

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07775

研究課題名(和文) イネのシリカから発見したタンパク質はバイオミネラリゼーションに関与するか

研究課題名(英文) Exploration of organic matrices(proteins) involved in biomineralization of rice leaves

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネは葉身や籾殻などにケイ酸体を形成し、環境ストレスから植物体を防御している。ケイ酸が重合して非結晶シリカにな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・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抗菌タンパク質であることを明らかにした。免疫電子顕微鏡法によりケイ酸体内部に同タンパク質の偏在が判明した。さらにケイ酸体内部の超微細構造を解析した結果、シリカナノ粒子間に有機マトリックスの存在が認められた。今回同定した有機マトリックスは既存のシリカ由来タンパクと比較して微弱なケイ酸重合活性を示したが、シリカ形成に対する機能は現時点では不明と言わざるを得ない。

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、海綿動物等で既に解明されているが、高等植物では未解明のままであった。本研究の成果により、イネのケイ酸体内部(シリカナノ粒子間に)に抗菌タンパク質が局在することが明らかとなった。化学防御物質として機能し得る同タンパク質群がケイ酸体に含まれていることを示したのは本研究が初めてであり、これまで廃棄されていた稲わら、籾殻が優れた抗菌材料として利活用できる新たな可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Oryza sativa forms silica bodies on leaf blades and rice husks to protect plants from some environmental stress. The molecular mechanisms of biosilicification (silica biomineralization) remains unclear in higher plants. In this study, we indicated that the organic matrices in silica bodies are antibacterial proteins. Immune electron microscopy revealed the localization of these proteins inside the silica body. Furthermore, as a result of analyzing the ultrafine structure inside the silica body by Cryo-FIB-SEM, an organic matrix was intermixed with silica nano particles. The organic matrices identified in this study showed weaker silicic acid polymerization activity compared to known biosilicification proteins (obtained from biosilicas of diatom and sponges), but its true function for silica formation is unknown at this time.

研究分野：バイオミネラリゼーション

キーワード：イネ シリカ 免疫電子顕微鏡法 有機マトリックス タンパク質 ケイ酸 抗菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本の代表農産物であるイネはケイ酸を吸収して非結晶シリカへと重合し、葉身や籾などの表面に非結晶シリカの集合体(ケイ酸体と呼称)を形成する。ケイ酸体の役割は物理的強度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システムと考えられてきた。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)に関する報告例は本研究開始当時ほとんどなく、イネのシリカ形成(バイオミネラリゼーション)の分子機構は未解明であった。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。イネ葉身に形成されたシリカ内からケイ酸重合活性を検出し、その主成分が塩基性タンパク質 LTPL12(当初 ASK11 と命名)であることを初めて突き止めた。シリカを作る生物は高等植物の他に珪藻や海綿動物、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が必ず存在することが報告されていた。しかし、高等植物において多糖類がシリカ形成のための鋳型となっている説は提唱されていたが、ケイ酸重合活性を示すタンパク質の報告は研究開始当時、キュウリ病原応答タンパク質の一例を除き皆無であった。

2. 研究の目的

他の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、特に葉身のシリカから発見したタンパク質 LTPL がケイ酸体形成に関与するのか調べるのが本研究の主な目的である。特に(1)葉身シリカ内のタンパク質のプロテオーム解析(2)籾殻シリカにも有機マトリックスが存在するのか確認すること、(3)LTPLの局在を免疫組織化学的手法で調べることを、以上の3項目に焦点を当てた。

3. 研究の方法

(1)ケイ酸体単離およびシリカからの有機マトリックス抽出

イネ葉身の破碎液を濾過した後、時計皿を用いて遠心力を加えると、皿の中心部にケイ酸体のみを集めることができる。収集したケイ酸体に対してフッ化水素酸溶液を添加してシリカを溶解させ、限外分子量 500-1000 の透析膜を用いてフッ素を除去した後、凍結乾燥を行った。

(2)有機マトリックスの同定

凍結乾燥物を SDS/DTT 溶液に溶解させ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供し、各種染色を行った。また、シリカ沈殿活性を調べるために透析乾燥物を各溶媒に溶かし、ケイ酸過飽和溶液に添加した。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。SDS-PAGE ゲル上の CBB 陽性バンドを全て切り出し、ゲル内消化と LC-MS 解析を実施(外注)した。公開されている既知データベースを用いてタンパク質を同定した。また、同様の手法を用いて籾殻シリカに含まれるタンパク質の同定を試みた。

(3)同定したタンパク質に対する抗体作製と免疫電子顕微鏡

同定した LTPL に対するポリクローナル抗体を作製(免疫動物はウサギ)した。LTPL の局在を調べるため、精製した一次抗体および抗ウサギ IgG ヤギ抗体(二次抗体)を用いて免疫組織化学的手法を用いて分析した。光学顕微鏡観察に BCIP/NBT システムを、免疫電子顕微鏡観察には金ナノ粒子結合二次抗体を使用した。分析には電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)および Cryo-FIB-SEM システムを使用した。

4. 研究成果

(1)葉身ケイ酸体(シリカ)の有機マトリックス

葉身に時期特異的に形成されるファン型ケイ酸体(図 1A)には LTPL12 の他に LTPL8 が主成分として含まれていた。両分子ともに分子量 11 kDa、等電点も近しく、両分子を電気泳動および HPLC 等で分離することは困難であった。また、LTPL 以外のタンパク質は CBB 染色による検出はできなかった。両タンパク質のホモログは他の植物にも広く存在する普遍的な抗菌タンパク質である。HPLC で精製を行ったところ、海綿シリカ形成タンパク質と比較するとケイ酸重合活性は微弱であった。また、フッ化水素酸溶液よりも穏やかにシリカを溶出できるフッ化アンモニウム溶液を用いて抽出を行った結果、前述の LTPL に加えて低分子領域に CBB 陽性かつ銀染色陰性のバンドが再現よく検出された(図 1B)。低分子画分にもケイ酸重合活性が認められた。

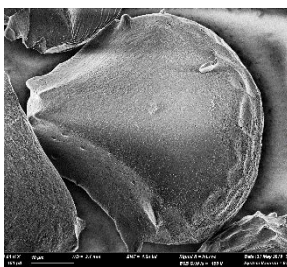


図 1A ファン型ケイ酸体の SEM 像



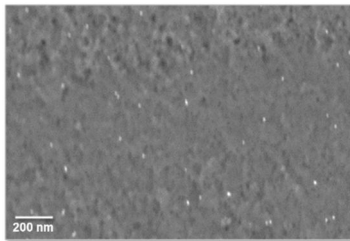
図 1B ケイ酸体に含まれていた有機マトリックス

(2) 籾殻シリカの有機マトリックス

葉身とは異なり、籾殻からシリカ構造体を分離することは困難であったため、籾殻を直接フッ化水素酸溶液に浸漬したところ、シリカ由来と予想される高分子質量のタンパク質の抽出に成功した。LC-MS 解析およびデータベース検索の結果、同タンパク質内の一部のドメインが植物の病原関連タンパク質（糖分解酵素）と高い相同性を示すことが分かった（投稿準備中につき、詳細な結果は示していない）。籾殻の非シリカ層（クチクラ）には糖分解酵素などの防御タンパク質が含まれている報告は以前からあったが、本研究により籾殻シリカ内にも抗菌タンパク質が含まれていることが明らかとなった。前述の LTPL も籾殻シリカ内分子の候補の一つとして挙げられたが、CBB 染色では検出できないことから、籾殻シリカの主要な有機マトリックス成分ではないことが示唆された。

(3) LTPL の局在解析、ケイ酸体内部のナノ構造解析

LTPL12、LTPL8 の各固有配列部分（8 アミノ酸合成ペプチドを作製）をターゲットに抗体を作製し、光学顕微鏡および電子顕微鏡による局在解析を行った。光学顕微鏡観察ではファン型ケイ酸体全体に強いシグナルが観察され（結果は示していない）、さらに免疫電子顕微鏡法では二次抗体の金コロイド粒子がケイ酸体内部に広く存在する様子が観察された（図 2A）。集束イオンビーム付属クライオ走査型電子顕微鏡（Cryo-FIB-SEM）システムを用いて、ケイ酸体内部の超薄切片を切り出し、HAADF-STEM（High Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy）による観察を行ったところ、ケイ酸体を構成するシリカナノ粒子と有機マトリックスが共存していることが示唆された（図 2B）。



(Ozaki et al., 投稿中)

図 2A ケイ酸体内部の免疫電顕像

(二次抗体金コロイド粒子径は 15 nm)

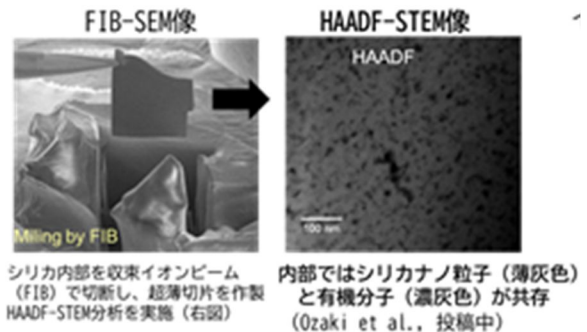


図 2B HAADF-STEM によるケイ酸体内部の観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wong YH, Ozaki N., Zhang WP. et al.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of Barnacle Shell Proteins by Transcriptome and Proteomic Approaches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomineralization, Endo K., Kogure T., Nagasawa H. (eds), Springer	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/978-981-13-1002-7_11	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 Ozaki N., Ishida T., Osawa A. et al.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Rice Plant Biomineralization: Electron Microscopic Study on Plant Opals and Exploration of Organic Matrices Involved in Biosilica Formation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomineralization, Endo K., Kogure T., Nagasawa H. (eds), Springer	6. 最初と最後の頁 129-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/978-981-13-1002-7_14	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 43(2)
2. 論文標題 ミネラルを利用した防御戦略 - 生物が鉱物をつくる分子メカニズム -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本農薬学会誌	6. 最初と最後の頁 129-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1584/jpestics.W18-39	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 2(12)
2. 論文標題 イネのシリカとバイオミネラリゼーション	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 61-65
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 -

1. 著者名 尾崎 紀昭, Fabio Nudelman	4. 巻 46 (3)
2. 論文標題 植物のバイオミネラリゼーション-動けない生物の防御戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本結晶成長学会誌	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) https://doi.org/10.19009/jjacg.46-3-04	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yasunori Nakamura, Masami Ono, Noriaki Ozaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Structural features of α -glucans in the very early developmental stage of rice endosperm	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cereal 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) 10.1016/j.jcs.2019.05.012	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 (7)
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18件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Ozaki Noriaki
2. 発表標題 Silica Biomineralization in rice plants
3. 学会等名 International Symposium & School on Crystal Growth Fundamentals 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻一希・石田拓也・野下浩二・尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ葉身ファン型シリカ形成に関するタンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第153回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤千佳・安孫子澗・大川莉奈・辻一希・尾崎紀昭
2. 発表標題 簡易ケイ酸定量法の確立とイネ葉身・籾殻におけるケイ酸含有量の測定
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第153回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安孫子澗・矢部涼香・尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ籾殻シリカ形成に関するタンパク質の探索
3. 学会等名 第13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 2018年

1. 発表者名 辻一希・石田拓也・鈴木道生・野下浩二・岡野桂樹・吉澤結子・尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ葉身シリカ形成に関するタンパク質の探索
3. 学会等名 第13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 2018年

1. 発表者名 中村江里・船生柗伍・緒明佑哉・尾崎紀昭・今井宏明
2. 発表標題 イネ葉身・籾殻・穂軸のバイオシリカのナノ構造解析
3. 学会等名 第13回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野桂樹・伴勇希・甲斐匠・尾崎紀昭・小黒-岡野美枝子・Wong Yue Him・吉村えり奈・野方靖行
2. 発表標題 アカフジツボの殻のマイクロアーキテクチャー 簡易光学顕微鏡と低真空SEMによる観察
3. 学会等名 第13回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yue Him Wong, Noriaki Ozaki, Chong Chen, Hiromi Watanabe, Erina Yoshimura, Yusayuki Nogata, Mieko Okano-Oguro, Benny KK Chan, Keiju Okano
2. 発表標題 Variations and conservations in barnacle shell structures and shell proteins
3. 学会等名 第13回バイオミネラリゼーションワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡野桂樹・Wong Yue Him・紙野圭・野方靖行・尾崎紀昭・小黒-岡野美枝子
2. 発表標題 アカフジツボの幼生セメント, 成体セメント, 殻中タンパク質の配列から水中で働く高機能分子複合体の秘密を探る,
3. 学会等名 第19回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ozaki Noriaki, Ishida Takuya, Suzuki Michio, Okano Keiju, Yoshizawa Yuko
2. 発表標題 Plant opal formation: What organic matrices are involved in biosilicification of the rice plants?
3. 学会等名 14th International Symposium on biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Funyu Shugo, Sato Kanako, Yamauchi Akira, Ishigure Takaaki, Oaki Yuya, Kisailus David, Ozaki Noriaki, Imai Hiroaki
2. 発表標題 Mechanical and optical properties of biosilicas in a rice plant.
3. 学会等名 14th International Symposium on biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Wong Yue Him, Sun J, Yoshimura E, Ozaki N, Oguro-Okano M, Qian PY, Okano K
2. 発表標題 Comprehensive profiling of barnacle shell proteins by an integrated transcriptomic and proteomic approach.
3. 学会等名 14th International Symposium on biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安孫子澯・山口明莉・野下浩二・岡野桂樹・吉澤結子・尾崎紀昭
2. 発表標題 イネ初殻シリカ形成に関するタンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第152回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安孫子澗・後藤千佳・尾崎紀昭
2. 発表標題 籾殻シリカ形成の分子機構解明に向けたタンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriaki Ozaki, Kazuki Tsuji, Rei Abiko, Michio Suzuki, Fabio Nudelman
2. 発表標題 Rice Plant Biomineralization: Ultrastructure of biosilica and defense protein
3. 学会等名 15th International Symposium on Biomineralization (Munich, Germany) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村江里, 佐藤可奈子, 緒明佑哉, 尾崎紀昭, 今井宏明
2. 発表標題 イネ科植物のプラントオパールナノ構造解析
3. 学会等名 第14回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎紀昭, 辻一希, 野下浩二, 鈴木道生, Fabio Nudelman
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡システムによるイネ ファン型シリカボディーのナノ構造解析
3. 学会等名 第14回バイオミネラリゼーションワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻一希, 野下浩二, Fabio Nudelman, 尾崎紀昭
2. 発表標題 イネのファン型ケイ酸体に存在するタンパク質の同定および機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度東北支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>秋田県立大学・応用生物科学科 尾崎紀昭研究室ホームページ https://sites.google.com/view/noriakiozaki-lab/%E3%83%9B%E3%83%BC%E3%83%A0</p> <p>リサーチマップ(尾崎紀昭) https://researchmap.jp/read0134744</p>
--

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
研究分担者	常盤野 哲生 (Tokiwano Tetsuo) (50312343)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授 (21401)	