

機関番号：13901  
 研究種目：基盤研究(S)  
 研究期間：2006～2010  
 課題番号：18107001  
 研究課題名(和文) ジベレリン受容に関する分子生物学的研究  
 研究課題名(英文) Study on gibberellin perception  
 研究代表者：  
 松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO)  
 名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
 研究者番号：00270992

研究成果の概要(和文)：ジベレリン受容体 GID1 の結晶構造解析を行い、GID1 の GA 分子結合の機構を解明した。GID1 はホルモン受容体リパーゼ(HSL)の構造と類似しており、HSLの活性サイトがGAの結合サイトに対応することが分かった。さらに、下等植物から高等植物に進化する過程で、GID1のGAと相互作用するアミノ酸が適切に変異することにより、GAに対する親和性や特異性が改良されたことが確認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the 3D structure of rice GA receptor (OsGID1) bound with GA. The overall structure shows an  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold similar to that of HSLs. The GA-binding pocket corresponds to the substrate-binding site of HSLs. On the basis of the OsGID1 structure, we mutagenized important residues for GA binding and examined their binding activities. Almost all of them showed very little or no activity, confirming that the residues revealed by structural analysis are important for GA binding. The observations indicate that GID1 originated from HSL and was further modified to have higher affinity and more strict selectivity for bioactive GAs by adapting the amino acids involved in GA binding in the course of plant evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2007年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2008年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
総計	86,000,000	25,800,000	111,800,000

研究分野：生物学

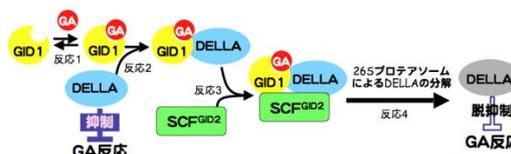
科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：成長生理、植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

研究開始時において、本研究のバックグラウンドになった GA シグナル受容の分子機構について以下に概要を述べる(図1参照)。

図1：植物における GA 受容の分子機構



GA 反応は DELLA タンパク質により制御されており、DELLA が活性状態の場合 GA 反応は抑制

される。GA が存在する場合、GA はその受容体 GID1 と結合する (反応 1)。GA と結合した GID1 は DELLA タンパク質との相互作用が可能となる (反応 2)。F-ボックスタンパク質の一種である GID2 は、GID1-GA-DELLA 複合体を形成した DELLA タンパク質を認識し (反応 3)、SCFGID2 として機能することにより、DELLA タンパク質をユビキチン化し最終的に 26S プロテアソームによる分解へと導く (反応 4)。抑制タンパク質 DELLA が分解される結果、抑制状態だった GA 反応は脱抑制され、GA 反応が開始される。

## 2. 研究の目的

本研究は、「研究開始当初の背景」において述べた GA のシグナル受容の各ステップにおける分子機構を解明することを目的とした。具体的には図 1 における 3 つのタンパク質、GID1、DELLA、GID2 が、GA 受容によりどのように相互作用することにより、抑制タンパク質 DELLA の分解を導くかに関する分子機構について研究した。

本研究当初に設定した目標は以下の 6 点であった。

- (1) GA 受容体 GID1 の GA 結合サイトはどこか。
- (2) GID1 と DELLA タンパク質との結合サイトはどこか。
- (3) GID1 と結合した DELLA タンパク質はどのような変化を受けるか。
- (4) DELLA タンパク質はどのような機構により GA シグナルを抑制するのか。
- (5) DELLA タンパク質と GID2 との結合サイトはどこか。
- (6) GA シグナル受容複合体の再構成。

## 3. 研究の方法

(1) 各種生化学方法 (大腸菌を用いたタンパク質合成、タンパク質精製、マスペクトル、表面プラズモン共鳴による解析、等) による、3 つのタンパク質、GID1、DELLA、GID2 の解析。

- (2) 結晶化タンパク質を用いた X 線構造解析。
- (3) GA 関連突然変異体を用いた分子遺伝学的解析。

## 4. 研究成果

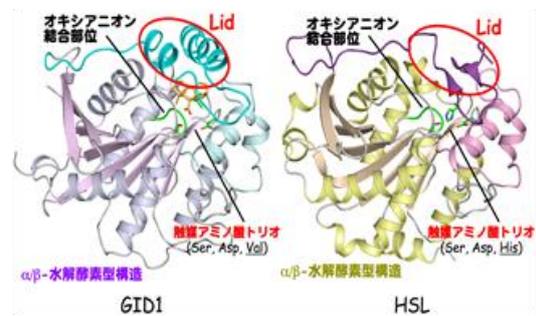
本稿では、上述した 6 つの研究目的に関して特に進展したいくつかの項目について記述する。

- (1) GA 受容体 GID1 の GA 結合サイトはどこか。

GA4 または GA3 と結合したイネ GID1 結晶を用いて 1.9 Å の解像度で X 線解析を行い、GID1 タンパク質構造の全体及び GA 結合サイトの構造を明らかにした (図 2、なお、本研究の構造解析に係わる一部はターゲットタンパクプロジェクトの支援のもと、構造生物学者である加藤博章教授 (京都大学) との共同研

究により行われた)。

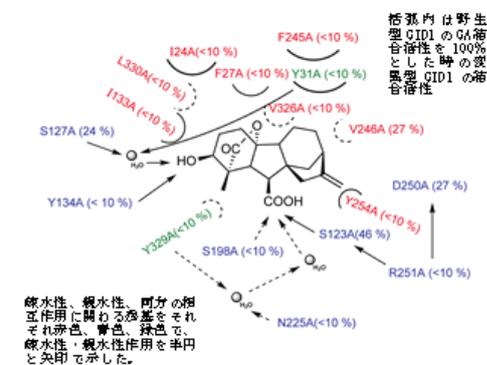
図 2 GID1 受容体の全体構造とホルモン受容体リパーゼ (HSL) との構造比較



GID1 受容体の全体構造はアミノ酸配列の相同性から予想されたように、酵素の一種であるホルモン受容体リパーゼ (HSL) の構造とよく似ていた。また、HSL の活性ポケットの部分に GA 結合ポケットに対応していた。HSL の活性部位を構成する 2 つのアミノ酸残基 (Ser198 と Asp296) やオキシアニオン結合部位は GID1 にも保存されており、これらの部位が GA 分子の C-6 に位置するカルボキシル基と水素結合を形成することが分かった。また、GA と GID1 との結合はこれらの水素結合以外に疎水的結合も関与していることが分かった。

解析された立体構造に基づき、GA との結合に関与することが予想された残基をアラニンに変異させ、GA 結合能を検討した (図 3、研究分担者、中嶋との共同研究)。その結果、17 種類のうち 13 種類について結合活性はなくなり、残りの 4 種類についても大きく活性が低下した。このことは、構造解析により推定された GA 結合に関与するアミノ酸が、実際に GA との結合に重要であることを示している。

図 3 GA 結合に関与するアミノ酸をアラニンに置換した変異体 GID1 の GA 結合能

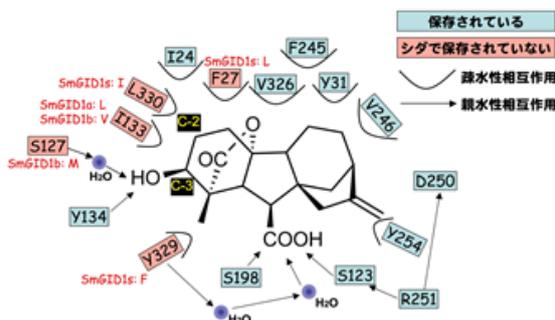


HSL は微生物、動物、植物に広く存在する酵素タンパク質であることを考えると、高等植物に存在する GA 受容体は、HSL を起源として植物の進化過程で確立されたと推論され

た。そこで、高等植物を含めどのような植物が GA 分子及び GID1 受容体を持つのかについて調べた。その結果、陸上植物のうち最も原始的と考えられているコケ植物には、GA 分子及び GID1 受容体、さらにはその他の GA 信号伝達関連遺伝子が存在しないことが確認された。一方、維管束植物の内、最も原始的生物と考えられている小葉類（シダの一種）の Selaginella においては、GA 分子及び GID1 受容体、さらにはその他の GA 信号伝達関連遺伝子が存在することが確認された。そこで、Selaginella GID1 (SmGID1) と進化が進んだイネの GID1 (OsGID1) の GA 結合に関与するアミノ酸残基の比較を行った。

GA 化合物はこれまでに 130 種類以上同定されているが、高等植物に対して活性を有する GA は、① 2 位の炭素 (C-2) に水酸基がなく、② 3 位の炭素 (C-3) に水酸基のついた、数種類の GA 種のみに限られている (図 4 参照)。ところが、SmGID1 では活性型 GA に対する結合能力が弱い一方、上記のルールにあてはまらない GA 種にも結合することが知られていた。

図 4 OsGID1 と SmGID1 の GA 結合に関与するアミノ酸残基の比較



これらの事実から、SmGID1 と OsGID1 間で共有されないアミノ酸残基は、植物進化の過程で GID1 が GA 受容体として確立するまでに結合に適した様々なアミノ酸を試したことを反映していると予想した。そこで、OsGID1 (進化型 GID1) を SmGID1 (原始型 GID1) のアミノ酸に置換し変異型 GID1 を作り GA 結合能や特異性を検討したところ、C-2 や C-3 に向かうアミノ酸の置換 (I133L や S127M) は GA に対する結合能や特異性を低下させることが確認された。以上の結果を総合すると、GID1 は HSL を起源とし、GA 受容活性を獲得した後も、植物進化の過程で活性型 GA の固有な構造を特異的に認識するべく構造を調整し続けたと推論した。

(2) GID1 と DELLA タンパク質との相互作用サイトはどこか。

GA-GID1 タンパク質の構造解析の結果、GID1 の N 末端に存在する Lid 領域の疎水性に

富んだ複数のアミノ酸がタンパク質分子の表面に出現することが分かった。この疎水性の表面に突き出ているアミノ酸が DELLA との結合に関与すると考えて、これらのアミノ酸をアラニンに置換した変異 GID1 を作成し酵母内で DELLA との相互作用を観察したところ、変異 GID1 は DELLA と結合しなかった。この結果とこれまでの知見 (DELLA 側の GID1 との結合サイトは N 末端側の DELLA 領域) より、GID1 と DELLA との結合は両方のタンパク質の N 末端側の領域 (GID1 は Lid 領域、DELLA タンパク質は DELLA 領域) を介して行われると結論した。

一方、GID1 と DELLA の in vitro での結合反応を表面プラズモン共鳴により解析した結果、両者の結合は 2 カ所以上でなされており、その一カ所が Lid 領域と DELLA 領域だが、それ以外の領域での相互作用が DELLA の活性調節には重要であることが判明した。これに関連して、我々が既に単離していた SLR1 の C 末端側に変異を持つ突然変異体 Slr1-d4 を用いた解析により、GID1 と SLR1 の安定的な結合には C 末端側の GRAS ドメインも必須であることが確認された。

(4) DELLA タンパク質はどのような機構により GA シグナルを抑制するのか。

これまでの研究により、GA シグナル抑制に必要な SLR1 の領域は C 末側の GRAS 領域であり、N 末側の DELLA 領域は必要ではないと考えられてきた。本研究では、SLR1 のアミノ酸に変異を導入しその GA シグナル抑制活性を測定することにより、詳細に GA シグナル抑制に関わる領域を特定した。その結果、SAW 領域の G576 に変異が入ると抑制活性が重篤に失われることが分かった。一方、それ以外の GRAS 領域の様々なアミノ酸の変異もある程度抑制活性が低下することから、SLR1 の GA 抑制活性には、SAW 領域が最重要であり、さらに GRAS 領域全体の構造もその活性を發揮するためには必要と結論した。

(5) DELLA タンパク質と GID2 との結合サイトはどこか。

上述したように、SLR1 と GID2 との相互作用は、GA を結合した GID1 と SLR1 が相互作用した状態でのみ起こる、すなわち、GID1 と SLR1 との相互作用が SLR1 と GID2 との結合のための前提条件となる。本研究においては、これを前提に、GID1-SLR1 複合体の結晶化、さらには GID1-SLR1-GID2 複合体の結晶化を試みたが、いずれの試みも成功しなかった。そこで、イーストスリーハイブリッド (Y3H) を用いて、SLR1 において、GID2 との相互作用に必要な領域を同定することを試みた。その結果、GID2 との結合には、GRAS 領域内に点在しており、特に VHIID 領域、PFYRE 領域の

一部、及びSAW領域の一部が必須であることが確認された。このことは、GID2はSLR1のGRAS領域の特定の一部を認識するのではなく、複数箇所を認識することを示している。

#### 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30件)

- ① Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka M. (2010) Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* 22, (8) 2680-2696. (査読有)
- ② Yamamoto, Y., Hirai, T., Yamamoto, E., Kawamura, M., Sato, T., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ueguchi-Tanaka, M. (2010) A rice *gid1* suppressor mutant reveals that gibberellin is not always required for interaction between its receptor, GID1, and DELLA proteins. *Plant Cell* 22, (11) 3589-3602. (査読有)
- ③ Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. (2010) The perception of gibberellins: clues from receptor structure. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, (5) 503-508. (査読有)
- ④ Asano, K., Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M., Angeles-Shim, R. B., Komura, T., Satoh, H., Kitano, H., Matsuoka, M. and Ashikari, M. (2009) Isolation and characterization of dominant dwarf mutants, *Slr1-d*, in rice. *Mol. Genet. Genomics* 281, (2) 223-231. (査読有)
- ⑤ Sazuka, T., Kamiya, N., Nishimura, T., Ohmae, K., Sato, Y., Imamura, K., Nagato, Y., Koshiba, T., Nagamura, Y., Ashikari, M., Kitano, H. and Matsuoka M. (2009) A rice tryptophan deficient dwarf mutant, *tdd1*, contains a reduced level of indole acetic acid and develops abnormal flowers and organless embryos. *Plant J.* (査読有)
- ⑥ Song X, Matsuoka M. (2009) Bar the windows: an optimized strategy to survive drought and salt adversities. *Genes Dev.* 1:23(15) 1709-1713. (査読有)
- ⑦ Suzuki, H., Park, S. H., Okubo, K., Kitamura, J., Ueguchi-Tanaka, M., Iuchi, S., Katoh, E., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Asami, T. and Nakajima M. (2009) Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *Plant J.* 60, (1) 48-55. (査読有)
- ⑧ Aleman, L., Kitamura, J., Abdel-Mageed, H., Lee, J., Sun, Y., Nakajima, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. and Allen, RD. (2008) Functional analysis of cotton orthologs of GA signal transduction factors GID1 and SLR1. *Plant Mol. Biol.* 68, (1-2) 1-16. (査読有)
- ⑨ Ueguchi-Tanaka, M., Hirano, K., Hasegawa, Y., Kitano, H. and Matsuoka, M. (2008) Release of the Repressive Activity of Rice DELLA Protein SLR1 by Gibberellin Does Not Require SLR1 Degradation in the *gid2* Mutant. *Plant Cell* 20, (9) 2437-2446. (査読有)
- ⑩ Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., Kato, H. and Matsuoka, M. (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, (7221) 520-523. (査読有)
- ⑪ Iuchi, S., Suzuki, H., Kim, Y.-C., Iuchi, A., Kuromori, T., Ueguchi-Tanaka, M., Asami, T., Yamaguchi, I., Matsuoka, M., Kobayashi, M. and Nakajima, M. (2007) Multiple loss-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J.* 50, (6) 958-966. (査読有)
- ⑫ Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I. and Matsuoka, M. (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19, (7) 2140-2155. (査読有)
- ⑬ Nakajima, M., Shimada, A., Takashi,

Y., Kim, Y-C., Park, S-H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M. and Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptor. Plant J. 46, (5) 880-889. (査読有)

- ⑭ Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sakamoto, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Sazuka, T., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2006) The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. Plant J. 48, (3) 390-402. (査読有)

[学会発表] (計15件)

- ① 奥野綾子:「ジベレリン変異体における倒伏抵抗性の評価」第52回日本植物生理学会年会 2011.3 (仙台) (要旨集)
- ② Matsuoka, M. “Molecular Interaction of Gibberellin Signaling Components, GID1, SLR1, and GID2.” The 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010). 2010.6.7. (Yokohama, JAPAN) (招待講演)
- ③ Seung-Hyun Park:「ジベレリン受容体のシグナル分担制御機構の解析」植物化学調節学会 2009.10.29 (仙台)
- ④ Matsuoka, M. :「Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1.」The 6th International Symposium of Rice Functional Genomics. 2008.11.10-12 (Jeju, Korea)
- ⑤ Nakajima, M. :「Characterization of Arabidopsis gibberellin receptors」19th International Conference on Plant Growth Substances 2007.7.22-23 (Puerto Vallarta, Mexico)
- ⑥ Ueguchi-Tanaka, M. :「Gibberellin perception and signal transduction in rice.」19th IPGSA Meeting. 2007.7.22-23 (Puerto Vallarta, Mexico)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号: 00270992

### (2) 研究分担者

中嶋 正敏 (NAKOJIMA MASATOSI)  
東京大学・農学生命科学研究科・助教  
研究者番号: 50237278

服部 束穂 (HATTORI TSUKAHO)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号: 10164865

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: