

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580094

研究課題名(和文) イネのエネルギー代謝物の流量制御を司るオルガネラ輸送体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of transporters regulating translocation of energy metabolites in rice organelle

研究代表者

野澤 彰 (Nozawa, Akira)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：30432800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム添加型無細胞合成法を利用したプロテオリポソーム再構成系によるトランスポーターの機能解析系の改良を行った。主に合成方法に焦点を絞りタンパク質の合成効率を上昇させることに成功した。その結果、コムギ胚芽由来のタンパク質に対する合成タンパク質の割合が高まり、簡易精製後のトランスポータータンパク質の輸送活性測定においてS/N比の高い解析系を構築することに成功した。この方法を用いて、植物のオルガネラに局在する様々なトランスポーターの解析を行なった。イネやアイスプラントの葉緑体に局在する糖リン酸輸送体やシロイヌナズナの葉緑体に局在する硫黄代謝物の輸送体などについて機能解析を行なった。

研究成果の概要(英文)：We improved a method for functional analysis of transporter proteins based on liposome-supplemented cell-free system. In the new system, detection range of transport activity against non-specific background activity was improved by up-regulated synthetic efficiency of membrane proteins in cell-free reaction. By using this method, we analyzed several transporter proteins localized in plant organelle. Substrate specificity of sugar-phosphate transporters in rice and iceplant plastids and sulfate metabolite transporter in Arabidopsis plastids.

研究分野：植物栄養学・土壌学

キーワード：糖リン酸輸送体 ミトコンドリアキャリア コムギ無細胞系 リポソーム

1. 研究開始当初の背景

植物の主要なエネルギー代謝経路である光合成と呼吸において、これらの経路に関する酵素蛋白質については植物の物質生産能力の理解や増強を目的とした研究が進んでいる。一方、これらの代謝経路で物質の輸送を制御する輸送体蛋白質の研究は、酵素研究と比較すると進展が遅い。本申請では、植物のエネルギー代謝器官の主要な輸送体蛋白質であるリン酸輸送体ファミリー(PTF)タンパク質とミトコンドリアキャリアファミリー(MCF)タンパク質についてそれらの基質輸送機能の解析や生体内での機能解析を通じてそれらのイネの生育や物質生産能力における役割を明らかにすることを目的に研究を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)申請者が開発した無細胞合成法を基盤とした *in vitro* 膜輸送体再構成系のさらなる技術的改良、ならびに同方法を利用した(2)イネ色素体に局在する PTF タンパク質と(3)ミトコンドリアに局在する MCF タンパク質の機能の解明である。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 膜輸送体再構成系の改良

申請者らは、コムギ無細胞合成系にリボソームを添加することにより膜タンパク質をリボソームとの複合体として合成し、この複合体を遠心処理により沈殿として回収した後、凍結融解および超音波処理を行うことにより機能型膜タンパク質を調製する方法を考案した。この方法では、簡便に機能的膜蛋白質を調製できるものの、非特異的にリボソームに結合してくるコムギ胚芽由来のタンパク質が微量ではあるが、活性測定系に混入するという問題がある。感度の高い解析系を構築するためには、精製膜タンパク質を用いた系の構築が必須である。そこで、His タグ付加により活性が低下しないこと確認している AtDTC と AtPPT1 をモデル蛋白質とし、タンパク質調製法の改良を行う。界面活性剤をコムギ無細胞系に添加し可溶性画分に合成し精製する方法と、リボソームとの複合体として合成後、界面活性剤で可溶化し精製する方法の二種類の方法を検討する。界面活性剤は、これまでに無細胞系において膜タンパク質の可溶化合成に実績のある Brij 系、大腸菌封入体からの MCF の可溶化に使われている Sarkosyl、リボソームに対して高い可溶化活性を示す Fos-cholin 系などを試験する。界面活性剤を使用する方法で上手くいかない場合にはタンパク質の合成活性を上昇させ、コムギ胚芽由来の微量混入タンパク質の比率を低下させることで輸送活性感度を上昇させる方法の構築を試みる。

(2) イネ色素体局在 PTF タンパク質

PTF は PPT, TPT, GPT, XPT の 4 種の輸送体から構成されるが単子葉植物では XPT に相同性を持つ遺伝子が未同定である。XPT はキシロース-5'リン酸を色素体内に輸送することでペントース-リン酸経路の形成に関与しているため、イネ色素体においても、デオキシリボースやリボースなど核酸合成に必要な糖前駆体合成に不可欠なはずである。PPT, TPT, GPT および XPT は配列類似性が高いことより、単子葉植物では PPT, TPT および GPT のいずれかが XPT の役割を兼ねている、もしくは XPT として機能している可能性がある。この仮説を検証するため、蛋白質を合成し、*in vitro* 再構成系を利用する基質特異性解析により、イネ XPT の同定を進める。

また、イネ以外の植物の PTF に関しても *in vitro* 再構成系を利用して輸送基質の特定を行い生体内での役割を推定する。

(3) ミトコンドリア局在 MCF タンパク質

酵母やシロイヌナズナでは約半数の MCF について輸送基質が同定されている。アミノ酸配列の相同性に基づく系統解析から、他のいくつかの MCF タンパク質について輸送基質を推定することができる。これらの中で、エネルギー代謝に関連する MCF に対象を絞り、輸送基質特異性の解析を行う。MCF 蛋白質は相同性の高い蛋白質間においても輸送基質の特異性に違いがあることが報告されており、個々の MCF の機能を理解するためにはそれぞれの輸送基質特異性の詳細を *in vitro* 再構成系により検証する必要がある。

4. 研究成果

(1) *in vitro* 膜輸送体再構成系の改良

リボソーム添加型コムギ無細胞系を利用したプロテオリボソーム再構成系によるトランスポーターの機能解析系の改良を行なった。主に合成方法に焦点を絞りタンパク質の合成効率を上昇させることに成功した。その結果、コムギ胚芽由来のタンパク質に対する合成膜タンパク質の比率が高まり、簡易精製後のトランスポータータンパク質の輸送活性測定において S/N 比を高めることに成功した。コムギ無細胞系を利用したプロテオリボソーム再構成系については実験法(論文)と応用例(論文)についてそれぞれ論文として発表した。

(2) 色素体局在 PTF タンパク質

イネ色素体に局在する PTF タンパク質 8 種のうち 4 種について cDNA をクローニングし、無細胞系でタンパク質合成を確認した。4 種全ての PTF タンパク質が活性型として合成できていることを確認し、2 種については基質特異性を決定した。

また、アイスプラントの 4 種の PTF タンパク質について無細胞系を利用し機能型タンパク質を合成し、それらの基質特異性を決定した。共同研究者が行なった遺伝子発

現のデータと組み合わせることでそれらの生体内の役割を推定し論文として発表した(論文)。

(3)ミトコンドリア局在 MCF タンパク質

MCF タンパク質に関しては酵母の複数のタンパク質に関して無細胞系を利用して機能型膜タンパク質として合成できることを確認した。この中で ATP/AMP 交換輸送体である Ant1p を利用して、外部から ATP を供給することで発光するルシフェラーゼ内封リポソームの作成を試みた。無細胞系で合成した Ant1p を膜上に配置することで ATP をリポソーム内部に取り込み、それを利用してルシフェラーゼがルシフェリンの酸化反応を触媒し発光することが確認された。この結果は論文として発表した(論文)。

また、シロイヌナズナの MCF の中に含硫核酸を輸送するものを見出した。この結果は植物生理学会にて報告した(学会発表)。

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9件)

Herbert Santos, Kenichiro Imai, Takashi Makiuchi, Kentaro Tomii, Paul Horton, Akira Nozawa, Mohamed Ibrahim, Yuzuru Tozawa, and Tomoyoshi Nozaki (2015) A novel mitochondrial β -barrel outer membrane protein in *Entamoeba*. *Sci. Rep.* **5**: 8545. 査読あり

doi: 10.1038/srep08545.

Yuhta Nomura, Atsushi Izumi, Yoshinori Fukunaga, Kensuke Kusumi, Ko Iba, Seiya Watanabe, Yoichi Nakahira, Andreas P.M. Weber, Akira Nozawa, and Yuzuru Tozawa (2014) Diversity in guanosine 3',5'-bisdiphosphate (ppGpp) sensitivity among guanylate kinases of bacteria and plants. *J. Biol. Chem.* **289**: 15631-15641. 査読あり

doi: 10.1074/jbc.M113.534768.

Akira Nozawa and Yuzuru Tozawa (2014) Incorporation of adenine nucleotide transporter, Ant1p, into proteoliposomes facilitates ATP translocation and activation of encapsulated luciferase. *J. Biosci. Bioengin.* **118**: 130-133. 査読あり

doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.001.

Akira Nozawa and Yuzuru Tozawa (2014) Modification of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins. *Methods Mol. Biol.* **1072**: 259-272. 査読なし

doi: 10.1007/978-1-62703-631-3_19.

野澤 彰, 戸澤 譲 (2014) 膜輸送体タンパク質の完全インビトロ機能解析系 バイオサイエンスとインダストリー 72 巻

190-196. 査読なし

Shin Kore-eda, Akira Nozawa, Yusuke Okada, Kazuki Takashi, Muhammad Abul Kalam Azad, Jun-ichi Ohnishi, Yoshitaka Nishiyama, and Yuzuru Tozawa (2013) Characterization of the plastidic phosphate translocators in the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **77**: 1511-1516. 査読あり

doi: 10.1271/bbb.130174

[学会発表](計31件)

名樂 仁、井上 寛之、戸澤 譲、野澤 彰 (2015) プロテオリポソーム再構成系を利用したシロイヌナズナ PAPST 1 ホモログ At3g51870 の輸送基質の解析 第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業大学 東京都・世田谷区

Akira Nozawa and Yuzuru Tozawa. (2014) Cell-free system for functional analysis of membrane transporters. The 12th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Ehime University, Matsuyama Ehime.

Daichi Morita, Hiroyuki Inoue, Yuki Shimonosono, Hitoshi Myoraku, Taito Takabayashi, Ryoji Fujimoto, Nobuhiro Yamashita, Yusuke Okada, Shinichi Teramoto, Hironori Takeda, Akira Nozawa, and Yuzuru Tozawa. (2014) Functional analysis of membrane transporters by in vitro reconstitution system. The 12th Matsuyama International Symposium on Proteo-Sciences. Ehime University, Matsuyama Ehime.

野澤 彰、戸澤 譲 (2014) Adenine nucleotide transporter ANT1 を膜上に配置したプロテオリポソームにおける内封ルシフェラーゼ活性の外部からの制御 平成 26 年度 日本農芸化学会 明治大学 神奈川県・川崎市

野澤 彰、戸澤 譲 (2014) 無細胞系を利用した膜蛋白質合成法の開発とその合成生物学への応用 第一回合成生物学研究部会 愛媛大学 愛媛県・松山市

野澤 彰、戸澤 譲 (2013) 脂質組成と再構成ミトコンドリアキャリア蛋白質の膜輸送活性との関係 日本農芸化学会中四国支部第 36 回講演会 島根大学 島根県・松江市

野澤 彰、戸澤 譲 (2013) コムギ無細胞系を利用した膜輸送体蛋白質の機能解析系の構築 第 54 回日本植物生理学会年会 岡山大学 岡山県・岡山市

野澤 彰、是枝 晋、戸澤 譲 (2012) プラスチド型リン酸輸送体ファミリータンパク質の合成と機能解析 第 7 回無細胞生命科学研究会 愛媛大学 愛媛県・松山市

野澤 彰 (2012) コムギ無細胞系を基盤とした膜タンパク質解析系の構築 岡山

大学資源植物科学研究所 拠点共同研究
主催 ワークショップ「植物ホルモンと
イオン輸送体の相互理解」岡山大学資源
植物科学研究所 岡山県・倉敷市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nozawa-labo.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野澤 彰 (NOZAWA, Akira)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
講師

研究者番号：30432800

(2)連携研究者

戸澤 譲 (TOZAWA, Yuzuru)

埼玉大学・大学院・理工学研究科・教授

研究者番号：90363267