

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570037

研究課題名（和文） ジベレリン核内受容体 GID1 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of a gibberellin receptor, GID1

研究代表者

上口（田中）美弥子（UEGUCHI-TANAKA MIYAKO）

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：70377795

研究成果の概要：

ジベレリン (GA) 受容体は、ジベレリンと結合すると抑制因子である DELLA タンパク質 (SLR1) と結合し SLR1 を分解し、脱抑制させることがわかっている。本課題では、受容体と GA との結合、SLR1 との結合に関して、構造解析 (X 線構造解析)、*in vitro*、*in vivo* のレベルで解析を行い、その分子メカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物分子・植物ホルモン・受容体

1. 研究開始当初の背景

ジベレリン (GA) は、植物の生長を促進する植物ホルモンであり、本ホルモンの欠損や伝達異常が起こると、植物は矮性・花形態異常・発芽の異常などを引き起こす。研究開始当時、本研究代表者らは、ジベレリン非感受性変異体 *gid1* の原因遺伝子を単離し、GID1 タンパク質が核内 GA 受容体であることを明らかにしていた (**Nature 2005**)。さらに、イースト・ツーハイブリッドアッセイにより、GID1 受容体が抑制因子の DELLA タンパク質と GA 依存的に結合することが明らかになった。これ

らの結果をふまえ、本研究では、ジベレリン受容体 GID1 と DELLA タンパク質を中心にして、GA 受容のさらなる理解をめざすこととした。

2. 研究の目的

本研究者が、2 年の申請期間で明らかにしたいことは、以下の 2 点であった。すなわち、(1) GID1 受容体が、どのドメインでどのようにして GA を受容するか (受容メカニズム)、(2) GA を受容した GID1 が、どのようにして DELLA タンパク質と結合できるようになるか、である。したがって、(1) と (2) の課題

について、*in vivo*および*in vitro*両面から詳しく解析することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*におけるGA依存的なGID1とDELLAタンパク質との相互作用の解析

イースト・ツーハイブリッドの実験により、酵母内でGID1とDELLAタンパク質がGA依存的に結合することが明らかになった (**Nature, 2005**)。しかしながら、植物体内における両者の結合を示すことはGID1受容体を理解する上で必須と考えられる。そこで、*in vivo*におけるGA依存的なGID1とDELLAタンパク質との相互作用の解析を行う。*in vivo*における相互作用の解析方法として以下の2つの方法を試みる。

① 共免疫沈降法

GID1-GFPを過剰発現させた形質転換イネにおいて、GID1-GFPタンパク質はGID1として正常に機能することが分かっている (**Nature, 2005**)。そこで、GID1-GFPを過剰発現させたイネのカルスもしくは、植物体にGA処理を行い、その素抽出液からGFP抗体を用いて免疫沈降を行う。さらに、免疫沈降画分にSLR1(イネにおけるDELLAタンパク質)が共免疫沈降されるかどうかをSLR1抗体を用いて調べる。同時に、*gid2*変異体 (DELLAタンパク質の分解に関わるF-boxタンパク質の欠損変異体イネ) に対してもGID1-GFPを過剰発現させ、同様な共免疫沈降を行う。*gid2*変異体中では、GID1-GFPがGAを受容してSLR1と結合するにもかかわらずSLR1が分解されないため、多量のSLR1が共免疫沈降されることが期待される。

② BiFC (Bi-molecular fluorescent complementation) 法

本法は、結合能を調べようとする2つのタンパク質にN末側とC末側に分割したYFP(YFPN, YFPC)との間で融合タンパク質を作成し、2つのタンパク質が結合する場合にYFPが再生され蛍光が植物内で観察されるという方法である。そこで、GID1とSLR1にYFPNもしくはYFPCをつないだコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介してたばこ内で一過的発現を観察する。

(2) GID1受容体のドメイン解析

GID1受容体には、GAと結合するドメインと、SLR1と結合するドメインがあると考えられる。イネとアラビドプシスの3つのGID1ホモログの間で共通なアミノ酸すべてを個々にアラニンに置換した変異型GID1タン

パク質を作成し、そのGA結合能とDELLAタンパク質結合能を調べる(アラニン・スキヤニング)。

(3) GID1受容体の結晶化とX線構造解析

GID1受容体を大腸菌にてリコンビナントタンパク質として大量調製、精製して結晶化を行う。結晶に対してX線構造解析を行う。

(4) GID1受容体の反応速度論的解析

GID1は受容体であるので、反応機構を知るためにはリガンド(GA)や相互作用するDELLAタンパク質との反応速度論的解析が重要であると考えられる。そのために、ピアコアを用いた解析を行う。すでに、GID1は、Hisタグまたは、GSTタグとの融合タンパク質として安定的に大腸菌を用いて大量精製することが可能であり、精製タンパク質がGA結合能を有していることは確認している。一方、DELLAタンパク質に関しては、多くの研究者がリコンビナントタンパク質合成の困難さを報告しているが、研究代表者は、イネのDELLAタンパク質であるSLR1がGSTタグとの融合タンパク質として安定的に大腸菌を用いて大量精製出来ることを確認している。そこで、これらリコンビナントタンパク質を用いてピアコアによる解析を行う。

(5) *gid2*変異体におけるGAシグナル伝達

*gid2*変異体は、Fボックスタンパク質であるGID2が壊れているために、SLR1タンパク質の分解が起こらずGAシグナルは流れないと考えられてきた。しかしながら*gid2*変異体を様々なGA濃度で育てることにより*gid2*変異体においても、部分的にGAシグナルが流れていることがわかってきた。本課題では、形質転換体や、変異体を利用してその理由を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *in vivo*におけるGA依存的なGID1とSLR1 (DELLAタンパク質)との相互作用の解析

① 共免疫沈降法

GID1-GFPを過剰発現させたイネのカルスにGA処理を行い、その素抽出液からGFP抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、*in vivo*においても、GID1とSLR1がGA依存的に結合していることが明らかになった。

② BiFC (Bi-molecular fluorescent complementation) 法

GID1とSLR1にYFPNもしくはYFPCをつないだコンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介してたばこ内で一過的発現を観察した

。GID1とSLR1の結合による、YFPの蛍光が観察された。さらに、変異SLR1タンパク質を用いた実験からそれらの結合がSLR1のDELLA/TVHYNPドメインを介して行われていることが明らかとなった(図1)。

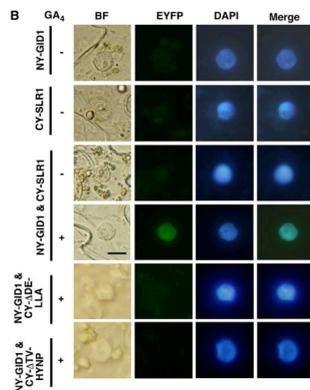


図1 BiFC法によるGID1とSLR1の結合

(2) GID1受容体のドメイン解析

イネとアラビドプシスの3つのGID1ホモログの間で共通なアミノ酸すべてを個々にアラニンに置換した変異型GID1タンパク質を作成し、そのGA結合能とDELLAタンパク質結合能を調べた(アラニン・スクリーニング)。その結果、ジベレリン結合ならびにDELLAタンパク質との結合に必要なドメインは、ほぼ共通しており、それは、GID1がリパーゼとの構造類似性から類推される活性中心部位とリッドドメインであることが明らかとなった。

(3) GID1受容体の結晶化とX線構造解析

ジベレリン受容体GID1の構造を、X線結晶解析により明らかにした(図2)。その結果、GID1は、 α 、 β -ハイドロラーゼと同様な構造をもち、その活性中心に対応する部分でジベレリンと結合していること、活性中心にかぶさる蓋があり、その部分でSLR1と結合していることが明らかとなった。さらに、シダ型に対応する変異型GID1が、結晶構造から類推すると不活性型ジベレリンに対してより結合活性を示すことが予想できた。実際、その部分をシダ型にかえた変異型GID1を作成し、その不活性型ジベレリンに対する結合能を調べたところ、たしかに結合活性が高まっていることが示された。このことは、GID1が、進化の過程でだいに活性型ジベレリンのみを認識し、活性型ジベレリンに高い結合活性を示すように変化していったという考え方を支持するものであった。

ジベレリン (GA₄)

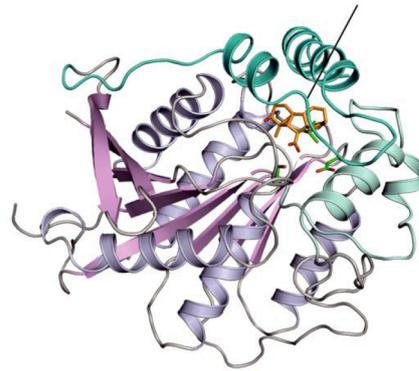


図2 GID1受容体の構造

(4) GID1受容体の反応速度論的解析

*in vitro*におけるGID1受容体とGAの結合様式、GA存在下におけるGID1受容体とSLR1タンパク質との結合様式についてピアコアを用いて解析した。その結果、GID1、SLR1の結合に関する結合定数等を求めることが出来、その値は、*in vivo*における現象を十分説明できるものであった。

(5) *gid2*変異体におけるGAシグナル伝達

今までの研究によりGID1はジベレリン受容体として機能し、GAと結合したGID1受容体は、抑制因子であるDELLAタンパク質と結合し、SCF^{GID2}を介してDELLAタンパク質を分解に導くことによりGA応答が起きていることが明らかになってきた。ところが、*gid2*欠損変異体では、DELLAタンパク質が分解されないにもかかわらず、GA応答が一部起きていることが分ってきた。この応答は、ジベレリン、GID1量依存的であった。これらのことから、このGA応答は、*gid2*変異体で、GID1-GA-SLR1コンプレックスが形成されるとSLR1の抑制活性が失われるからであると結論した。

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11件)

- ① Shimada A, Ueguchi-Tanaka M., Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, 520-523 (2008) 査読有り.
- ② Ueguchi-Tanaka M., Hirano K, Hasegawa Y, Kitano H, Matsuoka M. Release of the repressive activity of rice DELLA

- protein SLR1 by gibberellin does not require SLR1 degradation in the *gid2* mutant. *Plant Cell*. 20, 2437-2446 (2008) 査読有り.
- ③ Hirano K, Aya K, Hobo T, Sakakibara H, Kojima M, Shim RA, Hasegawa Y, Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol*. 49, 1429-1450 (2008) 査読有り.
- ④ Aleman L, Kitamura J, Abdel-mageed H, Lee J, Sun Y, Nakajima M, Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M, Allen RD. Functional analysis of cotton orthologs of GA signal transduction factors GID1 and SLR1. *Plant Mol Biol*. 68, 1-16 (2008) 査読有り
- ⑤ Hirano K, Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends Plant Sci.*, 192-199 (2008) 査読有り.
- ⑥ 上口 (田中) 美弥子, 中嶋正敏, 松岡信 ジベレリン受容体 植物の生長調節 42, (1) 30-36 (2007) 査読有り.
- ⑦ Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Ashikari, M. and Matsuoka, M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. 58, 183-198 (2007) 査読有り.
- ⑧ Chhun, T., Aya, K., Asano, K., Yamamoto, E., Morinaka, Y. Watanabe, M., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. and Ueguchi-Tanaka, M. Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *Plant Cell* 19, 3876-3888 (2007) 査読有り.
- ⑨ Hirano, K., Nakajima, M., Asano, K., Nishiyama, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Katoh, E., Xiang, H., Tanahashi, T., Hasebe, M., Banks, J.A., Ashikari, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the Lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 19, 3058-3079 (2007) 査読有り.
- ⑩ Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano H., Yamaguchi, I. and Matsuoka, M. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1 and gibberellin. *Plant Cell* 19, 2140-2155 (2007) 査読有り.
- 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. Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J*. 50, 958-966 (2007) 査読有り.
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 上口 (田中) 美弥子, 平野恒、長谷川慶子、北野英己、松岡信:「*gid2* 変異体における SLR1 タンパク質分解を伴わない GA シグナルの脱抑制」 第 50 回日本植物生理学会年会 2009. 3. 22 (名古屋)
- ② 平野恒、辻寛之、上口 (田中) 美弥子、松岡信:「イネのジベレリンシグナル伝達の初期過程にかかわる GID1, SLR1, GID2 の相互作用」 第 50 回日本植物生理学会年会 2009. 3. 22 (名古屋)
- ③ 島田麻子、上口 (田中) 美弥子、中津亨、中嶋正敏、直江洋一、大宮博子、加藤博章、松岡信:「ジベレリン受容体の立体構造を基にした分子進化と基質特異性の解析」 第 50 回日本植物生理学会年会 2009. 3. 22 (名古屋)
- ④ Ueguchi-Tanaka, M. “Structural analysis of gibberellin receptor, GID1” 11th Swiss-Japanese Joint Meeting on Biotechnology and Bioprocess Development 2008. 10. 27-29 (Minusio, Switzerland)
- ⑤ Makoto, M., Hirano, K. and Ueguchi-Tanaka, M. ”A soluble gibberellin receptor, GID1, and early gibberellin signal transduction.” 第 30 回日本分子生物学会年会

2007.12.9 (神奈川)

- ⑥ Ueguchi-Tanaka, M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) encodes a soluble GA receptor that shares sequence similarity with a hormone sensitive lipase (HSL) 14th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology 2007.10.8-10 (Kanazawa, Japan)
- ⑦ 浅野賢治、平野恒、上口(田中)美弥子、香村敏郎、佐藤光、北野英己、松岡信、芦荻基行：「イネ半優性矮性変異体 *Slr1-d* の遺伝学解析」日本育種学会第112回講演会 2007.9.22 (山形)
- ⑧ Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I. and Matsuoka, M. “MOLECULAR INTERACTIONS OF A SOLUBLE GIBBERELLIN RECEPTOR, GID1, WITH A RICE DELLA PROTEIN, SLR1, AND GIBBERELLIN.” 19th IPGSA Meeting. 2007.7.21-25. (Puerto Vallarta, Mexico)
- ⑨ Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Ashikari, M., Matsuoka, M. “Gibberellin perception and signal transduction in rice.” 19th IPGSA Meeting. 2007.7.21-25. (Puerto Vallarta, Mexico)
- ⑩ Matsuoka, M. and Ueguchi-Tanaka, M. “GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), a soluble gibberellin receptor in rice.” The 18th International Conference on Arabidopsis Research. 2007.6.20-23. (Beijing, CHINA)

[図書] (計1件)

- ① Itoh H, Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M. Molecular biology of gibberellins signaling in higher plants. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 268, 191-221 (2008) 査読有り.

6. 研究組織

(1)研究代表者 上口(田中)美弥子
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授
研究者番号 70377795

(2)研究分担者 無し

(3)連携研究者 無し