは免疫系細胞の活性化に寄与する情報伝達を Mg^{2+} が促進することに起因する¹⁹。それゆえ細胞内における Mg^{2+} 濃度の恒常性は生命活動に極めて重要であると言える。

Mg^{2+} の恒常性を司る Mg^{2+} 輸送システムが初めて見出されたのは 1960 年頃である²⁰。それ以降、 Mg^{2+} 輸送システムに寄与する様々な Mg^{2+} 輸送タンパク質が同定された²¹ (図表 1.2)。種々の Mg^{2+} 輸送タンパク質はユニークな特徴を示す。ある特定の Mg^{2+} チャネルにおいては、 Mg^{2+} 認識あるいは輸送に重要であると考えられるモチーフが原核生物から真核生物まで厳密に保存されている。しかし他の Mg^{2+} チャネルのトポロジーやモチーフなどを比較すると、進化的に関係性のある Mg^{2+} チャネルは存在しない (図表 1.2)。それゆえ、種々の Mg^{2+} 輸送タンパク質は異なるタンパク質を起源として進化したものと考えられる。これは、異なるファミリーでもアミノ酸残基や構造がよく保存された K^+ チャネルとは対照的である²²。

Mg^{2+} チャネル MgtE 及び CorA

MgtE

MgtE は Maguire らによるゲノム解析によりグラム陽性菌及びグラム陰性菌において初めて同定された Mg^{2+} 輸送タンパク質である^{23,24} (図表 1.2)。MgtE は約

50%の原核生物に保存されており²⁵、 Mg^{2+} 輸送システムに寄与する。その後、*mgtE* が *Borrelia burgdorferi* の引き起こすライム関節症の原因遺伝子であり、グラム陰性菌 *Aeromonas hydrophila* のヒトへの付着を促進することが明らかとなった²⁶。

MgtE の結晶構造は 2007 年、Hattori らにより報告された²⁷ (図表 1.3 A)。MgtE は細胞質ドメインとポアドメインで構成されるホモ二量体である (図表 1.3 A 左)。ポアドメインは TM2 及び TM5 により形成されており、イオン透過孔の細胞外側及び細胞内側が共に閉じた閉状態であった (図表 1.3 B)。細胞質ドメインは N ドメイン・CBS ドメイン・プラグヘリックスで構成されており、 Mg^{2+} 存在下では合計 12 個の Mg^{2+} と結合し、各ドメインが互いに密着した構造であった (図表 1.3 A 左)。一方で Mg^{2+} 非存在下では、N ドメインが大きく展開し、CBS ドメインとプラグヘリックスが開いた構造であった (図表 1.3 A 右)。これらの構造から、細胞質ドメインは Mg^{2+} 依存的に構造変化を起こし、これによりポアドメインの開閉を促すという、 Mg^{2+} リガンド依存的な輸送メカニズムが提唱された^{27,28} (図表 1.3 A)。その後 Hattori らは、細胞内の Mg^{2+} 濃度上昇に伴い、MgtE の Mg^{2+} 輸送活性が低下することを電気生理学的実験により明らかにし、上記の Mg^{2+} 輸送メカニズムを実証した²⁹。 Mg^{2+} の透過時には、疎水性ゲート及び親水性ゲートが大きく開くことが考えられる。特に親水性ゲートには平行に並ぶ二つのプラグヘリックスが配置しており、親水性ゲートを塞いでいる (図表 1.3 B)。それゆえ、 Mg^{2+} の透過には少なくともプラグヘリックスが外側へ動くことにより、 Mg^{2+} の透過に十分な空間が確保される必要がある²⁷。MgtE のイオン透過孔は疎水性ゲート・親水性ゲート・ Mg^{2+} 選択フィルターで構成される (図表 1.3 B)。

イオン透過孔の中央に存在する Mg^{2+} 選択フィルターは二つの Asp432 で構成されており、 Mg^{2+} と相互作用する²⁷ (図表 1.3 C)。Asp432 は厳密に保存されており、変異体 D432A 及び D432A は Mg^{2+} に対する透過性を失うことから、Asp432 は Mg^{2+} の透過に重要であると考えられる²⁹。MgtE のイオン透過性は非常に高く、 Mg^{2+} を 100 pS ($\sim 3 \times 10^7$ 個/sec)、そして Co^{2+} を 55 pS ($\sim 1.8 \times 10^7$ 個/sec) で透過する²⁹。対照的に、 Na^+ や K^+ などの一価金属イオン、 Mn^{2+} や Ni^{2+} などの二価金属イオンに対しては透過性を示さない。そのため、MgtE は Mg^{2+} に高い選択性を示す Mg^{2+} チャネルであると言える²⁹。

真核生物では、*mgtE* の相同遺伝子として *slc41* が同定されている¹⁸ (図表 1.2)。SLC41 ファミリーはヒトのほとんどの臓器に発現しており、近年、電気生理学的解析により SLC41 ファミリーに属する SLC41-A1・SLC41-A2・SLC41-A3 のイオン選択性が明らかとなっている³⁰⁻³³。SLC41 もまた MgtE において厳密に保存された Asp を保持しているが、イオン選択メカニズムについては未だ不明である。SLC41 の特徴は、*slc41* が遺伝子重複を起こしており、MgtE における細胞質ドメインが欠失していることである³⁴。それゆえ真核生物では、細胞内 Mg^{2+} 濃度の感知や Mg^{2+} の取り込みの制御を担うシステムは、原核生物とは異なると考えられる。

これまで MgtE の X 線結晶構造が決定されたことをきっかけに、MgtE の細胞質ドメインにおける新たな Mg^{2+} 結合部位の同定²⁹、二価金属イオンに対するイオン選択性²⁹、分子シミュレーションによる細胞質ドメインのダイナミクスなどが報告されている²⁸。しかし、MgtE の Mg^{2+} の認識メカニズムや Mg^{2+} を輸送する瞬間をとらえた開構造の決定など、未だ不明な点が多いのが現状である。

CorA

CorA はその変異体が細胞の Co^{2+} 耐性に寄与することから名付けられ、Maguire らによって *Salmonella typhimurium* 及び *E.coli* から初めてその遺伝子が単離された³⁵ (図表 1.2)。CorA は原核生物の約半分に保存されており、MgtE 同様に Mg^{2+} を細胞内へ取り込む³⁶。corA は三つのサブグループに分かれており、そのうちの 하나가 zntB を含む corA-like 遺伝子群である³⁷。Thermotoga maritime 由来 CorA (TmCorA) は MgtE と同様に Mg^{2+} 及び Co^{2+} の取り込みを担う³⁷。これとは対照的に、ZntB は Zn^{2+} を細胞外に排出するため、 Mg^{2+} 輸送システムには寄与しないと考えられる³⁸。

真核生物では、CorA-like タンパク質として Mrs2・Alr1・Mnr2 が同定されている (図表 1.2)。Mrs2 はミトコンドリアにおける Mg^{2+} 濃度の恒常性と呼吸鎖複合体の機能及び安定化に重要である³⁹。Alr2 及び Mnr2 は酵母が固有に有するタンパク質である⁴⁰。Alr1 は原形質膜、そして Mnr2 は小胞体に発現し、それぞれ Mg^{2+} の取り込みを行う。特に Mnr2 は小胞体内における Mg^{2+} の貯蔵に重要である⁴⁰。

TmCorA の閉状態の結晶構造は、2006 年に異なる二つのグループから報告された^{41,42}。CorA は十回膜貫通型の五量体タンパク質であり、ポアドメイン及び細胞質ドメインで構成される^{41,42} (図表 1.4 A)。五つの非常に長い TM1 がイオン透過孔を形成し、細胞外側には CorA-like タンパク質に厳密に保存される GMN モチーフが存在する (図表 1.4 A, B)。TM1 は $\sim 55 \text{ \AA}$ に渡る非常に長いヘリックス

で、その中央には塩基性残基に富む basic ring モチーフ (KKKK) が存在する (図表 1.4 A 左)。細胞質側に突き出た TM1 は細胞質ドメインを構成する。細胞質ドメインには合計 10 個の Mg^{2+} が単量体と単量体の境界に結合し、CorA の全体構造を安定化している (図表 1.4 A)。さらに、 Mg^{2+} 非結合型 (Cs^+ 結合型) TmCorA の結晶構造が明らかとなり、ポアドメインの構造は変化してはいなかったが、細胞質ドメインがわずかにねじれた構造となっていた⁴³。CorA の開状態構造は、分子動力学シミュレーションを用いた研究により明らかとなっている⁴⁴。 Mg^{2+} 非存在下では、細胞質ドメインと basic ring が大きく外側に開き、この構造変化に伴ってポアドメインのイオン透過孔が 5~Å にまで大きく開いていた。この構造変化は CorA が MgtE と同様に Mg^{2+} リガンド依存性 Mg^{2+} チャンネルであることを強く示唆するものである。

第 2 章の概要 ~ Mg^{2+} チャンネル MgtE の Mg^{2+} 認識メカニズムの解明~

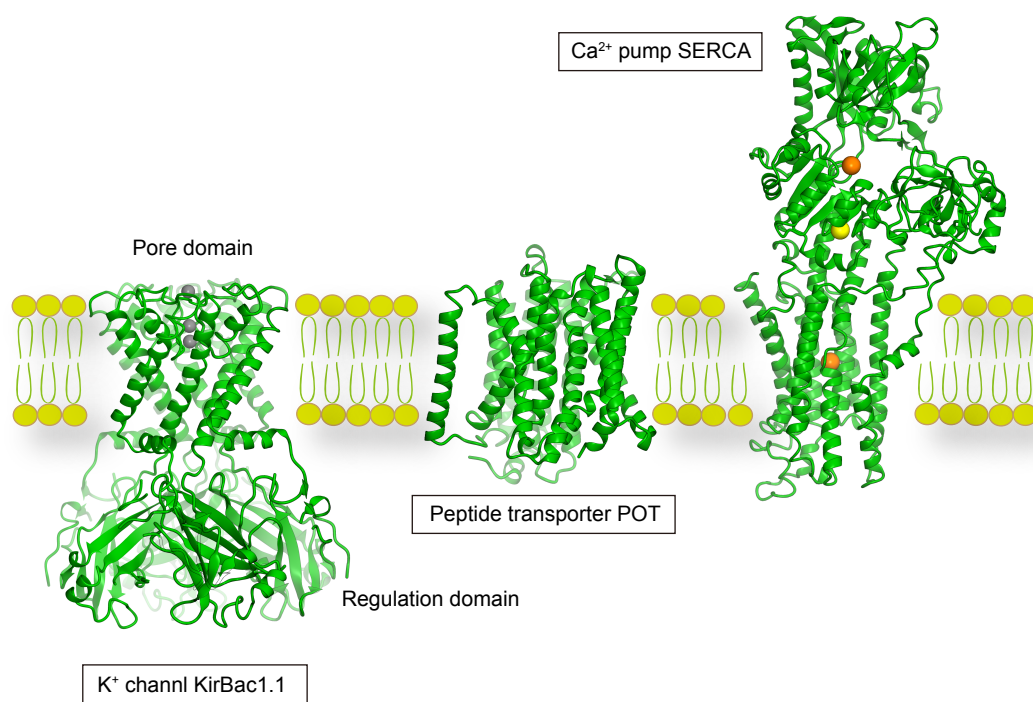
本章では、*Thermus thermophilus* 由来 MgtE の Mg^{2+} 選択フィルター Asp432 の Mg^{2+} 認識メカニズムの解明に向け、MgtE の高分解能構造の決定を目的とする。これまで最高分解能 2.9 Å の MgtE の結晶構造が報告されている²⁹。この構造では、イオン透過孔の中央に存在する Asp432 が Mg^{2+} を認識していた。しかし、両者の距離は 4.5 Å 以上離れており、Asp432 が直接 Mg^{2+} と結合するのか、 Mg^{2+} に配位する水和水と結合するのかは不明であった。そのため、二価金属イオンに配位する水和水の位置を特定することができる、分解能 2.5 Å 以上の高分解能

構造が必要である。本章では、 Mg^{2+} チャネル MgtE を標的とした高分解能構造を決定し、MgtE の Mg^{2+} 認識メカニズムの解明を目指す。まず、ポアドメインのみの MgtE (以下、MgtE-TMD) を精製し、 Mg^{2+} 存在下で lipidic cubic phase 法 (以下、LCP 法) により結晶化を行った⁴⁵⁻⁴⁸。その結果、分解能 2.3 Å の Mg^{2+} 結合型 MgtE-TMD の結晶構造を決定することに成功し、MgtE が完全水和状態にある Mg^{2+} を認識することが明らかとなった。さらに、 Mg^{2+} 選択フィルター Asp432 変異体の liposome を用いた Mg^{2+} 取り込み実験によって詳細な Mg^{2+} 認識メカニズムを解明するに至った。

第 3 章の概要 ~ Mg^{2+} チャネル MgtE の金属イオン選択メカニズムの解明 ~

本章では、MgtE のイオン選択性におけるさらなる考察のために、 Mn^{2+} 及び Ca^{2+} 結合型 MgtE-TMD の構造を決定すると共に、機能解析により MgtE の詳細なイオン選択性について議論する。MgtE のイオン選択性は電気生理学的実験により解析されており、 Mg^{2+} 及び Co^{2+} には透過性を示すが、その他の二価金属イオン ($\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mn}^{2+} \cdot \text{Ni}^{2+}$) には示さないことが明らかとなっている²⁹。しかし、MgtE がどのようにイオンを選択するのかについては未だ不明である。本章では、 Mn^{2+} 結合型 MgtE-TMD の高分解能構造の決定に成功し、 Mn^{2+} は Mg^{2+} と同様の様式で Asp432 に認識されることが明らかにした。 Ca^{2+} 結合型 MgtE-TMD は分解能が 3.2 Å であったため、詳細な Ca^{2+} 認識メカニズムの解明には至らなかった。 Mn^{2+} 及び Ca^{2+} 結合型 MgtE-TMD では、 Mg^{2+} 選択フィルター Asp432 とは異なる

箇所にも二価金属イオン結合部位が見出された。二価金属イオン結合部位が与えるイオン選択性への影響を調べるために、イオン結合部位を変異させた変異体 MgtE を調製し、liposome を用いた機能解析を行った。その結果、これらの結合部位が MgtE のイオン選択性に寄与することが明らかとなった。



図表 1.1

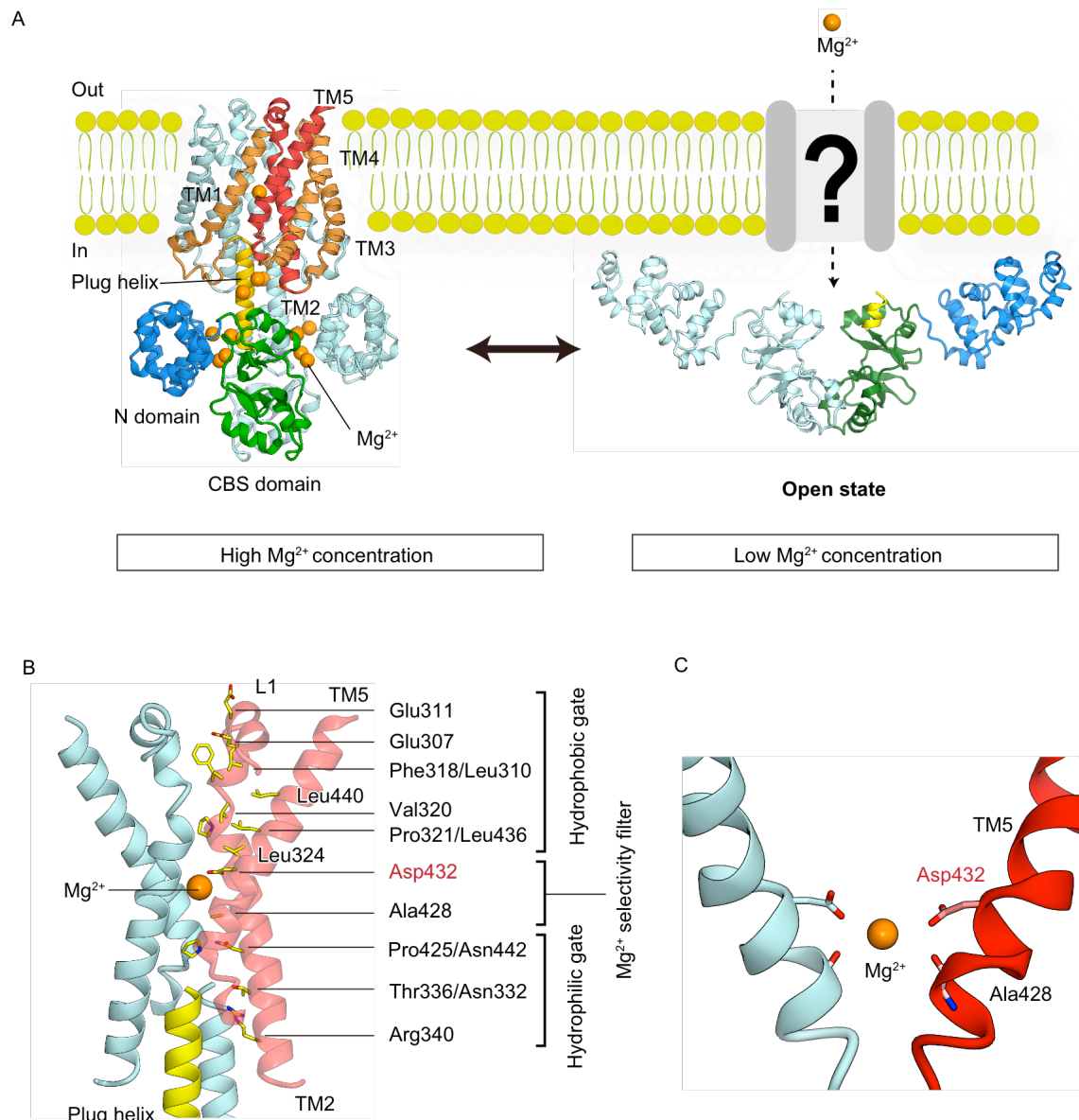
K⁺ channel KcsA (PDB ID : 1P7B), peptide transporter POT (PDB ID : 4IKV), Ca²⁺ pump SERCA (PDB ID : 4BEW) の結晶構造

Protein	Source	Membrane	TMs	Oligomeric state	Mechanism	Disease association
CorA	Prokaryotic	Plasma	10	(2 TMs × 5)	Channel	Virulence
MgtA/B	Prokaryotic	Plasma	10		P-type ATPase	Virulence
MgtC	Prokaryotic	Plasma				Virulence
MgtE	Prokaryotic	Plasma	10	(5 TMs × 2)	Channel	Virulence
MHX	Plants	Vacuole	11		Exchanger	
XNTA	Protozoan	Plasma	11		Channel	
ACDP	Eukaryotic	Plasma	4		Channel	UFS
Air1/2	Eukaryotic	Plasma	10	(2 TMs × 5)	Channel	
HIP14	Eukaryotic	Golgi	6		Channel	Huntington
Lep10/Mrs2	Eukaryotic	Mitochondria	4	(2 TMs × 5)	Channel	MDR
MagC1	Eukaryotic					
MMagT	Eukaryotic	Plasma	4		Channel	
MMgtE	Eukaryotic	Golgi	2		Channel	
Mnr2	Eukaryotic	Vacuole	10	(2 TMs × 5)		
NIPA	Eukaryotic	Plasma/endosomes	8–9	dimer	Channel	HSP
PCLN1/claudin	Eukaryotic	Tight junction	4	oligomer	Channel	HHN
SLC41 - A1	Eukaryotic	Plasma	11	pseudodimer	Exchanger?	
TRPM6	Eukaryotic	Plasma	24	(6 TMs × 4)	Channel	HSN
TRPM7	Eukaryotic	Plasma	24	(6 TMs × 4)	Channel	ALS, PD

図表 1.2

Mg²⁺ 輸送システムに寄与する Mg²⁺ 輸送タンパク質の概要²¹。Payandeh, J., Pfoh, R. & Pai, E. F. The structure and

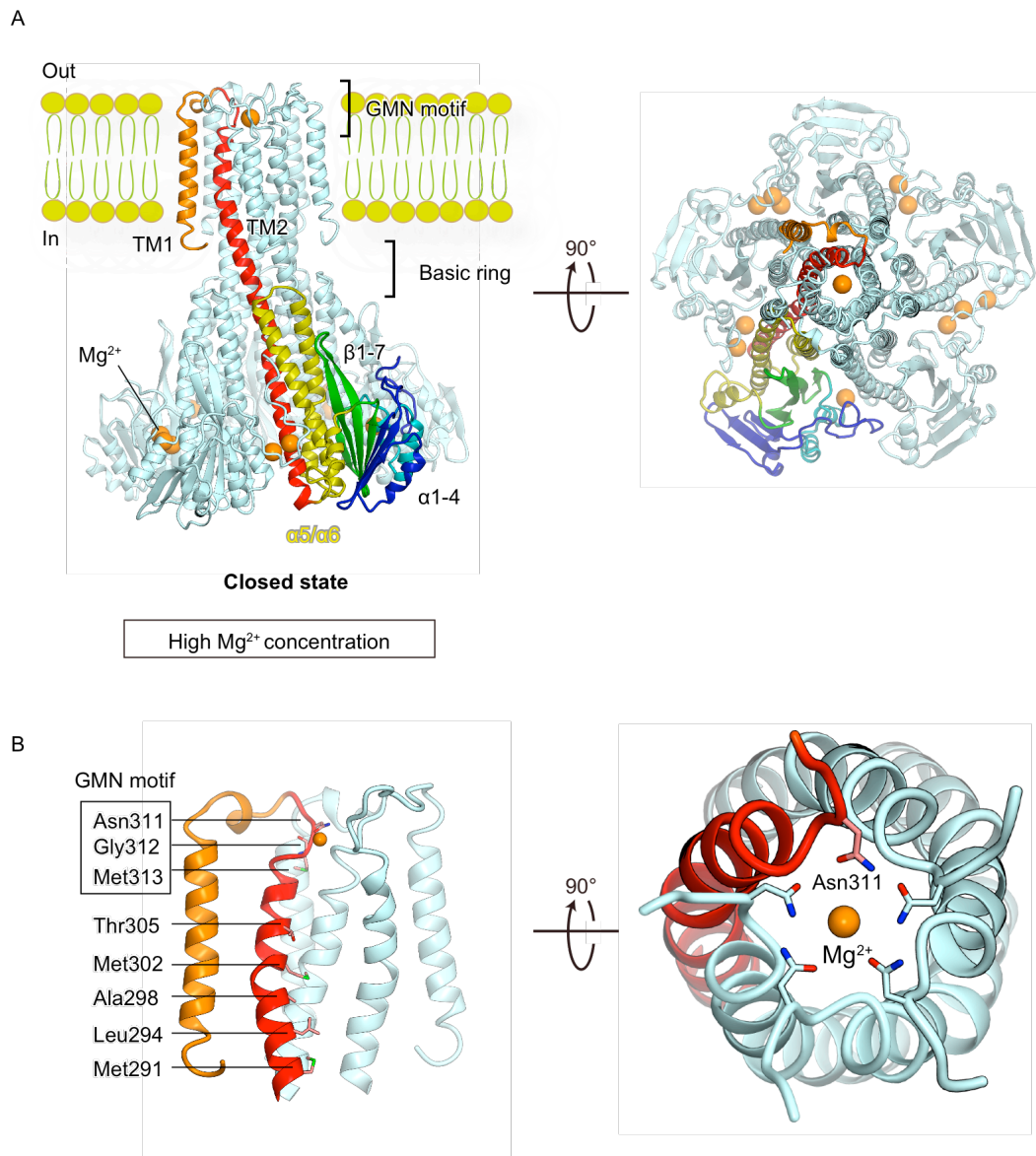
regulation of magnesium selective ion channels. Biochim. Biophys. Acta 1828, 2778-92 (2013). から転載



図表 1.3

Mg²⁺ チャンネル MgtE の結晶構造

(A) MgtE の Mg²⁺ 輸送メカニズム (PDB ID : 2ZY9, 2YVY). N domain を青、CBS domain を緑、plug helix を黄色、イオン透過孔を形成する TM2 及び TM5 を赤、その他の TM をオレンジ、もう片方のサブユニットを水色、Mg²⁺ をオレンジの球体で示す。(B) イオン透過孔の構造。イオン透過孔を形成する TM2 及び TM5 を赤、plug helix を黄色、片方のサブユニットを水色で記した。イオン透過孔の表面に位置するアミノ酸残基を表記した。(C) Mg²⁺ 選択フィルター Asp432 と Mg²⁺ の結合様式。Mg²⁺ と相互作用すると考えられるアミノ酸残基を表記した。配色は (B) と同様である。



図表 1.4

Mg^{2+} チャンネル CorA の結晶構造

(A) CorA の全体構造 (PDB ID : 4EV6). TM1 をオレンジ、TM2 を赤、 $\alpha 5/6$ を黄色、 $\beta 1-7$ を緑、 $\alpha 1-4$ を青、残りのサブユニットを水色、 Mg^{2+} をオレンジの球体で示す。(B) イオン透過孔の構造。イオン透過孔を形成する TM1 をオレンジ、TM2 を赤、残りのサブユニットを水色、 Mg^{2+} をオレンジの球体で示した。ここでは 5 つの内、3 つのサブユニットを示す。イオン透過孔の表面に位置するアミノ酸残基を表記した。 Mg^{2+} 選択フィルターである GMN モチーフを四角で囲った。

第2章 Mg^{2+} チャネル MgtE の Mg^{2+} 認識メカニズムの解明

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については非公開

第3章 Mg^{2+} チャネル MgtE の金属イオン選択機構の解明

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については非公開

第4章 総括

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られていないため、本章については非公開

5. 参考文献

1. Doyle, D. a. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
2. Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. & MacKinnon, R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43–48 (2001).
3. Kuo, A. *et al.* Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300**, 1922–6 (2003).
4. Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K channel. **423**, 33–41 (2003).
5. Cortes, D. M., Cuello, L. G. & Perozo, E. Molecular Architecture of Full-Length KcsA Role of Cytoplasmic Domains in Ion Permeation and Activation Gating. **117**, (2001).
6. Tereshko, V., Esaki, K., Fellouse, F. A. & Sidhu, S. S. Crystal structure of full-length KcsA in its. (2009).
7. Persson, I. Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? *Pure Appl. Chem.* **82**, 1901–1917 (2010).
8. Pavlov, M., Siegbahn, P. E. M. & Sandström, M. Hydration of Beryllium, Magnesium, Calcium, and Zinc Ions Using Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. A* **102**, 219–228 (1998).
9. Yatsimirskii, K. ELECTRONIC STRUCTURE, ENERGY OF HYDRATION, AND STABILITY OF METAL AQUO IONS. *Theor. Exp. Chem.* **30**, 1–9 (1994).
10. Jalilehvand, F. *et al.* Hydration of the calcium ion. An EXAFS, large-angle x-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 431–41 (2001).
11. Katz, A. K., Glusker, J. P., Beebe, S. A. & Bock, C. W. Calcium Ion Coordination: A Comparison with That of Beryllium, Magnesium, and Zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5752–5763 (1996).

12. Romani, A. & Scarpa, A. Regulation of cell magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 1–12 (1992).
13. Cowan, J. A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biomaterials* **15**, 225–35 (2002).
14. Selmer, M. *et al.* Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935–42 (2006).
15. Bennettw, P. M., Gratzew, W. B. & Unit, C. B. Effect of Magnesium Ions on Red Cell Membrane Properties. **257**, 251–257 (1990).
16. Hartwig, a. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat. Res.* **475**, 113–21 (2001).
17. Yang, W., Lee, J. Y. & Nowotny, M. Making and breaking nucleic acids: two-Mg²⁺-ion catalysis and substrate specificity. *Mol. Cell* **22**, 5–13 (2006).
18. Quamme, G. A. Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. (2010). doi:10.1152/ajpcell.00124.2009.
19. Li, F.-Y. *et al.* Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* **475**, 471–6 (2011).
20. Levi-montalcini, R. Active transport of magnesium in escherichia coli* by simon silver. 764–771 (1968).
21. Payandeh, J., Pfoh, R. & Pai, E. F. The structure and regulation of magnesium selective ion channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2778–92 (2013).
22. Yu, F. H. & Catterall, W. a. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci. STKE* **2004**, re15 (2004).
23. Townsend, D. E. *et al.* Cloning of the mgtE Mg 2 \mathcal{C} Transporter from *Providencia stuartii* and the Distribution of mgtE in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **177**, 5350–5354 (1995).
24. Smith, R. L., Thompson, L. J., Maguire, M. E. & Al, S. E. T. Cloning and Characterization of MgtE , a Putative New Class of Mg 2 \mathcal{C} Transporter from *Bacillus firmus* OF4. **177**, 1233–1238 (1995).
25. Moomaw, A. S. & Maguire, M. E. The unique nature of Mg²⁺ channel. *Physiology (Bethesda)*. 275–285 (2009).

26. Merino, S., Gav, R., Maguire, M. E. & Toma, J. M. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. **198**, 189–195 (2001).
27. Hattori, M., Tanaka, Y., Fukai, S., Ishitani, R. & Nureki, O. Crystal structure of the MgtE Mg²⁺ transporter. *Nature* **448**, 1072–1075 (2007).
28. Ishitani, R. *et al.* Mg²⁺-sensing mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE. **105**, 4–6 (2008).
29. Hattori, M. *et al.* Mg(2+)-dependent gating of bacterial MgtE channel underlies Mg(2+) homeostasis. *EMBO J.* **28**, 3602–3612 (2009).
30. Goytain, A. & Quamme, G. a. Functional characterization of the mouse [corrected] solute carrier, SLC41A2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 701–5 (2005).
31. Goytain, A. & Quamme, G. A. Functional characterization of human SLC41A1 , a Mg²⁺ transporter with similarity to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. **7000**, 337–342 (2005).
32. Kolisek, M. *et al.* Substitution p.A350V in Na⁺/Mg²⁺ exchanger SLC41A1, potentially associated with Parkinson's disease, is a gain-of-function mutation. *PLoS One* **8**, e71096 (2013).
33. Kolisek, M. *et al.* SLC41A1 is a novel mammalian Mg²⁺ carrier. *J. Biol. Chem.* **283**, 16235–47 (2008).
34. Mandt, T., Song, Y., Scharenberg, A. M. & Sahni, J. SLC41A1 Mg(2+) transport is regulated via Mg(2+)-dependent endosomal recycling through its N-terminal cytoplasmic domain. *Biochem. J.* **439**, 129–39 (2011).
35. Hmiel, S. P., Snavelly, M. D., Miller, C. G. & Michael, E. Magnesium Transport in *Salmonella typhimurium*: Characterization of Magnesium Influx and Cloning of a Transport Gene. **168**, 1444–1450 (1986).
36. Maguire, M. E. Hormonal regulation of magnesium uptake: differential coupling of membrane receptors to magnesium uptake. *Magnesium* **6**, 180–91 (1987).
37. Knoop, V., Groth-Malonek, M., Gebert, M., Eifler, K. & Weyand, K. Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TM-GxN proteins in the MIT superfamily. *Mol. Genet. Genomics* **274**, 205–16 (2005).
38. Worlock, A. J. & Smith, R. L. ZntB Is a Novel Zn²⁺ Transporter in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **184**, 4369–4373 (2002).

39. Bui, D. M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, a. & Schweyen, R. J. The Bacterial Magnesium Transporter CorA Can Functionally Substitute for Its Putative Homologue Mrs2p in the Yeast Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 20438–20443 (1999).
40. Deng, W. *et al.* Overexpression of an Arabidopsis magnesium transport gene, AtMGT1, in *Nicotiana benthamiana* confers Al tolerance. *J. Exp. Bot.* **57**, 4235–43 (2006).
41. Eshaghi, S. *et al.* Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution. *Science* **313**, 354–357 (2006).
42. Lunin, V. V *et al.* Crystal structure of the CorA Mg²⁺ transporter. *Nature* **440**, 833–7 (2006).
43. Pfoh, R. *et al.* Structural asymmetry in the magnesium channel CorA points to sequential allosteric regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18809–18814 (2012).
44. Dalmas, O., Sompornpisut, P., Bezanilla, F. & Perozo, E. Molecular mechanism of Mg²⁺-dependent gating in CorA. *Nat. Commun.* **5**, 3590 (2014).
45. Angeles, L. Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization. **93**, 14532–14535 (1996).
46. Misquitta, L. V *et al.* Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers. *Structure* **12**, 2113–24 (2004).
47. Cherezov, V. Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 559–66 (2011).
48. Caffrey, M. & Cherezov, V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat. Protoc.* **4**, 706–31 (2009).

6. 外部発表

【学会発表 (ポスター)】

1. Mg^{2+} channel MgtEのイオン認識メカニズムにおける構造基盤

日本蛋白質科学会2013年会

2013年6月25日~2013年6月27日 とりぎん文化会館 (日本)

2. Structural basis for the recognition of a fully-hydrated Mg^{2+} by the Mg channel MgtE.

Ligand Recognition and Molecular Gating

2014年3月24~2014年3月28日 ロサンゼルス (アメリカ)

3. Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg^{2+} channel MgtE

平成26年度 日本結晶学会年会

2014年11月1日~2014年11月3日 東京大学農学部 (日本)

【投稿論文】

1. “Structural basis for ion selectivity revealed by high-resolution crystal structure of Mg^{2+} channel MgtE. “

Nature Commu **5**, 5374 (2014)

Hironori Takeda, Motoyuki Hattori, Tomohiro Nishizawa, Keitaro Yamashita, Syed T. A. Shah, Martin Caffrey, Andrés D. Maturana, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki.

2. “Molecular mechanism of nitrate/nitrite antiport by NarK.”

Nature Commu , in revision.

Masahiro Fukuda, Hironori Takeda (equally author), Hideaki E Kato, Shintaro Doki, Koichi Ito, Ryuichiro Ishitani and Osamu Nureki.

6. 謝辞

本研究は東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻の濡木理教授の研究室で行われたものである。濡木教授には博士課程より研究室に受け入れてくださり、研究指導のみならず、進路の相談にのっていただき、大変感謝しております。石谷隆一郎准教授には研究を進める過程でたくさんのご指導とご助言を賜りました。また、論文の執筆においても大変感謝しております。研究室秘書の山崎枝子さんには事務手続きの面で大変お世話になりました。また、本研究は共同研究者である山下啓太郎博士、Martin Caffrey 教授、Syed T. A. Shah 博士、Andres D. Maturana 准教授のご協力のもと遂行されました。さらに、X 線回折実験の際は大型放射光施設 Spring-8 のスタッフの方々に大変お世話になりました。感謝申し上げます。最後にを応援するとともに温かく見守ってくださった家族に感謝申し上げます。