

大学間連携等による共同研究報告書

《タンパク質の構造・機能情報に根ざした高次生命現象の研究》

1. 報告書作成年月日：令和元年 11 月 29 日

2. 補助対象年度：平成 30 年度（平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日）

3. 共同研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

4. 研究の目的：タンパク質は多くの生命現象で中心的な役割を果たすが、その機能は精細な立体構造に基づいた物理化学的性質によって規定される。一方、高等動植物が示す複雑な生命現象の研究は、主に細胞生物学的手法を用いて進められるが、その生命現象に関与するタンパク質が特定された段階で終わってしまうことも多い。本研究では、生殖や環境応答といった、高度な生命現象を扱う細胞生物学者と、タンパク質科学者が協力し、これらの現象に関与するタンパク質の機能・構造解析を行い、得られた情報をさらに細胞生物学研究に還元する。これらの高次生命現象を、分子レベルの知見に基づいて、より深く理解することを目指す。

5. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名：渡辺 洋平
ローマ字氏名：Watanabe Yo-hei
所属研究機関名：甲南大学
部局名：理工学部・生物学科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：40411839

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：西村 いくこ
ローマ字氏名：Hara-Nishimura Ikuko
所属研究機関名：甲南大学
部局名：理工学部・生物学科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：00241232

研究分担者氏名：今井 博之
ローマ字氏名：Imai Hiroyuki
所属研究機関名：甲南大学
部局名：理工学部・生物学科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：40278792

研究分担者氏名：向 正則
ローマ字氏名：Mukai Masanori
所属研究機関名：甲南大学
部局名：理工学部・生物学科
職名：教授
研究者番号（8 桁）：90281592

研究分担者氏名：後藤 彩子
ローマ字氏名：Gotoh Ayako
所属研究機関名：甲南大学
部局名：理工学部・生物学科
職名：講師

研究者番号 (8 桁) : 70734680

研究分担者氏名 : 原 清敬
ローマ字氏名 : Hara Kiyotaka
所属研究機関名 : 静岡県立大学
部局名 : 食品栄養科学部
職名 : 准教授
研究者番号 (8 桁) : 40434378

6. 実施経過 : (完了)

7. 研究成果 :

高等動植物由来タンパク質の機能・構造研究において、大腸菌などの大量発現系を用いて、標的タンパク質を大量に調製することがある。その際、標的タンパク質が正しく立体構造を形成し、活性のある構造をとることが重要である。ClpB は、ATP のエネルギーを用いて、凝集状態のタンパク質を再生する分子シャペロンで、大腸菌内で合成された外来タンパク質の正しい立体構造形成を助けると考えられる。原子間力顕微鏡などを用いた解析により、ClpB が ATP の加水分解サイクルに伴って、その多量体構造をダイナミックに変化させる様子を明らかにした。また、ClpB の活性は、M ドメインとよばれる棒状のドメインによって制御されているが、その制御にかかわる、サブユニット間の相互作用を、アミノ酸残基レベルで特定した。こうした詳細な仕組みの解明は、より強力な ClpB シャペロンの作製につながるものと期待される。

植物の葉の細胞は、明暗の条件に応じて細胞核の位置を変える。すなわち、明所では DNA を紫外線から守るために細胞核を細胞の側壁に定位させるが、暗所では細胞の底面中央に定位させる。後者を暗定位という。細胞核の暗定位に関する知見は乏しかったが、モデル植物シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的解析からその機構の一端を明らかにした。具体的には、細胞核の暗定位に異常を示す *unp2* 変異体を単離し、その原因遺伝子が *ANGUSTIFOLIA (AM)* であることを同定した。AN タンパク質がリン酸化酵素 DYRKP と結合することを見出し、アクチン繊維の配向を制御することによって求心性の細胞核定位を引き起こすことがわかった。

始原生殖細胞中での生殖細胞性遺伝子 *vasa* 遺伝子の発現活性化の分子機構を明らかにすることを目的として、解析を進め、今年度、Short form Mamo タンパク質と転写活性化因子 OvoB タンパク質とが物理的に相互作用すること、これらの相互作用が *vasa* 遺伝子の発現を直接活性化することが明らかとなった。

社会性ハチ目昆虫 (アリ、ハチ) では、女王は羽化後まもない時期にしか交尾しないため、この時に受け取った精子を体内の「受精囊」の中に寿命が続く限り貯蔵する。アリ科の多くの種の女王の寿命は 10 年以上と、昆虫としては例外的に長寿のため、精子貯蔵期間も極端に長い。その分子メカニズムは不明である。これまでに、RNA-seq 法と *in situ hybridization* 法を組み合わせ、アリ科女王 (キイロシリアゲアリ *Crematogaster osakensis* を使用) の受精囊のみで強く発現している遺伝子を 12 個発見したが、今年度は新たに 13 個目の受精囊特異的遺伝子を発見できた。昨年度に引き続き、今年度はこれらの遺伝子の全長配列の決定を続けた。また、これらの遺伝子由来のタンパク質と精子を共培養して精子の生存を評価することを目指し、培養方法の確立をおこなっている。さらに、RNA 干渉法をおこなうための 13 遺伝子分の dsRNA の作成を完了した。

8. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Aono, S., Haruna, Y., Watanabe, YH., Mochida, S., Takeda, K. The fission yeast Greatwall-Endosulfine pathway is required for proper quiescence/G0 phase entry and maintenance. *Genes Cells*, 24, 172-186 (2019) DOI:10.1111/gtc.12665.
2. Sugita, S., Watanabe, K., Hashimoto, K., Niwa, T., Uemura, E., Taguchi, H., Watanabe, YH. Electrostatic interactions between middle domain motif-1 and the AAA1 module of the bacterial ClpB chaperone are essential for protein disaggregation. *J. Biol. Chem.*, 293, 19228-19239 (2018) DOI:10.1074/jbc.RA118.005496
3. Uchihashi, T., Watanabe, YH., Nakazaki, Y., Yamasaki, T., Watanabe, H., Maruno, T., Ishii, K., Uchiyama, S., Song, C., Murata, K., Iino, R., Ando, T. Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function. *Nat. commun.*, 9, 2147 (2018) DOI:10.1038/s41467-018-04587-w

4. Hatsugai, N., Nakatsuji, A., Unten, O., Ogasawara, K., Kondo, M., Nishimura, M., Shimada, T., Katagiri, F., Hara-Nishimura, I. Involvement of Adapter Protein Complex 4 in Hypersensitive Cell Death Induced by Avirulent Bacteria. *Plant Physiol.*, 176, 1824–1834 (2018) doi: 10.1104/pp.17.01610
5. Shimada, T., Kunieda, T., Sumi, S., Koumoto, Y., Tamura, K., Hatano, K., Ueda, H., Hara-Nishimura, I. The AP-1 Complex is Required for Proper Mucilage Formation in Arabidopsis Seeds. *Plant Cell Physiol.*, 59, 2331–2338 (2018) doi: 10.1093/pcp/pcy158
6. Takenaka, Y., Kato, K., Ogawa-Ohnishi, M., Tsuruhama, K., Kajiura, H., Yagyū, K., Takeda, A., Takeda, Y., Kunieda, T., Hara-Nishimura, I., Kuroha, T., Nishitani, K., Matsubayashi, Y., Ishimizu, T. Pectin RG-I rhamnosyltransferases represent a novel plant-specific glycosyltransferase family. *Nature Plants* 4, 669–676 (2018) doi: 10.1038/s41477-018-0217-7
7. Hamada, T., Yako, M., Minegishi, M., Sato, M., Kamei, Y., Yanagawa, Y., Toyooka, K., Watanabe, Y., Hara-Nishimura, I. Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in Arabidopsis. *J Cell Sci.*, 131, 216051 (2018) doi: 10.1242/jcs.216051
8. Inoue, S., Morita, R., Kuwata, K., Kunieda, T., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Minami, Y. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiol Biochem.*, 132, 138–144 (2018) doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.034
9. Ishikawa, K., Tamura, K., Ueda, H., Ito, Y., Nakano, A., Hara-Nishimura, I., Shimada, T. Synaptotagmin-Associated Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites Are Localized to Immobile ER Tubules. *Plant Physiol.*, 178, 641–653 (2018) doi: 10.1104/pp.18.00498
10. Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K., Kohchi, T. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS One*, 13, e0205117 (2018) doi: 10.1371/journal.pone.0205117
11. Ueda, H., Ohta, N., Kimori, Y., Uchida, T., Shimada, T., Tamura, K., Hara-Nishimura, I. Endoplasmic Reticulum (ER) Membrane Proteins (LUNAPARKs) Are Required for Proper Configuration of the Cortical ER Network in Plant Cells. *Plant Cell Physiol.*, 59, 931–1941 (2018) doi: 10.1093/pcp/pcy137
12. Iwabuchi, K., Ohnishi, H., Tamura, K., Fukao, Y., Furuya, T., Hattori, K., Tsukaya, H., Hara-Nishimura, I. ANGUSTIFOLIA Regulates Actin Filament Alignment for Nuclear Positioning in Leaves. *Plant Physiol.*, 179, 233–247 (2019) doi: 10.1104/pp.18.01150
13. Nakazaki, A., Yamada, K., Kunieda, T., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Shimada, T. Leaf Endoplasmic Reticulum Bodies Identified in Arabidopsis Rosette Leaves Are Involved in Defense against Herbivory. *Plant Physiol.*, 179, 1515–1524 (2019b) doi: 10.1104/pp.18.00984
14. Yoshinari, A., Hosokawa, T., Amano, T., Beier, M.P., Kunieda, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Naito, S., Takano, J. Polar Localization of the Borate Exporter BOR1 Requires AP2-Dependent Endocytosis. *Plant Physiol.*, 179, 1569–1580 (2019) doi: 10.1104/pp.18.01017
15. Shimada, T., Takagi, J., Ichino, T., Shirakawa, M., Hara-Nishimura, I. Plant Vacuoles. *Annu Rev Plant Biol.*, 69, 123–145 (2018)
16. Shimada, T.L., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. Membrane Dynamics and Multiple Functions of Oil Bodies in Seeds and Leaves. *Plant Physiol.*, 176, 199–207 (2018) doi: 10.1104/pp.17.01522
17. Shirakawa, M., Hara-Nishimura, I. Specialized Vacuoles of Myrosin Cells: Chemical Defense

Strategy in Brassicales Plants. *Plant Cell Physiol.*, 59, 1309-1316 (2018) doi: 10.1093/pcp/pcy082

18. Poret, M., Chandrasekar, B., van der Hoorn, R. A. L., Déchaumet, S., Bouchereau, A., Kim, T. H., Lee, B. R., Macquart, F., Hara-Nishimura, I., Avice, J. C. A Genotypic Comparison Reveals That the Improvement in Nitrogen Remobilization Efficiency in Oilseed Rape Leaves Is Related to Specific Patterns of Senescence-Associated Protease Activities and Phytohormones. *Front Plant Sci.*, 10 (2019) doi: 10.3389/fpls.2019.00046
19. Shimada, T., Fuji, K., Ichino, T., Teh, O.-K., Koumoto, Y., Hara-Nishimura, I. GREEN-FLUORESCENT SEED, to Evaluate Vacuolar Trafficking in Arabidopsis Seeds. *Method. Mol. Biol.*, 1789, 1-7 (2018)
20. Ueda, H., Hara-Nishimura, I. How to investigate the role of the actin-myosin cytoskeleton in organ straightening. *Method. Mol. Biol.*, 1924, 215-221 (2019)
21. Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I. Measurement of the caspase-1-like activity of vacuolar processing enzyme in plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1743, 163-171 (2018)
22. Martinoia, E., Mimura, T., Hara-Nishimura, I., Shiratake, K. The Multifaceted Roles of Plant Vacuoles. *Plant Cell Physiol.*, 59, 1285-1287 (2018) doi: 10.1093/pcp/pcy113
23. 後藤彩子, アリ科女王の長期間にわたる精子貯蔵メカニズム 比較生理化学会誌, 35, 150-157 (2018) DOI:10.3330/hikakuseiriseika.35.150

[学会発表] (計 39 件)

1. 内橋 貴之, 渡辺 洋平, 内山 進, 村田 和義, 飯野 亮太, 高速 AFM・ネイティブ質量分析・超遠心分析・電子顕微鏡の複合解析で明らかにする分子シャペロン ClpB の多量体構造とダイナミクス, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 28 日~2018 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2. Shimada TL, Shimada T, Okazaki Y, Saito K, Nakano A, Ueda T, Takano Y, Hara-Nishimura I, Regulation of plant sterol homeostasis by HIGH STEROL ESTER1 and sterol ester bodies. International Symposium on Plant Lipids 2018, 15 July, 2018, Yokohama
3. Hara-Nishimura I, Plant defense strategies against pathogens and herbivore. In Jagiellonian University Konan University Bilateral Meeting "Plant Organelle Dynamics". August, 2018, Krakow, Poland
4. 前田徹, 水穂そまれ, 國枝正, 高木純平, 山田健志, 西村いくこ, 尾崎まみこ, 昆虫の振る舞いを見越した植物の進化戦略: アブラナ科植物が獲得した匂いによる化学防除機構, 日本動物学会近畿支部会, 2018 年 5 月 12 日, 京都
5. 西村いくこ, 環境刺激を感じながらしなやかに生きる植物から学ぶ, 甲南大学春期公開講座「身近にあつて知らない科学」, 2018 年 6 月 9 日, 神戸
6. Shimada TL, Shimada T, Okazaki Y, Saito K, Nakano A, Ueda T, Takano Y, Hara-Nishimura I, Sterol ester-storage organelles (SE bodies) maintain sterol homeostasis in plants (ステロールエステル蓄積オルガネラ・SE ボディによる植物ステロール恒常性維持機構の解明), 日本生化学会大会シンポジウム, 2018 年 9 月 24 日, 京都
7. 尾崎まみこ, 前田徹, 水穂そまれ, 國枝正, 高木純平, 山田健志, 西村いくこ, 植物が獲得した匂いによる化学防除機構の進化と昆虫の感覚・行動応答, 日本味と匂学会第 52 回大会, 2018 年 10 月 29 日, 埼玉
8. 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 岩渕功誠, 西村いくこ, 葉緑体核様体に見られる新奇

光応答反応, 植物細胞骨格研究会 -PlantCytoskeleton2018-, 2018年11月, 奈良

9. 山田晃輝、橋本舞香、Valerian V. Dolja、上田晴子、西村いくこ、MyoB レセプターは植物のストレーティング機構に關与する, 植物細胞骨格研究会 -PlantCytoskeleton2018-, 2018年11月, 奈良
10. Segami S, Kinoshita S, Shimada TL, Shimada T, Hara-Nishimura I, and Maeshima M, Artfactual effects of protein tags for organelle morphology and growth. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月28日, 横浜
11. 島田貴士, 嶋田知生, 岡咲洋三, 東泰弘, 斉藤和季, 桑田啓子, 小山香梨, 加藤美砂子, 高野義孝, 上田貴志, 中野明彦, 上田晴子, 西村いくこ, HiSE1はHMG-CoA reductaseを制御することで植物におけるステロール恒常性を維持する, 第31回植物脂質シンポジウム, 2018年12月1日, 高知
12. 西村いくこ, 植物の細胞内運動と器官運動, 京都大学生命科学セミナー, 2019年2月20日, 京都
13. 上田晴子、西村いくこ, 植物の器官屈曲と復元力による姿勢制御機構, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月13日, 名古屋
14. 迫田和馬, 嶋田知生, 菅野茂夫, 西村いくこ, 田中佑, 気孔密度の改変が変動光に対する気孔開口と光合成の応答性に及ぼす影響, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月13日, 名古屋
15. 中井由実, 堀口吾朗, 岩淵功誠, 原田明子, 中井正人, 西村いくこ, 矢野貴人. 植物の tRNA-wobble 位ウリジン修飾は葉細胞の発達に影響する, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
16. 前田和輝, 國枝正, 田村謙太郎, 幡野恭子, 西村いくこ, 嶋田知生, シロイヌナズナにおける根冠ムシレージの蓄積と放出機構の解析, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
17. 岩淵功誠, 大西春菜, 田村謙太郎, 深尾陽一朗, 古谷朋之, 服部考郎, 塚谷裕一, 西村いくこ, ANGUSTIFOLIA はアクチン繊維の配向調節を介してシロイヌナズナの葉の求心性核定位を制御する, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
18. 後藤千恵子, 田村謙太郎, 西村いくこ, シャブテマリーエディット, 新規核タンパク質 SANP1 は根の寒天培地への貫入に關与する, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
19. 瀬上紹嗣, 木下悟, 島田貴士, 嶋田知生, 西村いくこ, 前島正義, GFP や TagRFP によるオイルボディ、液胞の形態と植物生長への人為的影響, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
20. 水穂そまれ, 前田徹, 高木純平, 國枝正, 山田健志, 尾崎まみこ, 西村いくこ, ER body は昆虫の摂食行動を抑制するに關与する, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
21. 高木純平, 嶋田知生, 西村いくこ, COPII 小胞形成ドメイン ERES とゴルジ体の關係, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
22. 細川卓也, 吉成晃, 國枝正, 嶋田知生, 西村いくこ, 高野順平, アダプタータンパク質複合体 AP-4 はホウ酸トランスポーターBOR1のTGNから液胞への輸送において重要である, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
23. 島田貴士, 嶋田知生, 岡咲洋三, 東泰弘, 斉藤和季, 桑田啓子, 小山香梨, 加藤美砂子, 高野義孝, 上田貴志, 中野明彦, 上田晴子, 西村いくこ, 小胞体タンパク質 HIGH STEROL ESTER 1 によるステロール恒常性維持機構, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋
24. 國枝正, 桑田啓子, 山田健志, 出村拓, 西村いくこ, シロイヌナズナにおける ER body 形成因子 NAI2 の機能解析, 第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月14日, 名古屋

25. 中崎淳子, 山田健志, 國枝正, 杉山龍介, 平井優美, 田村謙太郎, 西村いくこ, 嶋田知生, シロイヌナズナ本葉における恒常型 ER body の食害抑止機能の解析, 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年 3 月 14 日, 名古屋
26. 石原静圭, 坂下幸汰, 石田悠介, 木森義隆, 岩渕功誠, 西村いくこ, 葉緑体核様体に見られる新奇光応答反応, 第 60 回日本植物生理学会年会, 2019 年 3 月 15 日, 名古屋
27. 今井博之, 河野元春: 植物におけるグリコシルセラミダーゼ遺伝子の機能解析. 第 60 回日本脂質生化学会, 東京 (2018.5)
28. Hiroyuki Imai, Toshiki Ishikawa, Maki Kawai-Yamada, Makoto Miyagi, Tamotsu Tanaka: Identification of phytoceramide 1-phosphate and its producing enzyme in plants. 23rd International Symposium on Plant Lipids 2016, Yokohama (2018.7)
29. 今井博之, 河野元春: シロイヌナズナの GH116: β -グルコシダーゼパラログの機能解析. 第 36 回日本植物細胞分子生物学会, 金沢 (2018.8)
30. 今井博之, 田中保, 石川寿樹, 川合真紀: 植物に存在するセラミド 1-リン酸の LC-MS/MS による分析. 第 91 回日本生化学会大会, 京都 (2018.9)
31. Hidemi Kawabe, Toshiki Ishikawa, Hiroyuki Imai: Characterization of the genes for sphingolipid long-chain base C-8 desaturase in *Lotus japonicus*. Gordon Research Conference on 2019 Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function, Galveston TX, United States (2019.1)
32. Daiki Yanagawa, Hiroyuki Imai : The role of sphingolipid catabolic pathways in *Arabidopsis* treated with Fumonisin B1. 第 60 回日本植物生理学会年会, 名古屋 (2019.3)
33. 中村 翔一, 近藤 茜, 平 誠司, 小林 悟, 向 正則, ショウジョウバエ母性因子 Mamo の強制発現による異所的 vasa 遺伝子発現と細胞分裂誘導, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 28 日~2018 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
34. 近藤 茜, 末永 将也, 中村 翔一, 向 正則, ショウジョウバエの輸卵管の形成に関わる新規突然変異体の性質, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 28 日~2018 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
35. 向 正則, 中村 翔一, 近藤 茜, 佐藤 優子, 木村 宏, 父親の栄養条件が, 子にエピジェネティックに伝達されるか? ショウジョウバエを用いた実験系の開発, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月 28 日~2018 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
36. 後藤彩子, 女王アリの精子貯蔵システム~交尾後の精子の動態~, 第 4 回 幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート, 2018 年 8 月 20 日~2018 年 8 月 21 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
37. 後藤彩子, 女王アリの長期間にわたる精子貯蔵メカニズムの解明に向けて, 第 49 回精子研究会, 2018 年 12 月 1 日, 筑波大学下田臨海実験センター (神奈川県・下田市)
38. 後藤彩子, Role of queen's spermatheca for long-term sperm storage in ants, 行動生態学シンポジウム ー社会性からその先へー, 2019 年 2 月 23 日, 京都大学 (京都府・京都市)
39. 鎌田智也, 後藤彩子, 膜翅目昆虫における受精囊機能の進化, 第 66 回日本生態学会大会, 2019 年 3 月 15 日~2019 年 3 月 19 日, 神戸国際会議場・神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)