

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23380192

研究課題名(和文) 重金属環境下で有害化する植物アミロイド蛋白質の凝集及び毒性発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms on aggregation and toxicity of plant amyloid proteins which are toxic in the presence of metals

研究代表者

原 正和 (Hara, Masakazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：10293614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハイパーアキュムレーターによる重金属汚染除去技術の確立には、通常の植物の重金属感受性の仕組みを理解する必要がある。われわれは、植物に広く存在する、デハイドリンをはじめとしたHis型金属結合ペプチドを分析した。結果、本ペプチドは、通常天然変性状態にあるが、重金属濃度が高まると凝集体を形成し、活性酸素の発生源として細胞障害を引き起こしうることを明らかにした。こうした性質は、脳疾患におけるアミロイドと類似している。本ペプチドは、植物における重金属への感受性をコントロールしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is needed to understand a role of the heavy metal-sensitivity of normal plants to establish the technologies of heavy metal decontamination by hyperaccumulators. We analyzed a His-type metal binding peptide (dehydrin) which is commonly found in plants. Although the peptide shows the intrinsically disordered state under the normal condition, it forms aggregates with generating reactive oxygen species which can damage cells at the high concentration of heavy metals. Such characteristics of the peptide are similar to those of amyloids in brain diseases. This peptide can control the sensitivity to heavy metals in plants.

研究分野：植物生理学

キーワード：重金属 天然変性蛋白質 デハイドリン ハイパーアキュムレーター

1. 研究開始当初の背景

重金属を多量に蓄積する植物をハイパーアキュムレーターと呼ぶ。植物による重金属汚染除去技術の実用化には、高性能なハイパーアキュムレーターが求められる。しかし、ハイパーアキュムレーターは、小型で成長が遅いなど、欠点が多い。それを克服するため、ハイパーアキュムレーターがもつ重金属蓄積能力を、大型で成長が早い植物へ導入して、優れたハイパーアキュムレーターを作出しようとするアイデアが生まれた。しかし、ハイパーアキュムレーターの金属結合分子や金属トランスポーターを通常植物で発現させても、重金属汚染環境での栽培は、成功しないことが多い。これは、通常植物には、重金属の被害を受けやすい仕組みがあると考えられるが、こうした観点からの研究はほとんどない。

ところで、代表者は、植物の水ストレス蛋白質デハイドリンの機能研究を推進してきた。その結果、植物に、「His 型金属結合ペプチド」というグループがあることを提唱した。これは、SH 型金属結合ペプチド(ファイトキレーチン、メタロチオネイン)や低分子キレーターによって構築されてきた従来の重金属解毒スキームに、新たなパラダイムを投げかける成果となった。最近、代表者は、シロイヌナズナのデハイドリン AtHIRD11 について集中的に研究している。その結果、AtHIRD11 はシロイヌナズナの維管束中に多量に蓄積すること、His を多く含み(全 99 アミノ酸中 13%が His)、His を介して亜鉛、銅、ニッケルと結合することを明らかにした。最近の予備調査により、AtHIRD11 を高発現させたタバコ(タバコは元々金属に強い)の成長は、野生株に比べ、重金属によって抑制されること、スラスピ(シロイヌナズナに近縁のハイパーアキュムレーター)では、AtHIRD11 の発現は著しく抑えられていることがわかった。

2. 研究の目的

上述の背景から、His 型金属結合ペプチドは、通常条件下では植物に害を及ぼさないが、重金属環境下では毒性を示す可能性がある。これは、神経疾患におけるアミロイドの金属イオンへの応答パターンと類似する。本研究では、His 型金属結合ペプチドの毒性発現機構を解明し、植物の重金属感受性の仕組みの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AtHIRD11 本来の生理機能の解明

・CD とフーリエ変換赤外分光光度計を使って蛋白質の二次構造を予測した。1 次元プロトン NMR のシグナルを Dyson & Wright 則に当てはめ、変性状態を予測した。ゲル濾過では、ストークス径と変性状態を関連付けた Uversky 則を適用し、変性状態を推定した。蛍光プローブ試験、プロテアーゼ感受性試験

を実施した。コントロールとして、標準蛋白質(血清アルブミン、グロブリン)を用いた。

・ネイティブ AtHIRD11 の精製方法を確立し、CD 解析に供した。

・低濃度重金属条件下での AtHIRD11 の機能に関し、金属シャペロン活性、活性酸素消去活性、酵素安定化活性を検出した。

(2) 金属による AtHIRD11 の構造変化の解析と毒性発現

・金属イオン(亜鉛、銅、ニッケル、鉄、マンガン、カドミウム、対照としてマグネシウム、カルシウム)を、濃度を変えて作用させた場合の、AtHIRD11 の状態変化を調査した。生じた粒子を、遠心分離法、ゼータ電位粒子径測定法によって測定した。AtHIRD11 の凝集反応を制御する条件を見出した。AtHIRD11 の銅凝集体に対し、アスコルビン酸依存性ヒドロキシルラジカル発生を、蛍光プローブによって測定した。さらに、合成ペプチドにより、毒性発現ドメインを決定した。His/Ala 変換 AtHIRD11 は、遺伝子合成法でプラスミドを改変し、大腸菌によって合成した。

・インビボ試験として、AtHIRD11 高発現株を作出した。重金属処理を施し、生長、活性酸素障害(チオバルビツール酸法、カルボニル化蛋白質検出法)により傷害度を評価した。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの AtHIRD11 に注目して、CD、フーリエ変換赤外分光光度計、ストークス径試験、蛍光プローブ試験、プロテアーゼ感受性試験により、天然変性蛋白質の特性を示すことを確認した。一方、1 次元プロトン NMR では、シグナル強度が不十分のため、データ解析が出来なかった。これらの試験は、大腸菌発現 AtHIRD11 で行ったが、シロイヌナズナに含まれるネイティブな AtHIRD11 もまた天然変性状態にあるか否かを検証した。高塩濃度抽出と金属キレートカラムを併用した方法で AtHIRD11 を精製し、CD 測定を行ったところ、高度に無秩序な状態にあることが判明した。

低濃度重金属条件下における AtHIRD11 の機能を調査したところ、活性酸素消去活性、酵素安定化活性を示した。金属シャペロン活性は検出できなかった。

(2) AtHIRD11 は、マグネシウム、カルシウムではほとんど凝集することはなかったが、亜鉛、銅、ニッケルで容易に凝集化した。凝集径は不定であり、生理的な溶液条件であれば、重金属の濃度に依存して凝集した。凝集状態でフーリエ変換赤外分光分析を行ったところ、不定形構造のまま、凝集していることが判明した。電子顕微鏡による組織観察により、シロイヌナズナ師部細胞では、抗 AtHIRD11 抗体の抗原は、細胞質やミトコンドリアの周辺に、集合するように存在した。

試験管内で AtHIRD11 の毒性を再現するため、AtHIRD11 の飽和銅凝集体を得て、アスコ

ルビン酸を作用させた。すると、多量のヒドロキシルラジカルの発生が見られた。自然沈降させた凝集体を蛍光観察すると、ヒドロキシルラジカルは、凝集体の周囲から発生していることが示唆された。なお、His 改変 AtHIRD11 では、同濃度の銅によって凝集体は形成されず、溶液全体でヒドロキシルラジカルの発生が見られた。

インピボ試験として、組換えシロイヌナズナを作出した。AtHIRD11 高発現株のほか、AtHIRD11 の His/Ala 改変遺伝子を高発現させた株を作出した。後者は、有効な発現抑制株が作出できなかったための代替手段であった。銅、亜鉛、カドミウムを含む水を、濃度を変化させて灌水した。すると、銅処理において、低濃度の場合、野生株、AtHIRD11 高発現株、His 欠損株の成長にはさほど差はなかったが、高濃度の場合、AtHIRD11 高発現株のみで、やや成長不良傾向が見られた。しかし、これが、AtHIRD11 の過剰発現による結果か否かを検証することはできなかった。

以上の結果から次のように考察できる。AtHIRD11 は、無あるいは低金属濃度環境下では、二次構造をとらない天然変性状態にある。この時、デハイドリン特有の細胞保護作用を発揮する。しかし、金属イオン、特に亜鉛や銅の濃度が増すと、容易に、二次構造を形成しないまま凝集化する。この凝集体は、カルシウムやマグネシウムでは生じない。本凝集は、多くの神経疾患アミロイドが、シートなどの疎水性領域を介した堅固な凝集体を形成することとは異なる。

AtHIRD11 の銅凝集体は、植物体内に含まれる一般的な還元剤、例えばアスコルビン酸によって活性酸素種の発生源となりうる。確かに、銅イオン濃度が AtHIRD11 濃度を大きく上回ると、銅イオンのレドックス活性が高まり、活性酸素種が盛んに発生する。しかし、AtHIRD11 と銅イオンのモル比が似通っている場合、銅イオンのレドックスは逆に安定化され、活性酸素種の発生は低下する。この現象は、実際の植物体でも起きていると考えられる。現に、AtHIRD11 を過剰発現させた植物を高濃度の金属溶液で灌水した場合、野生株より成長が抑制される。また、電子顕微鏡観察で、AtHIRD11 凝集体は、細胞質やミトコンドリア周辺に存在すると予想され、重金属障害の一端を担っていると考えられる。

このように、AtHIRD11 は、低濃度の重金属環境下では植物を保護する働きを示すが、高濃度の重金属環境下では、一転して自己毒性を発現する可能性が示唆された。AtHIRD11 のみならず、植物が有する天然変性蛋白質には、同様の働きを示すものが存在すると考えられ、重金属中毒反応を自ら助長する植物特有の反応を司っていると理解できる。

神経疾患等に関わるアミロイドには、金属イオンが引き金となり、天然変性状態から凝集体へ変化するものがある。植物にも、重金属の存在により、天然変性状態から凝集体へ

変換するペプチドが存在した。こうしたアミロイド様のペプチドは、恐らくは植物に普遍的に存在し、重金属に対する感受性を制御している可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Masakazu Hara, Takuya Endo, Keita Kamiya, Ayuko Kameyama (2017) The role of hydrophobic amino acids of K-segments in the cryoprotection of lactate dehydrogenase by dehydrins. *Journal of Plant Physiology* 210:18-23. 査読有 doi:10.1016/j.jplph.2016.12.003.

Masakazu Hara, Shuhei Monna, Takae Murata, Taiyo Nakano, Shono Amano, Markus Nachbar, Hermann Wätzig (2016) The *Arabidopsis* KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *Plant Science* 245:135-142. 査読有 doi:10.1016/j.plantsci.2016.02.006.

原 正和「高次構造を持たない無秩序な植物タンパク質」(2016) *生物工学会誌* 94 巻1号 p23 *バイオメディア* 査読無

Maik Kleinwächter, Alzahraa Radwan, Masakazu Hara, Dirk Selmar (2014) Dehydrin expression in seeds: an issue of maturation drying. *Frontiers in Plant Science* 5:402. 査読有 doi:10.3389/fpls.2014.00402.

Alzahraa Radwan, Masakazu Hara, Maik Kleinwächter, Dirk Selmar (2014) Dehydrin expression in seeds and maturation drying: a paradigm change. *Plant Biology* 16: 853-855. 査読有 doi:10.1111/plb.12228.

Masakazu Hara, Saki Uchida, Takae Murata, Hermann Wätzig (2014) Efficient purification of cryoprotective dehydrin protein from the radish (*Raphanus sativus*) taproot. *European Food Research and Technology* 239:339-345. 査読有 doi:10.1007/s00217-014-2228-6.

Masakazu Hara, Mitsuru Kondo, Takanari Kato (2013) A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the His residues contribute to the radical-reducing activities. *Journal of Experimental Botany* 64:1615-1624. 査読有 doi:10.1093/jxb/ert016.

Masakazu Hara, Yuri Shinoda, Masayuki Kubo, Daiju Kashima, Ikuo Takahashi, Takanari Kato, Tokumasa Horiike, Toru Kuboi (2011) Biochemical characterization of the *Arabidopsis* KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. Acta Physiologiae Plantarum 33:2103-2116. 査読有
doi:10.1007/s11738-011-0749-1.

〔学会発表〕(計 16 件)

神谷慶太、遠藤拓弥、亀山阿由子、原 正和「デハイドリンの凍結保護活性における K セグメントの疎水性アミノ酸の役割」日本農芸化学会 2017 年度大会 2017 年 3 月 19 日 京都女子大学 (京都府京都市)

原 正和、遠藤拓弥、神谷慶太「デハイドリンにおける凍結保護セグメントの特性調査」日本植物細胞分子生物学会大会 2016 年 9 月 1 日 信州大学 (長野県上田市)

原 正和、門奈修平、村田尊英、中野太陽「銅によって失活した酵素に対するデハイドリンの回復活性」日本植物細胞分子生物学会大会 2015 年 8 月 10 日 東京大学 (東京都文京区)

原 正和、門奈修平、村田尊英、中野太陽「His 型金属結合ペプチドデハイドリンによる植物金属ストレス緩和作用」日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 28 日 岡山大学 (岡山県岡山市)

中野太陽、門奈修平、村田尊英、原 正和「植物における His リッチデハイドリンの銅ストレス保護作用」日本農芸化学会中部支部第 171 回例会 2014 年 10 月 11 日 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

天野翔乃、原 正和「ヘムと結合したデハイドリンの酵素活性発現に関する研究」日本農芸化学会中部支部第 171 回例会 2014 年 10 月 11 日 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

Masakazu Hara "Disordered dehydrin proteins related to abiotic stress tolerance in plants" PepCon 2014 - BIT's 7th Annual Protein and Peptide Conference, April 26, 2014 大連 (中国)

天野 翔乃、原 正和「ヘム存在下におけるデハイドリンの酵素活性発現に関する研究」日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 29 日 明治大学 (神奈川県川崎市)

Masakazu Hara "Potential protective use of stress-related unravel protein 'dehydrin' from plant" 3rd SU International Symposium, November 18, 2013 グランシップ (静岡県静岡市)

原 正和、加藤雄成「植物の天然変性蛋白質デハイドリンの活性酸素発生抑制活性を規定する配列特性」日本植物細胞分子生物学会大会 2013 年 9 月 10 日 北海道大学 (北海道札幌市)

加藤雄成、篠田友里、原 正和、近藤満「シロイヌナズナの His-rich デハイドリン AtHIRD11 の機能研究」日本農芸化学会中部支部第 165 回例会 2012 年 10 月 27 日 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

田中 莉子、加藤 雄成、原 正和「His リッチデハイドリンのアデノシン関連物質との結合に関する研究」日本農芸化学会中部支部第 165 回例会 2012 年 10 月 27 日 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

村田尊英、加藤雄成、原 正和「ストレス下における His リッチデハイドリンの機能に関する研究」日本植物細胞分子生物学会 2012 年 8 月 5 日 奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県生駒市)

原 正和「植物のストレス適応に關与する天然変性蛋白質」日本農芸化学会 2012 年度京都大会シンポジウム「天然変性領域を介した相互作用に基づくタンパク質応用化学の新展開」2012 年 3 月 25 日 京都女子大学 (京都府京都市)

Masakazu Hara "'Histidine-rich metal binding peptides' as another category of metal binders in plants -Dehydrin, starting from basics to application-" Shizuoka University International Symposium 2011, November 28, 2011 B-nest (静岡県静岡市)

原 正和「植物のストレス耐性における天然変性タンパク質の役割」静岡大学若手グローバル研究リーダー育成プログラムシンポジウム 2011 年 11 月 15 日 静岡大学 (静岡県静岡市)

〔図書〕(計 2 件)

原 正和 静岡学術出版「ナノバイオ・テクノロジー」静岡大学ナノバイオ科学研究分野編(2016) 267 頁(p12-28) ISBN:4864740615

原 正和 静岡学術出版「ダイコンの成分」(2015) 192 頁 ISBN-10:486474050X

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.green.shizuoka.ac.jp/lab_staff00011.html

<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/abc/envplant/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

原 正和 (HARA, Masakazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：10293614

(2)研究分担者

河岸 洋和 (KAWAGISHI, Hirokazu)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：70183283

研究分担者

堀池 徳祐 (HORIIKE, Tokumasa)

静岡大学・大学院総合科学技術研究科
農学専攻・准教授
研究者番号：20535306