

## 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3年8月31日
2. 補助対象年度：令和2年度（令和2年4月1日～令和3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）

これまでの研究により、イネ科植物の葉において、スフィンガトリエニンを有するスフィンゴ脂質の存在が見出されている。しかし、スフィンガトリエニンの分子構造の詳細や、イネ科植物以外の植物種における研究はほとんどない。本研究では、イネ科植物以外の葉を試料として脂質を調製し、高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)及びガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)によって、スフィンガトリエニンを有する分子種を解析した。現在、スフィンガトリエニンの詳細な構造解析を進めている。

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。その形態は、脂質二重層からなる小胞体膜がチューブ状やシート状の構造をとり、ひと続きの複雑な網目構造である。この特徴的な形態を維持するしくみを明らかにすることを目的として、小胞体膜タンパク質に着目した解析を行っている。これまでの研究から、このタンパク質を欠損したシロイヌナズナ変異体では小胞体の網目構造が粗くなり、野生型では観察されない直径 10  $\mu\text{m}$  におよぶ巨大な凝集体が形成されることを見出している。変異体でこの凝集体がどうやって形成されるかが鍵となると考え、今年度は次の解析を行った。(1) 透過型電子顕微鏡観察によって、この凝集体の微細構造を解析した。(2) 遠心分画法によってこの凝集体を単離する方法を確立し、質量分析を利用したプロテオーム解析を行った。現在、凝集体に蓄積するタンパク質の網羅的な同定を進めている。

分子シャペロン ClpB は、リング状の 6 量体を形成し、他の分子シャペロン DnaK とその補助因子と協力して、凝集したタンパク質をほぐし（脱凝集）再生する。脱凝集の際、ClpB はそのリング中央の孔に凝集タンパク質を引き込むことで脱凝集する。ClpB はサブユニット一つ当たり 2 つ、合計 12 の ATP 加水分解ドメインを持つ。これまでに、ClpB の ATP 加水分解が DnaK の結合により活性化されること、また、この活性化が ClpB のサブユニット間で協同的に起こることを見出している。昨年度は、脱凝集が進行する状況での ATP 加水分解の活性化の様子を解析した。その結果、凝集体に作用している状態では、より少ない DnaK で ClpB が活性化されること、また、過剰な DnaK の結合は脱凝集反応をかえって阻害することを見出した。

ショウジョウバエの生殖細胞中で作用する転写制御因子 Mamo のコファクターの探索を試み、基本転写因子 TBP 相互作用因子の一つ TAF3, TBP パラログ TRF2 が Mamo と遺伝学的に相互作用することを明らかにした。さらに、生殖細胞中での TBP と TRF2 の発現様式が、異なることが判明した。初期胚や卵巣先端部領域において TBP mRNA レベルが低いこと、これに対して TRF2 mRNA レベルが高いこと、TBP タンパク質と比較して、TRF2 タンパク質が生殖細胞中に一定のレベルで検出されることが明らかになった。ノックダウン実験から、TRF2 が生殖細胞の維持に、TBP が生殖細胞の分化に関与することが明らかになった。生殖細胞の中でそれぞれ基本転写因子の発現が別々の制御を受け、選択的に機能する可能性が示唆された。

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、受精嚢内の精子は不動化されていることを明らかにしており、これが精子の損傷を防ぐ重要な役割を担っていると考えられる。本年度は、各種試薬や阻害剤を使用することで、精子の不動化に関与する要素をほぼ特定することができた。

リン欠乏にさらされた植物では、昨年度までに解析を行ってきた PAH を介したリン脂質分解を介した膜脂質転換とともに、貯蔵脂質トリアシルグリセロール (TAG) の顕著な蓄積が葉で起こる。しかし、リン欠乏後の葉における TAG 蓄積については、その制御機構も含めて不明な点が多い。そこで昨年度は、リン欠乏に応答した脂質変化が起こる時期をまず明らかにすることを目的として、GC-FID を用いて膜脂質組成と TAG 含量を、また qPCR 法により膜脂質転換および TAG 合成に関わる遺伝子群の発現量を経時的に解析した。その結果、膜脂質転換が先に完了した後も、TAG 蓄積の増大が続くことが明らかになった。現在、得られた遺伝子発現量データをもとに、特に TAG 蓄積に寄与すると考えられる 3 つのリパーゼ候補の解析を進めている。

## 7. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

〔学会発表〕 (計 10 件)

〔図書・総説など〕 (計 2 件)

### 〔雑誌論文〕

1. Nagano, M., Ueda, H., Fukao, Y., Kawai-Yamada M., Hara-Nishimura, I. Generation of Arabidopsis lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome *b5-B*. *Plant Signal. Behav.* 15: 1790196 (2020)
2. Nakata, T.M., Nakao, M., Denda, A., Onoda, Y., Ueda, H., Demura, T. Estimating the Flexural Rigidity of Arabidopsis Inflorescence Stems: Free-Vibration Test vs. Three-Point Bending Test. *Plant Biotechnol.* 37, 471-474 (2020)
3. Nakaso, Y., Arimoto, S., Kawaguchi, K., Muto, T., Ueda, H. Mechanical measurement of gravitropic bending force in pea sprouts. *Plant Biotechnol.* 37, 475-480 (2020)
4. Nakamura, S., Hira, S., Kojima, M., Kondo, A., Mukai, M. Expression of the core promoter factors TBP and TRF2 in Drosophila germ cells and their distinct functions in germline development. *Develop Growth Differ.* 62, 540–553 (2020)  
DOI: 10.1111/dgd.12701
5. Gotoh, A. and Sasaki, K. (2021) Caste differentiation of spermatheca and organs related to sperm use and oviposition in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 52: 262-271.

6. RCB-mediated chlorophagy caused by oversupply of nitrogen suppresses phosphate-starvation stress in plants. Yoshitake Y, Nakamura S, Shinozaki D, Izumi M, Yoshimoto K, Ohta H, Shimojima M. *Plant Physiol.* (2021) Mar 15;185(2):318-330. doi: 10.1093/plphys/kiab030.
7. 5. MYB-like transcription factor NoPSR1 is crucial for membrane lipid remodeling under phosphate starvation in the oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica*. Murakami H, Kakutani N, Kuroyanagi Y, Iwai M, Hori K, Shimojima M, Ohta H. *FEBS Lett.* (2020) Oct;594(20):3384-3394. doi: 10.1002/1873-3468.13902.

#### 〔学会発表〕

1. 今井博之、計篤志、石川寿樹、菅原達也、植物のグルコシルセラミドに含まれるスフィンガトリエニンの解析 第 62 回日本脂質生化学会（2020 年 5 月・東京）口頭発表（コロナ禍のため参集を中止、大会は成立）
2. 羅霄霖、宮鍋征克、開忍、今井博之、キノコ類の酵素液を利用した植物からの遊離セラミドの生産 第 13 回セラミド研究会（2020 年 10 月）オンライン、口頭発表
3. 羅霄霖、宮鍋征克、開忍、今井博之、キノコ類の自己消化反応を利用した植物からの遊離セラミドの生産 第 59 回日本油化学会（2020 年 11 月）オンライン、口頭発表
4. 上田晴子、植物細胞における小胞体の動態と形態形成、第 93 回日本生化学会大会、2020 年 9 月、オンライン（招待講演）
5. Hara-Nishimura, I., Shimada, T.L., Shimada, T., Okazaki, Y., Kuwata, K., Oyama, K., Kato, M., Ueda, H., HIGH STEROL ESTER 1-dependent fail-safe regulatory system for plant sterol homeostasis. *Plant Biology 2020 Worldwide Summit*, 27-31 July, 2020, online (poster)
6. Tomonori Murakami, Takahiro Ishizaki, Takashi Yamasaki, Sayaka Hayashi, Yo-hei Watanabe, Cooperative Regulation Of ClpB Disaggregase By The Middle Domain And DnaK、第 20 回日本蛋白質科学会年会、2020 年 7 月、オンライン
7. 鎌田智也、後藤彩子、単独性および社会性狩蜂における受精嚢形態の比較、第 91 回日本動物学会 オンライン（2020 年 9 月）ポスター発表
8. 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 7 回生殖若手の会 オンライン（2020 年 10 月）ポスター発表
9. 若松孝幸、井原雄太、横山峰幸、前澤大介、太田啓之、下嶋美恵. 植物葉における KODA 生産のための技術基盤の構築、第 62 回日本植物生理学会年会、2021.3、島根（オンライン）、口頭発表
10. 若松孝幸、井原雄太、横山峰幸、前澤大介、太田啓之、下嶋美恵. 植物葉における KODA 生産のための技術基盤の構築、2021 年度日本農芸化学会、2021.3、仙台（オンライン）、口頭発表

〔図書・総説など〕

1. 今井博之  
植物脂質を用いた実験・実習教育の実践を通じて見る食用植物油の脂肪酸組成の潮流  
生物由来の油に関する文理融合型研究の推進  
甲南大学総合研究所 叢書 141 (2021.3).
  
2. 後藤彩子  
第2章 増殖マシンとしてのアリ  
外来アリのはなし (橋本佳明 編), 朝倉書店 (2020.5).