

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650096

研究課題名(和文) ビオチンライゲースを用いた新規インタラクトーム解析

研究課題名(英文) Interactome analysis with biotin ligase in Arabidopsis

研究代表者

田村 謙太郎 (Tamura, Kentaro)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40378609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インタラクトーム解析とは分子間相互作用の網羅的な同定手法である。本研究課題では、植物の核膜インタラクトーム解析のための新しいツール作りを目的とした。

改変型ビオチンライゲース(BirA)は近接タンパク質をビオチン化する。このBirAと核膜タンパク質との融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。この形質転換体においてBirA融合タンパク質および、ビオチン化タンパク質の蓄積を確認することが出来た。しかしながら、これらビオチン化タンパク質は蓄積量が少なく、精製および質量分析による同定を行うことが出来なかった。今後は、より高効率なビオチン化の系の開発と精製法の確立が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Interactomics is a powerful resource to reveal the whole set of molecular protein network in the cells. In this study, we aimed to develop a novel tool for interactomics in plant nuclear envelope by using modified biotin ligase (BirA). We generated transgenic Arabidopsis plants expressing BirA-fused nuclear envelope protein. Western blot analyses indicated that the biotinylated proteins are specifically accumulated in the transgenic plants. However, the accumulation level of biotinylated proteins was low. To purify and identify more effectively, it is required for the system allowing higher accumulation of biotinylated proteins in the transgenic plants

研究分野：植物細胞生物

キーワード：インタラクトーム ビオチン ビオチンライゲース シロイヌナズナ

### 1. 研究開始当初の背景

機能ゲノム科学分野において、タンパク質間相互作用ネットワークを明らかにするインタラクトーム解析は重要な手法として認識されていた。しかしながら、現在までに植物細胞における確固たる手法の確立はまだ十分に検討されておらず、網羅的なタンパク質間相互作用の情報が大きく立ち遅れていた。

申請者らは以前、蛍光タンパク質タグを利用した免疫沈降法によって、植物の核膜孔複合体成分の網羅的同定に成功していた。この免疫沈降法を利用した相互作用タンパク質の同定方法は、一過的だったり弱い相互作用のタンパク質は同定出来なかったり、タンパク質抽出の条件検討には長時間を有する点で問題があった。これらの問題を解決するために、よりハイスループットなインタラクトーム解析のツールを開発する必要があった。

### 2. 研究の目的

植物細胞を用いて、ビオチンライゲースによる新しいインタラクトーム解析の手法を確立することを目的とする。この解析のモデルとして、植物の核膜に注目し、核膜タンパク質のカatalog情報の取得を目指す。これらの成果により、未だ共通理解の得られていない高等植物の核膜の機能分化に関する知見の取得が期待できる。

### 3. 研究の方法

最近、近接するタンパク質を特異的にビオチン化する大腸菌由来の改変型ビオチンライゲース (BirA) が開発された (Roux et al., J. Cell. Biol. 2012)。この BirA と核膜タンパク質 (裏打ちタンパク質 KAKU4 および核膜孔複合体 Nup136) との融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。ウエスタンブロットにより、BirA 融合タンパク質を高レベルで蓄積するラインを複数ライン選抜し、その後の解析に使用した。

選抜した形質転換ラインの幼植物体 (発芽後 4-6 日後) に 1-10 mM のビオチン処理を 16 時間行った。処理後に、タンパク質を抽出して、ストレプトアビジンビーズによるビオチン化タンパク質の精製を試みた。

### 4. 研究成果

ビオチンライゲース (BirA) を用いたインタラクトーム解析のために、核膜タンパク質をターゲットとした BirA には核内膜タンパク質である KAKU4 及び、核膜孔複合体の構成因子である Nup136 を用いた。ウエスタンブロット解析により、KAKU4-BirA および Nup136 タンパク質が形質転換植物内で蓄積していることが確認できた (図 1)。

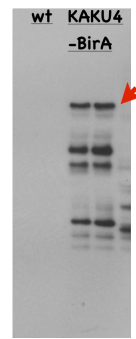


図 1. 野生型 (wt) 及び、KAKU4-BirA を発現する形質転換シロイヌナズナからタンパク質を抽出してウエスタンブロットを行った。形質転換体では約 100 kDa 付近に KAKU4-BirA の全長と予想されるタンパク質が蓄積していた (矢印)。

この形質転換体 (幼植物体) に 1 mM ビオチンを 16 時間処理した後、タンパク質を抽出して、ストレプトアビジン-HRP を用いたビオチンブロットを行った。その結果、形質転換体で特異的に蓄積しているビオチン化タンパク質の検出も成功した。しかしながら、植物が元来持つ内在性ビオチン化タンパク質の量が非常に多かった。

ビオチン化タンパク質の精製のために、ストレプトアビジンビーズ (Pierce) に抽出タンパク質を供した。精製画分を電気泳動後、ビオチンブロットおよび銀染色を行って、形質転換体特異的なビオチン化タンパク質の探索を行った。しかしながら、内在性のビオチン化タンパク質の量が多く、BirA 融合タンパク質由来と考えられるビオチン化タンパク質はほとんど検出できなかった。今後は内在性ビオチン化タンパク質の少ない組織 (たとえば根等の非光合成組織) を用いたり、より多くの BirA 融合タンパク質が蓄積する形質転換体を用いて、効率的なビオチン化タンパク質の抽出方法を探る必要がある。

### 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 17 件)

1. 田村 健太郎, 西村いくこ  
高等植物の細胞核を動かすミオシン XI-i ~ 細胞内で核を動かす仕組みは動物と植物で異なっていた~

**化学と生物**, 査読無し, 53, 69-70.

2. 田村 健太郎, 西村いくこ

高等植物の生存戦略を担う核-細胞質間分子輸送システム

**生化学**, 査読無し, 87, 2015, 34-40.

doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870034

3. Kentaro Tamura, C. Goto, and I. Hara-Nishimura

Recent advances in understanding plant nuclear envelope proteins involved in nuclear morphology

**J. Exp. Bot.** 査読有, 66, 2015, 1641-1647.

doi: 10.1093/jxb/erv036

4. K. Okamoto, H. Ueda, T. Shimada, **Kentaro Tamura**, T. Kato, M. Tasaka, M. T. Morita, and I. Hara-Nishimura  
An actin-myosin XI cytoskeleton regulates organ straightening adjust plant posture  
**Nat. Plants**. 査読有 , 1, 2015, 15031.  
doi:10.1038/nplants.2015.31
5. K. Okamoto, H. Ueda, T. Shimada, **Kentaro Tamura**, Y. Koumoto, M. Tasaka, M. T. Morita, and I. Hara-Nishimura  
An ABC transporter B family protein, ABCB19, is required for cytoplasmic streaming and gravitropism of the inflorescence stems  
**Plant. Signal. Behav.** 査読有 , *in press*.
6. O. Teh, N. Hatsugai, **Kentaro Tamura**, K. Fuji, R. Tabata, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Yamada, M. Hasebe, S. Sawa, T. Shimada, and I. Hara-Nishimura  
BEACH-domain proteins act together in a cascade to mediate vacuolar protein trafficking and disease resistance in *Arabidopsis*  
**Mol. Plant**. 査読有 , 8, 2015, 389-398.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.015
7. T. Ichino, K. Fuji, H. Ueda, H. Takahashi, Y. Komoto, J. Takagi, **Kentaro Tamura**, R. Sasaki, K. Aoki, T. Shimada, and I. Hara-Nishimura  
GFS9/TT9 contributes to intracellular membrane trafficking and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*  
**Plant J.** 査読有 , 80, 2014, 410-423.  
doi: 10.1111/tpj.12637.
8. M. Ohtsu, Y. Shibata, M. Ojika, **Kentaro Tamura**, I. Hara-Nishimura, H. Mori, K. Kawakita, and D. Takemoto  
Nucleoporin 75, a component of nuclear pore complex, is involved in the MAPK-mediated production of ethylene leading to the accumulation of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*  
**Mol. Plant Microbe Interact.** 査読有 , 27, 2014, 1318-1330.  
doi: 10.1094/MPMI-06-14-0181-R.
9. **Kentaro Tamura** and I. Hara-Nishimura  
Functional insights of nucleocytoplasmic transport in plants  
**Front. Plant Sci.** 査読有 , 5, 2014, 118.  
doi: 10.3389/fpls.2014.00118.
10. C. Goto, **Kentaro Tamura**, Y. Fukao, T. Shimada, and I. Hara-Nishimura  
The novel nuclear envelope protein KAKU4 modulates nuclear morphology in *Arabidopsis*  
**Plant Cell** 査読有 , 26, 2014, 2143-2155.  
doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.122168.
11. J. Takagi, L. Renna, H. Takahashi, Y. Koumoto, **Kentaro Tamura**, G. Stefano, Y. Fukao, M. Kondo, M. Nishimura, T. Shimada, F. Brandizzi, and I. Hara-Nishimura  
MALG05 functions in protein export from Golgi-associated endoplasmic reticulum exit sites in *Arabidopsis*  
**Plant Cell** 査読有 , 25, 2014, 4658-4675.  
doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.122168
12. **Kentaro Tamura**, K. Iwabuchi, Y. Fukao, M. Kondo, K. Okamoto, H. Ueda, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura  
Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in *Arabidopsis*  
**Curr. Biol.** 査読有 , 23, 2013, 1776-1781.  
doi: 10.1016/j.cub.2013.07.035.
13. S. Yamaoka, Y. Shimono, M. Shirakawa, Y. Fukao, T. Kawase, N. Hatsugai, **Kentaro Tamura**, T. Shimada, I. Hara-Nishimura  
Identification and dynamics of *Arabidopsis* AP-2 complex and its involvement in floral organ development  
**Plant Cell** 査読有 , 25, 2013, 2958-2969.  
doi: 10.1105/tpc.113.114082.
14. O. Teh, Y. Shimono, M. Shirakawa, Y. Fukao, **Kentaro Tamura**, T. Shimada, and I. Hara-Nishimura  
The AP-1  $\mu$  adaptin is required for KNOLLE localization at the cell plate to mediate cytokinesis in *Arabidopsis*  
**Plant Cell Physiol.** 査読有 , 54, 2013, 838-847.  
doi: 10.1093/pcp/pct048.
15. M. Abiko, H. Maeda, **Kentaro Tamura**, I. Hara-Nishimura, and T. Okamoto  
Gene expression profiles in rice gametes and zygotes: Identification of gamete-enriched genes and up- or down-regulated genes in zygotes after fertilization  
**J. Exp. Bot.** 査読有 , 64, 2013, 1927-1940.  
doi: 10.1093/jxb/ert054.
16. **Kentaro Tamura**, and I. Hara-Nishimura  
The molecular architecture of the plant nuclear pore complex

J. Exp. Bot. 査読有, 64, 2013, 823-832.  
doi: 10.1093/jxb/ers258.

17. W. Du, Kentaro Tamura, G. Stefano, and F. Brandizzi

The integrity of plant Golgi apparatus depends on cell growth-controlled activity of GNL1

Mol. Plant. 査読有, 6, 2013, 905-915.  
doi: 10.1093/mp/sss124.

〔学会発表〕(計 4件)

Kentaro Tamura, Y. Fukao and I. Hara-Nishimura: Interactive proteomics dissects structural dynamics of plant nuclear envelope. 1<sup>st</sup> International Plant Proteomics Organisation World Congress, Hamburg, Germany, Aug 31-Sep 4, 2014.

Kentaro Tamura: Key regulators of nuclear structure and dynamics in Arabidopsis. Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, Manchester, United Kingdom, Jul. 1-4, 2014.

田村 謙太郎, 岩淵功誠, 深尾陽一郎, 近藤真紀, 岡本圭史, 上田晴子, 西村幹夫, 西村いくこ: 植物の核膜が持つ新しい役割. 日本植物生理学会年会シンポジウム, 富山, 2014年3月18-20日.

Kentaro Tamura: Characterisation of a novel nucleoporin and plant specific nuclear proteins. 1<sup>st</sup> International Plant Nuclear Consortium, Oxford, UK, 24-26 Jun, 2013

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/4\\_saibou.html](http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/4_saibou.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村謙太郎 (TAMURA, Kentaro)  
京都大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 40378609

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: