

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06879

研究課題名(和文) 穀物アクアポリンのケイ酸取り込み機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of silicic acid uptake by grain silicic acid channel

研究代表者

齊藤 恭紀 (Saitoh, Yasunori)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・特任助教

研究者番号：10808786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケイ素は土壤中に多く含まれる元素で、イネやトウモロコシ、オオムギ等の重要な穀物の生育や生産性を左右する。穀物はケイ素を土壤中から取り込むことで、生物的・非生物的ストレスに対して耐性を獲得しているため、ケイ素を取り込む仕組みの理解は穀物の頑健性や生産性の向上に大きく寄与すると期待されている。本研究課題では、ケイ素の取り込みを担っているケイ酸チャネルの構造を原子レベルで解明し、ケイ素取り込みの原子基盤を明らかにすることを目的とした。本研究を通して、ケイ酸チャネルの構造を原子レベルで解明することができ、これまでに全く予想されていなかったケイ酸輸送に重要なアミノ酸残基等を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を通して、世界で初めて穀物のケイ酸チャネルの詳細な構造を明らかにすることが出来た。これにより、穀物の生育および生産性を左右するケイ素の取り込み機構を詳細に理解することが出来るようになったので、穀物の生育および生産性を以前よりも効率よく向上させることが可能となった。また、ケイ酸を輸送する膜タンパク質の構造はこれまでに報告例がないため、輸送基質の選択性がどのようにして発揮されているのかという点について新しい知見を提供できる極めて重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Silicon is an element abundantly contained in the soil, and influences the growth and productivity of important grains such as rice, corn and barley. Grains acquire resistance to biotic and abiotic stress by uptake of silicon from the soil, so it is expected that understanding of silicon uptake mechanism will greatly contribute to improving the robustness and productivity of grains. In this research project, I aimed to elucidate the structure of silicic acid channel responsible for silicon uptake at atomic level and clarify the atomic basis of silicon uptake. Through this research project, I was able to elucidate the structure of silicic acid channel at the atomic level, and identified amino acid residues that are important for silicic acid transport. These amino acids were never predicted from previous knowledge so far.

研究分野：構造生理学

キーワード：穀物 膜タンパク質 膜輸送体 チャンネル アクアポリン X線結晶構造解析 ケイ酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Si は土壌において最も豊富に存在するミネラルであり、多くの植物が相当量の Si を含有している (Epstein *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci U S A.*). 中でも世界三大穀物であるイネ、トウモロコシ、コムギが属するイネ目の植物は高い Si 含有率であることが知られており、我々の主食とするイネはその乾燥重量の約 10% にまで Si を取り込むことができる (Hodson *et al.*, 2005, *Annals of Botany*). この Si 含有量は、栽培植物中に豊富に含まれる必須元素、窒素・カリウム・ナトリウムよりも多い (Epstein *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci U S A.*). イネの根から取り込まれた Si は細胞壁中に SiO_2 の形で沈着し、物理的障壁として機能する。これにより、イネの組織は頑丈になり、倒伏や干ばつ、病原菌や害虫等への耐性も向上する (Ma and Yamaji, 2015, *Trends Plant Sci.*). すなわち、イネにおける Si の取り込みはイネの頑健性や生産性と直結しており、それゆえ多くの研究者の関心を集めてきた (Epstein *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Tamai, 2003, *New Phytologist.*). そのような中、岡山大学の馬らは、土壌中から Si を取り込むイネの Si チャネル、Low silicon rice 1 (Lsi1) を世界に先駆けて同定した (Ma *et al.*, 2006, *Nature*). この Lsi1 は分子量 32 kDa の膜タンパク質で、水チャネルのアクアポリンファミリーに属している。Lsi1 は根の外皮細胞および内皮細胞の頂端膜側に局在しており、浸透圧を駆動力として Si を Si(OH)_4 の形で取り込む。イネはこの Lsi1 と他の Si 輸送体を協同的に機能させることで、Si を土壌から中心柱まで運んでいる (Ma *et al.*, 2007, *Nature*; Yamaji *et al.*, 2008, *Plant Cell*; Ma and Yamaji, 2015, *Trends Plant Sci.*) (図 1).

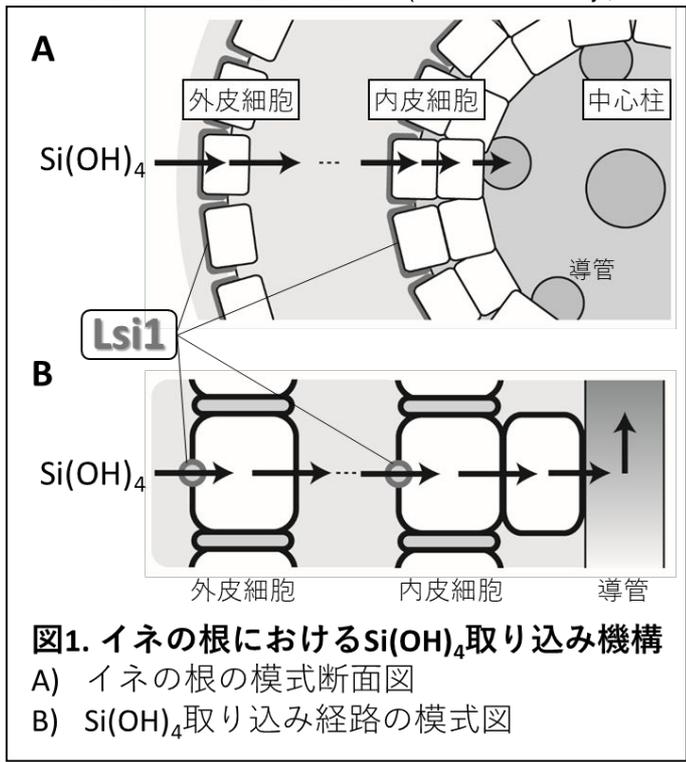


図1. イネの根における Si(OH)_4 取り込み機構
A) イネの根の模式断面図
B) Si(OH)_4 取り込み経路の模式図

Lsi1 は植物のアクアポリンの中で NIP (Nodulin 26-like Intrinsic Protein) サブファミリーに分類される。さらに、アミノ酸配列の類似性から NIP ファミリーは 3 つのサブグループ、NIP-I, NIP-II, NIP-III に分類されており、Lsi1 は NIP-III に属する。この NIP-III サブグループに分類される遺伝子群はケイ酸を透過することが確認されており、アクアポリンファミリータンパク質の研究から明らかになっている基質選択フィルター部分を構成すると予測されるアミノ酸残基の組み合わせが特徴的である (Mitani *et al.*, 2008, *Pflügers Arch.*). この基質選択フィルター部分を構成すると予測される残基は、他のアクアポリンファミリータンパク質と比べて小さいので、Lsi1 の基質選択フィルターは他のアクアポリンファミリータンパク質よりも大きくなっているのではないかと考えられている (Mitani *et al.*, 2008, *Pflügers Arch.*). アクアポリンファミリータンパク質の基質選択性は、主にこの基質選択フィルター部分と、NPA 領域と呼ばれるアクアポリンファミリーで良く保存されている部位によって決まっていると考えられている。しかしながら、同じ NIP ファミリーに属する亜ヒ酸チャネル、AtNIP5;1 の選択フィルターおよび NPA 領域のアミノ酸残基を Lsi1 のものに変えた AtNIP5;1 変異体はケイ酸を輸送しなかった。逆に、Lsi1 の基質選択フィルター部分を AtNIP5;1 のものに変えた Lsi1 変異体はケイ酸も亜ヒ酸も輸送しなかった (Mitani-Ueno *et al.*, 2011, *J Exp Bot.*). これより、既知の基質選択フィルター以外の部分が Lsi1 のケイ酸輸送に重要であると考えられてきていた。穀物における Si 輸送の制御に貢献すると期待される事から、ケイ酸チャネルがどのようにして Si(OH)_4 を透過させているのかについて興味を持たれているが、そもそも Si(OH)_4 を透過する膜タンパク質は全く構造解析例がなく、未知である。ケイ酸チャネルはアクアポリンファミリーに属することからアクアポリンと共通したフォールディングであると予想される。しかし、 Si(OH)_4 を透過する選択性については、これまでに構造解析されたアクアポリンの構造情報からは説明できないため (Ma and Yamaji, 2015, *Trends Plant Sci.*)、ケイ酸チャネルの詳細な構造を明らかにして基質選択性の機構を理解できるようにする必要がある。

2. 研究の目的

アクアポリンファミリーに属していながら Si(OH)_4 を通すという穀物由来のケイ酸チャネルのユニークな機構を原子レベルで解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ケイ酸チャネルのX線結晶構造解析を行い、原子レベルでその構造を明らかにすることを旨とした。得られた構造と既知のアクアポリンファミリータンパク質の構造を比較して、ケイ酸チャネルが $\text{Si}(\text{OH})_4$ を透過する機構を構造学的視点から原子レベルで明らかにする。

ケイ酸チャネルの大量発現は昆虫細胞発現系を用いて行った。いくつかのケイ酸チャネルの溶液中の挙動を、蛍光検出ゲル濾過クロマトグラフィー法 (Kawate and Gouaux, 2008, *Structure*)を用いて効率的に調べ、構造解析に適していると考えられるものを選別した。様々な条件を検討し、ケイ酸チャネルを安定的に純度良く精製する精製系を確立した(図2)。

膨大な結晶化条件のスクリーニングによってケイ酸チャネルの結晶を得たが、結晶の質が悪かったので、ケイ酸チャネルに変異導入を行い、結晶の質を向上させた(図3)。

また、結晶化後の処理条件もスクリーニングを行い、ケイ酸チャネルの結晶の質を損なわないように改良を重ねた。大型放射光施設SPring-8にて、ケイ酸チャネルの結晶を使ってX線回折データを収集した。得られた回折データセットを用い、分子置換法によって電子密度マップを計算して分子モデルを構築した。得られた分子モデルから、ケイ酸輸送に重要と思われるアミノ酸残基を見出し、そこに変異導入を行った。新たに確立した効率の良いケイ酸輸送活性測定系を用いて変異体のケイ酸輸送活性を測定することで、そのアミノ酸残基の重要性を調べた。

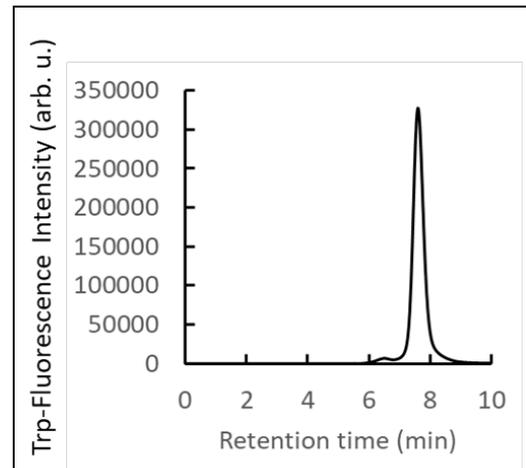


図2. 精製したケイ酸チャネルを蛍光検出ゲル濾過クロマトグラフィーで分析した結果.

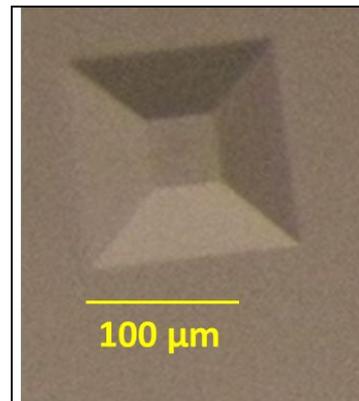


図3. ケイ酸チャネルの結晶.

4. 研究成果

構造解析に適したケイ酸チャネルを効率的にスクリーニングし、構造解析に適していると考えられるケイ酸チャネルを見出した。このケイ酸チャネルの精製系を確立し、ケイ酸チャネルの結晶化に成功した。様々な試行錯誤を重ねてケイ酸チャネルの結晶の質を向上させ、X線結

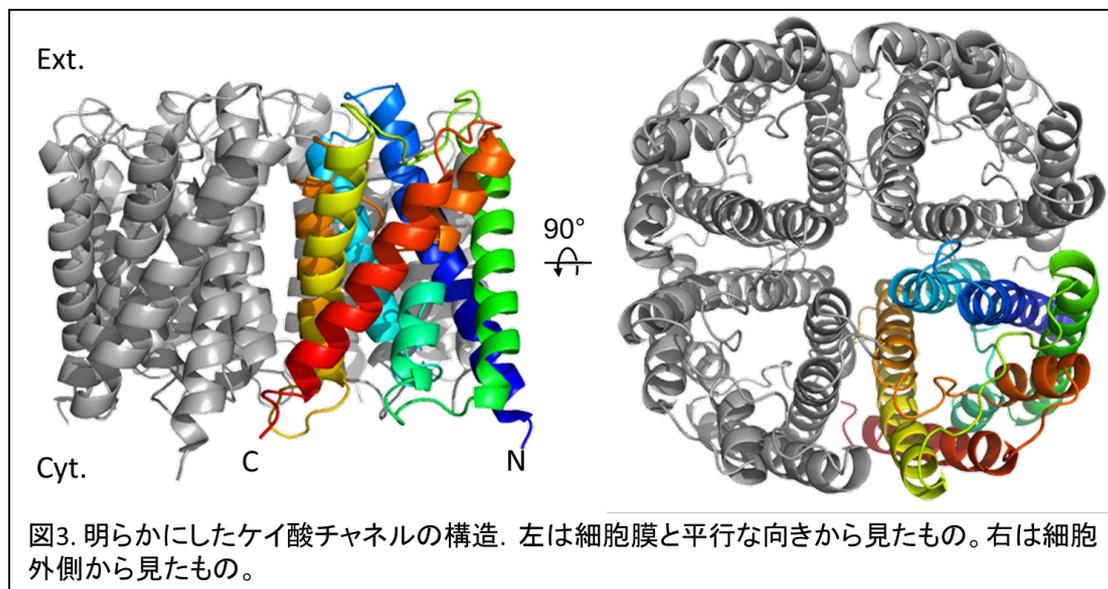


図3. 明らかにしたケイ酸チャネルの構造. 左は細胞膜と平行な向きから見たもの。右は細胞外側から見たもの。

晶構造解析を行うことで、世界で初めてケイ酸チャネルの構造を原子レベルで明らかにした(図4)。

得られた構造から、穀物のケイ酸チャネルは、これまでに報告されているアクアポリンファミリータンパク質とは膜貫通ヘリックスの傾きが異なっていることが明らかとなった。これにより、基質選択性を担っているフィルター部に変化が表れていた。ケイ酸チャネルの基質選択フィルター部を構成するアミノ酸残基は、他のケイ酸を輸送しないアクアポリンファミリータンパク質とは異なることが確かめられた。ケイ酸チャネルの機能を効率よく調べるために、昆虫細胞発現系を用いたケイ酸輸送活性を迅速に行う測定系を開発した。ケイ酸チャネル間で保存されていて、ケイ酸の透過経路にあるアミノ酸残基に変異を導入して、新規ケイ酸輸送活性測定系でケイ酸輸送活性を調べたところ、野生型よりもケイ酸輸送活性が下がっていたので、これらのアミノ酸残基とケイ酸との相互作用がケイ酸輸送に重要であると結論できた。この研究課題を行うことで、穀物のケイ酸チャネルのケイ酸透過機構について理解が深まり、アクアポリンファミリーの基質選択性に寄与する新たな領域を示すことができた。これにより、ケイ酸透過能を向上させたケイ酸チャネルを、これまでに比べてより合理的に作製することが可能になったので、ケイ酸吸収能が高くなったストレス耐性の高い穀物を作出することにつながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yasunori Saitoh, Kengo Matsuki, Shin-Ichiro Yonekura, Lingli Yang, Namiki Mitani-Ueno, Naoki Yamaji, Jian-Ren Shen, Jian Feng Ma, ○Michihiro Suga, Structure of a silicon transporter in plant, 第60回日本植物生理学会年会, 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。