

## 原核生物・真核生物のイオン輸送系を統御する構造の探索

●魚住信之

名古屋大学生物機能開発利用研究センター

### 〈研究の目的と進め方〉

原核生物と真核生物の蛋白質の構造と機能において生物の種類を超えた共通性を見出すことは利用価値の高い知見となる。本研究をはじめ以前に我々は、大腸菌の原核細胞は真核細胞のイオン輸送体の機能解析系に利用できることを示した。このことは、真核生物の膜蛋白質を原核生物の大腸菌において、その構造と機能の解析をすすめることができることを示している。

膜蛋白質は、翻訳後生体膜に挿入するステップが存在する。本研究では真核生物由来膜蛋白質の構造と機能を解析することを示すことをもう一つの目標とした。膜蛋白質発現系は細菌、動物、植物の他に、無細胞系である小胞膜を使用するによって、生体膜への組込みに必要な情報の抽出を目標とすることにした。

さらに、原核生物と真核生物のホモロイオン輸送体を同時に両発現系で解析し、1つの輸送体を1つの発現系で調べたのでは得られない多角的情報の獲得を目指し、研究対象とするイオン輸送体の構造と機能の全体像にせまることも目的とした。細菌、動物、植物の由来の区別なくK<sup>+</sup>チャネル・K<sup>+</sup>トランスポーターに関する構造と機能解析を行い、アミノ酸配列から推定する手法ですすめることとした。

### 〈研究開始時の研究計画〉

らん藻(*Synechocystis* PCC6803)のKtr系輸送系、細菌のNa/Hアンチポーター、植物・動物の膜電位依存性イオンチャネルとHKT系を研究対象に解析した。イオンチャネルの膜電位センサーを担う構造の形成を解析した。

### 〈研究期間の成果〉

ポストゲノムシーケンス時代の課題の1つは遺伝子産物(蛋白質)の構造と機能の解明である。本研究において、イオン輸送体を研究対象にして、アミノ酸配列の情報からだけでは類推できない共通構造や機能の発見をめざした。KチャネルとHKT系のアミノ酸配列には相同性は見られないが、膜貫通構造を決定すると、両者のイオン選択孔を形成する構造は同じであった。さらに、このイオン選択孔に存在するアミノ酸について調べたところ、4つのイオン選択孔に存在するイオン選択性に重要な影響を与える残基が4カ所ともにGlyの時(小麦HKT1等の場合)は、K<sup>+</sup>を輸送しSerの場合(AtHKT1等の場合)はK<sup>+</sup>輸送活性がないことが分かった。Ktr/Trk/HKT系トランスポーターとK<sup>+</sup>チャネルの構造の類似性を示しており、Ktr/Trk/HKT系トランスポーターがK<sup>+</sup>チャネルから進化したことを示している。本研究において、大腸菌発現系で得られた結果と動物細胞発現系で得られた結果、無細胞系で得られた結果は一致したことから、原核生物と真核生物の由来に関係なく、膜蛋白質は正規の構造に組み込まれることがわかった。また、微生物、動物・植物のK<sup>+</sup>チャネル・Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>トランスポーターの構造、機能と生体膜への組込みに必須となるアミノ酸を明らかにして共通原理と規則性を明らかにした。さらに、膜蛋白質が

生体膜に組み込まれる様式を検討し、今まで明らかでなかった2つの膜領域が同時に挿入される様式の存在を示した。

Kato, Y. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 0111081306

植物AtHKT1(HKT系)のトポロジーを大腸菌発現系を用いて決定した。アルカリフォスファターゼ酵素をAtHKT1蛋白質の途中に挿入することにより、挿入箇所が生体膜に関して内なのか外に存在する箇所なのかを明らかにした。この結果が真核細胞でも同様であるかを明らかにするために、FLAG抗体認識部位を5カ所、糖鎖修飾部位を7カ所創出した後、動物の発現系およびイヌの膵臓由来の膜小胞を用いて検討した。この結果、大腸菌で決定したトポロジーとすべての点で一致しAtHKT1は8回膜貫通構造を有すること証明した。既に外国のグループが報告していたHKT1膜蛋白質が10回膜貫通構造とするモデルを修正することとなった。大腸菌で決定した膜蛋白質のトポロジーは真核細胞で決定した場合と完全に一致したことから大腸菌の膜蛋白質発現系の有効性が明らかとなった。また、AtHKT1はアフリカツメガエル卵母細胞では検出できないK<sup>+</sup>輸送能が大腸菌発現系では観察される。この理由としてAtHKT1に存在する一カ所のN型糖鎖修飾が関係している可能性があった。糖鎖非修飾に残基置換したAtHKT1変異蛋白質を卵母細胞で発現させてイオン電流を膜電位固定法で調べたところ糖鎖修飾はイオン選択性には関与しないことがわかった。このことから、大腸菌は酵母や動物細胞よりもK<sup>+</sup>の要求性が小さくAtHKT1は大腸菌のK<sup>+</sup>取込み活性欠損変異を相補できたと考えている。大腸菌はK感受性の高いイオン輸送体発現系であることが示され、酵母や動物の膜蛋白質発現系を補う膜蛋白質機能解析系としても有効であることが示された。

Sato, Y., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 0111081314

Kチャネル(KAT1)の親水性膜貫通領域はpost-translationalに小胞体膜に挿入されることを示し、以前の大腸菌で得られた結果と一致した。親水性膜貫通領域は隣の親水性膜貫通領域と相互作用をして生体膜に移行することがあることを見いだした。2つの膜貫通領域が同時に挿入される様式であることが分かった。これは新規の挿入機構である。膜電位依存性Kチャネルは、膜電位センサーを司る領域とイオン選択孔を司る領域は独立して生体膜に挿入されることが分かった。生体膜挿入機能を調べたところ、独立して挿入する機能が存在することを見いだした。

Uozumi, N. (2001) Am. J. Physiol. 0111081319

植物に存在する3種類のK輸送体(Kチャネル、KUP系、HKT系)が大腸菌において正しい構造を形成して生体膜に挿入され、機能の発現がおこり、構造解析を大腸菌のシステムを用いて行うことができることを示した。

Maser, P., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 0304232013

微生物・植物で広く発現しているHKT/Trk/Ktr系Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>トランスポーターの膜貫通構造を大腸菌や動物細胞に発現させて解析することにより明らかにした。HKT系(AtHKT1)のトポロジーから推定されるイオン透過孔に存在する特徴的なアミノ酸を置換し、NaとKの選択部位を決定したところ、AtHKT1のSer68とMet69がGlyとLeuに変換されることにより、K透過選択性に変換することが明らかとなった。4つのイオン選択孔に存在するイオン選択性に重要な影響を与える残基が4カ所ともにGlyの時(小麦HKT1等の場合)は、K<sup>+</sup>を輸送しSerの場合(AtHKT1等の場合)はK<sup>+</sup>輸送活性がないことが分かった。このことは、HKT/Trk/Ktr系トランスポーターとK<sup>+</sup>チャンネルの構造の類似性を示しており、HKT/Trk/Ktr系トランスポーターがK<sup>+</sup>チャンネルから進化したことを示している。NaとKの選択部位の決定は本輸送系の本質的でアイデアばかりではなく、あらゆるKの輸送系に必須のイオン選択孔の一般化に重要な知見となる。

Nakamura, T., (2001) J. Bacteriol. 0304232017

植物にも存在する細菌Na/H antiporterの膜貫通領域に存在するAspはHの透過には関与するがNaの透過には関与しないことを示した。Na/Hアンチポーターの生体膜領域にある酸性アミノ酸を他のアミノ酸に置換してもNaの輸送は維持されることが分かった。

Imai, K., (2002) J. Chromatography B. 0304232008

生体膜蛋白質や膜と結合している蛋白質の精製方法の一つを検討した。ヘパリンを担体として用いることによって、効果的に細胞中の蛋白質をSDSゲルで分離することが可能となった。

Maser, P., (2002) FEBS Letters. 0304232002

HKT系(AtHKT1)が耐塩性に関与していること変異株の解析から明らかにした。この輸送系を破壊すると、地上部である葉や茎の生育が阻害され、根の部位では阻害が検出できなかった。本輸送体の発現部位とNaを取り込む輸送体がどのようにして耐塩性を持つのかに興味もたれる。

Sato, Y., (2003) Biosci. Biotech. Biochem. 0304231956

膜電位依存性KチャンネルKAT1の膜貫通部位に存在する酸性アミノ酸のうち、膜電位センサー機能を担うアミノ酸を同定した。

Sato, Y., (2003) J. Biol. Chem. 0304231952

植物から動物に存在する膜電位依存性イオンチャンネルの膜電位センサーを担う構造の形成を解析した。S2に存在する2つの負電荷アミノ酸は、正電荷が数個存在するS4の生体膜への挿入と生体膜への維持に重要であることが分かった。膜電位センサーを構成する膜貫通領域に存在する電荷アミノ酸の静電荷の相互作用をするアミノ酸の組み合わせを明らかにした。これまで、電荷アミノ酸が膜電位センサーの機能として重要であることは示されていたが、本結果はそれらの電荷アミノ酸が膜への挿入に重要なことも示した。

Kato Y., (2003) Biosci. Biotech. Biochem. 0403261649

植物AtHKT1(HKT系)のN末端の細胞内領域とC末端の細胞内領域は短い。C末端の細胞内領域にレポーター蛋白質(GFP)やペプチド配列(FLAG)を付加した場合はイオ

ン輸送活性が阻害されたことから、C末端の細胞内領域が短いことが構造維持に必須であることが分かった。

Umigai, N., (2003) J. Biol. Chem. 0403261634

原核生物と真核生物に広く存在するKチャンネルの中で最小限の単位である2回膜貫通型Kチャンネルの生体膜への挿入様式を調べた。高い疎水性を有するイオン選択孔を形成する領域には、膜へ挿入するための能力はないことが明らかとなった。この性質は、イオンチャンネルに共通する性質と考えられた。

Zhang, L., (2004) J. Biol. Chem. 0403261719

動物G蛋白質調節型KチャンネルのGIRKは機械受容性チャンネルであるがその性質がチャンネル蛋白質のどこに依存しているのかは不明であった。本研究でC末端細胞内領域のPIP2結合領域が機械受容性に関与して、PKCがその調節に関係することが分かった。このようなC末端の構造の共通性からその他のイオンチャンネルにおいても調節領域として同定することが可能となった。

Matsuda, N., (2004) J. Biol. Chem. 0504081740

ラン藻(Synechocystis sp. strain PCC 6803)のHKT/Trk/Ktr系Na/Kトランスポーターにおいて、KtrBのイオン選択孔を形成する膜蛋白質と、KtrA蛋白質と他の生物のホモログ輸送体からは見いだされていない細胞質因子KtrEが必須であることを見いだした。Ktr系はCCCPの添加で阻害され、H駆動力のない変異株に発現させると輸送活性が検出できなかったことから、H駆動力がKtr系輸送体に関与することが示唆された。また、ラン藻に高浸透圧ストレスを与えるとKの流出が起こり、そのK流出を補うKの取込みに関与して、浸透圧変化に適応するのに必須なK取込み系として機能していることが明らかとなった。らん藻Ktr系の破壊株のイオン輸送機能を野生株と比較した。らん藻の破壊株のK輸送は減少していることが分かった。また、本輸送系はNaに強い依存性があるが、Naの輸送活性はほとんど見いだせなかった。また、pHは中性付近で最も輸送活性が高いが、プロトンイオノフォアの添加で輸送活性が阻害されたことから、プロトン駆動力が必須であることが明らかとなった。

Tholema, N., (2005) J. Biol. Chem. 0601201901

Ktr/HKT系イオントランスポーターのイオン選択に関与するアミノ酸の4つのGlyは90度方向からイオン透過孔を形成する。この形は、Kチャンネルが4量体で1つのイオン選択孔を形成しているのと同じ構造である。植物のAtHKT1はそのうち一つがSerになっているが、細菌のKtrBは4アミノ酸ともにGlyである。Serを導入してGlyと置換した場合のイオン選択性への影響を検討した。4箇所のGlyのうち一箇所をSerに置換すると、Naの透過性が検出された。もともたもっているKの透過性は失われていなかった。このNaの透過性についてはAtHKT1を再現しているが、K輸送活性が維持されていることはAtHKT1には見られない性質である。また、4箇所のGly/Serは等価であることが明らかとなった。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

真核細胞由来の膜蛋白質の解析法の開発：真核生物由来の膜蛋白質の構造と機能の解析に大腸菌を膜蛋白質発現用の宿主とすることは以下の特色と意義がある。1) 酵母や動物細胞の発現系では膜蛋白質は細胞内小器官の膜のみに移行して原形質膜に発現しないことがあるが、

原核生物の大腸菌を宿主とすればその膜蛋白質は原形質膜のみに発現する。2) 大腸菌の内在水イオン輸送系をノックアウトしたバックランド活性の低い発現系が利用できる。3) 大腸菌の大量培養により安価で迅速に膜蛋白質を供給することが可能である。以上のように大腸菌発現系は簡便性・迅速性を備えており、真核生物の膜蛋白質の機能解析を格段に加速する。本研究で検証された大腸菌を宿主とする膜蛋白質の発現方法に関する手法は、植物のKUP/HAK系Kトランスポーターの輸送活性検出法として使用されるようになった。

イオン輸送体の進化的に保存された共通構造の解明：微生物から高等生物に共通して存在する3種類のK<sup>+</sup>輸送体のうちKtr/HKT系トランスポーターとKチャンネルの膜貫通基本構造が同じであり、進化的に保存されていることを明らかにした。また、大腸菌の細胞外のみで活性を有するアルカリフォスファターゼ(PhoA)を用いた膜蛋白質との融合法で膜貫通部位を決定した。さらにこの構造結果は真核生物においても同一であることを確認した。さらに、構造結果を元に、検証を加えK輸送体の進化上保存されている膜貫通構造を明らかにして、アミノ酸配列からでは推定が難しかったイオン選択部位(孔)が同定された。ポストゲノムシークエンス時代の課題の一つの膜蛋白質の膜構造と機能において、実験結果によって新たに解明されるアミノ酸配列情報のみでは見いだせない、共通性のある構造があることが示された。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

各々の膜貫通部位の決定方法には長所と短所の両方が備わっており、複数の方法で構造決定の信頼性を高めて結論を出す必要があることがわかった。また、各々の手法において使い分けの基準を示すことが必要である。

植物のKUP系輸送体のトポロジーの決定は、大腸菌を宿主とする場合、蛋白質発現量が非常に少ないため、信頼性の高い結果を得ることが出来なかった。このため、大腸菌のKUP系輸送系を用いて構造決定を試みる。KUP系輸送系の膜貫通構造を形成するのにかしないのか明確に結論できない領域があった。動的な領域とも考えられるが、最終構造の決定は更なる実験結果の積み重ねが必要であると考えられる。

#### 〈今後の課題〉

KチャンネルとHKT:Ktr系トランスポーターにおいてアミノ酸配列においてお互いの相同性は低い。また、膜貫通予測ではお互いの膜貫通構造は一致しない。しかし、本研究で実験的に検討したところ、両者の膜蛋白質の膜貫通構造は同じであり、イオン選択に関与するアミノ酸においても共通性があることが明らかとなった。今後、実験結果に基づいてさらにバイオインフォマティクスが発展すると思われるが、その発展は実験結果の蓄積が支え、情報処理と実験結果による情報が螺旋系を描きながら進展すると思われる。両者がバランスをとりつつ進展することが必要と思われる。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文 (査読付きのもののみ)

Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., Sato, Y., Goshima, S., and Uozumi, N. (2001) Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 protein, a

member of the superfamily of K<sup>+</sup> transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98, 6488-6493. 0111081306

Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2002) Integration of Shaker-type K<sup>+</sup> channel, KAT1 into the endoplasmic reticulum membrane: Synergistic insertion of voltage sensing segments, S3-S4 and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99, 60-65. 0111081314

Uozumi, N. (2001) E. coli as an expression system for K<sup>+</sup> transport systems from plants. Am. J. Physiol. 281, C733-C739. 0111081319

Maser, P., Hosoo, Y., Goshima, S., Horie, T., Eckelman B., Yamada, K., Yoshida, K., Bakker, E.P., Shinmyo, A., Oiki, S., Schroeder, J. I., and Uozumi, N. (2002) Glycine residues in potassium channel-like selectivity filters determine potassium selectivity in four-loop-per-subunit HKT transporters from plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99, 6428-6433. 0304232013

Nakamura, T., Fujisaki, Y., Enomoto, H., Nakayama, Y., Takabe, T., Yamaguchi, N., and Uozumi, N. (2001) Residue aspartate-147 from the third transmembrane region of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter NhaB of *Vibrio alginolyticus* plays a role in its activity. J. Bacteriol., 183, 5762-5767. 0304232017

Imai, K., Iida, T., Takano, Y., and Uozumi, N. (2002) Membrane-bound heparin binding proteins from HL-60 cells purified in a 2-step affinity chromatography differentially eluted with divalent cations. J. Chromatography B, 780, 1-12. 0304232008

Maser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Fairbain, D. J., Kubo, M., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Nishimura, M., Uozumi, N., Robertsin, W., Sussman, M. R., and Schroeder, J. I. (2002) Altered shoot/root Na<sup>+</sup> distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na<sup>+</sup> transporter AtHKT1. FEBS Letters, 531, 157-161. 0304232002

Sato, Y., Hosoo, Y., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2003) Requirement of negative residues, Asp 95 and Asp 105, in S2 on channel function and membrane integration of voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, KAT1 Biosci. Biotech. Biochem., 67, 923-926. 0304231956

Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2003) Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K<sup>+</sup> channel, KAT1. J. Biol. Chem., 278, 13227-13234. 0304231952

Kato Y., Hazama A., Yamagami M., and Uozumi N. (2003) Addition of a peptide tag at the C terminus of AtHKT1 inhibits its Na<sup>+</sup> transport. Biosci. Biotech. Biochem., 67, 2291-2293. 0403261649

Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2003) Topogenesis of two transmembrane type K<sup>+</sup> channels, Kir 2.1 and KcsA. *J. Biol. Chem.*, 278, 40373-40384. 0403261634

Zhang, L., Lee, J-K., John, S. A., Uozumi, N., Kadama, I. (2004) Mechanosensitivity of GIRK channels is mediated by PKC-dependent channel-PIP2 interaction. *J. Biol. Chem.*, 279, 7037 - 7047. 0403261719

Matsuda, N., Kobayashi, H., Katoh, H., Ogawa, T., Futatsugi, L., Nakamura, T., Bakker, E.P., and Uozumi, N. (2004) Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup> uptake Ktr system from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its role in the early phases of cell adaptation to hyperosmotic shock. *J. Biol. Chem.*, 279, 54952-54962. 0504081740

Tholema, N., vor der Bruüggen, M., Mäser, P., Nakamura, T., Schroeder, J.I., Kobayashi, H., Uozumi, N., and Bakker, E.P. (2005) All four putative selectivity filter glycine residues in KtrB are essential for high affinity and selective K<sup>+</sup> uptake by the KtrAB system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 280, 41146-41154. 0601201901

#### 4) 総説・著書

Uozumi, N., Kato, K., Matsuda, N., Sato, Y., Mizutani, A. (2002) Structure and function of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> translocating AtHKT1 transporters from plants. *Recent Research Developments in Membrane Biology. Research Signpost* 119-126

水谷昭文、佐藤陽子、松田信行、加藤靖浩、魚住信之 (2003) 植物カリウムイオン輸送系と生理的役割。(植物の膜輸送システム ポンプ・トランスポーター・チャンネル研究の新展開 編者 加藤潔、島崎研一郎、前島正義、三村徹郎) 植物細胞工学別冊18 秀潤社 40-47

佐藤陽子、水谷昭文、魚住信之 (2003) K<sup>+</sup>イオン輸送系の植物成長と塩感受性への役割 (植物の代謝コミュニケーション 植物分子生理学の新展開 編者 杉山達夫、水野猛、長谷俊治、齊藤和季) 蛋白質核酸酵素増刊号48(15) 共立出版 2052-2060

Ibuki T., Tokida Y., Matsuda N., Czempinski K., Muller-Roeber B., Ona T., and Uozumi N. (2004) Characterization of potassium channels from *Arabidopsis thaliana*. 167-169 In T. Ona (ed.) *Improvement of forest resources for recyclable forest products*. Springer

Uozumi N. (2004) Large-scale production of hairy root 75-105 In T. Kobayashi (ed.) *Recent progress of biochemical and biomedical engineering in Japan II*. Springer

魚住信之 K<sup>+</sup>チャンネルの膜挿入様式とイオン透過孔の保存性 (2004) 生化学 76 449-452

魚住信之 (2005) 膜電位依存性Kチャンネル (イオンチャンネル) 最前線update 倉智嘉久) 別冊・医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 76-81