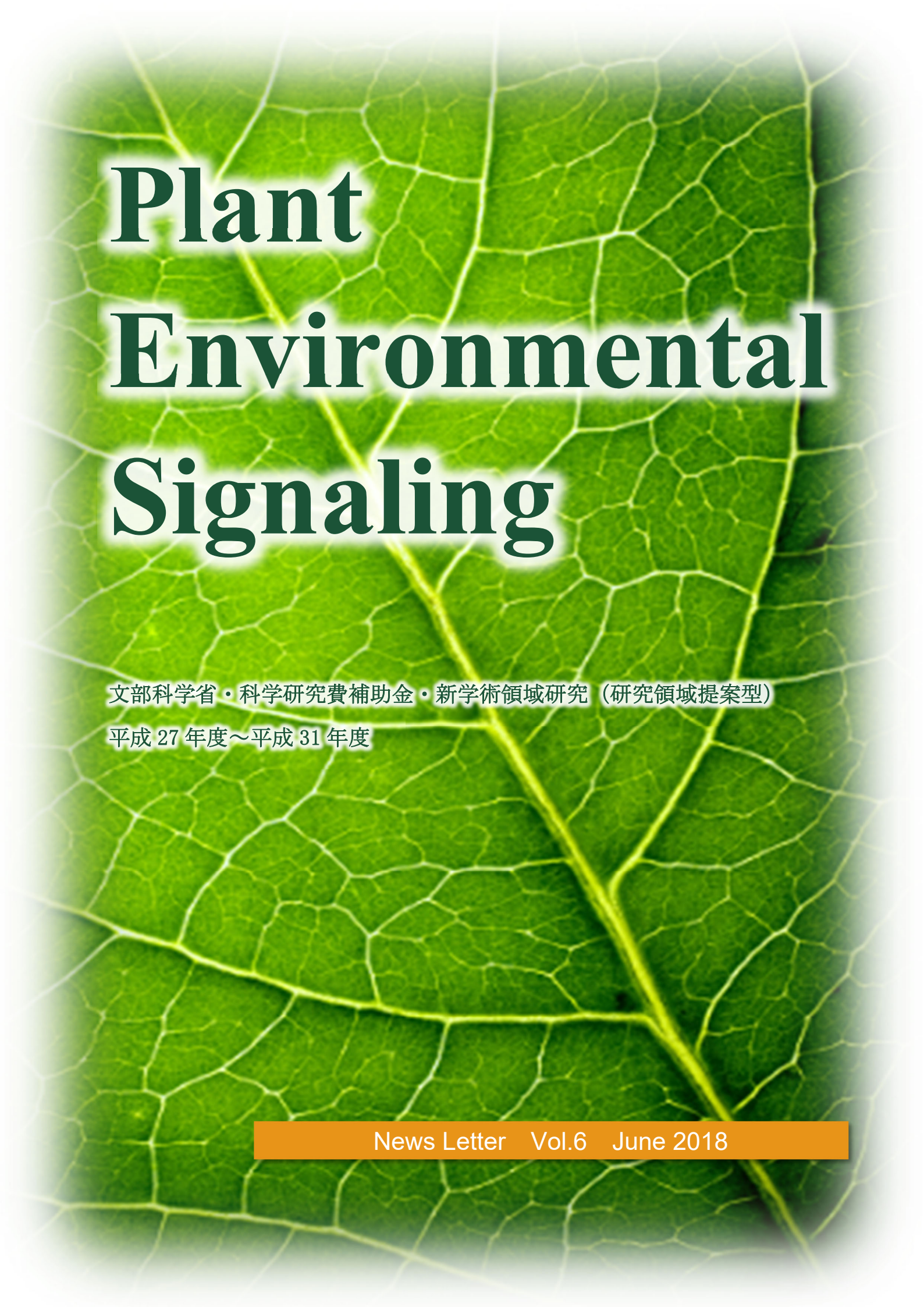




Plant Environmental Signaling

文部科学省・科学研究費補助金・新学術領域研究（研究領域提案型）

平成 27 年度～平成 31 年度

News Letter Vol.6 June 2018

目 次

◆活動報告-----p.3

平成 30 年 3 月 14 日-15 日

第 6 回領域会議（東京大学・本郷キャンパス）

平成 30 年 5 月 8 日

角谷研・松永研合同セミナー（東京理科大学・野田キャンパス）

平成 30 年 5 月 28 日-29 日

第 7 回領域会議（ウェルシーズン浜名湖）

◆若手渡航支援-----p.6

共同実験実施のための海外派遣

平成 30 年 6 月 3 日-9 日 松永班：平川健氏

◆アウトリーチ活動-----p.7

◆質量分析部門の紹介-----p.8

◆新公募班の紹介-----p.13

◆今後のイベント-----p.15

◆編集後記-----p.16

活動報告

平成 30 年 3 月 14 日-15 日

第 6 回領域会議（東京大学・本郷キャンパス）

第 6 回領域会議が東京大学・本郷キャンパス 理学部 2 号館において開催されました。
今回の領域会議開催は、福田班が担当しました。

2 日間にわたり、研究成果について、ディスカッションが行われました。懇親会でも班員や
若手研究者間の研究討議が活発に行われ、盛況な領域会議となりました。



セッションの様子



セッションの様子



集合写真

平成 30 年 5 月 8 日

角谷研・松永研合同セミナー（東京理科大学・野田キャンパス）

角谷班と松永班が、東京理科大学において第 3 回合同セミナーを開催しました。



合同セミナーの集合写真

平成 30 年 5 月 28 日-29 日

第 7 回領域会議（ウェルシーズン浜名湖）

第 7 回領域会議が浜松市のウェルシーズン浜名湖において開催されました。

今回の領域会議開催は、木下班が担当しました。19 班の 2018～2019 年度公募班とともに、2 日間にわたり、研究計画や研究成果についてディスカッションを行いました。

懇親会でも班員や若手研究者間の研究討議が活発に行われ、盛況な領域会議となりました。



セッションの様子



セッションの様子



総括班会議。評価委員：山本正幸先生
(基礎生物学研究所所長)を囲んで



集合写真

若手渡航支援

共同実験実施のための海外派遣

平成 30 年 6 月 3 日－9 日

松永班の平川健が 2018 年 6 月 3 日-9 日に、ドイツの IPK とチェコの IEB を訪問しました。

写真左は EMBO workshop の会場の IPK、中央はフランスの共同研究者ホワイト教授とのディスカッション、右は訪問先のチェコの実験植物学研究所。



アウトリーチ活動

平成 29 年度（12 月 23 日以降）

日付	活動名	場所	活動内容	対象者	活動メンバー
3/22	高校生対象研究室見学会	東京理科大学基礎工学部 生物工学科	熊本県立宇土高等学校の教員・学生を対象とした研究説明・研究室見学	高校生	有村 源一郎
3/25	京都産業大学 オープンキャンパス	京都産業大学	学部や研究内容について高校生に紹介	高校生 一般	木村 成介

平成 30 年度

日付	活動名	場所	活動内容	対象者	活動メンバー
4/14	京都府立洛西高等学校 洛西サイエンス チャレンジ講座	京都府立洛西高等学校	高大連携授業「SDGs ハテナ ソン授業:わたしの学びの未 来を探す」の講師を担当した	高校生	木村 成介
6/10	京都産業大学 オープンキャンパス	京都産業大学	学部や研究内容について高校生に紹介	高校生 一般	木村 成介

質量分析部門の紹介

桑田啓子（名古屋大学 ITbM・特任助教）

質量分析部門では、nanoLC-MS/MS システム（Thermo Fisher Scientific 社、Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer）を用いたペプチド・プロテオミクス解析を中心に、質量分析計を使った研究支援を行っています。主な支援内容および研究班とのこれまでの成果の一部をご紹介しますのでご参考ください。我々は班員の先生方の研究を加速したく日々取り組んでおりますが、研究支援の質・量を向上させるためにも新手法・改善点などアドバイスをいただきたくお願いいたします。

（１）リン酸化プロテオミクス（網羅的解析）

タンパク溶液を溶液消化後、リン酸化ペプチドを濃縮し、測定します。5,000 種類ほどのリン酸化ペプチドのリン酸化部位および検出頻度（peptide counting; PSMs）の情報を提供します。

- *植物体・培養細胞など特に種類は問わないですが、比較定量を目的とする場合 1 測定あたり 100 micro gram のタンパク質を用意してほしいです。精度をあげるためには 200 micro gram ぐらいは送ってほしいのですが、見たいタンパク質が検出できる試料調製を行なっているかどうか判断するまでは少量（無理なく用意できる量）での事前検討が無難です。
- *ペプチドリストが膨大なため、データを受け取った研究者の負担が大きいのが現状です（データ整理してから結果をお渡しします。検討中）。試料調製がうまくいっているかどうかの判断ができるタンパク質がサンプル中に含まれていると解析に時間をかける価値があるかどうかの目安になります。
- *リン酸化プロテオミクスのポイントは、タンパク質精製、リン酸化ペプチド濃縮、リン酸化ペプチド測定に適したメタルフリーな測定系の構築、の3つだと考えています。タンパク質の精製は色々な方法がありますが、中性条件で行えるクロロホルム抽出メタノール沈殿が無難です。この方法は溶液量が9倍になるので薄いタンパク質溶液が大量にある場合は事前に濃縮した方が回収率がよくなります。

これまでの成果

■木下研究班との研究成果

処理区間でのリン酸化ペプチド数（検出頻度）を比較することにより、シロイヌナズナ黄化芽生えにおいて細胞膜 H⁺-ATPase のリン酸化制御に関わる因子の興味深い候補が得られた。なおデータ処理においては、処理区間でリン酸化の割合が増減することが既知であるタンパク質をサンプル調製成否の判断材料として用いた。

（２）インターラクトーム解析

アフィニティー精製されたタンパク質溶液（溶出液）をゲル内消化後測定します。同定されたタンパク質の peptide counting および abundance をサンプル間で比較することにより結合タンパク質を推定します。「網羅的解析（ショットガン）」および「ゲルバンド切り出し」の主に２種類の方法でサンプルを用意してください。

＊「網羅的解析（ショットガン）」の場合は、溶出液を 5~10mm 程度泳動し、丸ごと切り出します。抗体のバンドを切り分けたい場合は、20~30mm 程度泳動し、CBB 染色して抗体のバンドを単独で切り分けると目的のタンパク質が検出しやすくなる場合があります。しかしながら微量サンプルの場合、泳動距離を長くしてもタンパク質同定数の向上につながらない時が多々あるのでまずは 5~10mm 程度泳動での結果を見て分割が必要そうであれば 20~30mm 程度泳動して分割の方が無難です。

＊「ゲルバンド切り出し」の場合は、溶出液を泳動後染色して興味があるバンドを切り出します。分子量情報が得られますので、目的のタンパク質が染色できる程度濃縮できている場合、この手法は有効です。しかしながら、インターラクトーム解析の場合、目的のタンパク質を目視できないことが多々あるので、ウエスタンついでにゲルを染色してみてバンド検出が難しそうであれば「網羅的解析（ショットガン）」を選択した方が無難です。

＊インターラクトーム解析については、目的タンパク質が検出されたとの連絡をもらうことが多いです。うまくいっている系のひとつだと位置付けています。IP の工程で成否が決まるのでこちらでできることは装置の感度を良好に保つことと、正確な前処理を行うことです。IP の条件検討はウエスタンで確認しながら行ってください。溶出に関しては回収率を優先にした方が結果は得やすい傾向があります。つまり、例えば pH を酸性にして溶出するよりも laemmli sample buffer で溶出した方が（抗体も多量に溶出してきますが）組み換えタンパク質は定量的に回収できるのであればそちらを選択した方が良いです。

これまでの成果

■松永研究班との研究成果 1 Fujimoto, *et.al.*, J. Exp. Bot., 2016, 67, 6101-6110.

松永研究室が開発した「生きた植物の核内 DNA を解析できる TALE-FP 法」における TALE タンパク質の標的 DNA 配列をセントロメア、テロメア結合タンパク質を同定することで検証した。

■松永研究班との研究成果 2

DNA 損傷部位に RAD54 がリクルートされる機構を解明するためにインターラクトーム解析をおこなった。その結果、ヒストン脱メチル化酵素が RAD54 と相互作用することが示唆された。変異体解析からヒストン脱メチル化酵素は RAD54 を制御することで相同組み換えに寄与していることが示唆された。

(3) リン酸化など翻訳後修飾部位解析（特定のタンパク質に対して）

翻訳後修飾の比較をアミノ酸レベルで行います。

*protein coverage を 100%にするために、複数の酵素を組み合わせて消化することがあります。したがって、複数レーン泳動し、バンドを切り出して複数のチューブにゲルを用意していただけたほうが、タンパク質中の翻訳後修飾部位を網羅的に検出しやすくなります。

*CBB で染まる程度のタンパク質量があったほうが成功率はたかまる傾向があります。

これまでの成果

■竹澤研究班との研究成果

ARK タンパク質のリン酸化部位解析キナーゼドメインにある特異的なセリン残基のリン酸化が検出された。アラニン置換実験およびイムノブロット解析の結果から、このセリン残基のリン酸化は ABA 応答への ARK 活性化に重要であることが示唆された。

(4) タンパク質バンドの同定

SDS-PAGE のバンドに含まれるタンパク質をゲル内消化後測定します。

*発現させたタンパク質を SDS-PAGE で分析したときに予想外の移動度だった場合、アミノ酸配列を確認したくなりますね。そのような時気軽にゲルバンドを切り出して送ってください。CBB で明らかに濃く染まるバンドであれば同定できることがほとんどですが、ゲルバンドが薄い場合、対象試料由来のバンドも一緒に送っていただけるとバックグラウンド由来のタンパク質を差し引くことができるので解釈しやすいです。

これまでの成果

■三浦研究班との研究成果

大腸菌で発現させたタンパク質のアミノ酸配列を確認するために測定を行った。目的とするアミノ酸配列を protein coverage 100%で検出できた。

(5) プロテオミクス以外の測定

タンパク質・ペプチド・糖・代謝物などの精密質量測定および定量

*質量分析部門が保有する装置でイオン化する物質であれば測定対象ですのでお気軽にご相談ください。

これまでの成果

■木下研究班との研究成果 Plant Physiology. 2016, 171, 580-589.

光合成が細胞膜プロトン ATPase を活性化する際に糖蓄積を経由することを、グルコース、フルクトース、スクロース、グルコース-1-リン酸、グルコース-6-リン酸を LC-MS で定量した。

■松林研究班との研究成果

植物病原菌と植物細胞の共培養サンプルを、 α -クロロフェノール抽出後に QE で測定することで、病原菌由来のエリシターペプチドとその阻害ペプチドを検出した。植物と病原菌との間における攻防の一端が明らかとなった。

【 研究支援の手順 】

研究代表者から担当者まで共同研究の申し込みをしていただき（メール可）、事前打ち合わせ後、サンプルを送付（ヤマト運輸の冷凍または冷蔵便、午前中着指定）してください。

新公募班の紹介

新しく以下の5つの公募班が本新学術領域に加わりました。

遠藤班 維管束を利用した時間情報共有メカニズムの解明

研究代表者 遠藤 求 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・教授



遠藤 求

植物の概日時計はさまざまな局所的に受容した様々な環境情報を何らかの形で全身へと伝えることで、協調した概日リズムを可能にしている。しかし、どのようにして長距離の時間情報伝達を可能にしているかについてはほとんど明らかにされていない。本研究では地上部と根の間でのフィードバックループの存在を明らかにすることを目指す。特に、環境変動が比較的穏やかな根において時間情報が記憶され、それを栄養という形で根から地上部へ伝えている可能性を検証し、その分子メカニズムを明らかにする。

清水班 季節性のない熱帯雨林での時系列トランスクリプトームによる環境認識・記憶の解析

研究代表者 清水 健太郎 横浜市立大学 木原生物学研究所・客員教授

連携研究者 工藤 洋 京都大学生態学研究センター・教授

連携研究者 爲重才覚 横浜市立大学 木原生物学研究所・特任助教



清水 健太郎

植物の遺伝子ネットワークは、野外の複雑な変動環境に適応したものであるため、従来のような実験室の制御環境の実験だけでは、植物が実際にどのような環境刺激を認識し記憶しているかを解明しきれないことが指摘されてきた。我々は、野外変動環境 in natura でゲノムワイドな遺伝子発現と気象データを解析する手法を開発してきた。本研究ではとくに、季節性の薄い熱帯雨林での環境応答の解明を目指す。

高野班 病原糸状菌の局所的侵入に対し自律応答する植物生体防御システム

研究代表者 高野 義孝 京都大学大学院農学研究科・教授



高野 義孝

高等植物は、自身に適応していない植物病原糸状菌に対し非常に頑強な抵抗性を示す。本抵抗性システムは、不適応型菌の局所的侵入を阻止する抵抗性と、万が一侵入された場合に活性化し菌の進展を防ぐ抵抗性、から成る多層構造を有している。後者の抵抗性は「侵入後抵抗性」と呼ばれ、植物における切り札的な生体防御機構として捉えることができるが、侵入後抵抗性の分子的背景は不明な点が多い。本研究では、糸状菌の局所的侵入に対して新たに活性化される、この自律的・局所的植物免疫系の分子基盤の解明を目指す。

玉田班 植物の自律分散型記憶を統御するクロマチンステートの解明

研究代表者 玉田 洋介 基礎生物学研究所 生物進化研究部門・助教

連携研究者 長谷部 光泰 基礎生物学研究所 生物進化研究部門・教授



玉田 洋介

細胞記憶の統御に必須の役割を果たしているのがクロマチンステートである。細胞記憶に対するクロマチン修飾の機能は明らかにされつつあるが、クロマチンステートはクロマチン修飾に加えてヒストンバリエーションやクロマチン構造によっても構成されており、これらがどのように相互作用しながら植物の自立分散型記憶を統御しているのかについてはほとんどわかっていない。本研究では、主にヒストンバリエーション H3.3 に着目しつつ、クロマチンステートがどのように細胞記憶を統御しているのかを解明することを目的とする。

研究代表者 豊田 正嗣 埼玉大学大学院理工学研究科・准教授



豊田 正嗣

植物は、葉や根を傷つけられた時、傷害を受けた器官のみならず、遠く離れた健康な器官でも抵抗性を上げることができる。このような全身獲得抵抗性反応は古くから知られているが、どのようにして植物は傷つけられたことを感知し、この情報を高速伝搬させ、全身の抵抗性をあげるのかは、明らかになっていない。本研究は、植物全体を高速イメージングできる顕微鏡技術に、グルタミン酸バイオセンサー・イメージングスプリッティング光学系・電気生理学的手法を組み合わせることで、グルタミン酸/イオンチャネル型グルタミン酸受容体/カルシウムシグナルを介した全身獲得抵抗性の分子メカニズムを解き明かす。

今後のイベント

平成 30 年 9 月 27 日-29 日

第 4 回若手の会（中京大学青木湖セミナーハウス レイクビュー白馬）

平成 30 年 9 月 16 日

日本植物学会 第 82 回大会・共催シンポジウム（広島国際会議場）

編集後記

新学術領域「植物の成長可塑性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム」は後半の研究期間に入りました。新しい公募班の方々も加わりました。益々活発な共同研究やアウトリーチ活動が展開されております。引き続き、本領域ニュースレター「Plant Environmental Signaling」では、本領域の広報活動の中核となるべく、研究メンバーの活動をお伝えして参ります。領域ホームページ（検索キーワード：環境記憶）も併せてご覧ください。今後どうぞよろしくお願い致します。

平成 30 年 6 月 20 日 Plant Environmental Signaling 編集部

Plant Environmental Signaling

文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究

「植物の成長可逆性を支える環境認識と記憶の自律分散型統御システム」

編集人：松永幸大

発行人：木下俊則

発行日：平成 30 年 6 月 20 日

Copyright 2018 無断転載禁止

