

研究終了報告書

「穀物由来ケイ酸輸送体の構造解析」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：齊藤 恭紀

1. 研究のねらい

ケイ素 (Si) は土壤中に最も豊富に含まれるミネラルであり、植物の生育や生産性を大きく向上させる働きを持つ。穀物のイネは非常に多くの Si を取り込むことが知られており、その乾燥重量の 10%以上にもなる。イネは根から吸収した Si を各組織の細胞壁に二酸化ケイ素の形で沈着させ、物理的障壁として機能させている。これにより、イネは病原菌や虫害などの生物的ストレスだけでなく、倒伏や干ばつなどの非生物的ストレスにも耐性を獲得している。この Si によるストレス耐性の増強作用は極めて大きく、Si 取り込み能を欠失したイネの変異体では米の収量が野生型の 10 分の 1 に減収してしまう。イネの Si 吸収には、根に発現するケイ酸チャネル Lsi1 及びケイ酸排出輸送体 Lsi2 が必須であることが分かっているが、それらの構造・ケイ酸輸送機構に関する知見はほとんど無かった。申請者は穀物の根におけるケイ酸取り込み機構を原子レベルで理解したいと思い、これまでに Lsi1 の構造を世界で初めて原子レベルで解明し、そのケイ酸透過機構の詳細を明らかにしてきた (Saitoh *et al.*, 2021, *Nature Commun.*; Saitoh and Suga, 2022, *Front Plant Sci.*)。これにより、土壌から根の細胞内への受動的なケイ酸取り込み機構は原子レベルで理解できるようになったが、Lsi2 の構造は未知であり、根の細胞内から導管へ能動的にケイ酸を輸送する機構の詳細は全く分かっていない。Lsi2 のケイ酸輸送機構には不明な部分が多く、ケイ酸輸送に重要なモチーフ残基すら分かっていないので Lsi2 の構造情報の必要性は高い。Lsi1 および Lsi2 はケイ酸の他に化学的性質がよく似ている極めて有害な亜ヒ酸も輸送し、イネにおけるヒ素の主要な取り込み因子であることも分かってきており、Lsi2 の構造に基づいた安全なイネ品種作出のニーズも高まってきている。

本研究課題では穀物由来の Lsi2 の構造解析を成し遂げ、Lsi1 の構造の知見と合わせて穀物のケイ酸・亜ヒ酸輸送機構を原子レベルで理解できるようにすることを研究目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

2020 年度では Lsi2 の結晶化を目指した。Lsi2 の大量発現・精製系を確立し、穀物由来の Lsi2 を大量に精製することに成功した。いくつかの界面活性剤で精製した Lsi2 を用いて、結晶化条件のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、Lsi2 の結晶を得たが、結晶の質が十分に高くなかった。結晶の質を高めるために、結晶化条件と結晶化コンストラクトの最適化、Lsi2 の安定性を高める溶液条件の探索を進めた。さらに、結晶の質を高めるために Lsi2 の構造認識抗体の作製を進めた。2021 年度では Lsi2 の結晶化・単粒子構造解析を目指した。精製した Lsi2 を用いて、脂質キュービックフェーズ法で結晶化条件のスクリーニングを行い、微結晶を得たが、結晶の質は低いままであった。結晶の質を高めるために、Lsi2 の安定



性を高める溶液条件の探索を進め、Lsi2 の安定性に適した界面活性剤や脂質の種類を絞り込むことができた。Lsi2 の安定性を高めるためにディスオーダー領域を削除した欠失変異体を作製し、大量発現・精製・結晶化を行い、微結晶を得ることに成功したが、結晶性は低く、更なる安定化が必要であることが分かった。Lsi2 のホモログ遺伝子についても性状確認を行った。Lsi2 の単粒子構造解析を行うため、クライオ電子顕微鏡で精製試料を観察し、解析を行った。最終年度では Lsi2 の構造認識抗体の作製のための条件検討を進め、免疫における抗原の質を改良することが出来た。

研究期間を通じて Lsi2 の構造解析を成功させるために Lsi2 の安定化、結晶化条件の探索、構造認識抗体の作製、クライオ電子顕微鏡観察の条件検討を進めてきた。当初予定していなかった構造解析後の機能解析系の立ち上げも行ってきた。

(2) 詳細

研究目的

穀物由来の Lsi2 の構造を原子レベルで解明し、そのケイ酸輸送機構を詳細に理解できるようにすることを達成目標とした。

研究成果

【Lsi2 の結晶化及び回折データの収集】

《Lsi2 の大量発現・精製系の改良》 昆虫細胞発現系を用いて穀物由来の Lsi2 の大量発現を行った。2020 年度にバキュロウイルスの添加量・培養時間・温度を検討し、発現量の増加に成功した。Lsi2 の精製系において、各精製ステップの条件検討を行い、収量を改良した。精製した Lsi2 の純度と単分散性は良好であった。確立した精製系により Lsi2 を大量に精製し、可溶化条件の検討、結晶化や抗体作製、性状解析、クライオ電子顕微鏡観察に用いた。

《界面活性剤・脂質の検討》 昆虫細胞発現系で発現させた Lsi2 を様々な界面活性剤で可溶化し、蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー法を用いて可溶化度や単分散性、熱安定性を調べた。その結果、Lsi2 の可溶化に適した界面活性剤の特定に成功した。安定に可溶化できる界面活性剤を決めた後、可溶化時に脂質を混ぜて Lsi2 の安定性がどう変化するかを同様の方法で検討した。その結果、Lsi2 の安定性を最も高める脂質の特定に成功した。Lsi2 の可溶化に適した界面活性剤・脂質を用いて Lsi2 の精製を行い、結晶化・クライオ電子顕微鏡観察を試みた。Lsi2 の可溶化に適した界面活性剤・脂質の種類の見極めは当初の予定通りに完了した。

《Lsi2 の結晶化条件のスクリーニング》 複数種類のバッファー条件で精製した野生型 Lsi2 を用いて、蒸気拡散法による結晶化を試みた。精製試料それぞれにつき、1,000 以上の結晶化条件を試したところ、Lsi2 結晶を作ることに成功した。しかし、この結晶の結晶性は低く、良質な回折データを取得することはできなかった。そこで、Lsi2 の構造中のディスオーダー領域を削除した欠失変異体を大量発現・精製し、結晶化を行ったところ異なる結晶化条件で微結晶を得ることに成功した。しかしながら、この結晶の結晶性も低く、良質な回折データを取得す

ることはできなかった。これより、ディスオーダー領域を削除したことで結晶コンタクトを変更することはできたが、良好な結晶コンタクトの形成が出来ていないことが考えられた。結晶コンタクトの相互作用点を増やして良好な結晶を得るために、脂質キュービックフェーズ法を用いて Lsi2 の結晶化を試みた。1,000 条件以上の結晶化条件をスクリーニングし、Lsi2 の微結晶を得ることに成功したが、依然として結晶性は低く良質な回折データを得ることは出来ていない。これより、Lsi2 の良質な結晶を得るためには、さらなる Lsi2 の安定化・結晶コンタクト可能な部位の増大を行い、良質な結晶コンタクトを形成しやすくすることが必要であると考えられた。そのため、Lsi2 の表面エントロピーの低下を企図した表面アミノ酸残基への変異導入、Lsi2 の構造認識抗体の作製を試みてきた。Lsi2 の構造認識抗体の作製は 2020 年度から進めているが、新型コロナウイルスのパンデミックの影響によって当初の予定よりも大幅に遅延している。異なる穀物由来のケイ酸排出輸送体の発現・性状解析を行い、大量精製への準備を完了させた。

《結晶化コンストラクトの改良》 野生型の Lsi2 の結晶化を試みたが良好な結晶は得られなかった。これは安定な結晶パッキングが形成されていない為であると考えられたので、ディスオーダー部位の削除、点変異導入による熱安定性の向上・表面エントロピーの減少・コンフォメーションの固定化を進めた。精製した欠失変異体を用いて結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、野生型とは異なる結晶化条件で微結晶が得られた。これより、Lsi2 のディスオーダー部位が Lsi2 の結晶化コンタクトに影響していたことが示唆された。得られた微結晶の X 線回折能は低かったため、さらなる Lsi2 の安定化が必要であると考えられた。2021 年度の 7 月に高精度で構造予測ができるプログラム、AlphaFold2 が発表されたため、Lsi2 の構造予測を行い、結晶化コンストラクトの作製に活用した。この Lsi2 の予測構造を用いて欠失すべきディスオーダー部位の至適化を行い、表面エントロピーを増大させ得るアミノ酸残基を見出した。欠損変異と表面変異によるコンストラクトの改良は着実に進んできており、今後は改良した安定性の高い Lsi2 の結晶化コンストラクトを精製し、結晶化条件のスクリーニングを行う。

【クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析】

Lsi2 の結晶化が当初の計画通りに進んでいないので、2021 年度の秋から共用が開始された SPring-8 のクライオ電子顕微鏡を用いて Lsi2 の単粒子構造解析を進めた。グリッド条件の検討を行い、良好な単粒子像が得られる条件が分かった。詳細な構造情報を得るためには粒子の数や分子量を増大させ、粒子の配向を揃える必要があるため、構造認識抗体の作製とグリッド条件の至適化を進めていく。

【ACT-X の活用及び自身の研究に対する影響等】

ACT-X では、領域会議や slack 等によって分野の異なる同世代の優秀な研究者と出会い、積極的に意見交換を行うことでそれぞれの研究に対する興味のポイントを知り合うことができ、共同研究に発展するための広い視野を身に着けることが出来た。彼らとのやり取りを通して、実験そのもののコツや、良い研究体制構築のノウハウ、子育て等のライフイベントの情報共有等ができた。ACT-X 内の幅広い人脈を通じて、二人のケイ酸に関する生物学者と知り合

うことができた。自身を含めた複数の ACT-X 研究者で講演会を開催することも決まった。また、専門分野が異なるアドバイザーの先生方からは、知らなかった社会問題と自身のテーマを結び付ける方向性を示していただくことができ、視野が大きく広がった。野村総括や JST の領域担当からは長い目で若手研究者を育成していく姿勢を見せてもらい、今後の励みとなった。また、出産・子育て・介護支援制度を活用し、少額の科研費ではできなかった研究補助員の雇用を経験することができた。これにより、雇用のノウハウや研究チームの構築や維持に係る費用や労力・影響度合いを知ることができた。ACT-X 研究者になったことで、自身に対する注目度も上がり、共同研究も始まった。このように、ACT-X を通じて人脈が広がっただけでなく、自身の研究を俯瞰的に見るできるようになり、共同研究や講演会の企画も始まって、研究体制の構築を行うという視点やノウハウも身に付いた。

3. 今後の展開

本研究課題を通して穀物の生育や生産性に大きく影響するケイ酸輸送体 Lsi2 を大量に精製する系を確立でき、結晶性は低いながらも Lsi2 の結晶の作製に成功した。良質な Lsi2 結晶を作製するために様々なアプローチで試行錯誤を繰り返した結果、構造解析を成功に導くための知見や準備が揃ってきた。今後は Lsi2 の結晶化コンストラクトのさらなる改良を進めて良質な結晶の作製を行うとともに、クライオ電子顕微鏡観察に適したグリッド条件の至適化を行い、高分解能で Lsi2 の構造解析を成し遂げ、Lsi2 のケイ酸輸送機構の一端を明らかにする。

4. 自己評価

ACT-X の申請時に掲げた達成目標「穀物由来の Lsi2 の構造を原子レベルで解明し、そのケイ酸輸送機構を詳細に理解できるようにする」を期間内に達成できなかったが、多くの大きなライフイベントや、100 年に一度のパンデミックと言われるコロナ禍やウクライナ情勢の悪化に伴う活動制限や物価高騰、商品の品薄が続いた中で、Lsi2 の可溶化条件の至適化、大量発現・精製系の確立、結晶コンストラクトの改良、Lsi2 の構造認識抗体の作製、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析、酵母を用いた機能解析系の立ち上げをほぼ一人で進め、構造解析の成功まであと一息というところまで進めて来た。研究実施体制についても、ACT-X の「出産・子育て・介護」支援制度を活用し、自身で非常勤研究員の雇用を進め、効率的に研究が進む体制づくりを進めて来た。

この研究課題と同時に進めていた穀物のケイ酸チャネル Lsi1 の構造研究に関しては Nature Communications 誌に掲載され、その Altmetric スコアはスコア付けされた論文中トップ 3%に位置している(Nature Communications 誌内ではトップ 82%の Altmetric スコア)。この研究成果は日本経済新聞や中国のメディア等、国内外の多方面から取り上げられ、日本蛋白質科学会の若手奨励賞の受賞にもつながった。Lsi1 の構造研究の波及効果から分かるように、穀物のケイ酸取り込みに関する膜タンパク質の構造研究に対する社会の関心は極めて高く、学術的価値も高い。今後ますます深刻化するであろう気候変動や食料不足に対し、Lsi2 の構造研究は頑健で安全な作物を創るための基盤的な知見となるので、社会・経済への波及効果は大きいと思われる。

また、研究領域内外の異分野の研究者と積極的に交流を深め、研究者ネットワークの形成に努めてきた。異分野の研究者と交流することで自身の強みと弱みを俯瞰的に見ることができ、そ



の結果として、領域の内外で共同研究を開始することになった。

このように、当初の目標は達成できなかったが、予期せぬ困難な状況下においても挑戦的で重要な研究課題の推進とヒューマンネットワークの形成を積極的に行い、粘り強く成果を出してきたことは評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. **Yasunori Saitoh**, Namiki Mitani-Ueno, Keisuke Saito, Kengo Matsuki, Sheng Huang, Lingli Yang, Naoki Yamaji, Hiroshi Ishikita, Jian-Ren Shen, Jian Feng Ma, Michihiro Suga. Structural basis for high selectivity of a rice silicon channel Lsi1. Nature Communications. 2021, 12(1) 6236-6236. ※Altmetric スコアはスコア付けされた論文中トップ 3%であった。

イネの高いケイ酸取り込み能に必要なイネ由来のケイ酸チャネル Lsi1 の構造を 1.8 Å 分解能で解明し、Lsi1 の持つ高いケイ酸選択性の詳細な構造基盤を初めて明らかにした。構造に基づいた機能解析・分子動力学シミュレーションを行うことで Lsi1 のケイ酸選択性に重要な部位とその相互作用機構、詳細なケイ酸透過機構を原子レベルで理解できるようにした。

2. **Yasunori Saitoh**, Michihiro Suga. Structure and function of a silicic acid channel Lsi1. Frontiers in Plant Science. 2022, 13(982068) 1-9.

植物のケイ酸輸送・分配システムについて網羅的にまとめ、ケイ酸チャネル Lsi1 の構造と機能についてホモログタンパク質との網羅的な比較をしつつ詳細に解説した。植物のケイ酸輸送・分配システムを原子レベルで理解していくために今後解決すべき課題を挙げ、本研究課題でもあるケイ酸排出輸送体の Lsi2 の構造解析の必要性について言及した。

(2) 特許出願

なし。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表]

- ① 穀物由来ケイ酸チャネルによるケイ酸輸送機構の構造学的研究
○齊藤 恭紀, 三谷-上野 奈見季, 齊藤 圭亮, 松木 謙悟, 黄 勝, 楊 靈麗, 山地直樹, 石北 央, 沈 建仁, 馬 建鋒, 菅 倫寛
日本膜学会 第 33 回 膜シンポジウム 2021 “膜が分かる・膜で分ける・膜で分かる”
2021 年 11 月 17 日
- ② Structural basis for high selectivity of a rice silicic acid channel
○齊藤 恭紀, 三谷-上野 奈見季, 齊藤 圭亮, 松木 謙悟, 黄 勝, 楊 靈麗, 山地直樹, 石北 央, 沈 建仁, 馬 建鋒, 菅 倫寛

PDB50th Anniversary Symposium in Asia 2021 年 11 月 24 日

- ③ イネ由来ケイ酸チャネルによるケイ酸透過機構の構造基盤
○齊藤 恭紀, 三谷-上野, 奈見季, 齊藤 圭亮, 松木 謙悟, 黄 勝, 楊 靈麗, 山地直樹, 石北 央, 沈 建仁, 馬 建鋒, 菅 倫寛
第 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 2 日
- ④ イネ由来ケイ酸チャネルによるケイ酸透過機構の構造基盤
○齊藤 恭紀, 三谷-上野 奈見季, 齊藤 圭亮, 松木 謙悟, 黄 勝, 楊 靈麗, 山地直樹, 石北 央, 沈 建仁, 馬 建鋒, 菅 倫寛
第二十二回 日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム 2022 年 6 月 8 日
- ⑤ イネ由来ケイ酸チャネルのケイ酸透過機構の構造研究
○齊藤 恭紀, 三谷-上野 奈見季, 齊藤 圭亮, 松木 謙悟, 黄 勝, 楊 靈麗, 山地直樹, 石北 央, 沈 建仁, 馬 建鋒, 菅 倫寛
第 17 回バイオミネラルリゼーションワークショップ 2022 年 11 月 11 日

[受賞]

- ⑥ 日本蛋白質科学会 若手奨励賞「イネ由来ケイ酸チャネルによるケイ酸透過機構の構造基盤」, 齊藤 恭紀, 一般社団法人日本蛋白質科学会, 2022 年 6 月

[学会誌]

- ⑦ 齊藤 恭紀, 菅 倫寛, 「植物のケイ酸チャネルの構造と機能」, 日本結晶学会誌, 2022 年 12 月, 64(4) 265-266