

II-3. COE-助教授

作成者	所属（専攻）・氏名 21世紀COEプログラム 稲葉 丈人 連絡先（内線・メール） 6200 tinaba@iwate-u.ac.jp
研究課題名 （英語名）	低温下における葉緑体機能の恒常性維持機構 Elucidating the mechanisms that maintain chloroplasts' function under low temperature stress
研究分野及びキーワード	研究サブグループ：21世紀COE「熱一生命システム関連学」特別研究分野 研究キーワード：（葉緑体）（低温ストレス）（シロイヌナズナ）
研究協力者 （氏名・所属等）	
<p>研究成果報告</p> <p>目的</p> <p>低温ストレス下では、光合成をはじめとする葉緑体内の様々な代謝活動が著しく低下し、葉緑体タンパク質の凝集や包膜の構造変化・崩壊などが起こると考えられる。このような条件下で植物が生存するには、葉緑体におけるストレスを核へ伝達してストレス応答に必要な遺伝子発現の誘導、あるいは抑制をすることが必要である。また、低温ストレスで特異的に葉緑体に蓄積するタンパク質は、低温下での葉緑体機能低下を防ぐ役割があることが予想される。そこで、当グループでは特に低温下における葉緑体機能の恒常性維持機構を解明し、得られた成果をもとに耐寒性植物の創出を目的とする。</p> <p>研究結果</p> <p>本年度は、低温下で葉緑体の機能低下を防ぐと予想されるタンパク質の選定とそれらのタンパク質複合体精製のための実験系確立を主たる目的として研究を行った。まず、文献調査とコンピューターでの解析により、対象とするタンパク質を Cor15 及び Cor413tm の二種類に絞った。そして、それらの遺伝子を RT-PCR によりクローニングした。次にそれらのタンパク質に対する抗体を作製するため、組み換えタンパク質を大腸菌内で発現させ精製した。現在、これらのタンパク質に対する抗体を作製中である。</p> <p>同時に、Cor15 複合体をアフィニティー精製するための実験系の確立を行った（図 1A）。まず、COR15-Protein A 融合遺伝子を作製した。そしてこの実験系が機能するかどうか調べるために大腸菌内で組み換えタンパク質を発現させて精製し、プロテアーゼによる切断を行った。その結果、IgG-sepharose により Cor15-proteinA を精製し、プロテアーゼによる切断で Cor15 のみを溶出する方法の確立に成功した（図 1B）。この実験で用いたタンパク質は植物で発現させるものと全く同じものであり、実験系は確立できたと確信している。</p> <p>来年度以降に向けての反省点、改善すべき点、そして、対策方法</p> <p>平成 16 年度は稲葉のみで研究を行ってきたが、平成 17 年 4 月より中山克大氏、齋藤久美子氏を研究員として迎え、実際にグループとしての活動を開始した。そこで平成 17 年度は特に両研究員が快適に研究活動を遂行できるよう、研究室の円滑な運営に努めたい。</p> <p>来年度研究計画の概略</p> <p>平成 17 年度は、Cor15 複合体の精製と Cor413tm の機能解析を目標に研究を進める。</p> <p>1. Cor15 タンパク質複合体の精製 COR15 は低温で誘導される遺伝子のひとつとして見つかった。Cor15 タンパク質の過剰発現株が凍</p>	

結耐性を獲得することから、植物の低温耐性獲得において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、そのアミノ酸配列からは既知の機能ドメインとの相同性が見出されず、分子レベルでの機能は未だ不明である。そこで今年度は、Cor15 タンパク質を含む複合体をアフィニティー精製し、その構成因子・機能を明らかにする。抗体を用いたアフィニティー精製だけでなく、タグを付加した Cor15 (Cor15-protein A 融合タンパク質) をシロイヌナズナで発現させ、Cor15 複合体を精製する。複合体が精製できたら各因子を TOF-MS により同定し、詳細に解析する。それらの結果により、Cor15 が具体的に葉緑体内の何(特定のタンパク質、膜構造など)を低温障害から守っているのか分子レベルで明らかにする。

2. Cor413tm タンパク質の機能解析

Cor413tm は 6 回膜貫通ドメインを持ち、葉緑体に輸送されることが予想されるタンパク質である。これまでの研究で、さまざまな植物種において遺伝子が保存されており、なおかつ低温誘導されることが知られている。しかし、タンパク質レベルでの機能・局在場所などは全く分かっていない。そこで、まず、Cor413tm に対する特異抗体を作製する。すでに組み替えタンパク質を大腸菌内で発現させることに成功したので、Cor413tm タンパク質全長に対するよい抗体が出来ると期待している。抗体ができたら、実際に Cor413tm が葉緑体に輸送されるのか、葉緑体内のどこに局在するのか、さらに低温により局在が変化するか調べる。同時に各植物組織における Cor413tm の発現を調べ、葉緑体のみが存在するのか、それともほかのタイプのプラスチドにも存在するのか明らかにする。また、過剰発現株及び発現抑制株を用いて、実際に Cor413tm タンパク質が植物の低温あるいは凍結耐性の獲得に寄与しているか調べる。

本研究拠点形成に関連して受けた研究助成

特になし

その他特記すべき事項

特になし

研究成果

原著論文

Inaba, T., Alvarez-Huerta, M., Li, M., Bauer, J., Ewers, C., Kessler, F. and Schnell, D.J. 2005. atTic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *Plant Cell* **17**:1482-1496.

国際学会発表

Inaba, T., Li, M., Ewers, C., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F. and Schnell, D.J. 2004. An essential role of atTic110 in protein translocation into chloroplasts in Arabidopsis. *Plant Biology* 2004. (Invited talk)

Inaba, T. 2004. An essential role of atTic110 in protein translocation into chloroplasts in Arabidopsis. *New England Arabidopsis Meeting*. (Invited talk)

Inaba, T., Ewers, C. and Schnell, D.J. 2004. Multiple domains of atTic110 are essential for protein import into chloroplasts in Arabidopsis. *68th Annu. Meeting Amer. Soc. Plant Biol. NE Sec.*

Inaba, T., Li, M., Ewers, C. and Schnell, D.J. 2004. Multiple domains of atTic110 are essential for protein import into chloroplasts in Arabidopsis. *Plant Biology* 2004.

国内学会発表

稲葉丈人, Ming Li, Carolin Ewers, Mayte Alvarez-Huerta, Felix Kessler and Danny J. Schnell. 2005. 葉緑体タンパク質透過装置構成因子 Tic110 の機能解析. 日本植物生理学会 2005 年度年会.

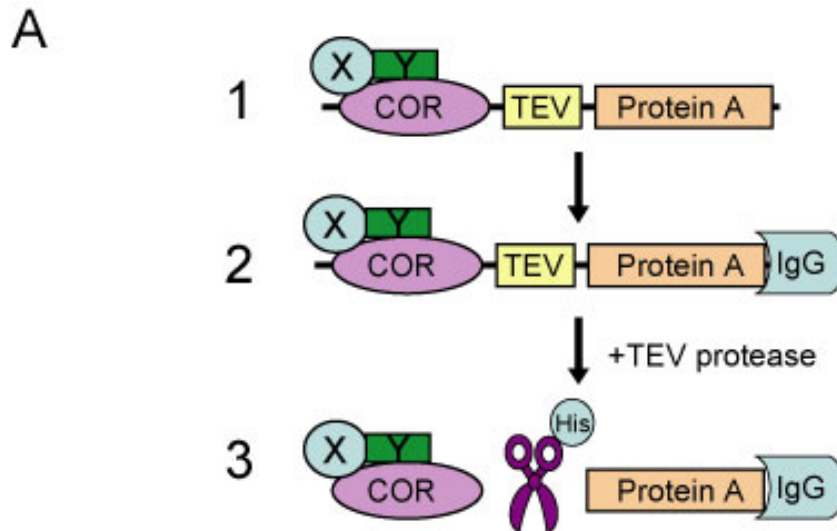


図 1A, Protein A 融合タンパク質を用いた精製の概略

1. COR 遺伝子と TEV プロテアーゼ認識配列、及び Protein A の融合遺伝子を作製し植物に導入する。2. IgG-sepharose を用いて Protein A 融合タンパク質を植物から精製する。3. TEV プロテアーゼによる切断で Cor 複合体のみを溶出する。TEV プロテアーゼにはヒスチンタグが付加されているので、それを使って溶出液中から除去することができる。

B

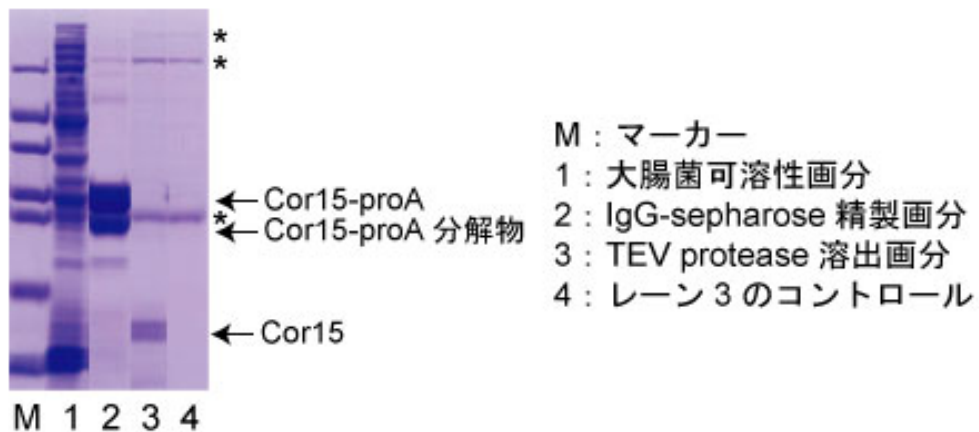


図 1B, Cor15-protein A 融合タンパク質の発現と精製

Cor15-protein A を発現する大腸菌の可溶性画分を用いて、IgG-sepharose で融合タンパク質を精製した (レーン 2)。精製したタンパク質を IgG-sepharose 上で TEV プロテアーゼ処理すると、切断された Cor15 のみが溶出されてくるのが分かる (レーン 3)。* 印は非特異的に溶出されたバンドを示している。