

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658093

研究課題名(和文)植物におけるアミロイド様蛋白質の金属生理学的役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of metal physiological roles of amyloid-like proteins in plants

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドは、脳神経系疾患に関与する蛋白質である。金属イオンの存在下、天然変性状態からアミロイド凝集体へ変化する。しかし、生物におけるアミロイド形成の意義に関する定説はない。本研究は、植物にアミロイドに似た特性を有する蛋白質が存在し、それが、植物の重金属耐性に関与することを示した。すでに、本蛋白質は植物の種子に含まれ、種子が長期間乾燥に耐える現象に関与していることが知られている。従って、アミロイド様蛋白質は、植物を含む生物に広く分布し、ストレス耐性に関与することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Amyloids are proteins which are related to the brain and nerve system disorder. The proteins change their structures from disordered states to aggregate forms under the presence of metal ions. The established theory regarding the significance of amyloid formation in organisms has not been accepted. This study showed that plants possess amyloid-like proteins which contribute to the heavy metal tolerance in plants. It is known that the amyloid-like proteins which accumulated in plant seeds allow the seeds to maintain their drought tolerance for long periods of time. These results suggest that the amyloid-like proteins are distributed throughout the organisms including plants and are related to their stress tolerance.

研究分野：植物ストレス生理学

キーワード：重金属耐性 アミロイド 植物 デハイドリン

1. 研究開始当初の背景

アミロイドは、脳神経系疾患に関与する蛋白質であり、金属イオンの存在下、天然変性状態からアミロイド凝集体へ変化する。アミロイド関連疾患の予防と治療を目指し、アミロイドの形成メカニズムや、疾患との関係が盛んに研究され、多くの成果が得られてきた。一方、アミロイドの形成には、生物にとって、ポジティブな意義があるという意外な仮説がある。例えば、重金属を結合、隔離することにより、老化した脳内に蓄積しがちな重金属の濃度を下げるとはならないか、というものである。こうした説は、生物全般におけるアミロイドの意義を議論するうえで興味深い。

代表者は、植物の水ストレス蛋白質デハイドリンの研究を推進してきた。デハイドリンは、種子の成熟期の乾燥段階で強く発現する LEA (late embryogenesis abundant) 蛋白質の一種であり、種子が長期間乾燥に耐える性質に関与する。成長した植物でも、乾燥や低温に応答して多量に発現し、乾燥及び低温耐性に関わる。しかし、デハイドリンは、特定の二次構造をとらない天然変性蛋白質である上、既知の蛋白質と配列上の相関がないことから、どのように機能しているのか不明であった。

本研究は、デハイドリンが植物体内で凝集体として存在すると示唆されたことに端を発する。既にわれわれは、デハイドリンが重金属と結合することを見出ししていた。そこで、デハイドリンがアミロイドと似たふるまいをし、植物の金属ストレス耐性に関与することが予想された。シロイヌナズナのゲノムデータベースを、デハイドリンの配列特性に関するパラメーターを頼りに検索したところ、デハイドリン以外にも、アミロイドに似た物性を示す蛋白質の存在が示唆された。

2. 研究の目的

植物における、デハイドリン及びアミロイド候補蛋白質に関し、重金属による凝集メカニズムを解明し、重金属結合性と活性酸素静止活性に優れた新しい蛋白質を創出する。

3. 研究の方法

A 植物アミロイド候補データベースの完成: 植物アミロイドの候補を、天然変性蛋白質でかつ金属結合性という観点から、シロイヌナズナ遺伝子データベースからスクリーニングした。天然変性蛋白質予測ソフト (IUPred) と、当研究室が有するシロイヌナズナ高 His 含有蛋白質データベースを活用した。

B 試験対象遺伝子の選出と凝集化の調査: Aの方法で選出した植物アミロイド候補蛋白質を大腸菌発現系で得、金属キレートカラムによって精製した。タグを外した後、銅や亜鉛などの金属イオンを添加し、低速遠心で沈殿可能な凝集体を形成するか否かを調査した。

C 植物アミロイドの凝集及び活性酸素静止メカニズムの解明: Bで得られた蛋白質に関し、凝集時の二次構造の変化を、円二色性スペクトル、フーリエ変換赤外分光光度計によって調査した。凝集体の形成を、遠心分離法、ゼータ電位粒子径測定法によって測定した。活性酸素静止活性は、銅-アスコルビン酸活性酸素発生系を適用し、蛍光強度で活性を比較した。

D 高機能植物アミロイドの創成: Cによって選出された、高い凝集性と活性酸素静止活性を兼ね備えた蛋白質に対し、活性ドメインを特定するため、15程度のアミノ酸配列からなるドメインに分割し、活性酸素静止活性を測定した。高い活性酸素静止活性を示す配列特性をつかんだので、それを連結した人工配列を合成し、活性酸素静止活性を決定した。さらに、その配列を含むデハイドリン遺伝子を設計し、シロイヌナズナに導入して、銅を含む培地での生育特性を調査した。

4. 研究成果

A 植物アミロイド候補データベースの完成

B 試験対象遺伝子の選出と凝集化の調査

まず、植物のアミロイド様蛋白質の候補を選出することから研究を開始した。アミロイド等の凝集に関わる配列要因に、デハイドリンの配列特性を合わせ、天然変性蛋白質でありかつ金属結合特性を有する、という特徴付けを行った。金属結合性を示す代表的なアミノ酸のうち、システインは、高次構造形成促進型のアミノ酸であるため、パラメーターから除外した。代わりに、高次構造形成に影響を与えないヒスチジンを金属結合残基とした。最終的に、代表者が有するシロイヌナズナゲノム高 His 含有蛋白質データベース (一部は次の論文にて公開: 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) の上位蛋白質に対し、天然変性蛋白質予測ソフト (IUPred) を適用して抽出した。さらに、シロイヌナズナの遺伝子発現データベースの情報も加味し、ヒスチジン残基に富み、天然変性スコアが高く、通常時ないしはストレス時に発現量が多いものを5遺伝子選択することが出来た。

これら5つの遺伝子を、大腸菌発現用ベクターに組み込み、蛋白質を発現させたところ、全てにおいて発現が確認できたが、十分な発現量が確保でき、金属キレートカラムで精製してタグを除去できたものは、2種類のみであった。一方は、シロイヌナズナデハイドリン AtHIRD11、もう一方は、細胞外マトリクス関連蛋白質 (研究のため未公開) であった。本研究の成果報告は、AtHIRD11 に集中して記す。

C 植物アミロイドの凝集及びラジカル静止メカニズムの解明

AtHIRD11 に関し、凝集体形成時の二次構造の変化を、円二色性スペクトル、フーリエ変換赤外分光光度計、蛍光色素法によって調査した。円二色性スペクトルによれば、銅イオンを添加した場合、AtHIRD11:銅イオン=1:5 のモル比までは、ヘリックス構造比の微増がみられるものの(図1) 依然大部分はランダム状態であった。同様の結果は、フーリエ変換赤外分光光度計でも示された。また、蛋白質の疎水領域の形成を検出するために使われる蛍光色素 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) を AtHIRD11 に添加した場合、通常のアミロイド蛋白質とは異なり、銅イオンの有無にかかわらず、蛍光強度は低いままであり、銅イオンによる疎水領域の形成は起こらないことが判明した。さらに、凝集体の粒子を遠心分離法、ゼータ電位粒子径測定法によって測定した。いずれも、平均ストークス径は 100~150 nm と見積もられ、ある一定のサイズの粒子を形成するものの、通常のアミロイドのサイズに比べて 10 倍程度大きかった。以上の結果、デハイドリン AtHIRD11 は、銅

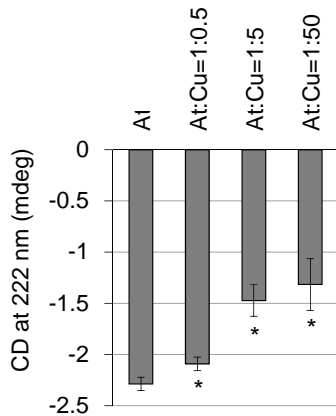


図1 AtHIRD11に銅イオンを添加した場合の円二色性スペクトル

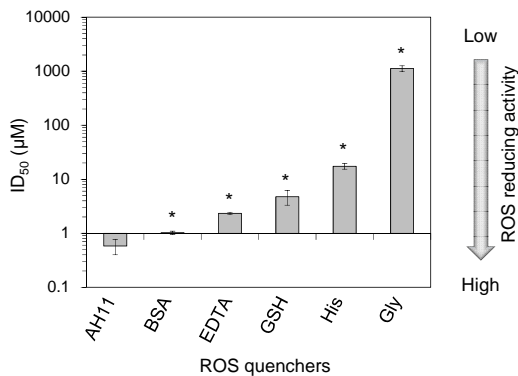


図2 AtHIRD11(図中AH11)の活性酸素発生抑制活性と他の活性酸素発生抑制物質との活性の比較

と共に凝集体を形成するが、その凝集体は、ランダム状態を維持しながら、比較的大きなストークス径を有する、柔軟性に富むものであることが予想された。こうした性質は、繊維化するアミロイドとは異なる性状の凝集体であることを意味する。

次に、銅と凝集体を形成した AtHIRD11 が、銅の活性酸素の発生になんらかの影響を与えるか否かについて調査した。活性酸素静止

活性は、銅-アスコルビン酸活性酸素発生系を適用し、蛍光強度で活性を定量した。既知の活性酸素発生抑制物質に比べ、AtHIRD11 は、最も強い活性酸素静止活性を示した。

D 高機能植物アミロイドの創成

AtHIRD11 の配列を7つに分割し、銅-アスコルビン酸活性酸素発生系を使って活性酸素発生抑制活性を調べた(図3)。その結果、多くのドメインで、活性が検出された。しかし、D5及びD7ドメインは、活性酸素発生抑制活性が低かった。それぞれの配列に含まれ

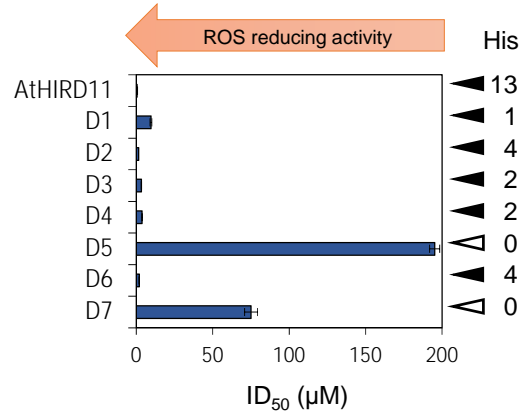


図3 AtHIRD11の7個のドメインの活性酸素発生抑制活性

るヒスチジンの数をカウントしたところ、活性強度の序列は、ヒスチジン数と概ね一致した。そこで、最も活性が強かった D6 ドメインについて、アラニン置換体や非ヒスチジン残基のヒスチジン化により、様々なヒスチジン含量の変異 D6 ドメインを設計し、活性酸素発生抑制活性を調べたところ、D6 ドメインよりも、ヒスチジン含量が多くても少なくても、D6 ドメインの活性よりも低下することが明らかになった。D6 ドメインが活性発現に最適な配列であることが分かったので、D6 ドメインを4回連結した人工 AtHIRD11 の塩基配列を合成し、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの制御下で発現させたシロイヌナズナを育成した。本植物の銅耐性は、野生株に比べて、同等ないしは低下することが分かった。なお、AtHIRD11 を過剰に発現させた株は、野生株より高い銅耐性を示した。

以上、シロイヌナズナのデハイドリン AtHIRD11 を植物アミロイドの候補とし、物理化学的、生理学的に研究した。その結果、AtHIRD11 は、重金属によって凝集するが、通常のアミロイドのようなシートを基調としたコンパクトな凝集体ではなく、ランダム状態を維持したまま、大きなストークス径を示す、柔らかな凝集体としてふるまうことが示唆された。一方、凝集体になることにより、包含した重金属(この場合は銅)の活性酸素発生を抑制し、重金属を安定に保つ作用があることが分かった。しかし、これらの作用は、AtHIRD11:銅イオン=1:5程度の場合であり、それよりも銅が過剰な条件下では、悪影響が出る結果となった。AtHIRD11の

場合、ヒスチジン含量が活性酸素発生抑制活性に影響を与えるが、ヒスチジン含量が高すぎた場合、むしろ逆効果が出る可能性も示唆された。こうした、過剰銅または過剰ヒスチジンによる害については、別の研究報告で詳細を述べたい。

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)

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

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

Sabine Redweik, Claudia Cianciulli, Masakazu Hara, Yuanhong Xu, Hermann Wätzig (2013) Precise, fast and flexible determination of protein interactions by Affinity Capillary Electrophoresis: Part 2: Cations. *Electrophoresis*, 34, 1812-1819

〔学会発表〕(計4件)

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)

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) 奨励賞受賞

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)

門奈修平、加藤雄成、原正和、シロイヌナズナデハイドリンによる酵素活性の変化、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)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
植物機能生理学研究室(原)
<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