

# 大学間連携等による共同研究報告書

## 《生体内の機能分子の定量化と可視化に着目した生命システムの解明》

1. 報告書作成年月日：令和2年9月16日
2. 補助対象年度：令和元年度（平成31年4月1日～令和2年3月31日）
3. 共同研究期間：平成31年4月1日～令和4年3月31日
4. 研究の目的：

本研究では、原核・真核生物の代謝物に関するゲノム機能研究の技術とノウハウを結集し、GC-MSおよびLC-MS/MSによるターゲットメタボリズムの解析技術により、水溶性・脂溶性の代謝分子の動態を組織レベル、または細胞レベルで網羅的・包括的に解析する基盤技術の構築を目指す。さらに、共焦点レーザー顕微鏡と高感度カメラを組合せ、多色同時可視化によって複数の分子の発現や局在パターンの変化を比較しながら解析する。また、照明法の異なる全反射顕微鏡を使うことで、生体膜上の分子の動態を1分子レベルで解析する。このように、機能分子の生体内における時空間的な動態を知ることにより、生命システムの理解を目指す。

### 5. 研究組織

#### (1)研究代表者

研究代表者氏名：今井 博之  
ローマ字氏名：Hiroyuki Imai  
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

#### (2)研究分担者

研究分担者氏名：渡辺 洋平  
ローマ字氏名：Yo-hei Watanabe  
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

研究分担者氏名：上田 晴子  
ローマ字氏名：Haruko Ueda  
所属研究機関名：甲南大学  
部局名：理工学部・生物学科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：90402776

研究分担者氏名：向 正則  
ローマ字氏名： Masanori Mukai  
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：Ayako Gotoh  
所属研究機関名：甲南大学  
部局名：理工学部・生物学科  
職名：准教授  
研究者番号（8 桁）：70734680

研究分担者氏名：下嶋 美恵  
ローマ字氏名：Mie Shimojima  
所属研究機関名：東京工業大学  
部局名：生命理工学院  
職名：准教授  
研究者番号（8 桁）：90401562

## 6. 実施経過および研究成果（継続中）

キャベツ葉での成長途上の部分を試料とした脂質抽出物中には、リン脂質全体の約5%のセラミド 1-リン酸(PC1P)が存在する。PC1P はキャベツ葉をホモジナイズすることで産生され、このとき、植物における主要スフィンゴリン脂質のグリコシルイノシトールホスホセラミド(GIPC)が減少することから、GIPC を特異的に分解するホスホリパーゼ D(GIPC-PLD)によって PC1P が生じると考えられている。LC-MS/MS によって PC1P を定量する場合、LC 用の配管部品にステンレスを使用しているため、PC1P 分子種を分離するために、移動相に少量のリン酸を添加する方法を採用していたが、MS/MS の不具合が頻繁に生じることが分かり、さらなる分析法の検討が必要となった。そこで、PC1P を誘導体化して、LC-MS/MS によって分析する方法を検討している。

小胞体は、タンパク質・脂質の生合成や代謝など生命の根幹を担う多機能性オルガネラである。その構造は、チューブ状構造とシート状構造が複雑に組み合わさり、細胞内でひとつづきのネットワークを形成しているが、それを維持するしくみは不明な点が多い。そこで、シロイヌナズナで小胞体形態形成に関わることがわかっているものの、その作用機序は明らかになっていない小胞体膜タンパク質に着目した。このタンパク質を欠損した変異体では細胞内に異常な構造体が形成されることから、さまざまな蛍光標識オルガネラマーカーを用いたライブイメージングによって、野生型の局在パターンと比較しながらこの構造体を構成する成分を検証した。一方、着目した小胞体膜タンパク質について、共免疫沈降と MS 解析を組合せたプロテオーム解析から相互作用候補因子を抽出し、これらの候補因子との相互作用の再現性の確認と遺伝学的相互作用の検証を進めている。

タンパク質の研究において、その試料の調製に、大腸菌などの大量発現系がよく用いられる。外来タンパク質を大量に発現した大腸菌のタンパク質代謝は、通常とは大きく異なり、時に巨大なタンパク質の凝集物である封入体を形成する。分子シャペロン ClpB は、凝集したタンパク質を再生する機能を持つが、封入体形成との関係はよくわかっていない。そこで、ClpB シャペロンの封入体形成への影響を調べる。これまでに、一般的な大腸菌株ではなく、タンパク質の大量発

現によく用いられる大腸菌株 BL21(DE3)の *clpb* 遺伝子欠損株を作成した。

ショウジョウバエの生殖細胞中での遺伝子発現の制御ネットワークには不明な点が残されている。Mamo タンパク質が転写活性化因子 OvoB、エピジェネティックな制御因子 CBP と共同して、始原生殖細胞中の *vasa* 遺伝子の発現活性化に関わることが判明してきた。新たな Mamo の相互作用因子を明らかにすることを目的として、遺伝学的な相互作用因子解析を行った結果、基本転写因子ホモログの一つ *Trf2* が Mamo と相互作用することが明らかになった。また、*Trf2* mRNA が始原生殖細胞中で強く発現することが判明した。

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「受精嚢」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）の受精嚢で強く発現している遺伝子を特定した。昨年度は、これらの遺伝子の全長配列を決定するため、RACE 法および次世代シーケンサーを用いた Iso-Seq 法をおこない、23 遺伝子の全長を特定できた。さらに、これらの遺伝子の機能を阻害することで、貯蔵精子にどのような影響を調べるために、二本鎖 RNA を作成し、RNA 干渉法の条件検討を実施している。

シロイヌナズナにおいてリン欠乏時の膜脂質転換に寄与するホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ (PAH) について、ゼニゴケの PAH 欠損変異体を作成し、GC-FID を用いたグリセロ脂質組成および脂肪酸組成の比較解析を行った。その結果、PAH を介した葉緑体への脂質供給は、器官・組織特異的に重要な役割を担っており、そのため栄養の有無に関わらず個体生育に大きな影響を与えることが明らかになった。

## 7. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

〔学会発表〕 (計 29 件)

〔図書・総説など〕 (計 1 件)

### 〔雑誌論文〕

1. Goto-Yamada, S., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Yamada, K. Sucrose Starvation Induces Microautophagy in Plant Root Cells. *Front Plant Sci.*, 10, 1604 (2019)  
DOI:10.3389/fpls.2019.01604.
2. Shimada, T.L., Shimada, T., Okazaki, Y., Higashi, Y., Saito, K., Kuwata, K., Oyama, K., Kato, M., Ueda, H., Nakano, A., Ueda, T., Takano, Y., and Hara-Nishimura, I. HIGH STEROL ESTER 1 is a key factor in plant sterol homeostasis. *Nat. Plants*, 5, 1154-1166 (2019)  
DOI:10.1038/s41477-019-0537-2.
3. A truncated form of a transcription factor Mamo activates vasa in Drosophila embryos. Shoichi Nakamura, Seiji Hira, Masato Fujiwara, Nasa Miyagata, Takuma Tsuji, Akane Kondo, Hiroshi Kimura, Yuko Shinozuka, Makoto Hayashi, Satoru Kobayashi & Masanori Mukai *Communications biology* (2019) 2:422. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0663-4>
4. Murakawa M, Ohta H, \*Shimojima M. (2019) Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 101(1-2):81-93.
5. Hidayati NA, Yamada-Oshima Y, Iwai M, Yamano T, Kajikawa M, Sakurai N, Suda K, Sesoko K,

Hori K, Obayashi T, Shimojima M, Fukuzawa H, \*Ohta H. (2019) Lipid remodeling regulator 1 (LRL1) is differently involved in the phosphorus-depletion response from PSR1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 100(3):610-626.

6. Hasi, RY., Miyagi, M., Morito, K., Ishikawa, T., Kawai-Yamada, M., Imai, H., Fukuta, T., Kogure, K., Kanemaru, K., Hayashi, J., Kawakami, R., Tanaka, T.: Glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity catalyzes transphosphatidylation. *J Biochem.*, 166, 441-448, (2019.11).

#### 〔学会発表〕

1. 上田晴子、西村いくこ、小胞体の形態からみる植物の生存戦略、第 61 回日本植物生理学会年、2020 年 3 月、大阪（招待講演）
2. 上田晴子、植物細胞の小胞体のダイナミックな形態変化、奈良先端科学技術大学院大学・異分野融合ワークショップシンポジウム「植物の複雑な構造とその形状や動態を解析するための技術基盤」、2019 年 12 月、奈良（招待講演）
3. 上田晴子、横田悦雄、西村いくこ、小胞体のゾーンからみる形態形成機構、日本植物学会第 83 回大会、2019 年 9 月、仙台（招待講演）
4. Shimada, T.L., Shimada, T., Okazaki, Y., Higashi, Y., Saito, K., Kuwata, K., Oyama, K., Kato, M., Ueda, H., Nakano, A., Ueda, T., Takano, Y., Hara-Nishimura, I., HIGH STEROL ESTER 1 is a key regulator in plant sterol biosynthesis. 8th Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids, 19-22 September, 2019, Australia
5. 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、メバロン酸経路の負の制御因子 HIGH STEROL ESTER1 の解析、第 2 回天然ゴム研究会、2019 年 7 月 19 日、横浜（招待講演）
6. 中村翔一、近藤茜、平 誠司、小林 悟、小島真琴、鈴木みのり、政所茂智、向 正則  
ショウジョウバエ生殖細胞性遺伝子 *vasa* 遺伝子の異所的発現が体細胞に与える影響  
日本動物学会第 90 回大会（2019 年 9 月・大阪）口頭
7. 近藤 茜、中村翔一、向 正則、松岡優一、吉浦玲奈  
ショウジョウバエ輸卵管の羽化後の分化とその制御  
第 42 回日本分子生物学会年会（2019 年 12 月・福岡）ポスター
8. 中村翔一、近藤茜、平 誠司、小林 悟、小島真琴、鈴木みのり、政所茂智、向 正則  
ショウジョウバエ生殖細胞性遺伝子 *vasa* 遺伝子の異所的発現が体細胞に与える影響  
第 42 回日本分子生物学会年会（2019 年 12 月・福岡）ポスター
9. 村上友規、石崎貴裕、山崎孝史、林清夏、渡辺洋平、ClpB シャペロンのミドルドメインによる協同的な脱凝集活性制御、第 92 回日本生化学会大会、2019 年 09 月 18 日～2019 年 09 月 20 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

10. 渡辺洋平、凝集体をほぐす分子シャペロン ClpB の動きとその制御、第 92 回日本生化学会大会シンポジウム、2019 年 09 月 18 日～2019 年 09 月 20 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）
11. 奈良崎泉、桂衣里奈、後藤彩子  
「アリ科の繭に対する衛生行動」  
第 67 回日本生態学会大会 2020 年 3 月
12. 鎌田智也、後藤彩子  
「ハチ目昆虫における受精嚢内精子運動」  
第 67 回日本生態学会大会 2020 年 3 月
13. 後藤彩子  
「アリ科女王の長期間の精子貯蔵システムにおける受精嚢の役割」  
第 67 回日本生態学会大会 2020 年 3 月
14. 鎌田智也、後藤彩子  
「膜翅目昆虫における精子貯蔵機能の進化」  
日本動物学会 第 90 回大会 2019 年 9 月
15. 後藤彩子  
「アリ科女王の精子貯蔵メカニズム」  
日本動物学会 第 90 回大会 2019 年 9 月
16. 鎌田智也、後藤彩子  
「ハチ目昆虫における受精嚢形態と機能の進化」  
第 21 回 日本進化学会 2019 年 8 月
17. 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」  
第 5 回 ユニーク会 2019 年 7 月
18. 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 7 回 KITAEL セミナー 2019 年 5 月
19. 下嶋美恵：植物における小胞体－葉緑体間脂質輸送を介した栄養応答、日本植物学会第 83 回大会、2019.9.15-17、仙台、招待講演
20. 下城彩、中村将、北浦銀河、佐々木一関本結子、清水信介、堀孝一、岩井雅子、太田啓之、石崎公庸、下嶋美恵：ゼニゴケにおけるリン欠乏時の膜脂質転換機構の解析、第 5 回植物の栄養研究会、2019.9.20-21、広島、ポスター
21. Shimojima, M, Murakawa, M., Ohta, H. Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis. 9<sup>th</sup> European Symposium on Plant Lipids 2019.7.07-7.10, Marseille, France, Oral presentation、国際

22. Shimojima, M, Murakawa, M., Ohta, H. Lipid remodeling under acidic conditions and its interplay with low Pi stress in Arabidopsis. 8<sup>th</sup> Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids 2019.11.19-11.22, Canberra, Australia, Oral presentation、国際
23. Shimojo, M., Nakamura, M., Kitaura, G., Sasaki-Sekimoto, Y., Shimizu, S., Hori, KI., Iwai, M., Ohta, H., Ishizaki, K., Shimojima, M. Lipid remodeling under phosphate starvation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. 8<sup>th</sup> Asian-Oceanian Symposium on Plant Lipids 2019.11.19-11.22, Canberra, Australia, Oral presentation、国際
24. 下城彩、中村将、北浦銀河、佐々木一関本結子、清水信介、堀孝一、岩井雅子、お h 多啓之、石崎公庸、下嶋美恵、ゼニゴケにおけるホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ PAH の役割、第 61 回日本植物生理学会年会、2020.3.19-21、大阪、口頭発表
25. Ihaya, R., Yoshitake, Y., Shimazaki, K., Kurosawa, Y., Ohta, H., Shimojima, M. シロイヌナズナにおける hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD1) の機能解析、第 61 回日本植物生理学会年会、2020.3.19-21、大阪、ポスター発表
26. Yoshida, E., Ohta, H., Shimojima, M. シロイヌナズナを用いた植物葉における油脂含量増大のための基盤研究、第 61 回日本植物生理学会年会、2020.3.19-21、大阪、ポスター発表
27. Hiroyuki Imai: Glucosylceramide profiles in the leaves of gymnosperms and angiosperms. 9<sup>th</sup> European Symposium on Plant Lipids, Marseille (2019.7) Poster presentation、国際
28. 今井博之、田中保、石川寿樹、川合真紀：LC-MS/MS によるフィトセラミド 1-リン酸分子種の定量解析。第 92 回日本生化学会大会、横浜（2019.9）ポスター発表
29. 田中保, Rumana Yesmin Hasi, 森戸克弥, 小暮健太郎, 林順司, 川上竜巳, 金丸芳, 今井博之, 石川寿樹：グリコシルイノシトール ホスホセラミドの単離法の開発。第 12 回セラミド研究会学術集会, 札幌（2019.10）口頭発表

〔図書・総説など〕

1. 石川寿樹、今井博之  
第 7 章 植物のセラミド関連脂質  
セラミド研究の新展開：基礎から応用へ  
セラミド研究会編集, 食品化学新聞社, (2019.6).