

機関番号：13801

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19380182

研究課題名 (和文) 植物における His 型結合ペプチドの検索と化学生物学的機能の解明

研究課題名 (英文) Screening of the His-type binding peptides and elucidation of their chemical-biological functions in plants.

研究代表者

原 正和 (HARA MASAKAZU)

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：10293614

研究成果の概要 (和文)：植物には、金属恒常性と金属耐性に関わる SH 型金属結合ペプチドが存在するという事実が確定している。本研究で、われわれは、植物において、SH 基ではなく、ヒスチジン残基によって金属と結合する新しいタイプのペプチドを見出だそうと試みた。その結果、様々な植物から His 型金属結合ペプチドを見出だすことに成功した。ここに、われわれは、植物における His 型金属結合ペプチドに関する新たなパラダイムを提唱する。

研究成果の概要 (英文)：It has been established that plants possess SH-type metal-binding peptides which are related to the metal homeostasis and the metal tolerance. In this study we challenged to find novel type peptides which bind metals with histidine residues not with SH groups in plants. Consequently, we found His-type metal binding peptides from various plants. Here, we propose a new paradigm regarding His-rich metal binding peptides in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究代表者の専門分野：植物生理学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：植物、蛋白質、金属結合、遺伝子、ストレス

1. 研究開始当初の背景

植物は、地上の生態系を支える生産者であり、その役割を十分果たすには、適切な種類と量のミネラルが必要である。しかし、耕地を含む既利用地では、多くが人為・非人為的にミネラルバランスを失っているといわれる。とりわけ、特定のミネラルが過剰となった土地、中でも重金属汚染地の修復は困難であり、地球規模の課題である。バイオテクノロジー分野では、ここ 10 年ほどの間に、ファイトキレーチンやメタロチオネイン、さらにはシデ

ロフォアなどのペプチド系物質を使ったファイトレメディエーション研究が展開され、一定の成果をあげてきた。しかし、ファイトキレーチン、メタロチオネインに関して、必ずしも発現と耐性に正の相関がない事例も多い。これは、ファイトキレーチンやメタロチオネインのみではすべての重金属耐性を説明できないことを意味する。

ところで、申請者らは、植物の水ストレスタンパク質デハイドリンを研究してきた。デハイドリンは、多くの生物が水ストレス時に

蓄積するペプチドであるヒドロフィリン類の一種であり、LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質に属する。申請者は、ミカンからデハイドリン遺伝子を単離し、デハイドリンが活性酸素を消去することによってタバコの低温耐性を向上させることを示した。その過程で、デハイドリンがHKGEHHS GDHH というモチーフで銅などの金属と高親和性 (解離定数 $1.6 \mu\text{M}$) かつ高容量 (1分子あたり 16mol の銅) で結合すること、その結合にはヒスチジン残基が関与していることを見出した。デハイドリンにはシステインがないので、植物には、ファイトキレーチンやメタロチオネインとは異なる、非SH型金属結合ペプチドともいべき分子種が存在することがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非SH型金属結合ペプチドの世界に切り込むことであり、特に、ヒスチジンを介して結合する金属ペプチドの、化学生物学的性質と生理学的役割を解明することである。

3. 研究の方法

本研究は、1) His型金属結合ペプチドの網羅的スクリーニングとカタログ化、2) His型金属結合ペプチド特にデハイドリンの金属結合特性と新規生理機能の解明、の2つの柱から成る。1) では、直接結合アッセイスクリーニングと結合アッセイ遺伝子ライブラリースクリーニングを試みる。これらは、申請者が本研究の用途のために開発したスクリーニング法であり、前者はすでに実績がある。スクリーニングの成果は、His型金属結合ペプチドの候補としてカタログ化し、植物におけるHis型金属結合ペプチドの構造上の特性を見出す。また、発現量やグループの規模が顕著なものを選定し、結合の特異性や親和性など、金属との相互作用に関するデータを得るとともに、組織特異的または金属特異的発現、各種変異体の作成による生理学的機能の解明を進める。2) では、すでにHis型金属結合ペプチドとカテゴリ化されるべきデハイドリンについて、その金属結合ドメインの化学的性質を明らかにする。本ドメイン (HKGEHHS GDHH) は、H-X3-HモチーフとダブルHisモチーフ (HH) という、合成ペプチド研究で金属との親和性が認められる配列を、11アミノ酸の中にコンパクトに配した特異な領域であり、金属結合様式は大変興味深い。まず、CDスペクトルやNMRによって金属錯体形成時の立体配置を推定し、結合ドメインの構造多様性と他のHis型

金属結合ペプチドとの構造・結合活性相関などを解明する。

また、デハイドリンが金属と結合して発揮する生理機能を調査すべく、金属依存的に結合する分子種の同定を行う。リコンビナントタンパク質を使ったブルダウンアッセイなどを駆使してタンパク質や核酸、低分子をターゲットにする。すでに行っている予備実験では、核酸との相互作用がみられた。そこで、さらに相互作用の対象を広げて検索し、デハイドリンの新規な機能の発見につなげる。

4. 研究成果

1) His型金属結合ペプチドの網羅的スクリーニングとカタログ化：直接結合アッセイスクリーニングと結合アッセイ遺伝子ライブラリースクリーニングを試みたところ、ダイコン、キュウリ、ホウレンソウなどの野菜に加え、足尾地域の木本植物群、静岡県海岸線の海岸植物から、His型金属結合ペプチドの候補を、合計12個単離することができた。そのうち半数をMSによって同定し、そのほとんどが機能未知遺伝子産物であることが判明した。一方、研究の過程で、インシリコスクリーニングを試みた。シロイヌナズナ全体のORFのHis含量をパラメーターに、序列化したところ、高His含量の遺伝子群が発見された。この成果は、論文の添付資料として公表した。シロイヌナズナゲノム中で最もHis含量が高いペプチドAtHIRP1を詳細に研究した。その結果、本遺伝子は、乾燥などの環境ストレスによって強く誘導されること、本遺伝子産物は葉緑体に輸送されること、重金属と結合することを見出だした。AtHIRP1は、ストレスを受けた植物の葉緑体において、金属の恒常性維持や、ストレスによって引き起こされる重金属傷害の回避などに役立っている可能性がある。

2) His型金属結合ペプチド特にデハイドリンの金属結合特性と新規生理機能の解明：ウンシュウミカンのデハイドリンが亜鉛依存的に核酸と結合する事を見出した。CDにより、ウンシュウミカンのデハイドリンは、通常のバッファー条件では、特定の二次構造をとらない、いわゆる天然変性タンパク質として存在した。しかし、亜鉛と結合する事により、ランダム状態の割合が低下し、ヘリックス状態が増加するという二次構造の変化が認められた。ウンシュウミカンデハイドリンの金属結合モチーフHKGEHHS GDHHに関し、亜鉛存在下でのNMRによる立体配置を決定しようとしたが、シグナルの不安定さから帰属を断念した。上記の1)で述べた通り、わ

れわれは、シロイヌナズナの高 His 含有遺伝子群を特定したが、各種の演算の結果、そのほとんどが、特定の構造をとらないことが分かった。以上の結果、植物には、高 His 含有ペプチドをコードする遺伝子群が存在し、それらの多くは、天然変性タンパク質であるが、金属との共存により、特定の立体構造をとる、という可能性が示された。

ウンシュウミカンのデハイドリンの機能研究は進んだものの、デハイドリンが金属と結合するという現象の生理的な意義については不明であった。現在の技術では、カンキツは、生理学的、分子遺伝学的な研究を容易に行える実験対照とはいえない。そこで、ウンシュウミカンデハイドリンのホモログを、モデル植物シロイヌナズナのゲノムに求めた。ウンシュウミカンデハイドリンは、K2S 型デハイドリンであるが、K2S 型デハイドリンは、カンキツ以外からはほとんど見出だされていない。実際、シロイヌナズナのゲノムには、K2S 型デハイドリンはコードされていない。しかし、その類縁型である、KS 型デハイドリンは存在する。KS 型デハイドリンは、デハイドリンのサブタイプの中でも最も小さく（数十～百アミノ酸程度）、高等植物に広く分布することが次第に分かってきた分子種である。

すでに、シロイヌナズナのゲノムには、10 種類のデハイドリンがコードされていることが分かっている。このうち、ストレスで誘導される 4 種のデハイドリンが主に研究されてきた。われわれは、改めて、各種データベースを検索し、シロイヌナズナで最も強く発現するデハイドリンは、これら 4 種のデハイドリンではなく、His を高含有する (13.3%) *Atlg54410* であることを見出だした。*Atlg54410* は、まさに、上述の KS 型デハイドリンであった。われわれは、シロイヌナズナの His に富むデハイドリンという意味から、このタンパク質を *AtHIRD11* と命名した。*AtHIRD11* は、シロイヌナズナで最も強く発現するデハイドリンであるにも関わらず、これまで、全く特徴付けが行われてこなかった。そこで、われわれは、*AtHIRD11* の生化学的な特徴付けに集中した。その結果、*AtHIRD11* は、遺伝子及びタンパク質発現において、ストレスへの感受性が低く、細胞分裂組織である形成層帯に局在することが分かった。そこで、*AtHIRD11* をシロイヌナズナから精製したところ、リン酸化されていることが確認できた。*AtHIRD11* は、植物組織内で、凝集体として存在し、精製タンパク質は、重金属と強く結合することが分かった。分裂組織での局在や、凝集体としての存在様式は、これまで研究されてきたデハイドリンの一般的性質とはかけ離れていた。このように、最も多量に発現するデハイドリンが、特異な性質を

示すことが分かったため、25 年の歴史をもつデハイドリン研究に、新しい方向性を与える結果となった。

AtHIRD11 の生理的な役割の解明には、現在育成中の形質転換体（過剰発現体及び RNAi ノックダウン）を使った研究の成果を待たねばならないが、分裂組織に恒常的かつ多量に発現する金属結合性タンパク質という性質から、植物の成長と分化において重要な役割を担っている可能性が高い。また、われわれの研究室で、*AtHIRD11* を過剰に発現させたタバコの重金属環境下での生育特性が次第に明らかになっている。

以上、本研究によって、植物には、His 型金属結合ペプチドという分子カテゴリーが存在し、植物の成長と分化、さらには、重金属耐性などに深く関わっている可能性が見えてきた。今後、His 型金属結合ペプチドの分子的な特徴付けを進め、植物の成長制御やファイトレメディエーションへの応用に役立てたい。

最終的に、植物における His 型金属結合ペプチドの概念をまとめ、植物における役割とデハイドリンとの関連を考察した総説を国際誌に発表した。

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 5 件)

1. Hara M, Shinoda Y, Kubo M, Kashima D, Takahashi I, Kato T, Horiike T, Kuboi T (2011) Biochemical characterization of the Arabidopsis KS-type dehydrin protein, whose gene expression is constitutively abundant rather than stress dependent. *Acta Physiologiae Plantarum*, in press [査読有]
2. Hara M, Kashima D, Horiike T, Kuboi T (2010) Metal-binding characteristics of the protein which shows the highest histidine content in the Arabidopsis genome. *Plant Biotechnology*, 27:475-480 [査読有]
(http://www.wdc-jp.biz/pdf_store/jspcmb/pdf/pb27_5/27_475.pdf)
3. Hara M (2010) The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling & Behavior* 5:503-508 [査読有]
4. Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T (2009) DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant, Cell and Environment* 32:532-541 [査読有]
5. Hara M, Tokunaga K, Kuboi T (2008) Isolation of a drought-responsive

alkaline α -galactosidase gene from New Zealand spinach. Plant Biotechnology 25:497-501 [査読有]

(http://www.wdc-jp.biz/pdf_store/jspcm/b/pdf/pb25_5/25_497.pdf)

[学会発表] (計 10 件)

1. 原 正和 「植物のストレス蛋白における“天然変性”領域を介する相互作用」日本農芸化学会 2011 年度大会 [京都] 大会シンポジウム「“ひらひら”した不定形の領域を介する蛋白相互作用：医薬、農薬の新たな探索標的」2011 年 3 月 28 日
2. 加藤雄成、篠田友里、原 正和 シロイヌナズナデヒドリン AtHIRD11 タンパク質の物性変化に関する研究 日本農芸化学会 2011 年度大会 [京都] 2011 年 3 月 27 日
3. Masakazu Hara Dehydrins; unstructured proteins of plants. Official seminar of DDP program. Department of Botany, Technische Universität Braunschweig. 29 Nov, 2010
4. 原 正和、篠田友里、鹿島大樹、久保正幸、久保井徹 シロイヌナズナ His リッチデヒドリンのリン酸化と組織分布 第 28 回日本植物細胞分子生物学会仙台大会・シンポジウム講演要旨集 2010 年 9 月 3 日
5. Masakazu Hara Dehydrins, stress-related proteins of plants -Functions and possible applications-Pusan National University-Shizuoka University Joint Symposium and Graduate Students Forum for Promotion of the DDP. 5 Feb, 2010 at Hamamatsu Meitetsu Hotel
6. 鹿島 大樹、久保井 徹、原 正和 シロイヌナズナにおける His 型金属結合ペプチド AtHIRP1 の調査 農芸化学会中部支部第 153 回例会 (名古屋大学) 2008 年 11 月 1 日
他 4 件

[その他]

ホームページ等

<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・農学部・教授

研究者番号：10293614

(2) 研究分担者

河岸 洋和 (KAWAGISHI HIROKAZU)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：70183283

矢永 誠人 (YANAGA MAKOTO)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：10246449