

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05710

研究課題名(和文) イネのケイ酸体に含まれる長鎖ポリアミンの同定とシリカ形成における機能解析

研究課題名(英文) Characterization of long-chain polyamines in silica bodies and functional analysis in silica formation

研究代表者

尾崎 紀昭 (Ozaki, Noriaki)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：50468120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネは葉身や籾殻などに非結晶シリカを主成分とするケイ酸体を形成し、様々な環境ストレスから植物体を防御する。しかし、ケイ酸を重合してシリカを形成する分子機構は高等植物では不明のままであった。本研究はイネ葉身からケイ酸体を単離し、シリカに含まれる有機マトリックスがセルロースナノファイバーと長鎖ポリアミンと想定される有機分子が協同することで、シリカナノ粒子形成に關与するモデルを導き出した。しかし、本研究期間中に候補分子を長鎖ポリアミンと同定するには至らず、現在も解析を継続中である。長鎖ポリアミンはシリカ形成を行う珪藻、海綿、細菌で発見されているが、現在も植物界では発見されていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物がケイ酸を重合し、シリカを作るバイオミネラリゼーションの分子メカニズムは珪藻、海綿、細菌で既に解明されているが、植物では未解明のままであった。本研究の成果により、イネのケイ酸体にはセルロースナノファイバー(CNF)とタンパク質、長鎖ポリアミン様分子が存在することが明らかとなった。研究期間中にポリアミンを同定することはできなかったが、バイオミネラリゼーションという視点で捉えると例えば甲殻類(ザリガニ)の石灰化に見られる不溶性有機マトリックスであるキチンファイバーと可溶性有機マトリックス(タンパク質、ペプチド)が協同して非晶質炭酸カルシウムを形成する仕組みと類似していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Rice plants form silica bodies composed mainly of amorphous silica in leaf blades and rice husks to protect the plant body from various environmental stresses. Despite this importance, the molecular mechanism of silica formation has remained unclear in higher plants. This study researched isolated silica bodies from rice leaf blades and we proposed a model in which the organic matrix in silica involves the co-operation of cellulose nanofibres and organic molecules assumed to be long-chain polyamines, which are involved in silica formation. However, the candidate molecules were not identified during the study period and the analysis is still continuing. The Long-chain polyamines have been found in biosilica-forming diatoms, marine sponges and some bacteria, but are still not found in the higher plants.

研究分野：バイオミネラリゼーション、生物材料化学

キーワード：イネ ケイ酸 シリカ セルロースナノファイバー 長鎖ポリアミン 有機マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネはケイ酸を土壌から吸収した後、未解明のメカニズムによってケイ酸を重合して非結晶シリカを生成する。葉身や葉鞘、籾などの表面には非晶質シリカを主成分とする構造体(葉身の場合、ケイ酸体と呼称)が沈着するが、ケイ酸体の役割は物理的強度向上や病原菌への抵抗性を高めるなど、多様な環境ストレスからの防御戦略と考えられてきた。国内外におけるイネのケイ酸研究に関する動向は、ケイ酸トランスポーターが発見されて以降(Ma et al., Nature 2006)ケイ酸が葉身や籾に輸送・分配される機構が解明されるなど(Yamaji et al., PNAS 2015)ケイ酸輸送に関する研究の進展が見られた。しかし、ケイ酸輸送の最終地点(重合して非結晶シリカになる反応過程)に関する研究例は2019年までほとんどなく、イネのシリカ形成(バイオミネラル化)の分子機構は未解明であった。当時はケイ酸重合活性物質がイネでは発見されていなかったため、イネのケイ酸重合は無機化学的な反応で進行すると一般的には考えられてきたが、イネ科ソルガム(モロコシ)でケイ酸重合活性を持つタンパク質(Slp1)が2020年に報告された。シリカを作る生物には珪藻や海綿動物、ある種の細菌が知られており、これらの生物にはケイ酸重合活性を示す有機マトリックス、特に長鎖ポリアミン(LCPA)が種を超えて含まれていることが報告されていた。一方、高等植物にはポリアミンは普遍的に存在するが長鎖構造を持つLCPAが含まれるという報告はこれまでになかった。

2. 研究の目的

他のシリカ形成生物にみられるようなケイ酸重合活性を示す有機マトリックスが、イネにも存在するのか調べることを当初の目的とした。葉身の機動細胞内に形成されるファン型ケイ酸体の主要なシリカ可溶性成分として、タンパク質LTPLとLCPA様化合物(仮称)がSDS-PAGE上で確認されたが、このうちLTPLにはケイ酸重合活性をほとんど検出できなかったことから、同活性はLCPA様化合物由来であると想定し、この化合物を同定することを試みた。また、ケイ酸体における不溶性マトリックス成分について電子顕微鏡観察による探索と分析を行った。

3. 研究の方法

(1) ケイ酸体の単離と非晶質シリカからの可溶性有機マトリックス抽出

複数品種(あきたこまち、台中、日本晴)のイネ葉身を収集した。葉身を破碎した後、フィルター濾過によりケイ酸体を葉身から分離し、時計皿に供して回転を加えることで、ケイ酸体のみを収集した。粗精製ケイ酸体に対して硫酸処理、中和後にセルラーゼ処理を行い、機動細胞壁成分を除去した。次にSDS-DTT溶液を添加して加熱後、pH4~5に調整したフッ化アンモニウム溶液(NH₄F)に浸漬することで非晶質シリカを溶解させた。溶解画分を遠心分離した上清を限外分子量500-1,000の透析膜を用いて不要な低分子成分を除去した後、凍結乾燥を行った。

(2) LCPA様化合物の同定に向けた検討

凍結乾燥試料を緩衝液に溶解して試料溶液とし、SDS-PAGEに供した。また、試料溶液を限外分子量3,000の膜フィルターを通過させ、LTPLとLCPA様化合物を分離した。また、分子量3,000以下の成分をケイ酸過飽和溶液に添加し、一定時間におけるシリカ沈殿量をモリブデンブルー法により測定した。またこれらの成分に関してLCPA同定技術を有する学外研究機関に依頼することを計画した。

(3) 電子顕微鏡を用いたシリカナノ粒子と不溶性マトリックスの微細構造解析

ファン型ケイ酸体が形成される時期の電子顕微鏡用試料(超薄切片)を作成し、透過型電子顕微鏡(TEM)および電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)を使用して、シリカが形成される部位の経時的変化を調べた。

4. 研究成果

【2020年度】

秋田県立大学の圃場で栽培されているあきたこまち、台中、日本晴の各品種の葉身をサンプリングし、葉身からファン型シリカを単離した。その後、NH₄F溶液を用いた比較的温和な条件下でシリカを溶解し、シリカ内部にLCPA様分子が共通して含まれていることをSDS-PAGE等で確認した。既に考案されているケイ酸重合活性検定系をより微量で測定できるように改良を行った。

【2021年度】

LCPA様分子と相互作用する候補分子と予想しているイネLTPLの組換えタンパク質を作製する環境を整えた(葉身からのmRNA抽出とcDNAクローンの単離には成功)。各品種のファン型シリカの微細構造をFE-SEMで分析した結果、数十nmのシリカナノ粒子と不溶性有機マトリックスの存在が示唆された。セルラーゼ処理によりマトリックス構造が消失することから、構造体はセルロースナノファイバー(CNF)であることが示唆された。一方、LCPA様化合物の同定に十分な量の試料(ファン型ケイ酸体)を得ることが困難であった。その代わりに、葉身シリカに含まれているLTPLを精米からも得ることに成功した。イネLCPA

の単離は十分に行うことができなかったが、前年度より再現性の高いケイ酸重合活性検定系を確立することができた。また、イネ葉身の TEM 切片試料を作製し、シリカ形成細胞(機動細胞)における非晶質シリカの形成過程を経時的変化を調べることに成功した。その結果、特にシリカ形成初期過程において CNF のような鉱物形成の足場になる有機マトリックスの存在(出現)が重要であることを可視的に示すことができた。

【2022 年度】

NH₄F 可溶性画分中の非タンパク質成分の分離と同定を試みたが、前年度に続き出発材料(単離・精製したケイ酸体)が諸事情により大量に確保できなかったこと、微量のポリアミン同定技術を有する学外の共同研究期間(広島大学)を訪問することができないなど、最終目的であるイネのポリアミン様物質の同定(HPLC による精製と LC-MS、NMR 解析など)には至らなかった。しかし、本課題の研究期間は終了したが、イネのシリカ形成に関与することが推定される組換え LTPL の作製およびシリカ内ポリアミン様分子の単離と同定に向けた研究を 2023 年度も継続・展開している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toshiki Maeno, Yuki Yamakawa, Yohei Takiyasu, Hiroki Miyauchi, Yasunori Nakamura, Masami Ono, Noriaki Ozaki, Yoshinori Utsumi, Ugo Cenci, Christophe Colleoni, Steven Ball, Mikio Tsuzuki, Shoko Fujiwara	4. 巻 13
2. 論文標題 One of the isoamylase isoforms, CMI294C, is required for semi-amylopectin synthesis in the rhodophyte <i>Cyanidioschyzon merolae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2022.967165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Toshiaki Nose, Hayato Watanabe, Keiju Okano, Naoko Fujita, Jun Murata, Hajime Muraguchi, Noriaki Ozaki, Michinori Honma, Ryota Ito	4. 巻 30
2. 論文標題 Shear Direction Switching Phenomena in Twisted Nematic Liquid Crystal Cells for Novel Differential Interference Contrast Imaging Systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Society for Information Display	6. 最初と最後の頁 671-679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsid.1106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eri Nakamura, Noriaki Ozaki, Yuya Oaki, Hiroaki Imai	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellulose Intrafibrillar Mineralization of Biological Silica in a Rice Plant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 7886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87144-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 尾崎紀昭	4. 巻 4
2. 論文標題 イネのシリカ(ケイ酸体)形成の謎に迫る	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 83 - 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 千葉優吏, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ機動細胞のファン型シリカに含まれるタンパク質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎望, 川野潤, 尾崎紀昭, 三輪京子, 永井隆哉
2. 発表標題 プラントオパールに含まれる有機分子のシリカナノ粒子形成への寄与
3. 学会等名 日本鉱物科学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千葉優吏, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ機動細胞のケイ酸体に含まれるタンパク質の解析
3. 学会等名 第17回バイオミネラルリゼーションワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伴勇希, 中村江里, 今井宏明, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ葉身に存在するケイ酸体の形成機構解明とナノ構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度東北支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴勇希, 中村江里, 緒明佑哉, 今井宏明, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ機動細胞におけるケイ酸体の形成過程とナノ構造解析
3. 学会等名 第16回バイオミネラリゼーションワークショップ(
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎望, 川野潤, 尾崎紀昭, 三輪京子, 永井隆哉
2. 発表標題 イネ科植物のケイ酸体およびペプチドを用いた合成シリカの分子構造
3. 学会等名 第16回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伴勇希, 中村江里, 緒明佑哉, 今井宏明, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ機動細胞に形成されるケイ酸体のナノ構造解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村江里, 尾崎紀昭, 齋藤継之, 緒明佑哉, 今井宏明
2. 発表標題 イネのプラントオパールナノ構造解析およびセルロースナノファイバーを用いた類似体合成
3. 学会等名 日本化学会・第10回CSJ化学フェスタ 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ葉身のファン型ケイ酸体に含まれる防御タンパク質
3. 学会等名 第15回バイオネラリゼーションワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村江里，緒明佑哉，尾崎紀昭，今井宏明
2. 発表標題 イネのバイオシリカ形成におけるセルロースナノファイバーの重要性
3. 学会等名 第15回バイオネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiaki Nose, Keiju Okano, Naoko Fujita, Jun Murata, Hajime Muraguchi, Noriaki Ozaki, Michinori Honma, Ryota Ito
2. 発表標題 Simple differential interference contrast imaging system by using twisted nematic liquid crystal cells
3. 学会等名 The 27th International Display Workshops (IDW '20) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾崎紀昭，鈴木道生，Fabio Nudelman
2. 発表標題 イネのプラントオパールに含まれる有機基質と防御タンパク質
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科運営HP研究室リスト
https://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/DBT/Lab_list.html
尾崎紀昭研究室（個人のHP）
<https://sites.google.com/view/noriakiozaki-lab/>

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
---------	---------