

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18570

研究課題名(和文)植物プロテインチロシンキナーゼによる新規ジベレリンシグナル伝達制御機構の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the role of plant tyrosine protien kinase for gibberellin signalling.

研究代表者

根本 圭一郎(Nemoto, Keiichiro)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：60566727

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)：近年、植物におけるタンパク質のチロシン(Tyr)リン酸化の生物学的役割に注目が集まっている。しかしながら、植物プロテインチロシンキナーゼの存在や、Tyrリン酸化の生物学的な意義は不明であった。研究代表者らは、植物ホルモン・ジベレリン(GA)受容体の量がユビキチンリガーゼGARUによって負に制御され、一方、GARUはTAGK2依存的なTyrリン酸化によって不活性化されることでGID1が安定化することを見出した。本研究結果から、TAGK2依存的なTyrリン酸化とGARU依存的なユビキチン化によってGID1タンパク質を介したGA応答が厳密に調整されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Several recent studies suggest that plants have a Tyr-phosphorylation signal pathway, although, the role of Tyr-phosphorylation in biochemical and physiological processes is poorly understood. Here, we demonstrate that GARU (GA receptor RING E3 ubiquitin ligase) mediates ubiquitin-dependent degradation of phytohormone gibberellin receptor GID1, and that the plant tyrosine-protein kinase TAGK2 inhibits GARU-GID1A interactions by phosphorylation of GARU at Tyr residue. We propose that GA response is negatively regulated by GARU-dependent GID1 ubiquitination and positively by Tyr phosphorylation of GARU by TAGK2.

研究分野：生化学

キーワード：リン酸化 ユビキチン化 ジベレリン シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ゲニステイン(GNS)は主にダイズなどのマメ科植物が生産するイソフラボンの一種であるが、広範な動物プロテインチロシンキナーゼ(Tyr-PK)の活性を阻害する機能を有することが明らかになっている。興味深いことに、タバコやオオムギなどにGNSを処理すると、生育・分化などの制御に関わる植物ホルモン・ジベレリン(GA)シグナルが顕著に抑制されることが明らかになっており、これらの結果から、植物にはGNS高感受性の植物Tyr-PKが存在し、Tyr-PKによってGAシグナルが制御されている可能性が示唆されている。しかしながら、現在までに、植物から動物Tyr-PKと相同性の高い遺伝子は見出されていないために、GNSの標的となりうるTyr-PKの存在やTyrリン酸化の生物学的意義については明らかにされていない。

研究代表者らはこれまでに、植物内において特定の基質分子のTyrリン酸化を触媒するCDPK-related PK (CRK)ファミリーを同定している。さらに、CRKファミリーはGNSによって顕著に活性が阻害されることを見出しており、我々はCRKをTAGK(target of genistein protein kinase)と命名した。分子遺伝学的なアプローチによって、TAGKファミリーのうちのTAGK2はGAシグナルの正の調節因子として機能する可能性を見出している。さらに、GA受容体GID1と相互作用する新規同定因子RING型ユビキチンE3リガーゼGARU(GA receptor RING E3 ubiquitin ligase)はTAGK2によってTyrリン酸化されること、リン酸化状態のGARUはGID1と相互作用できないことなどを明らかにしている。以上の結果から、TAGK2-GARU-GID1間のネットワークがGAシグナルの調節機構として機能している可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究では、GARU依存的なGA受容体のユビキチン化と分解の可能性と、TAGK2依存的なGARUのTyrリン酸化の機能を解析することにより、新たなGAシグナル伝達制御機構の発見と、Tyrリン酸化の生物学的な意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GARU依存的なGID1ユビキチン化の生物学的意義の解析

受容体GID1と相互作用する新規因子GARUがユビキチン化依存的なGID1の分解誘導に関与することを明らかにするために、コムギ無細胞系を用いた*in vitro*ユビキチン化アッセイおよび、植物細胞による一過的発現系を用いた*in cell*ユビキチン化アッセイによって解析した。さらに、*garu*遺伝子欠損体におけるGID1安定性、GA応答性を解析した。GA応答は、主に受容体がGAシグナル抑制因子DELLAとGA依存的に結合し、分解誘導することによって開始されると考えられている。そ

こで、GA依存的なDELLAタンパク質の分解速度の解析や、GA依存的な胚軸伸長率について評価した。

(2) GARUのTyrリン酸化の生物学的意義の解析

TAGK2依存的なGARUのTyrリン酸化は、GARU-GID1間の相互作用を抑制することが明らかになっている。そこで、TAGK2によってTyrリン酸化されたGARUがGID1をユビキチン化できるかどうかを上記(1)と同様に*in vitro*および*in cell*アッセイ系を用いて解析した。さらに、TAGK2高発現体および*tagk2*遺伝子欠損体におけるGID1安定性、GA応答性を評価し、TAGK2依存的なGARUのTyrリン酸化の機能を解析した。

4. 研究成果

(1) GARU依存的なGID1ユビキチン化の生物学的意義の解析

シロイヌナズナのゲノム上にはGA受容体が3種(GID1A, GID1B, GID1C)存在するが、*in vitro*ユビキチン化解析の結果、GARUは3種すべての受容体をユビキチン化することが明らかになった。また、一過的発現解析においても、GID1はGARU活性依存的にユビキチン化されることが確認された。さらに、GID1とGARUを共発現させるとGID1の発現量が顕著に低下すること、プロテアソーム阻害剤MG132によってGID1タンパク質量が回復することなどから、GARU依存的なGID1のユビキチン化は26Sプロテアソーム系による分解誘導に関与することが明らかになった(図1)。GARUによるGID1のユビキチン化部位を同定するために、GID1タンパク質上に存在する17ヶ所のリジン残基を個々にアルギニンに変換した変異体GID1を作成し、*in vitro*ユビキチン化解析を実施した。1~4重リジン残基変異体GID1はいずれもGARU依存的にユビキチン化されたが、リジン残基をすべてアルギニンに変換した変異体GID1はユビキチン化されなかったことから、GARUによるユビキチン化はGID1タンパク質上の複数ヶ所のリジン残基で起こることが明らかになった。現在までに、ユビキチン化部位の同定に至っていないが、GARUがGID1-DELLA複合体をユビキチン化できないことを見出していることから、GARUによるユビキチン化はGID1とDELLAの接合面のリジン残基で起こる可能性が高い。

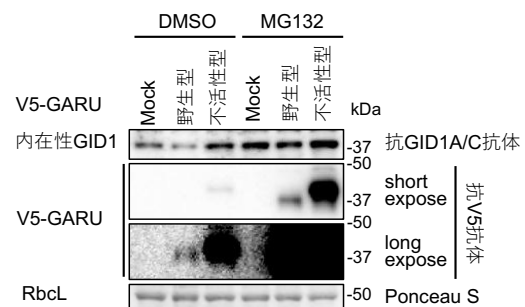


図1 GARU活性依存的なGID1分解

garu 遺伝子欠損体における GID1 の安定性をタンパク質翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いて解析した結果、*garu* 遺伝子欠損体において GID1 タンパク質の安定性が向上していることが明らかになった。さらに、*garu* 遺伝子欠損体は野生型と比較して、GA 誘導性の DELLA 分解速度の促進、胚軸伸長率の向上が認められた(図 2)。これらの結果から、GARU は GID1 をユビキチン化依存的に分解することで、GA シグナルを負に制御する働きがあることが明らかになった。

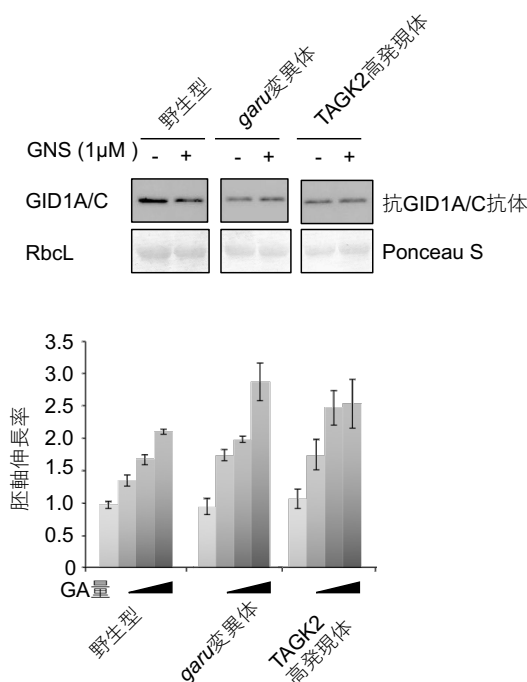


図2 *garu* 遺伝子欠損体および TAGK2 高発現体における GA 感受性

(2) GARU の Tyr リン酸化の生物学的意義の解析

まず、TAGK2 による GARU の Tyr リン酸化が植物細胞内において触媒されるかどうかを一過的発現系によって解析した。その結果、GARU の Tyr321 残基は TAGK2 活性依存的にリン酸化されること、TAGK2 の阻害剤である GNS 処理によってリン酸化レベルが減少することが明らかになった。さらに、GNS 処理は GID1 タンパク質レベルの減少を誘導したことから、TAGK2 依存的な GARU のリン酸化は GID1 の安定化に関与すると考えられる。ついで、TAGK2 による Tyr リン酸化が GARU 活性に及ぼす影響を評価するために、GARU のリン酸化部位に変異を導入した擬似リン酸化型(Tyr321Glu, Tyr321Asp) および非リン酸化型変異体(Tyr321Phe) を作成し、植物細胞内におけるユビキチン化活性を解析した。その結果、野生型と比較して、擬似リン酸化型 GARU を発現させた細胞内においては GID1 のユビキチン化および分解誘導の減退が確認された。さらに、*tagk2* 遺伝子欠損体および高発現体における GID1 安定性および GA 応答性を解析したところ、高発現体内では GID1 の安定化、GA 応答

能の亢進が確認された(図 2)。これらの結果から、TAGK2 依存的な Tyr リン酸化は GARU の不活性を誘導することによって GID1 を安定化し、結果的に GA 応答を亢進する働きがあることが明らかになった。また、GNS は TAGK2 を阻害することによって、GARU 活性化および GID1 の分解を誘導し、結果的に GA 応答を抑制している可能性を見出した。

本研究成果は、世界で初めて植物内における GNS の標的分子を同定し、Tyr リン酸化の生物学的な意義を明らかにした。TAGK の Tyr リン酸化によるタンパク質-タンパク質間相互作用制御の発見は、これまで未解明だった植物における Tyr リン酸化による制御機構解明の重要な足掛かりになることが期待できる。さらに、植物は GARU によるユビキチン化と TAGK2 による Tyr リン酸化という2つの翻訳後修飾によって GID1 量を厳密にコントロールし、GA シグナルの恒常性を維持していることが明らかになった。また、GNS は主にマメ科植物などが生産する二次代謝産物であるが、本研究成果から、GNS が他植物の TAGK を標的とした植物間コミュニケーションのためのシグナル分子として機能している可能性が示唆される。今後、シグナル分子としての GNS の機能や、TAGK ファミリーの機能を詳細に解析することで植物における Tyr リン酸化の生物学的な意義を明らかにしていきたい。

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 5 件)

- (1) Nemoto, K., Kagawa, M., Nozawa, A., Hasegawa, Y., Hayashi, M., Imai, K., Tomii, K., Sawasaki, T. Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system. **Scientific reports** 8:4268 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-22538-9 [査読有]
- (2) Nemoto, K., Ramadan, A., Arimura, G-I., Imai, K., Tomii, K., Shinozaki, K., Sawasaki, T. Tyrosine phosphorylation of the GARU E3 ubiquitin ligase promotes gibberellin signalling by preventing GID1 degradation. **Nature Communications** 8:1004 (2017). doi: 10.1038/s41467-017-01005-5 [査読有]
- (3) Ogawa, S., Miyamoto, K., Nemoto, K., Sawasaki, T., Yamane, H., Nojiri, H., Okada, K. OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin

production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. **Scientific Reports** 7: 40175 (2017). doi: 10.1038/srep40175 [査読有]

(4) Takagi, M., Sakamoto, T., Suzuki, R., Nemoto, K., Obayashi, T., Hirakawa, T., Matsunaga, T. M., Kurihara, D., Nariai, Y., Urano, T., Sawasaki, T., Matsunaga, S. Plant Aurora kinases interact with and phosphorylate transcription factors. **Journal of Plant Research** 129(6): 1165-1178 (2016). Doi: 10.1007/s10265-016-0860-x [査読有]

(5) Yano, T., Takeda, H., Uematsu, A., Yamanaka, S., Nomura, S., Nemoto, K., Iwasaki, T., Takahashi, H., Sawasaki, T. AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. **PLoS One** 11(6): e0156716. (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0156716 [査読有]

[学会発表] (計 3 件)

(1) 根本圭一郎、GARU ユビキチンリガーゼのチロシンリン酸化はジベレリン受容体を安定化し GA シグナルを促進させる、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年 3 月 28 日-30 日、札幌コンベンションセンター

(2) 根本圭一郎、ジベレリン受容体のユビキチン化依存的な分解に関与する新規 RING E3 ユビキチンリガーゼの同定と機能解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日-18 日、鹿児島大学

(3) Nemoto, K., Discovery of novel ABA agonists by a wheat cell-free based high-throughput screening system, Gordon Research Conference: Salt & Water Stress in Plants, May 29 - June 3 (2016), Les Diablerets Conference Center, Switzerland.

[図書] (計 件)

(1) Nemoto, K., Nozawa, A., Yamanaka, S., Nomura, S., Kido, K., Sawasaki, T. **Springer**, Autophosphorylation Assays Using Plant Receptor Kinases Synthesized in Cell-Free Systems, **Plant Receptor Kinases: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology** (2017), pp113-120.

(2) Nozawa, A., Nemoto, K., Nomura, S., Yamanaka, S., Kido, K., Sawasaki, T. **Springer**, Cell-Free Synthesis of Plant Receptor Kinases. **Plant Receptor Kinases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology** (2017), pp37-46.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

(1) 機関紙

根本圭一郎、澤崎達也、チロシンリン酸化によるジベレリン応答の新しい制御機構、「バイオサイエンスとインダストリー (B&I)」vol. 76, pp222-225, 2018.

(2) 報道関連

① プレスリリース(愛媛大学)

<https://www.ehime-u.ac.jp/post-65580/>

[http://www.pros.ehime-](http://www.pros.ehime-u.ac.jp/topics/detail.php?serial=120)

[u.ac.jp/topics/detail.php?serial=120](http://www.pros.ehime-u.ac.jp/topics/detail.php?serial=120)

② 愛媛新聞 (総合) 2017 年 (平成 29 年) 10 月 20 日 (金)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 圭一郎 (Nemoto, Keiichiro)

公益財団法人岩手生物学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号: 60566727

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号: 50314969

富井 健太郎 (TOMII, Kentaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・研究チーム長

研究者番号: 40357570

今井 賢一郎 (IMAI, Kenichiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・研究員

研究者番号: 80442573

有村 源一郎 (ARIMURA, Genichiro)

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号: 60505329