

平成30年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14841

研究課題名(和文) ナノ粒子利用によるダイズ生育初期における湿害の改善法の開発

研究課題名(英文) Improvement of soybean-flooding tolerance by nanoparticles

研究代表者

小松 節子 (KOMATSU, Setsuko)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：90355751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の水田転換畑におけるダイズの栽培では、障害が発生し生産が不安定となるので、湿害を回避する技術が必要である。そこで、出芽期のダイズの冠水抵抗性におけるナノ粒子の関与をプロテオミクス技術により解析する。ダイズの出芽期における冠水ストレスによる生育遅延は、ナノ亜鉛やナノ銀と比較して、ナノアルミナにより軽減される。ナノアルミナによるストレス軽減効果には、エネルギー代謝系や細胞死の抑制が関与していることが明らかになった。さらにミトコンドリアプロテオミクスを行うことにより、冠水下のダイズのストレス軽減に、エネルギー制御や膜透過性が関与していることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the possible interactions between nanoparticles (NPs) and crops under flooding stress, the label-free proteomic technique was used. Alumina-NPs under flooding stress enhanced soybean growth compared to ZnO-NPs and Ag-NPs. Alumina-NPs-responsive proteins were related to protein synthesis/degradation, glycolysis, and lipid metabolism. Alumina-NPs promoted the growth of soybean under flooding stress by regulating energy metabolism and cell death. Mitochondrion was the target organelle of Alumina-NPs. Mitochondrial proteomic analysis revealed that the abundance of voltage-dependent anion channel protein was increased in soybeans with Alumina-NPs. Therefore, Alumina-NPs of various sizes affect mitochondrial proteins under flooding stress by regulating membrane permeability and tricarboxylic acid cycle activity. Furthermore, the energy regulation and membrane permeability might be the principal component for NPs interaction with soybean.

研究分野：分子生物学

キーワード：ストレス応答反応 ナノ粒子 ダイズ 湿害 プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

日本においてダイズの播種は梅雨期に重なっているため、生育初期の湿害が問題であり、出芽不良による欠株、雑草との生育競合、および土壌病原菌の感染につながり、最終的に収獲量の低下を招く。この生育初期の湿害を3期に分けると、「発芽前」の湿害に関しては栽培学的に種子含水率の調節等により実用的に回避でき、「生育1週間」以降の湿害に関しては遺伝学的に活発に研究されている。「出芽期」の湿害に関しては、プロテオオミクス技術を用いて冠水応答機構および冠水耐性機構等が解明されつつある。つまり、ダイズ出芽期の湿害には多数の因子が相互作用し、細胞内局在性を示しているため、ダイズに耐湿性を付与するには、複数の関連因子を改変する必要があることが示されている。

一方、ナノ粒子は、比表面積が極めて大きいこと、量子サイズ効果によって特有の物性を示すことなど、一般的な大きさの固体の材料とは異なることから、様々な分野で研究・利用が進められている。特に、各種細菌に対して抗菌・殺菌力があり、さらに人体には無害なナノ銀やナノアルミナは、植物の生長を促すことが報告され、サイズ・濃度特異性や細胞内局在性も示唆されつつある。そこで、ナノ粒子の植物における機能発現に至る機構を解明し、ナノ粒子利用によるダイズ出芽期における湿害を改善する技術を開発することは重要である。

### 2. 研究の目的

(1) ナノ粒子によるダイズ出芽期の湿害応答を制御する機構を解明する。つまり、ダイズ出芽期の冠水時における、ナノ粒子によるタンパク質間相互作用や細胞内局在性を解析し、冠水下でのダイズの生育遅延の改善におけるナノ粒子の役割をタンパク質レベルで解明する。

(2) ナノ粒子によるダイズ出芽期の湿害を改善する技術を開発する。つまり、ダイズの生長に対するナノ粒子のサイズ・濃度特異性や器官・細胞内局在性、効果の時期特異性を解析し、ナノ粒子利用によるダイズ出芽期における湿害を改善する技術を提案する。

### 3. 研究の方法

(1) ダイズ湿害発生時におけるナノ粒子の影響の形態学的・植物生理学的解析：ナノ粒子は、比表面積が極めて大きいこと、量子サイズ効果によって特有の物性を示すことから、ナノ銀(2, 15, 50-80 nm)、ナノアルミナ(5, 30-60, 135 nm)、ナノ亜鉛等を用いて、さらに、濃度依存性と時期特異性を、形態学的・植物生理学的に測定する。さらに、ダイズの出芽期の冠水ストレスにおいて、ユビキチン・プロテアソーム系のタンパク質群

が変動することが明らかになっているので、ナノ粒子処理後、エバンスブルーの取り込みを測定し、細胞死の発生程度を解析し湿害の緩和程度を数値化する。

(2) ダイズ湿害発生時におけるナノ粒子の影響のタンパク質科学的解析：出芽期のダイズを用いて、(1)で冠水による生育遅延を改善したナノ粒子を用いて、無処理群、冠水処理群、冠水処理+ナノ粒子処理群を設定し、経時的にタンパク質を抽出し、ゲルフリー・ラベルフリーデファレンシャルプロテオミクス解析を行う。さらに、同じ条件下で、ミトコンドリア等を精製し、精製効率を測定後、ゲルフリー・ラベルフリーデファレンシャルプロテオミクス解析を行い、ナノ粒子の器官特異的機作を明らかにする。

(3) ナノ粒子添加により変動するタンパク質群利用によるダイズ湿害耐性機構解明：既に(2)で同定されたナノ粒子添加により変動するタンパク質群の蓄積量の経時的变化を用いてクラスター解析を行い、ナノ粒子添加によるタンパク質の変動パターンから、ダイズ湿害機構および湿害耐性機構を推定する。さらに、クラスター解析後、情報科学的にタンパク質間相互作用を解析し、ナノ粒子の機能発現の鍵となるタンパク質群を絞り込む。特に酵素群においては、酵素活性を指標とした確認実験を行う。

(4) 顕著に変動するタンパク質群の他作物への影響の解明：ナノ粒子存在下のダイズで検出されたタンパク質群による調節機構が、コムギ等でも共通に存在するか否かを解析する。

### 4. 研究成果

(1) ダイズ(品種エンレイ)を用いて、出芽期の冠水処理時のナノ粒子の影響を解析した。ダイズを播種後、2日目で4日間の冠水処理を行う時に、各種粒子サイズ・各種濃度のナノアルミナ、ナノ銀、ナノ亜鉛水溶液を添加し、経時的に根の伸長および重量等を測定した。ナノ亜鉛や高濃度のナノ粒子は伸長を抑制するが、50 ppmの30-60 nmナノアルミナは、根の伸長を促進する効果がある(図1)。

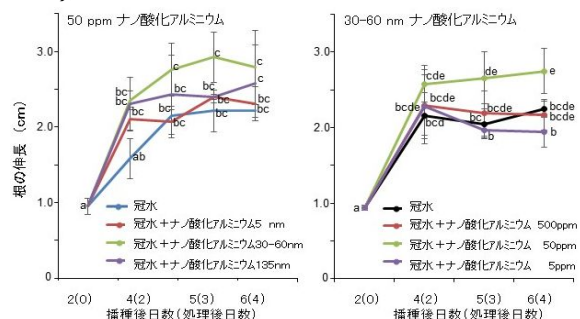


図1 冠水下のダイズの伸長に及ぼすナノアルミナの影響：異なるアルファベットはANOVA解析により顕著であることを示す。

(2) 冠水処理時に 50 ppm の 30-60 nm ナノアルミナを添加後、経時的にタンパク質を抽出しプロテオミクス解析を行い、得られたタンパク質群を、代謝マップ上にプロットした。冠水処理により、解糖系、嫌気代謝系およびクエン酸回路等が促進するが、ナノアルミナにより抑制される(図2)。

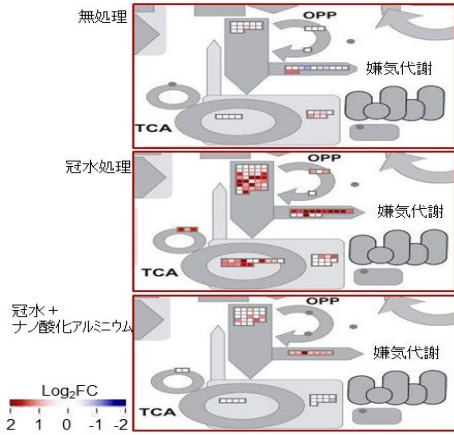


図2 冠水下のダイズの根タンパク質群に及ぼすナノアルミナの代謝系に及ぼす影響：プロテオミクス解析で得られたタンパク質群に対して MapMan ソフトを用いて、マッピングした。赤は増加、青は減少を示す。

(3) 無処理、冠水処理、ナノアルミナ添加により共通に変動する 172 タンパク質群の経時変化を利用して、クラスター解析を行った。解糖系、ストレス、植物ホルモンの関与するタンパク質群の蓄積が冠水により増加し、ナノアルミナにより、対照レベルまで回復する(図3)。

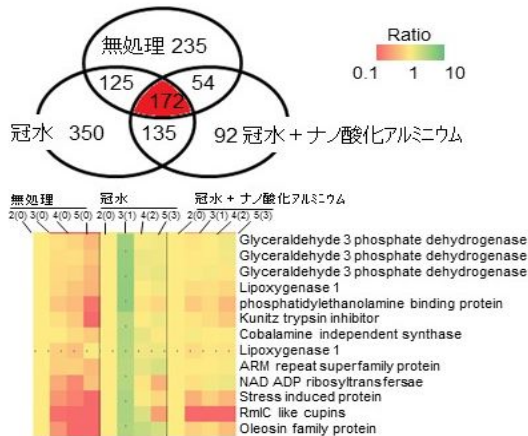


図3 冠水下のダイズの根タンパク質群に及ぼすナノアルミナの影響：ダイズ播種後2日での冠水処理時に、50 ppm の 30-60 nm ナノアルミナを添加し、タンパク質を経時的に抽出した。変動するタンパク質群の蓄積量を用いてクラスター解析を行った結果の一部を示す。

(4) 無処理、冠水処理、ナノアルミナ添加のダイズ根の細胞死への影響を経時的なエバンスブルーの取込により解析した。ダイズ根において、冠水処理により細胞死は増加したが、ナノアルミナ添加により減少した。つまり、ナノアルミナ添加により、冠水で細胞死を抑制することにより、冠水ストレスを軽減していることが示唆される(図4)。

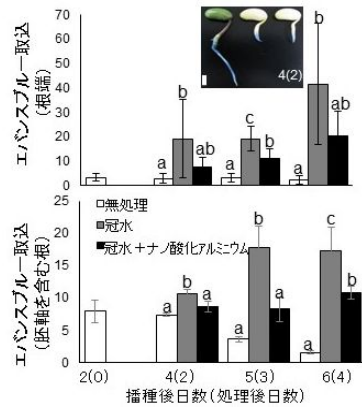


図4 冠水下のダイズの地下部に及ぼすナノアルミナの影響：ダイズ播種後2日での冠水処理時に、50 ppm の 30-60 nm ナノアルミナを添加し、エバンスブルーの取込 (A600/g 重量) を測定した。異なるアルファベットは ANOVA 解析により顕著であることを示す。

(5) クラスター解析後、情報科学的にタンパク質間相互作用を解析し、ナノ粒子の機能発現の鍵となるタンパク質群を絞り込んだ結果、ミトコンドリアに存在するタンパク質群の関与が示唆された。そこで、ダイズ根端からミトコンドリア画分を精製し、ミトコンドリアプロテオミクス解析を行った。結果として、多くのミトコンドリアに存在するタンパク質群は、冠水処理時と同様にナノアルミナ添加で減少したが、voltage dependent anion channel 等イオンチャンネル関連タンパク質は、ナノアルミナ添加で増加した(図5上)。voltage dependent anion channel は、遺伝子発現レベルにおいてもナノアルミナ添加で誘導された(図5下)。

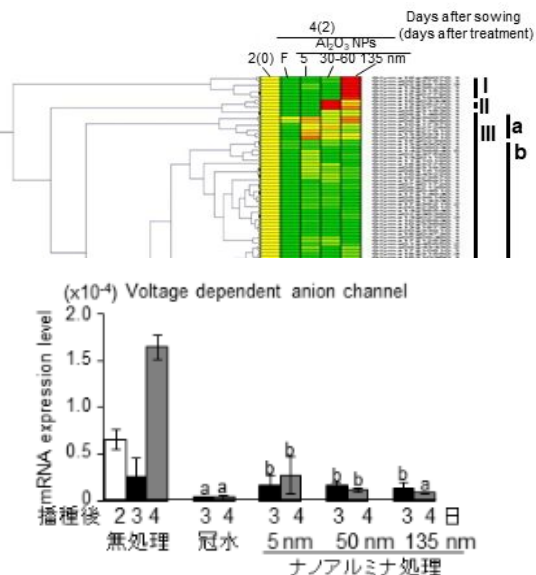


図5 ナノアルミナ添加後のダイズ根におけるミトコンドリアプロテオミクス解析後のクラスター解析結果の一部と遺伝子発現解析結果の一部：クラスター解析図において、処理前と比較して、それぞれの処理により赤は増加・緑は減少を示す(上)。voltage dependent anion channel の遺伝子発現解析結果を示す。異なるアルファベットは ANOVA 解析により顕著であることを示す。

(6) ナノ粒子添加により顕著に変動するタンパク質群のサイズ以外の作物への影響を検討するために、コムギを用いて、プロテオミクス解析を行った。コムギにおいては、ナノアルミナよりもナノ銅やナノ鉄の方が、生育初期の生長を促進した。さらに、非生物学的ストレスに関しては、冠水ストレスよりも乾燥ストレスに介して、ストレス緩和に関する効果を示した。しかし、ナノ粒子によりストレスを緩和する機構に関しては、コムギもサイズと同様に、エネルギー制御や膜透過性に関連する機構が関与することが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

Yasmeen F, Raja NI, Ilyas N, Komatsu S. Quantitative proteomic analysis of shoot in stress tolerant wheat varieties on copper nanoparticle exposure. *Plant Mol Biol Rep.* 査読有, 36, 2018, 326-340. doi: 10.1007/s11105-018-1082-2

Yasmeen F, Raja NI, Razzaq A, Komatsu S. Proteomic and physiological analyses of wheat seeds exposed to copper and iron nanoparticles. *Biochim Biophys Acta.* 査読有, 1865(1), 2017, 28-42. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.10.001

Mustafa G, Komatsu S. Review- Nanoparticles mediated soybean response mechanism at morphological, physiological, and proteomic level. *Current Proteomics.* 査読有, 14(1), 2017, 3-12. doi: 10.2174/1570164613666161128145103

Yasmeen F, Raja NI, Razzaq A, Komatsu S. Gel-free/label-free proteomic analysis of wheat shoot in stress tolerant varieties under iron nanoparticles exposure. *Biochim Biophys Acta.* 査読有, 1864(11), 2016, 1586-98. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.08.009

Yasmeen F, Raja NI, Mustafa G, Sakata K, Komatsu S. Quantitative proteomic analysis of post-flooding recovery in soybean root exposed to aluminum oxide nanoparticles. *J Proteomics.* 査読有, 143, 2016, 136-150. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.014

Mustafa G, Komatsu S. Insights into the response of soybean mitochondrial proteins to various sizes of aluminum oxide nanoparticles under flooding stress. *J Proteome Res.* 査読有, 15(12), 2016, 4464-4475. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00572

Mustafa G, Sakata K, Komatsu S. Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress. *J Proteomics.* 査読有, 148, 2016, 113-25. doi: 10.1016/j.jprot.2016.07.027

Mustafa G, Komatsu S. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. *Biochim Biophys Acta.* 査読有, 1864(8), 2016, 932-44. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.02.020

Hossain Z, Mustafa G, Sakata K, Komatsu S. Insights into the proteomic response of soybean towards Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *J Hazard Mater.* 査読有, 304, 2016, 291-305. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.10.071

### [ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Mustafa G, Komatsu S. Insights into nanoparticles interaction with soybean at the proteomics level. *MSP2018*, 2018.

Mustafa G, Komatsu S. Quantitative proteomic analysis of soybean mitochondrion on exposure to varying size of aluminum oxide nanoparticles under flooding. *International Proteomics Conference 2017*, 2017.

Yasmeen F, Raja NI, Komatsu S. Differential effects of copper and iron nanoparticles on wheat shoot proteomics. *International Plant Proteomic Conference*, 2017.

Komatsu S, Mustafa G, Hossain Z, Yasmeen F, Wang X, Yin X. Quantitative proteomic analysis of flooding and its recovery in soybean exposed to aluminum oxide nanoparticles. *15th Human Proteome Organization World Congress*, 2016.

小松節子, WANG Xin, YIN Xiaojian. アルミニウムナノ粒子存在下の冠水および回復過程におけるサイズのプロテオミクス解析. 第89回日本生化学会大会, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

小松 節子 (KOMATSU, Setsuko)  
筑波大学・生命環境系・研究員  
研究者番号 : 9 0 3 5 5 7 5 1

### (4) 研究協力者

MUSTAFA Ghazala  
YASMEEN Farhat  
HOSSAIN Zahed