

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04392

研究課題名(和文)カルシウムを介する新しいジベレリン信号伝達経路の解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel gibberellin signaling pathway through calcium

研究代表者

高橋 陽介 (Takahashi, Yohsuke)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：90183855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：DELLAタンパク質はジベレリン(GA)信号伝達において中心的な役割を果たす成長抑制因子である。GAはDELLAの分解を介して植物の成長を促進している。GAが細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる事が報告されていたが、GAによるCa<sup>2+</sup>濃度の上昇とDELLAとの関連は明らかにされていなかった。本研究ではCa<sup>2+</sup>センサータンパク質と全てのDELLAを欠損したシロイヌナズナ変異体などを用いて、GAによるCa<sup>2+</sup>濃度の上昇とDELLAの分解は独立している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジベレリン(GA)は植物の成長に顕著な促進作用を示すホルモンである。GAがいかんして植物の成長を制御しているのかを解明するためにGAの細胞内信号伝達に関する研究を行った。GA信号伝達において中心的な役割を果たしていると考えられているのが、DELLAタンパク質である。GAにより細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が速やかに誘導され、この誘導にはDELLAは関与しない事を明らかにした。本研究で見いだされたDELLAを介さないGA特異的なCa<sup>2+</sup>濃度の上昇は未知のGA信号伝達経路の存在を示唆している。

研究成果の概要(英文)：DELLA proteins play a central role in gibberellin (GA) signaling. GA triggers DELLA degradation via the ubiquitin-proteasome pathway, thereby promoting plant growth. An increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> was observed previously after several hours of GA application. Recent studies also suggest the existence of a DELLA-independent GA response. However, the effect of DELLA on the GA-induced increase in Ca<sup>2+</sup> remains unknown. This study reexamined the effects of GAs on Ca<sup>2+</sup> using the Ca<sup>2+</sup> sensor protein in Arabidopsis. Ca<sup>2+</sup> increased within a few minutes of GA treatment, even in transgenic plants expressing a mutated degradation-resistant version of DELLA and in della pentuple mutant plants. In addition, it was also revealed that Ca<sup>2+</sup> is not involved in DELLA degradation. These results suggest that the GA-induced increase in Ca<sup>2+</sup> occurs via a DELLA-independent pathway, providing important information on the GA signaling network.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物ホルモン 信号伝達 転写制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ジベレリン (GA) は植物の成長に顕著な促進作用を示す植物ホルモンである。GA と GA 受容体が結合すると、GA 信号伝達の抑制因子 DELLA タンパク質と E3 の結合が促進され、DELLA タンパク質がユビキチン - 26S プロテアソーム系により分解される。その結果、DELLA タンパク質により抑制されていた転写因子 PIF などが機能し、GA 依存的な転写が開始される。このメカニズムにより GA 信号伝達は全て説明出来るかと思われた。しかし、このモデルには過去に蓄積されてきた生理学的な知見と合致しない点も認められる。例えば植物生理学の教科書には GA 信号伝達において細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇や、プロテインキナーゼが関与することが記述されている。ところが GA による DELLA の分解を中心とした GA 信号伝達モデルには  $Ca^{2+}$  シグナリングもタンパク質のリン酸化も関与していないとされていた。DELLA の標的である PIF は胚軸伸長において GA と光の信号伝達のノードの役割を果たしている。しかし PIF の七重変異体の個体サイズは野生型と同等であり GA 欠損変異体のような矮性を示さない。さらに PIF の過剰発現体の個体サイズも野生型と大差はなく、GA を投与されたような徒長形質は示さない。PIF が転写活性化因子であるのに対し GA による遺伝子発現の変化は主に抑制的であることがゲノムワイドの解析から明らかにされた。したがって GA レベルが低い時には転写を促進し、GA レベルが高い時には転写を抑制する未知の DELLA タンパク質の標的転写因子の存在が予想されていた。

## 2. 研究の目的

我々は、 $Ca^{2+}$  阻害剤が GA 応答の一部を遮断することを明らかにした。また  $Ca^{2+}$  センサーを用いた実験から GA による DELLA タンパク質の分解に先行して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することを見出した。これらの結果は DELLA の分解をスイッチとする GA 信号伝達経路とは独立な未知の GA 信号伝達経路の存在を示唆する。また我々は、これまで実体が不明であった GA レベルが低い時に転写を促進する転写因子 GAF1 を同定した。GAF1 は GA レベルが低い時には DELLA と複合体を形成して転写を促進し、GA レベルが高い時には転写を抑制することで植物の成長を制御すると考えられた。本研究では上記の成果を発展させ、DELLA タンパク質の分解に先行して起こる  $Ca^{2+}$  依存的な GA 信号伝達系の解明を目的とし、以下の研究を行う。

$Ca^{2+}$  依存的な GA 信号伝達系を解析する。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が DELLA 依存的なのか或いは独立なのかを明らかにする。

転写因子 RSG の機能を制御する NtCDPK1 は  $Ca^{2+}$  により活性化されると自己リン酸化される。この自己リン酸化は GA 依存的な  $Ca^{2+}$  シグナリングの初発反応と考えられる。自己リン酸化部位を同定し GA 信号伝達における NtCDPK1 自己リン酸化の生理的意義を調べる。

DELLA 非依存的な経路を介して GA により発現が制御される遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

$Ca^{2+}$  依存的な GA 信号伝達系の解析

シロイヌナズナの全ての DELLA を欠損する五重変異体 *dellaP* に  $Ca^{2+}$  センサータンパク質遺伝子を導入し、GA 依存的な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化を測定する。 $Ca^{2+}$  濃度の上昇が DELLA の分解に関与する可能性を調べるため、 $Ca^{2+}$  チャネル阻害剤が GA による DELLA の分解へ与える影響を調べる。

NtCDPK1 の自己リン酸化の解析

NtCDPK1 は  $Ca^{2+}$  のセンサーでもあるので、GA による  $Ca^{2+}$  濃度上昇により直接活性化される。質量分析により NtCDPK1 の自己リン酸化部位を同定する。そのアミノ酸に変異を導入し、NtCDPK1 の機能への影響を調べる。

DELLA 非依存的な GA 信号伝達経路で制御される遺伝子の探索

全ての DELLA を欠損する五重変異体 *dellaP* において GA 投与により発現が変化する遺伝子を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により探索する。

## 4. 研究成果

全ての DELLA を欠損するシロイヌナズナ五重変異体 *dellaP* と非分解型 DELLA である RGA 17 を発現する形質転換体に  $Ca^{2+}$  センサータンパク質遺伝子を導入し、GA 依存的な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化を測定した。その結果、活性型 GA である  $GA_3$  の投与により  $Ca^{2+}$  濃度が上昇したが、非活性型 GA の  $GA_{9-Me}$  では  $Ca^{2+}$  濃度の変化は認められなかった (図 1)。したがって GA による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇は DELLA に依存しないことが明らかになった。次に DELLA の分解に  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が必要であるのかを調べた。DELLA の一つ RGA と蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質を発現する形質転換体を用いて解析を行った。 $Ca^{2+}$  チャネル阻害剤

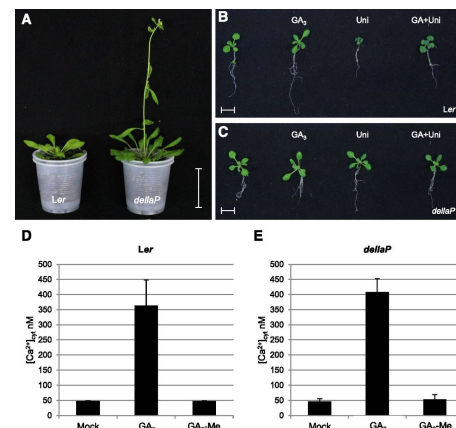


図 1. *dellaP* 変異体における活性型 GA 特異的な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇。

の  $\text{Co}^{2+}$  と  $\text{La}^{3+}$  により  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を抑制した状態で GA を投与し、RGA-GFP が分解されるか調べた。その結果、 $\text{Co}^{2+}$  と  $\text{La}^{3+}$  の有無にかかわらず RGA-GFP の分解は GA 添加後 30 分後に観察された。したがって活性型 GA による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇と DELLA の分解は独立であることが明らかになった (図 2)。

カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 は転写因子 RSG をリン酸化することで、RSG の機能を制御している。in vitro の解析から NtCDPK1 がカルシウムにより自己リン酸化されることが明らかになった。キナーゼの活性化では触媒領域内アクティベーションループの自己リン酸化が引き金となることが多い。ところが CDPK のアクティベーションループ内の該当アミノ酸は進化の過程で Glu または Asp に置換されていることから CDPK のアクティベーションループは既に活性化状態にあり、自己リン酸化部位は別に存在すると考えられた。質量分析による解析の結果、NtCDPK1 の自己リン酸化部位は N 末の変領域内に存在することが明らかになった。N 末の変領域は基質認識に参与する事が知られている。NtCDPK1 の自己リン酸化部位にアミノ酸置換を導入した変異型 NtCDPK1 を作製して解析を行った結果、NtCDPK1 の自己リン酸化は基質認識に影響を与えることが明らかになった (図 3)。

GA は DELLA を介さず細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることが明らかになった。これは DELLA 非依存的な GA 信号伝達経路が存在する事を示している。細胞内信号伝達は遺伝子発現の変化を引き起こす。DELLA 非依存的な GA 信号伝達経路で制御される遺伝子を同定するために全ての DELLA を欠損する五重変異体 *dellaP* において GA 投与により発現が変化する遺伝子を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により探索した。その結果、*dellaP* 変異体においても GA に応答する候補遺伝子群が得られた。それらの遺伝子群の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害剤を用いて調べたところ、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性のものと  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性のものが存在する事が明らかになった。今後はこれらの遺伝子の機能を変異体を用いて解析すると同時に DELLA に依存しない GA による転写調節の分子機構を明らかにしてゆきたい。

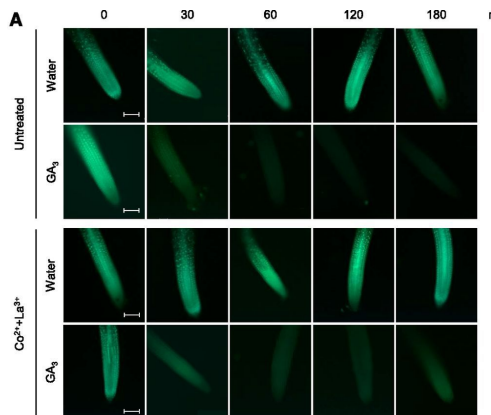


図 2. RGA-GFP は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を抑制しても GA 依存的に分解される。

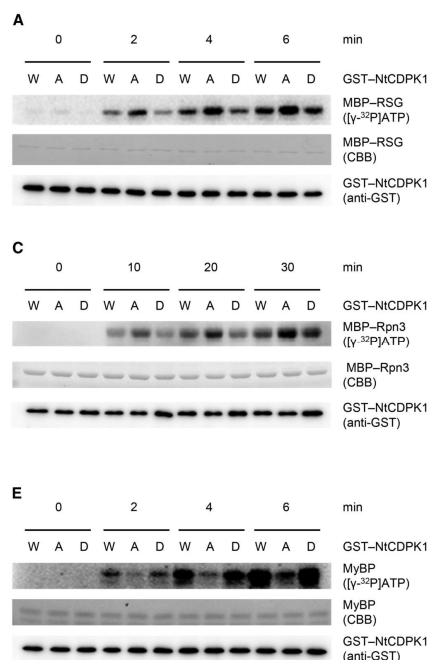


図 3. NtCDPK1 の自己リン酸化部位への変異導入により基質選択性が変化する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2018) New gibberellin signaling pathway via  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Atlas of Science* <http://atlasofscience.org/new-gibberellin-signaling-pathway-via-ca2-signaling/> 査読有
- Ito, T., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2018) Autophosphorylation of Ser-6 via an intermolecular mechanism is important for the rapid reduction of NtCDPK1 kinase activity for substrate RSG. *PLOS ONE* **13**, e0196357. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196357>. 査読有
- Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2018) DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling. *Plant Signal Behav.* **13**, e1445933. DOI: [10.1080/15592324.2018.1445933](https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1445933). 査読有
- Okada, K., Ito, T., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2017) Gibberellin induces an increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  via a DELLA-independent signaling pathway. *Plant Physiol.* **175**, 1536-1542. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01433> 査読有
- Fukazawa, J., Mori, M., Watanabe, S., Miyamoto, C., Ito, T. and Takahashi, Y. (2017) DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA 20-oxidase 2. *Plant Physiol.* **175**, 1395-1406. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.00282> 査読有
- Ito, T., Ishida, S., Oe, S., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2017) Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase1. *Plant Physiol.* **174**,

2457-2468. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.00515> 査読有

7. Fukazawa, J. Ito, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2015) Binding of GID1 to DELLAs promotes dissociation of GAF1 from DELLA in GA dependent manner. *Plant Signal Behav.* **10**, e1052923. DOI:10.1080/15592324.2015.1052923 査読有
8. Ito, T. and Takahashi, Y. (2015) Phosphatase protection assay: 14-3-3 binding protects the phosphate group of RSG from  $\lambda$  protein phosphatase. *Bio-Protocol.* **5**, e1395. [bio-protocol.org/e1395](http://bio-protocol.org/e1395). 査読有

[学会発表](計 25 件)

1. 深澤壽太郎, 大橋由紀, 中居可奈子, 高橋竜平, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリンによる花成制御機構の解析 日本植物生理学会 第 60 回年会 名古屋大学 2019.3.14.
2. 伊藤岳, 勝部隆義, 深澤壽太郎, 高橋陽介 GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン生合成酵素遺伝子の転写制御 日本植物生理学会 (名古屋) 2019.3.13.
3. 深澤壽太郎, 大橋由紀, 中居可奈子, 高橋竜平, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリンによる花成制御機構の解析 植物化学調節学会 第 53 回大会 北海道大学 札幌 2018.11.4.
4. 伊藤岳, 石田さらみ, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に關与するカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自己リン酸化による機能制御の解析 日本植物学会 第 82 回大会 広島国際会議場 広島 2018.9.15.
5. 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自己リン酸化による機能制御 第 75 回中国四国植物学会 山口大学 2018.5.13.
6. 大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御 第 75 回中国四国植物学会 山口大学 2018.5.13. 優秀発表賞
7. 中林誠太郎, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 DELLA 複合体による ABA 受容体遺伝子の発現制御 第 75 回中国四国植物学会 山口大学 2018.5.12. 優秀発表賞
8. 岡田佳那子, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA 非依存的な細胞質カルシウムイオンの上昇経路 日本植物生理学会 第 59 回年会 北海道大学 2018.3.30.
9. Fukazawa J, Mori M, Ito T, Takahashi Y. DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of *GA20ox2* in Arabidopsis. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Academia Sinica, Taipei, Taiwan 2017.11.4.
10. Ito, T., Ishida, S., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase NtCDPK1. Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, 2017.11.5. poster prize
11. 深澤壽太郎, 藤井麻弥, 西航一郎, 森亮太, 高橋陽介 ジベレリンとジャスモン酸によるクロストーク制御機構の解析 植物化学調節学会 第 52 回大会 鹿児島大学 2017.10.29.
12. Fukazawa J, Ito T, Takahashi Y. DELLA-GAF1 complex regulates gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. 5th International symposium Plant Signaling and Behavior 2017, Matsue, Shimane prefecture, Japan 2017.7.1. invited talk
13. Ito, T., Ishida, S., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase NtCDPK1. Plant Biology 2017, Honolulu, Hawaii, 2017.7.24.
14. 中村駿志, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ホメオドメインタンパク質によるジベレリン生合成遺伝子の転写制御機構の解析 第 74 回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13.
15. 大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御 第 74 回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13. 優秀発表賞
16. 森 亮太, 藤井麻耶, 伊藤 岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 DELLA を介したジベレリンとジャスモン酸のクロトーク制御 第 74 回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13.
17. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン生合成酵素遺伝転写制御 第 74 回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.14. 優秀発表賞
18. 深澤壽太郎, 大橋由紀, 森亮太, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体による新たな標的遺伝子の制御 日本植物生理学会 第 58 回年会 鹿児島大学 2017.3.17.
19. Fukazawa, J., Ito, T., Takahashi, Y. DELLA-GAF1/IDD2 complex regulates gibberellin homeostasis and signaling. 22nd International Plant Growth Substances Association Conference, Toronto, Canada, 2016.6.22.
20. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 GAF1 複合体による GA 生合成酵素遺伝子の転写抑制機構の解析 第 73 回中国四国植物学会 米子コンベンションセンター 2016.5.14. 優秀発表賞
21. 伊東裕太, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリンとオーキシンによる茎部の伸長制御機構の解析 第 73 回中国四国植物学会 米子コンベンションセンター 2016.5.14. 優秀発表賞
22. 深澤壽太郎, 高橋竜平, 藤井麻弥, 高橋陽介 DELLA-GAF1 複合体によるジベレリン信号伝達の制御機構 第 73 回 中国四国植物学会 米子コンベンションセンター 2016.5.15.
23. 伊藤岳, 石田さらみ, 高橋陽介 カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の自

- 己リン酸化による機能制御の解析 第 57 回日本植物生理学会 (岩手大学) 2016.3.19.
24. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 EPR1 の新規転写抑制モチーフの機能解析 第 38 回日本分子生物学会 (神戸ポートアイランド) 2015.12.3.
  25. 深澤壽太郎, 高橋竜平, 藤井麻弥, 三島由佳, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体の標的遺伝子の探索 植物化学調節学会 第 50 回大会 東京大学 2015.10.25.

〔図書〕(計 1 件)

桜井英博, 柴岡弘郎, 高橋陽介, 小関良宏, 藤田知道 (2017) 植物生理学概論改訂版 培風館, 東京 総ページ数: 246

〔その他〕

ホームページ: <https://home.hiroshima-u.ac.jp/ppclab/takahashi.html>