

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770097

研究課題名（和文）植物由来鉄カドミウムトランスポーターのX線結晶構造解析

研究課題名（英文）X-ray crystal structure determination of the Iron/Cadmium transporter in plant.

研究代表者

宮園 健一（MIYAZONO KENICHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：90554486

研究成果の概要（和文）：重金属公害の原因の一つであるカドミウムの植物細胞内での毒性の鍵となる細胞内鉄・カドミウムイオントランスポーターの立体構造を決定し、その分子機構を解明するために、植物由来の二つの膜タンパク質 AtNRAMP3 および AtNRAMP 4 の X 線結晶構造解析実験を行った。大腸菌の発現系を利用することによって二つのタンパク質の異種発現に成功したが、X 線結晶構造解析を行えるような良質な結晶は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：To reveal the Iron/Cadmium transport mechanisms of two plant membrane protein, AtNRAMP3 and AtNRAMP4, which are thought to be key proteins for the cadmium toxicity in plant, we tried to determine the crystal structure of these proteins. We have succeeded overexpression of these membrane proteins using *E.coli* protein over expression system, but we couldn't obtain the crystals of these proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：蛋白質、植物、環境、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

生育のための栄養を他の生物から取得する動物とは異なり、植物は生育に必要な栄養の多くを、光合成による炭素固定と生育土壌中からの養分の吸収によって調達する。鉄、マンガン、銅、亜鉛といった細胞機能の維持に必要な微量元素原子も土壌中から根を通して吸収するが、その際、生育に必要な有害な重金属も同時に吸収してしまうため、

有害な重金属によって汚染された土壌で育った植物は、高い濃度でそれらを蓄積してしまう。有害重金属の代表として、カドミウムがある。一般的に、カドミウムは生物の生育に必要な遷移金属原子であり、その摂取は人体に対して極めて有害であることが知られている。植物による土壌からのカドミウム吸収は以下の二つの点において重要視されている。一つ目は、有害物質の食物連鎖への導入という食糧生産上の問題点である。植

物は、ある程度の量の有害重金属を無毒化する機構を有しており、カドミウム汚染土壌においても、その汚染度合が軽度であれば生育可能である。しかし、食物連鎖を考えると、ヒトをはじめとする植物の消費者の段階では、致命的な濃度まで有害物質が濃縮されてしまう可能性があり、生態系に悪影響を与えてしまう。実際、カドミウムによって引き起こされた公害であるイタイイタイ病も、カドミウムによって汚染された土壌によって生産された農作物の摂取が原因の一つとされており、近年でも汚染米の偽装流通問題と関連して話題に挙げられている。二つ目の点として、植物の有害金属蓄積作用を利用した汚染土壌の環境浄化(ファイトレメディエーション)が挙げられる。植物を用いた金属汚染土壌の浄化は通常の浄化方法と比較し安価で、かつ環境に優しい手法であるため、その応用のための研究が国内外において盛んに行われている。このように植物の重金属吸収機構は様々な観点から注目されており、植物細胞内でのこれら重金属の挙動に関しても多数の研究が報告されている(図1参照)。

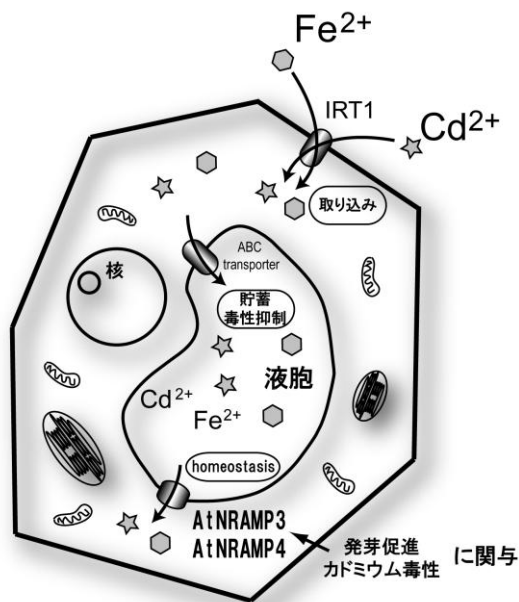


図1 植物細胞内における鉄カドミウム輸送

鉄●及びカドミウム☆は膜トランスポーターIRT1により細胞内に取り込まれる。液胞に蓄積されたカドミウムはAtNRAMP3やAtNRAMP4により細胞質基質に放出されることによって毒性を示すこととなる。

2. 研究の目的

植物細胞内で働く二つの金属トランスポーターAtNRAMP3及びAtNRAMP4を対象とし、構造学的な観点からその分子機構の

解明を目指す。これらのタンパク質は、鉄やマンガンといった二価イオンをプロトンと共役して透過する膜トランスポーターである

Natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP)ファミリーに属し、互いに76%のアミノ酸配列の相同性を有する。AtNRAMP3及びAtNRAMP4は、植物細胞内において液胞膜上に存在し、液胞から細胞質基質への金属イオンの透過を行うことが知られている。AtNRAMP3およびAtNRAMP4は鉄欠乏状態での種子の発芽に関与しており、液胞に貯蓄していた鉄イオンを細胞質基質に輸送することによって種子の発芽を手助けする。その一方、植物のカドミウムに対する感受性にも関与していることが知られており、シロイヌナズナにおいてはAtNRAMP3を欠失させた場合、カドミウムに対する耐性が若干増加し、また、AtNRAMP3を大量発現させた場合はカドミウムに対して非常に感受的になることが示されている。植物は、生育に必須な金属と同じ経路で細胞内に侵入してしまった有害な重金属を、細胞質基質から液胞に移動させることにより無毒化する機構を備えている。そのため、液胞から細胞質基質への鉄・カドミウムの透過機構の詳細な分子機構の解明は、発芽制御などに関連する植物細胞内における鉄イオンのホメオスタシスの理解だけでなく、植物のカドミウムに対する感受性を理解する上で極めて重要である。

3. 研究の方法

(1) 発現コンストラクトの作製

X線結晶構造解析法による構造決定のためには大量のタンパク質が必要であるため、大腸菌の異種発現系を利用したAtNRAMP3およびAtNRAMP4の大量発現を試みた。X線結晶構造解析のために必要な結晶の作製には安定なタンパク質を利用することが好ましいため、好熱性古細菌*Sulfolobus tokodaii*由来のホモログタンパク質(ST1901 下図2参照)に関しても発現コンストラクトの作製を行った。

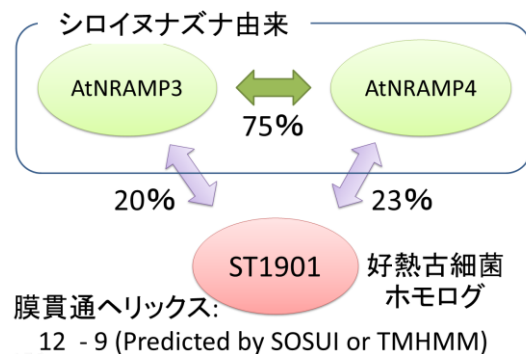


図2 ターゲット間のアミノ酸配列相動性。

発現および精製段階での性状評価を簡便に行うために、各タンパク質に関して蛍光タンパク質 GFP と融合させる形で発現させるコンストラクトを設計した (図 3)。結晶化を行う際に、GFP が融合したままだと、結晶化を阻害する可能性があるため、目的膜タンパク質および GFP の間には TEV プロテアーゼサイトが含まれるようにコンストラクトを設計した。また、精製を簡便に行うために、N 末端側及び C 末端側に His タグが融合するように設計した。

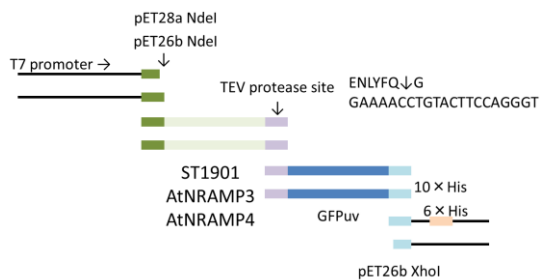


図 3 発現コンストラクトの概要図
T7 プロモーターの下流に目的膜タンパク質 - TEV プロテアーゼ切断サイト - GFP がタンデムにつながるように設計している。His タグは N 末端側または C 末端側、もしくはその両方に融合するようにコンストラクトを設計した。

(2) 大腸菌を利用した異種発現

異種膜タンパク質の大量発現は、しばしば発現宿主である大腸菌の生育を阻害することが知られているため、発現ストレスに強い形質をもつことが知られている二つの大腸菌株 C41 (DE3) および C43 (DE3) を利用して、目的膜タンパク質の発現実験を行った。発現条件を最適化するため、発現誘導条件や、発現培地条件の検討を行った。

(3) 蛍光ゲル濾過法を利用した発現タンパク質の性状解析

異種発現系を利用して膜タンパク質を大量発現させると、正しい形状 (均一性) を持ったタンパク質が得られない場合もあり、発現させた膜タンパク質の性状を確認する必要がある。確認は、蛍光ゲル濾過法によって行った。発現させた膜タンパク質には蛍光タンパク質である GFP が融合しているため、その蛍光を検出することによって、クルードの状態でも効率よく性状の解析が行える手法である。

(4) 発現タンパク質の精製

適切な条件で発現させた膜タンパク質を、結晶化を行える純度まで精製するため、カラムクロマトグラフィーによる目

的膜タンパク質の精製を行った。N 末端側及び C 末端側に His タグを融合させて発現させているため、Ni-NTA カラムによる精製等を行った。

4. 研究成果

(1) 発現コンストラクトの作製

三種類の膜タンパク質 AtNRAMP3、AtNRAMP4、ST1901 の遺伝子断片及び、蛍光タンパク質 GFP の遺伝子断片を PCR 法によって増幅し、In fusion HD Cloning kit (TAKARA) を利用することによって、図 3 に示すような膜タンパク質発現用ベクターを作製することに成功した。また、Ni-NTA カラムでの精製度を上げるため、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TAKARA) を利用して、His 残基の数を増やした His タグ (C 末端 10×His) を持ったコンストラクトも作製することに成功した。

(2) 大腸菌を利用した異種発現

目的膜タンパク質を大量発現させるため、発現誘導に必要な IPTG 濃度や発現時の温度を検討した。発現誘導時における IPTG 濃度は、0.1 mM, 0.01 mM, 0.001 mM を検討し、温度は 37°C および 25°C を検討した。培養後、界面活性剤としてドデシルマルチド (DDM) を含む緩衝液条件下で、大腸菌からの膜タンパク質抽出を行い、SDS-PAGE によって発現の確認を行った。結果、下図 4 の通り、目的タンパク質の発現が確認できた。

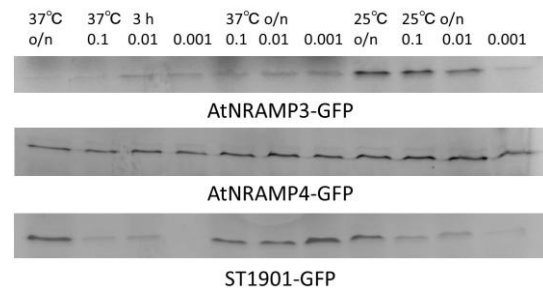


図 4 各条件での目的膜タンパク質の発現
o/n はオーバーナイトで培養したことを示す。検出には GFP の蛍光を利用した。AtNRAMP4 の検出は、他のサンプルよりも長時間露光しているため、発現したタンパク質量としては少ない。

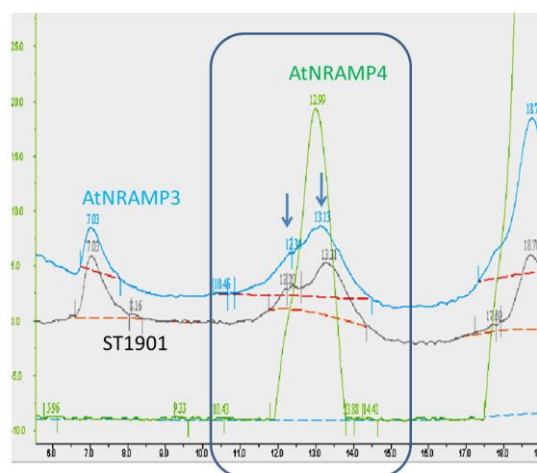
結果、AtNRAMP 3 は 25°C の条件で、ST1901 は 37°C の条件で好ましく発現させることが示された。また、AtNRAMP4 に関しては、どの条件でも目的タンパク質の発現量にあまり差がないことが示された。

各膜タンパク質は、鉄・カドミウム輸送にかかわるため、大腸菌での発現を行う際に培

地中に鉄の添加を試みた。鉄の挙動を安定化させるため、培地中には炭酸ナトリウムと混合してから添加した。その結果、培地中に FeCl₃ を 0.1 mM 添加することによって、目的膜タンパク質の発現が向上することが示された。発現した膜タンパク質にうまく鉄イオンが結合すれば、発現した膜タンパク質の挙動が安定化することが期待されるため、そのような機構によって、大量発現時の安定性が向上したことが、発現量の増加につながったものと考えられる。

(3) 蛍光ゲル濾過法を利用した発現タンパク質の性状解析

発現させた膜タンパク質の性状を確認するために、蛍光ゲル濾過法による分子量および分散度の確認を行った。大量発現させた膜タンパク質を DDM によって可溶化し、ゲル濾過カラムによって分離を行ったところ、下図 5 のような結果が得られた。



Superdex 200 10/30 50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 0.2%DD

図 5 蛍光ゲル濾過法による解析結果
枠内が、凝集していない膜タンパク質画分である。AtNRAMP 3 および ST1901 は二つのピーク（図中矢印）に分離した。

GFP の蛍光を検出しながらゲル濾過を行ったところ、どのコンストラクトにおいても、適切な分子量を持って溶出されることが示された。また、AtNRAMP4 では、均一な分子量として溶出される一方、AtNRAMP3 および ST1901 に関しては、単量体および二量体と思われる位置に溶出ピークが観察され、これらの膜タンパク質は多量体を形成する可能性が示唆された。

(4) 発現タンパク質の精製

目的膜タンパク質を大量調製し、結晶化実験を行うために、発現させた膜タンパク質を Ni-NTA カラムを用いて精製を行った。その結

果、吸着力はあまり強くないものの、Ni-NTA カラムへの吸着が観察された。

(下図)

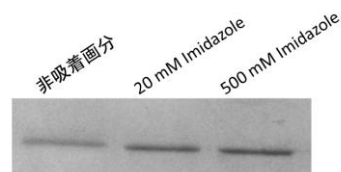


図 5 ST1901-GFP 融合タンパク質の Ni-NTA カラムによる精製。

Ni-NTA カラムによる精製が可能であることが示されたが、目的膜タンパク質の発現が十分ではなく、結晶化を行えるような純度まで目的膜タンパク質を精製し結晶化する条件を現在引き続き検討を行っている。

5. 主な発表論文等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮園 健一 (MIYAZONO KENICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：90554486