

平成 22年 2月 26日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780236  
 研究課題名 (和文) Cor15am による基質タンパク質保護機構の解明とその応用  
 研究課題名 (英文) Mechanism of substrate protection by the cold regulated protein, Cor15am, and its application.  
 研究代表者  
 稲葉 丈人 (INABA TAKEHITO)  
 岩手大学・連合農学研究科・プロジェクト教員  
 研究者番号：00400185

## 研究成果の概要 (和文)：

植物は温度や乾燥などの環境ストレスにさらされると、数多くの遺伝子の発現を誘導することが知られている。中でも顕著に誘導されるのが、LEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパク質やヒドロフィリンに代表される親水性タンパク質である。本研究では LEA 様タンパク質のひとつである Cor15am に着目し、その機能を解析した。

## 研究成果の概要 (英文)：

When plants are exposed to abiotic stress, they induce the expression of a number of genes. Among them, some genes encode highly hydrophilic polypeptides, such as late embryogenesis abundant (LEA) proteins. In this study, we characterized a LEA-related protein, Cor15am, using various approaches.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：タンパク質・糖鎖工学

## 1. 研究開始当初の背景

それまでの代表者らの研究により、ストレス誘導性の親水性タンパク質 Cor15am にタンパク質に対する凍結保護活性があること、さらに基質タンパク質と直接相互作用できることが明らかになった (Nakayama et al., *Plant Physiol.*, 144, 513-523)。特筆すべきこと

に、組み換え型 Cor15am のタンパク質凍結保護活性は、一般的に安定化剤として用いられているウシ血清アルブミン (BSA) よりも高かった。また、Cor15am は極めて熱に安定であり、100度で10分間加熱しても沈殿することなく可溶性タンパク質として存在できた。このような性質は、凍結保護活性のみならず、

熱処理などに対しても保護活性を發揮できることを示唆していた。

以上のような背景を踏まえ、代表者は Cor15am による基質タンパク質保護機構の解明に関する研究を提案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、Cor15am タンパク質による基質タンパク質保護機構の解明とその応用を目指し、研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Cor15am によるタンパク質リフォールディング活性の調査

(2) 熱及び乾燥ストレスに対する Cor15am の保護活性の検証

(3) Cor15am によるタンパク質凝集の抑制効果の検証

(4) 酵母ツーハイブリッド法を用いたタンパク質間相互作用に關与するドメインの探索

(5) ザゼンソウ及びミズバショウからの Cor15am 様タンパク質遺伝子の単離

## 4. 研究成果

(1) Cor15am によるタンパク質リフォールディング活性の調査

まず、試験管内でのタンパク質リフォールディングアッセイ系を用い、Cor15am に変性したタンパク質を巻き戻す活性があるか調べた。その結果、Cor15am にはリフォールディング活性は無いことが明らかになった。

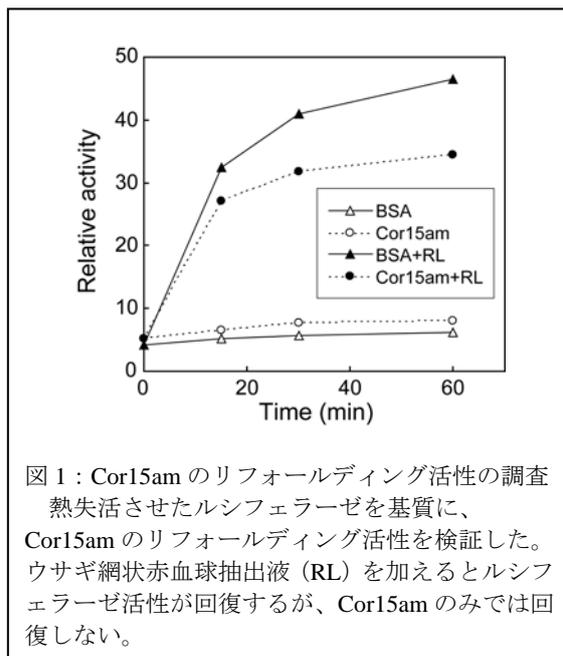


図1: Cor15am のリフォールディング活性の調査  
熱失活させたリンフェラーゼを基質に、Cor15am のリフォールディング活性を検証した。ウサギ網状赤血球抽出液 (RL) を加えるとリンフェラーゼ活性が回復するが、Cor15am のみでは回復しない。

## (2) 熱及び乾燥ストレスに対する Cor15am の保護活性

研究項目1の結果から、Cor15am によるタンパク質保護活性はリフォールディング活性ではなく、酵素を失活から保護する活性であると考えた。そこで次に、酵素失活のタイムコースをモニターできる系を開発し、これを用いて仮説が正しいか検証した。

まず、LDH を含む溶液を脱水処理すると、脱水の程度により酵素の失活の程度が異なることが判明した。同様に、高温 (43°C) で処理すると、LDH は徐々に失活することが明らかになった。そこで、これらの系を用いて Cor15am によるタンパク質保護活性を調べた。

Cor15am を含む LDH 溶液を脱水あるいは高温処理すると、酵素の失活は顕著に抑えられた。その効果は、ポジティブコントロールの BSA と同等かそれ以上であった。このことから、Cor15am はその保護活性により、酵素の失活を遅延させていることが明らかになった。

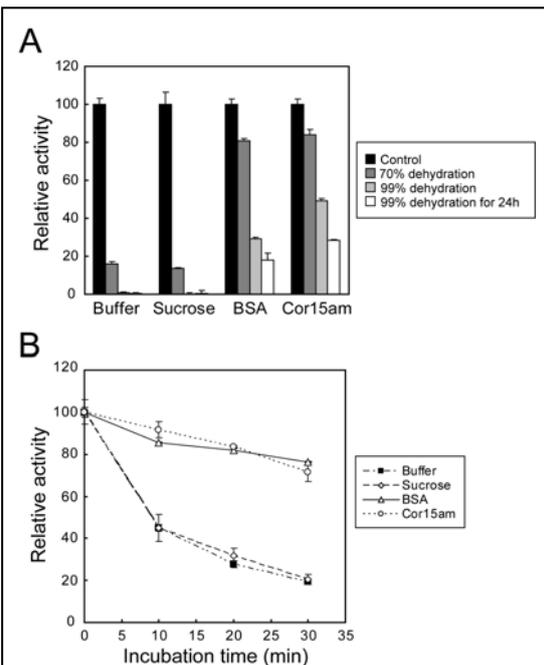


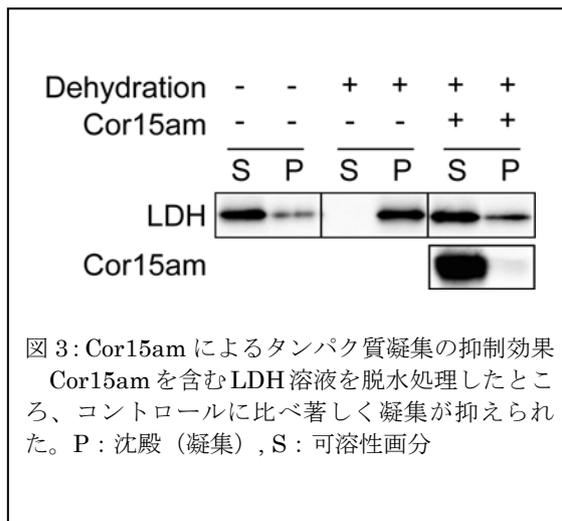
図2: 熱及び乾燥ストレスに対する Cor15am の保護活性

Cor15am を含む LDH 溶液を脱水 (A) 及び熱処理 (B) し、Cor15am の影響を調べた。その結果、Cor15am はポジティブコントロールの BSA と同等か、それ以上の保護活性を持つことが明らかになった。

### (3) Cor15am によるタンパク質凝集の抑制効果の検証

研究項目 1 及び 2 の結果から、Cor15am によるタンパク質保護活性は凝集抑制効果であると仮説を立て、その検証を行なった。

脱水により容易に凝集沈殿する乳酸脱水素酵素 (LDH) に Cor15am を加えて脱水処理した。その後、再度水を加えたところ、大部分の LDH は凝集沈殿していたが、Cor15am を加えた溶液では大部分の LDH が可溶性画分に検出された。このことから、Cor15am によるタンパク質保護活性は、凝集の抑制によるものであることが明らかになった。



### (4) 酵母ツーハイブリッド法を用いたタンパク質間相互作用に関与するドメインの探索

これまでの研究で、Cor15am がホモ多量体を形成することが明らかになっていた。そこで、酵母ツーハイブリッド法を用いて Cor15am の多量体形成に関与するドメインの探索を行った。その結果、少なくともこの方法では全長 Cor15am 同士の相互作用が検出できないことが示唆された。一方で、Cor15am の相互作用は化学架橋法では検出できたことから、今後はこの方法を用いてさらに分子間相互作用を解析する予定である。

### (5) ザゼンソウ及びミズバショウからの Cor15am 様タンパク質遺伝子の単離

Cor15am は低温誘導性タンパク質であるため、寒冷地に生息する植物は、より保護活性の高い類似タンパク質を持っている可能性が考えられる。そこで、寒冷地に生息するザゼンソウ及びミズバショウから COR15A 関連遺伝子のクローニングを試みた。

ザゼンソウ肉穂花序 cDNA ライブラリーの中で配列が明らかになったクローンから、

LEA 様タンパク質を探索した。さらに、degenerate primer を用いて、ミズバショウからの遺伝子単離を試みている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

※以下の論文は全て査読有

#### ① Inaba, T. (2010)

Bilateral communication between plastid and the nucleus: plastid protein import and plastid-to-nucleus retrograde signaling.

*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 471-476

#### ② Ito-Inaba, Y., Hida, H. and Inaba, T. (2009)

What is critical for plant thermogenesis? - Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages.

*Planta*, 231, 121-130

#### ③ Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.S., Terauchi, R. and Inaba, T. (2009)

Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling.

*Plant Physiology*, 151, 1339-1353

#### ④ Ito-Inaba, Y., Sato, M., Masuko, H., Hida, H., Toyooka, K., Watanabe, M. and Inaba, T. (2009)

Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage (*Symplocarpus renifolius*).

*Journal of Experimental Botany*, 60, 3909-3922

#### ⑤ Ito-Inaba, Y., Hida, Y., Mori, H. and Inaba, T. (2008)

Molecular identity of uncoupling proteins in thermogenic skunk cabbage.

*Plant and Cell Physiology*, 49, 1911-1916

#### ⑥ Okawa, K., Nakayama, K., Kakizaki, T., Yamashita, T. and Inaba, T. (2008)

Identification and characterization of Cor413im proteins as novel components of the chloroplast inner envelope.

*Plant, Cell and Environment*, 31, 1470-1483

#### ⑦ Inaba, T. and Schnell, D.J. (2008)

Protein trafficking to plastids: one theme, many

variations.

*Biochemical Journal*, 413, 15-28

⑧Nakayama, K., Okawa, K., Kakizaki, T. and **Inaba, T.** (2008)

Evaluation of the protective activities of a late embryogenesis abundant (LEA) related protein, Cor15am, during various stresses *in vitro*.

*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72, 1642-1645

[学会発表] (計 15 件)

①稲葉靖子, 飛田耶馬人, **稲葉丈人** (2010) ザゼンソウとミズバショウの比較による植物熱産生機構の解析 日本農芸化学会 2010 年度年会, 東京大学, 東京都, 2010.3.27~3.30

②柿崎智博, 松村英生, 中山克大, 蔡晃植, 寺内良平, **稲葉丈人** (2010) Retrograde Signal によるプラスチドタンパク質輸送と核遺伝子発現の協調的制御 日本農芸化学会 2010 年度年会, 東京大学, 東京都, 2010.3.27~3.30

③**稲葉丈人** (2009) 細胞内輸送を介した植物の多様な環境応答機構に関する研究 農芸化学奨励賞受賞記念講演 第 144 回日本農芸化学会東北支部大会, 岩手大学, 岩手県盛岡市 (招待講演) 2009,10,30~31

④Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.S., Terauchi, R. and **Inaba, T.** (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling pathway. Plant Biology 2009 Minisymposium -Chloroplast Signalling and Gene Expression-, Hawaii Convention Center, USA, July 18-22, 2009 (招待講演)

⑤Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.S., Terauchi, R. and **Inaba, T.** (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling pathway. Plant Biology 2009, Hawaii Convention Center, USA, July 18-22, 2009

⑥Ito-Inaba, Y., Masuko, H., Hida, Y., Watanabe, M. and **Inaba, T.** (2009) Developmental changes and organelle biogenesis in the reproductive organs of thermogenic skunk cabbage. Plant Biology 2009, Hawaii Convention Center, USA, July 18-22, 2009

⑦**稲葉丈人** (2009) 細胞内輸送を介した植物の多様な環境応答機構に関する研究 日本

農芸化学会 農芸化学奨励賞 受賞講演 日本農芸化学会 2009 年度年会, 福岡国際会議場, 福岡県 (招待講演), 2009.3.27~29

⑧大川久美子, 中山克大, **稲葉丈人** (2009) 葉緑体膜タンパク質 AtCor413im の包膜への輸送シグナルの同定 日本農芸化学会 2009 年度年会, 福岡国際会議場, 福岡県, 2009.3.27~29

⑨柿崎智博, 中山克大, 蔡晃植, **稲葉丈人** (2009) 転写因子 AtGLK1 を介したプラスチドシグナルの伝達機構 日本植物生理学会 2009 年度年会, 名古屋大学, 愛知県 2009.3.21~24

⑩稲葉靖子, 飛田耶馬人, 増子潤美, 渡辺正夫, **稲葉丈人** (2009) ザゼンソウの発熟ステージ移行にともなう生殖器官の発達とオルガネラダイナミクス 日本植物生理学会 2009 年度年会, 名古屋大学, 愛知県, 2009.3.21~24

⑪**Inaba, T.** (2008) The role of plastid protein import in the regulation of nuclear gene expression. IU-UGAS/IU-GSA/IU-COE Joint Symposium, October 27-29, 2008, Morioka, Japan (招待講演)

⑫Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Terauchi, R. and **Inaba, T.** (2008) The role of plastid protein import in the regulation of nuclear gene expression. Gordon Research Conference on Mitochondria and Chloroplasts, August 10-15, 2008, University of New England, Biddeford, ME, USA

⑬Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Terauchi, R. and **Inaba, T.** (2008) Novel signaling pathways that coordinate chloroplast protein import and the expression of nuclear-encoded chloroplast proteins. Plant Biology 2008, June 26-July 1, 2008, Merida, Mexico

⑭**Inaba, T.** (2008) The role of plastid protein import in the regulation of nuclear gene expression. Plant Neurobiology 2008, Fukuoka, June 6-9, 2008 (招待講演)

⑮**稲葉丈人** (2008) 核-葉緑体間コミュニケーション-タンパク質輸送と葉緑体シグナル- 佐賀大学総合分析実験センター講演会, 佐賀県 (招待講演), 2008 年 6 月 5 日

〔図書〕（計 2 件）

①中山克大, 大川久美子, **稲葉丈人** (2009)  
ストレス応答タンパク質とその作用機構.  
温度と生命システムの相関学, p. 117-138 東  
海大学出版会

②**稲葉丈人** (2009)  
様々な温度環境に生きる生命の理解に向け  
て.  
温度と生命システムの相関学, p. 295-298 東  
海大学出版会

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.inabalab.org/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲葉 丈人 (INABA TAKEHITO)

岩手大学・連合農学研究科・プロジェクト  
教員

研究者番号 : 00400185