

平成23年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 新学術領域研究 4. 研究期間 平成23年度～平成24年度
5. 課題番号

2	3	1	1	9	5	1	2
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 ミネラル欠乏ストレス時に根で機能する輸送体の包括的解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
8 0 4 3 2 5 9 0	フカオ 深尾	ヨウイチロウ 陽一朗	バイオサイエンス研究科 特任准教授

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

植物は栄養飢餓に曝されると必要なミネラルを土壌から吸収して体内に分配する。本研究では、植物がミネラル欠乏に陥ったときに、根が土壌からミネラルを取り込み導管へ排出するまでの過程で機能する輸送体タンパク質情報を細胞層ごと（表皮、皮層、内皮、内鞘、中心柱）に取得し、その機能を理解する。さらに個々の輸送体機能を解析した結果を統合し、複数の輸送体がどのように協調して環境変化に適応するのかを明らかにする。

本年度は主に本研究を推進するための技術的な基盤整備を行った。

- ・シロイヌナズナ根からのプロトプラスト調製と FACS による回収の最適化
過去に報告されている手法を基に、セルラーゼ濃度やプロトプラストのソート液の組成を再検討し、回収時のプロトプラストに対するダメージを軽減する方法に改善した。プロトプラストが破壊されることなく、GFP 蛍光を発するプロトプラストのみを純度高く回収できる手法を確立した。
- ・微量タンパク質同定のためのサンプル調製法と分析法の検討
特に輸送体などの膜タンパク質をより多く同定するために重要となる、「タンパク質サンプルの調製法」とトリプシン消化後の「ペプチドの分離法」について詳細に検討し、ペプチドを溶液中で等電点電気泳動により分画する OFFGEL 法が有効であることを確認した。本法では、プロトプラストから 6M Urea 溶液でタンパク質を抽出し、希釈後トリプシン消化する。得られたペプチドを OFFGEL 法により 24 分画し、各画分を C18 レジンにより脱塩・精製した後、質量分析する。24 の分析結果を統合してデータベースサーチを行い、合計で 10μg 相当のペプチドサンプルを用いて、1562 個のタンパク質を同定することに成功した。膜貫通領域予測サイト SOSUI でこれらを検索したところ、24%に相当する 380 個が 1 回以上膜貫通領域を持つことが明らかとなった。また C18 による精製法を変えることで、回収されるタンパク質の数や種類が異なることも確認している。

10. キーワード

- | | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------|
| (1) ミネラル欠乏 | (2) シロイヌナズナ | (3) プロトプラスト | (4) 根 |
| (5) プロテオミクス | (6) FACS | (7) 輸送体 | (8) |

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ③やや遅れている。
(理由) 当初の計画通り、本年度中にシロイヌナズナの根からプロトプラストを調製し、FACSにより回収するための実験系およびプロテオミクスのためのタンパク質調製法と同定手法に関して確立することができたが、通常の生育条件とミネラル（亜鉛、カルシウム、マグネシウムなど）欠乏条件で増減するタンパク質の同定には至らなかったため、やや遅れていると判断している。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

やや研究計画に遅れが生じているものの、当初の計画通り研究を推進することで目的を達成できると考えている。期間内に研究を完了させるために、FACSで回収した表皮細胞を用いてミネラル欠乏ストレスに応答する輸送体の同定を優先的に行い、それら輸送体の局在解析のためのGFP形質転換体作成にできるだけ早い段階で取りかかる。形質転換体が作成できたものから顕微鏡観察および免疫沈降実験を行う。また平行してカエル卵母細胞を用いた輸送体の活性測定のための準備を行い、遂行する。ただし研究代表者の先行研究から、輸送活性の条件検討に時間が要する可能性が考えられるため、SALK研究所から取得した変異体も機能解析に用いる。さらに各細胞層に局在するタンパク質の定性的な解析を行い、根における細胞層ごとのプロテオームマップを作成する。

13. 研究発表（平成23年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

【雑誌論文】 計（ 0 ）件 うち査読付論文 計（ 0 ）件

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
掲載論文の DOI（デジタルオブジェクト識別子）					

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
掲載論文の DOI（デジタルオブジェクト識別子）					

著者名	論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁
掲載論文の DOI（デジタルオブジェクト識別子）					

【学会発表】計（ 0 ）件 うち招待講演 計（ 0 ）件

発表者名	発表標題	
学会等名	発表年月日	発表場所

【図書】計（ 0 ）件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

【取得】計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--