

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780060

研究課題名（和文）植物ホウ酸トランスポーターの構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of plant borate transporter

研究代表者

笠井 光治 (KASAI KOJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：80517938

研究成果の概要（和文）：植物ホウ酸トランスポーターBOR の結晶構造を明らかにするために、BOR タンパク質の可溶性・精製・結晶化の条件検討を行った。酵母に発現させたシロイヌナズナの BOR4 タンパク質と界面活性剤ドデシルマルトシド（DDM）の組み合わせが結晶化に適した単分散性の良い組み合わせであることを明らかにし、BOR4 タンパク質精製系を確立した。また、アニオン交換体の輸送阻害剤である DIDS および輸送基質であるホウ酸の添加により、BOR4 タンパク質の熱安定性を大幅に向上できることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We screened conditions for solubilization, purification, and crystallization of plant BOR borate transporter. We found that combination of Arabidopsis BOR4 and detergent dodecylmaltoside (DDM) showed high monodispersity. Furthermore, addition of DIDS (anion exchanger inhibitor) or borate increased thermal stability of BOR4-DDM complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：植物栄養代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者所属研究室において、世界に先駆けて微量必須元素の一つであるホウ素の輸送に関与する植物のホウ酸トランスポーターBOR1 を見いだしていた。

(2) BOR1 によるホウ素輸送のメカニズムは不明であった。

(3) 膜タンパク質の生化学的機能や構造に関する研究（特に高等動物・植物の場合）はその発現、精製、結晶化が困難であるために限定的にしか進んでいない。

(4) ホウ素輸送の分子機構を理解するために

は膜輸送体の生化学的性質および立体構造情報は不可欠である。

(5) シロイヌナズナから 7 種類、と酵母から 1 種類の BOR 遺伝子が単離されており、そのうち、シロイヌナズナの BOR1、BOR2、BOR3、BOR4、BOR5 と酵母の ScBOR1 遺伝子について、GFP (Green Fluorescent Protein の略) およびヒスチジンタグ (6 x His、タンパク質精製に利用するためのタグ) と融合した形でタンパク質発現するコンストラクトを作製していた。これらコンストラクトを酵母に導入して BOR タンパク質を活性がある形で発現する系を確立していた。

2. 研究の目的

(1) BOR タンパク質の結晶構造を明らかにする。

(2) 膜タンパク質は可溶性のタンパク質と比べて、発現、精製、結晶化が困難である。それを打開するために、近年、動物の膜タンパク質の結晶構造解析で利用され成果をあげている新しい技術を取り入れて、ホウ酸トランスポーターBOR の結晶化に適した条件を探索し、結晶構造解析を成功させ、ホウ素輸送機構を原子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酵母を用いて、シロイヌナズナ、コムギ、酵母由来の 10 種類の BOR タンパク質を GFP およびヒスチジンタグ (6 x His) 融合タンパク質として発現させた。BOR タンパク質を含む酵母膜画分を回収し、酵母発現タンパク質の可溶化に適した界面活性剤を FSEC 法(注 1) により探索した。

(2) FSEC 法により選抜された BOR4-GFP-6xHis タンパク質と界面活性剤ドデシルマルトシド(DDM)との組み合わせについてタンパク質を精製した。精製タンパク質からは GFP-6xHis タグは除去して以降の実験に使用した。

(3) 精製した BOR4 タンパク質-DDM 複合体の熱安定性を向上させる条件を CPM アッセイ(注 2)により探索した。

(4) (3) の項で見いだした熱安定性が向上する条件下で結晶化スクリーニングを行った。結晶化スクリーニングには、膜タンパク質の結晶化に実績のある Molecular Dimensions 社の MemGold kit および lipidic sponge phase screen kit を用いた。

(注 1) FSEC 法: Fluorescence Size-Exclusion Chromatography (FSEC) 法の略。界面活性剤で可溶化した界面活性剤-タンパク質複合体が単分散性であるかどうかを判定できる手法。GFP 融合した膜タンパク質を界面活性剤で可溶化した後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでタンパク質をサイズ分画して、GFP 蛍光を指標としてタンパク質の大きさが均一であるかどうか観察できる。

(注 2) CPM アッセイ: 熱変性によりタンパク質の外部にむき出しになった内在のシステム残基に結合する CPM(N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)-phenyl]maleimide)の蛍光をモニターすることで膜タンパク質の熱安定性を調べる方法。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナの 5 種の BOR タンパク質 (BOR1、BOR2、BOR3、BOR4、BOR5)、酵母の BOR タンパク質 (ScBOR1)、コムギの 4 種の BOR タンパク質 (TaBOR1.1、TaBOR1.2、TaBOR1.3、TmBOR4.5)、計 10 種類の BOR タンパク質を FSEC 法で解析し、シロイヌナズナ BOR4 と界面活性剤 DDM の組み合わせが最も単分散性の良い組み合わせであることを明らかにした(図 1)。

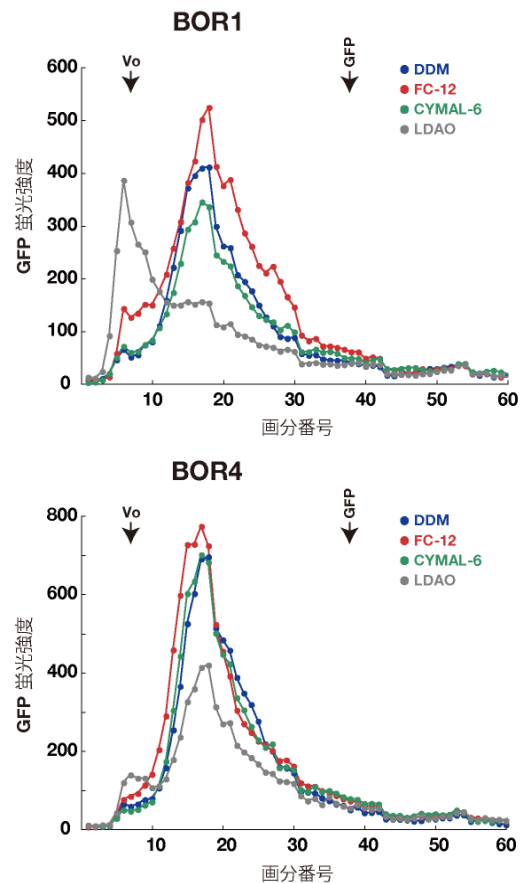


図 1. FSEC 法による可溶性界面活性剤スクリーニングの一例

BOR1-GFP-6xHis 及び BOR4-GFP-6xHis を含む膜画分を 4 種類の界面活性剤、DDM、FC-12、CYMAL-6、LDAO で可溶化して、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分画後、各画分の GFP 蛍光強度を測定した。Vo はボイドボリューム(分画限界の上限)を表す。GFP は GFP 単体の場合の溶出画分の場所を示す。BOR1 に比べて、全ての界面活性剤において BOR4 の溶出ピークがシャープであり、これは BOR4 と界面活性剤の複合体の単分散性が高いことを示している。

(2) CPM アッセイ法による BOR4-DDM の熱安定性を向上させる条件の探索を行い、アニオン交換体の輸送阻害剤である DIDS で処理することにより BOR4-DDM の熱安定性が大幅に向上すること明らかにした。また、輸送基質であるホウ酸によっても、BOR4-DDM の熱安定性

が向上した (図 2)。ホウ素の添加濃度を 0.1 ~10 mM と変化させた場合、熱変性パターンが異なり、ホウ素濃度により BOR4 のコンフォメーションが異なる可能性が示唆された。

(3)DIDS およびホウ酸を添加した条件で BOR4-DDM の結晶化を試みているが、残念ながら

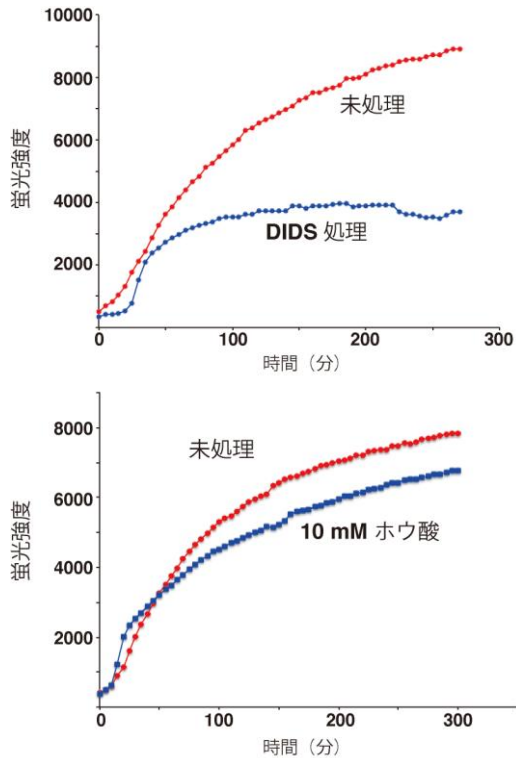


図 2. CPM アッセイによる BOR4-DDM の熱安定性の確認
BOR4-DDM を CPM 存在下で 40°C に加熱し、蛍光を測定した。変性が進むと蛍光が増大する。DIDS 処理をした膜画分から精製した BOR4-DDM は熱安定性が大幅に高くなっていた (A)。また、精製された BOR4-DDM に 10 mM ホウ酸を添加することでも熱安定性の上昇が観察された (B)。

ら結晶が出る条件は見いだせていない。

(4) BOR1 の植物体での機能を欠損させる変異である *bor1-1*, *bor1-2* 変異を BOR1 と BOR4 に導入したタンパク質を合成し、結晶化の候補として使用できるかどうかを検討した。残念ながら、これら *bor1-1*, *bor1-2* 変異により BOR タンパク質の細胞膜局在性が失われることが判明した。この結果は結晶化解析の立場からはネガティブであるが、新しい知見でもあるため論文として公表する予定である。

(5) 本研究の目的は BOR の結晶構造を解析することであるが、残念ながらこれまでに BOR の結晶を得るに至らなかった。しかしながら、数多くの BOR タンパク質の中で BOR4 が界面

活性剤で可溶化した際の単分散性が高く結晶構造解析に向いていると考えられること、DIDS とホウ酸の添加で BOR4 の熱安定性を向上出来ることを明らかにした。今後は、本研究で絞り込まれた条件を用いて、結晶化条件のスクリーニングに集中することで BOR4 の結晶が得られると期待される。

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 3 件)

(1) Shimpei Uraguchi, Takehiro Kamiya, Takuya Sakamoto, Koji Kasai, Yutaka Sato, Yoshiaki Nagamura, Akiko Yoshida, Junko Kyojuka, Satoru Ishikawa, Toru Fujiwara. Low-affinity cation transporter (*OsLCT1*) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109: 20959-20964 (2011) 査読有

DOI: 10.1073/pnas.1116531109

(2) Akira Yoshinari, Koji Kasai, Toru Fujiwara, Satoshi Naito, Junpei Takano. Polar localization and endocytic degradation of a boron transporter, BOR1, is dependent on specific tyrosine residues. *Plant Signal. Behav.* 7:64-69 (2012) 査読有

DOI: 10.4161/psb.7.1.18527

(3) Ramón Pérez-Castro, Koji Kasai, Felipe Gainza-Cortés, Simón Ruiz-Lara, José A. Casaretto, Hugo Peña-Cortes, Jaime Tapia, Toru Fujiwara, Enrique González. *VvBOR1*, the grapevine ortholog of *AtBOR1* encodes a efflux borate transporter and is differentially expressed in reproductive tissues from *Vitis vinifera*. *Plant Cell Physiol.* 53: 485-494 (2012) 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pcs001

[学会発表] (計 3 件)

(1) 笠井 光治、高野 順平、藤原 徹、シロイヌナズナホウ酸トランスポーターBOR1の細胞内偏在機構の解析、日本土壤肥料学会 2011 年度つくば大会、2011 年 8 月 8 日~8 月 10 日、つくば国際会議場

(2) 笠井 光治、高野 順平、藤原 徹、ホウ酸トランスポーターBOR1の極性欠損変異体の解析、第 53 回日本植物生理学会年会、2012 年 3 月 16 日~3 月 18 日、京都産業大学

(3) 笠井 光治、藤原 徹、ホウ酸トランスポーターBOR1の極性形成およびホウ素濃度に応答した分解制御の生理学的意義、第 54 回日本植物生理学会年会、2013 年 3 月 21 日

~3月23日、岡山大学

〔図書〕(計0件)

〔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://park.itc.u-tokyo.ac.jp/syokuei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 光治 (KASAI KOJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任
准教授

研究者番号：80517938

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし