

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16056

研究課題名(和文) 穀物由来ケイ酸チャネルの基質選択機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of high selectivity of a crop silicon 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) 3,300,000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等の重要な穀物の生育や生産性を左右する。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。本研究課題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透過に重要なアミノ酸残基等を明らかにすることができた。得られたケイ酸チャネルの構造に基づいて、ケイ酸チャネルの機能解析や計算機シミュレーションを行うことで、どのようにしてケイ酸がケイ酸チャネル内を通過していくのかを詳細に理解することができるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

穀物のケイ酸チャネルを働けなくすると、イネは様々なストレスに弱くなり、米の収量が通常の10分の1にまで低下します。また、ケイ酸チャネルは有毒なヒ素の取り込み経路でもあることが示されてきました。そのため、ケイ酸チャネルの基質透過機構を詳細に理解して、より頑健で、有害なヒ素を取り込まない安全なイネを作出しようという流れがありました。しかし、ケイ酸チャネルの構造は未知であり、詳細な基質透過機構は不明でありました。本研究課題でケイ酸チャネルの詳細な構造を解明することに成功し、その基質透過機構を詳細に理解できるようになりました。この知見を活用し、頑健で安全なイネの作出が進むと期待されます。

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 etc. 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 and water molecules that are important for silicic acid permeation. These amino acids were never predicted from previous knowledge so far. Based on the structure, functional analysis and computer simulations of silicic acid channel have been carried out to understand in detail how silicic acid passes through the channel. As a result, the substrate permeation mechanism of silicic acid channel can be understood in detail.

研究分野：構造生理学

キーワード：穀物 膜タンパク質 チャネル ケイ酸 アクアポリン X線結晶構造解析 ストレス耐性 基質選択性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ケイ素 (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科の植物は高い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SiO₂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、岡山大学の馬博士らは、土壌中からSiを取り込むイネのSiチャンネル、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、水チャン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

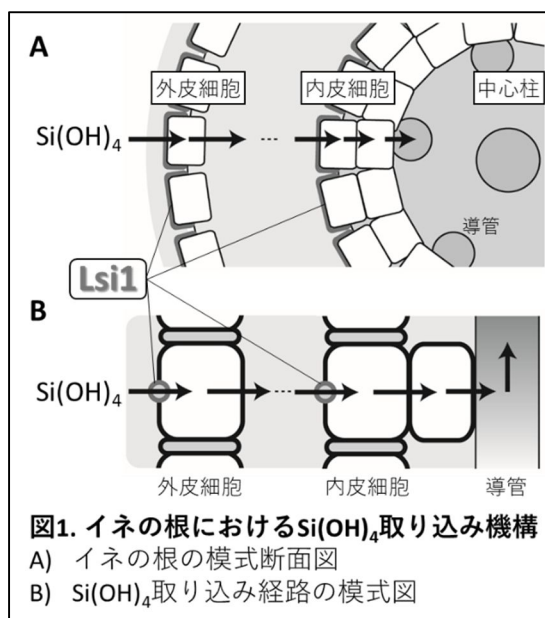


図1. イネの根におけるSi(OH)₄取り込み機構
A) イネの根の模式断面図
B) Si(OH)₄取り込み経路の模式図

動力としてSiをSi(OH)₄の形で細胞内に取り込む。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)。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。NIPサブファミリーはさらに、アミノ酸配列の類似性から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, *Pflugers Arch.*)。この基質選択フィルター部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, *Pflugers 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ンネル、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、ケイ酸チャン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。ケイ酸チャン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.*)、ケイ酸チャン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。

研究代表者はこれまでに、科学研究費助成事業、研究活動スタート支援(17H06879)の支援の下、穀物由来のケイ酸チャンネルの構造を解明し、ケイ酸チャンネルに特有の基質透過フィルターを明らかにしてきた。しかしながら、得られた構造の分解能が高くなく、ケイ酸チャンネルの詳細な基質選択機構は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、イネのケイ酸チャンネルの基質選択機構を原子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではケイ酸チャンネルの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。そのために、課題申請時に3.5 Å分解能を与えるケイ酸チャンネル結晶の質を向上させる必要があった。下記の方法を試し、ケイ酸チャンネルの結晶の質の改良を行った。

【熱安定性の向上】

結晶性の改善のためには、ケイ酸チャンネルの熱安定性の向上が有効であることがこれまでの研究で明らかになっていたので、脂質の添加や変異導入によってさらなる熱安定性の向上を図った。変異導入は膜貫通ヘリックス間のパッキングに寄与しているアミノ酸残基を中心に行った。熱安定性の測定には迅速に評価ができる蛍光検出ゲル濾過クロマトグラフィー法による熱安定性測定法 (Hattori *et al.*, 2012, Structure) を用いた。変異を導入したケイ酸チャンネルの基質透過能は昆虫細胞発現系とカエルの卵母細胞を用いた機能解析系により評価した。

【結晶パッキングの改良】

低分解能構造の結晶パッキングに関わる残基を見出し、それらに変異導入を行って結晶性の向上を目指した。

大型放射光施設SPring-8のビームラインにて改良したケイ酸チャンネル結晶のX線回折データを収集し、これを基に分子置換法を行い、ケイ酸チャンネルの構造を解明した。

【Lsi1の基質透過能の解析】

Lsi1の構造から見出した基質透過に重要だと考えられるアミノ酸残基に変異を持つLsi1変異体を作製し、それらの基質透過能を測定して、基質透過に重要な相互作用を特定した。基質透過能の測定は、Lsi1を発現させた昆虫細胞あるいはカエルの卵母細胞に基質を取り込ませ、誘導結合プラズマ質量分析計によってSiもしくはAsを定量するという新たに開発した方法で行った。さらに、特定したケイ酸透過に重要なLsi1のアミノ酸残基をグリセロールチャンネルに与えることで、ケイ酸透過能を獲得するかどうかを調べた。

【Lsi1と類似タンパク質との構造比較】

Lsi1 と構造が似ているタンパク質の比較を行い、Lsi1 との共通点と相違点を探った。

【分子動力学的シミュレーション】

Lsi1 のチャンネル内にケイ酸が浸透するかどうか、水分子がどのようにケイ酸チャンネルを透過するのかを明らかにするために分子動力学的シミュレーションを行った。

上記から得られた知見を総合して Lsi1 の基質選択機構を考察した。

4. 研究成果

本研究では、ケイ酸チャンネルの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目指した。これまでに得られていたケイ酸チャンネルの結晶パッキングの情報等を元にして、さらなる結晶化条件と結晶化コンストラクトの改良を行った。その結果、結晶パッキングが変わった棒状のケイ酸チャンネル結晶を得ることができ、1.8 分解能の回折データセットを取得した(図2)。

この結晶はlattice

translocation defectと呼ばれる結晶の障害を持っており、構造解析に苦労したが、回折データを補正することで、1.8 分解能

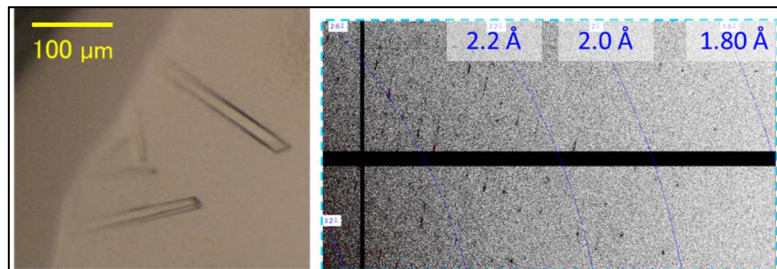


図2. ケイ酸チャンネルの結晶とそのX線回折像。

でケイ酸チャンネルの構造を決定することに成功した(図3)。分解能の大幅な向上によって、

ケイ酸チャンネルを構成するアミノ酸残基とチャンネルと相互作用している水分子等を明確に可視化することができた。ケイ酸チャンネル内の一番狭い部分である基質選択フィルター部分を、構造が良く似て

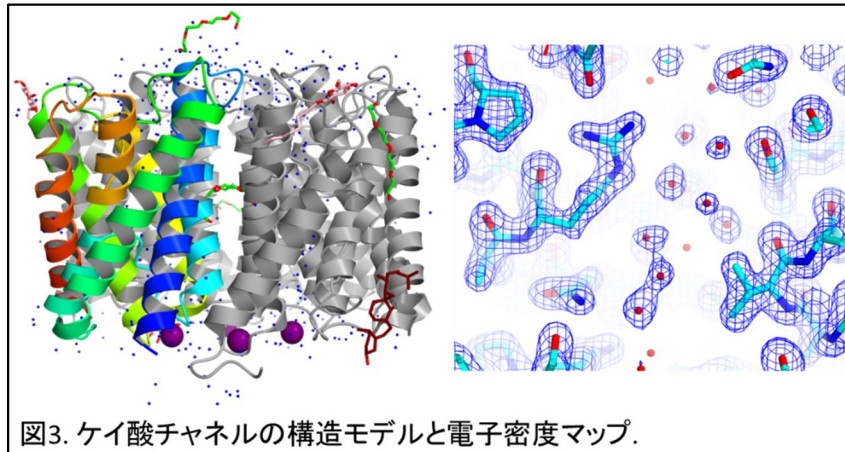
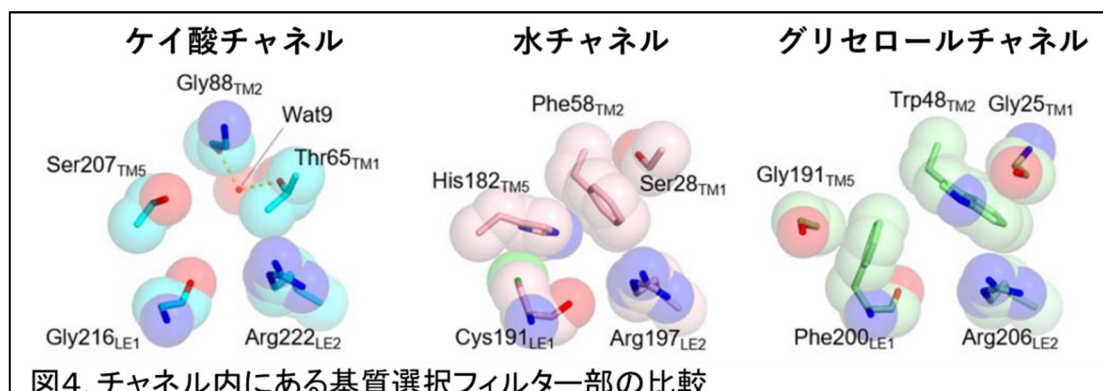


図3. ケイ酸チャンネルの構造モデルと電子密度マップ。

いる水チャンネルとグリセロールチャンネルと比較したところ、基質選択フィルター部分を構成するアミノ酸残基の数・種類がケイ酸チャンネルで独特であった。さらに、ケイ酸チャンネルの基質選択フィルターはアミノ酸残基以外に、水分子もその構成要素であることが構造から見出された(図4)。



Lsi1 の基質選択フィルターに変異導入を行ったところ、Lsi1 のケイ酸透過能が低下あるいは消失した。さらに、Lsi1 の基質選択フィルターをグリセロールチャンネルに与えたところ、グリセロールチャンネルはケイ酸を透過する能力を獲得した。この機能解析実験により、Lsi1 の基質選択フィルターはケイ酸の透過に重要であることを示された。

分子動力学シミュレーションを行い、得られた Lsi1 の構造にケイ酸が浸透していく様子を捉えた。これは解明した Lsi1 の構造がケイ酸を透過し得る構造であることを示している。そして、基質選択フィルター部分を構成する水分子はシミュレーション中にほとんど動かないことが分かった。これより、基質選択フィルター部分はアミノ酸残基だけではなく、水分子もその構成要素の1つとして働いており、Lsi1 の基質選択性に関わっていることが明らかになった。

この研究課題を行うことで、穀物のケイ酸チャン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因子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ンネルを、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。さらに、ケイ酸と類似した有害な亜ヒ酸を透過しないケイ酸チャンネルの作出を行う上でも重要な構造基盤となるだろう。本研究課題の研究成果は纏めて学術雑誌に投稿しており、査読を受けている状態にある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------