

様式2

平成29年度 生体医歯工学共同研究実施報告書

受理年月日	
受理番号	2003

平成 30 年 3 月 19 日

生体医歯工学共同研究拠点 研究所長会議 議長 殿

共同研究代表者

所属機関 国立大学法人 島根大学

職 名 助教

氏 名 西村 浩二

印

勤務先所在地 〒690-8504

島根県松江市西川津町1060

電話番号 0852-32-6288

FAX番号 0852-32-6109

E-mailアドレス : knishimu@life.shimane-u.ac.jp

下記により、共同研究の実施報告を致します。

記

研究題目	(和)植物タンパク質の膜輸送経路を規定する膜小胞輸送因子のホスファチジルイノシトールリン脂質結合ドメインの機能解析 (英)Functional analysis on phosphatidylinositol phospholipid-binding domain of membrane vesicle transport factors which govern membrane trafficking pathways of plant proteins		
研究領域	1. 生体材料に関する基礎・応用研究 2. 生体工学に関する基礎・応用研究 ③. 生体機能分子に関する基礎・応用研究 4. 化学・電気・機械・材料工学の生体応用研究		
研究期間	平成 29 年 6 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
西村 浩二	島根大学学・研究・学術情報機構	助教	遺伝子クローニング、バイオイメージング
栗井光一郎	静岡大学・電子工学研究所	准教授	脂質解析
生体医歯工学共同研究拠点内対応教員	(共同研究をした教員名を記載) 栗井光一郎 准教授(静岡大学・電子工学研究所)		
研究成果			

<p>植物の膜小胞輸送では、輸送されるタンパク質（積荷タンパク質）は、輸送小胞の被覆タンパク質成分である積荷認識タンパク質により特異的に選抜される。積荷認識タンパク質は細胞質局在の可溶性タンパク質であり、単独で積荷タンパク質が局在する膜に集まることができない。哺乳動物では、特定のホスファチジルイノシトールリン脂質（PIPs）に結合するタンパク質の介在により、積荷認識タンパク質が膜に動員され、特定の積荷タンパク質を輸送小胞に組み込み、小胞輸送により、目的の細胞内区画に輸送すると考えられている。植物においても、哺乳動物の ANTH/ENTH/VHS アダプタータンパク質のオーソログが存在する。そこで本研究では、モデル植物シロイヌナズナにおいてエンドサイトーシス経路に関わる ECA4 と液胞輸送経路に関わる MTV1 が異なる PIP 特異性の解析を試みた。</p> <p>その結果、PIP 結合特異性の評価に用いる MTV1、ECA4 タンパク質の ENTH/ANTH アダプタードメインは、大腸菌での組換えタンパク質の発現量が極めて低く、調製が非常に難しいことがわかった。しかし、発現ベクターやタンパク質調製の条件を検討することにより、タンパク質精製標品を十分量調製することが可能となった。そこで、両タンパク質の PIP 結合特異性解析を Lipid overlay assay により行ったところ、特異性の評価が困難なものであることが判明した。その理由としては、それぞれのタンパク質精製標品と PIP アレイとの結合実験の至適化が十分ではないことが挙げられた。検討項目としては、メンブレンへの非特異的吸着を軽減する、あるいは精製タンパク質の全長を用いるなどの方策を講じることが挙げられた。</p> <p>今後は、脂質結合実験の至適化を進め、MTV1、ECA4 双方の PIP 結合特異性を明確にし、植物タンパク質の膜輸送経路の決定機構を解明したい。</p>		
<p><b>使用した設備・資料・試料等</b></p>	<p>膜被覆小胞関連タンパク質と膜リン脂質との相互作用解析のために、蛍光イメージャーおよび多数のホスファチジルイノシトールリン脂質結合膜アレイを使用。</p>	
<p><b>本研究成果に関連する論文発表状況</b></p>		
<p>国際学会発表：  Characterization of lipid binding activity of EPSIN N-TERMINAL HOMOLOGY (ENTH) domain of <i>Arabidopsis</i> MODIFIED TRANSPORT TO THE VACUOLE1 (MTV1), <a href="#">Nishimura K</a>, Awai K, The 7th Asian Symposium on Plant Lipid (ASPL2017), 2017.11.30. Taipei</p>		
<p><b>次年度の共同研究継続の有無</b></p>	<p><input checked="" type="radio"/> 有 ・ 無</p>	<p>拠点内対応教員とご相談の上ご記入ください。</p> <p>継続の場合には次年度の研究計画をご記入願います。</p>
<p><b>次年度の研究計画（継続の場合）</b></p>		
<p>H29 年度の結果を踏まえ、まず MTV1 および ECA4 と PIP アレイとの結合特異性を評価できる実験系の構築を行う。H29 年度では、脂質結合特異性の評価が困難であったが、次年度では、PIP アレイメンブレンへの非特異的吸着の軽減化や、用いる精製タンパク質プローブをドメインだけでなく全長を用いるなどの方策を講じ、脂質結合特異性の評価について生体医歯工学共同研究拠点である静岡大学の設備を用いて適切に行う。さらに、ECA4 と MTV1 の PIP 結合ドメインをお互いにスワップしたキメラタンパク質を作成し、野生型と比較して積荷タンパク質の輸送にどのような影響がでるか調べる。そのために、PIP 結合ドメインをスワップしたキメラタンパク質全体の脂質結合特性を評価した上で、さらに ECA4 と MTV1、およびそれらの PIP 結合ドメインスワップキメラタンパク質の細胞内挙動をそれぞれの蛍光融合タンパク質を用いて共焦点レーザー蛍光顕微鏡による蛍光バイオイメージングで細胞内挙動を解析する。以上の生化学的解析と細胞生物学的解析の双方から、植物タンパク質のポストゴルジ膜輸送経路における PIP の生理的役割を明らかにしたい。</p> <p>追記：平成 30 年 4 月 1 日より、島根大学生物資源科学部・准教授に異動予定。</p>		