

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770036

研究課題名 (和文) 新規転写因子 G A F 1 によるジベレリン信号伝達機構の解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of GAF1, a novel GA signaling factor.

研究代表者

深澤 壽太郎 (FUKAZAWA JUTAROU)

独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：90385550

研究成果の概要：

ジベレリンは、植物の生長を制御する植物ホルモンとして知られている。GA 信号伝達において、DELLA タンパク質は、抑制因子として働き、GA 依存的に分解されることが報告されている。レセプターの発見により分解までの制御機構が明らかになったが、DELLA タンパク質の機能は、不明であった。本研究では、DELLA タンパク質と相互作用する因子 GAF 1 を単離し、酵母、植物細胞を用いた実験系を確立し GAF1-DELLA 複合体による GA 信号伝達の一つの作用機構モデルを提唱した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：植物生理・分子

キーワード：ジベレリン、転写因子、標的遺伝子、信号伝達

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモン・ジベレリン (GA) は、種子発芽、伸長成長、開花時期を制御するホルモンとして知られている。GA 信号伝達における研究は、GA 感受性変異体を用いた解析より複数の GA 信号伝

達に関与する因子が同定されている。中でも、植物固有の GRAS family に属する RGA/GAI は、DNA 結合能をもたない核内タンパク質で、GA 信号伝達の抑制因子として知られている。2005年に GA のレセプター GID1 が単離された。活性型 GA と結合した GID1 が RGA/GAI と

結合し、さらに SCF 複合体を解したユビキチン化により RGA/GAI が分解されることが明らかとなった。GA の添加にともない RGA/GAI が分解され、下流の抑制が解除されることで GA 信号伝達が起こると考えられているが、RGA/GAI の下流の信号伝達経路は、不明である。RGA/GAI との相互作用因子の単離が様々な研究室で試みられているが、GID1 および、SCF 複合体以外の因子、特に下流に存在する因子は同定されていない。申請者は、独自に開発した Two hybrid 法により RGA/GAI と相互作用する転写因子 GAF1 の単離に成功した。

2. 研究の目的

GAF1 機能解析を通じて GA 信号伝達における RGA/GAI による信号伝達の抑制機構ならび標的遺伝子を含めた GA 応答遺伝子の発現調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

形質転換植物体の作製

GAF1 過剰発現体、および T-DNA 挿入変異体を用いて、GAF1 転写因子の表現型を解析する。また、既存の GA 生合成、信号伝達変異体との多重変異体を作製することにより GA と GAF1 の関連を解析する。

酵母を用いたモデル実験系の確立

酵母を用いたモデル実験において GAF1 は、単独では、ほとんど転写活性化能を有さないが、GAI とともに発現させると非常に強い転写化能を示すことが明らかとなっている。GAF1 は、塩基配列特異的な結合能を有することから、標的遺伝子の結合を主な役割とし、転写

活性化能を有する GAI や転写抑制因子と考えられる WD タンパク質と複合体を形成することで、標的遺伝子の発現制御を行っていると考えられる。そこで、まず酵母を用いた実験系において GAF1, GAI, WD タンパク質の組み合わせにより転写活性化能がいかに変化するかを解析する。GAI による転写活性化と WD による転写抑制が拮抗するのか等を、レポーター遺伝子解析並びに、pull down 解析により明らかにする。

植物体を用いたモデル実験系の確立及び解析

植物体内での GAF1 による転写制御解析系を確立する。まず、GAF1 結合配列の下流にレポーター遺伝子 GUS をつないだ形質転換植物を作製し、GA 添加や、GA 合成阻害剤処理等による GA 内生量に応じたレポーター遺伝子の発現量の変化を解析する。また、同様のレポーター遺伝子を用いて、植物細胞を用いたトランジェント解析により GAF1 複合体による転写活性化能を比較する。

標的遺伝子の解析

GAF1 の標的遺伝子の同定を目的として GAF1 過剰発現体を作製し、マイクロアレイ解析を行なう。発現量に変化が認められた遺伝子の中で、GA 応答遺伝子や、開花時期を制御する遺伝子は、GAF1 標的遺伝子の可能性が高いと考えられる。これらの遺伝子を中心に、GAF1 の結合配列の情報を基に、ゲルシフト解析及び、クロマチン免疫沈降法を用いて GAF1 の標的遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

DELLA タンパク質と相互作用する転写因子 GAF1 の機能解析を行っている。GAF1 は、シロイヌナズナの DELLA タンパク質 RGA / GAI ばかりでなく、転写抑制因子と考えられる WD repeat protein (WDR) とも相互作用することを見出した。GAF1 タンパク質、DELLA タンパク質、WDR タンパク質による 3 つのタンパク質が 2 量体、3 量体の複合体を形成することで、転写活性化能を変化することにより、標的遺伝子の遺伝子発現制御を調節するとの仮説のもと、実験系を確立し以下のことを明らかにした。

2007 年度は、以下のことを明らかにした。

- ①GAF1 過剰発現体は、開花時期の促進、胚軸の伸長、葉の展開の表現型を示した。また GA 合成阻害剤存在下でも、開花時期の遅延を回復した。
- ②GAF1 における、GAI との相互作用に必要な領域を同定した。この領域を欠失した GAI と相互作用しない変異体タンパク質 mtGAF1 (Δ GAIbd)、を複製した。
- ③酵母を用いたモデル実験より GAF1 はほとんど転写活性化能を示さない転写因子であるが、GAI をともに発現させると、強い転写活性化能を有し、対照的に WDR は転写抑制因子として機能することが明らかになった。また、ゲルシフト解析により、GAF1 は、GAI とは対照的に DNA 配列特異的な結合能を有することが明らかとなった。
- ④GAF1 の標的遺伝子を探索するため、花成制御遺伝子および、ジベレリン応答遺伝子に焦点をあて、GAF1 過剰発現体において発現量に変化している遺伝子をマイクロアレイにより解析した。

2008 年度は、植物細胞を用いたトランジェントの実験系を確立し、植物細胞内における GAF1 及び相互作用因子による、転写制御機構の解析を行った。その結果、GAF1 は、単独では、弱い転写活性化因子として機能するが GAI をともに発現させると、強い転写活性化能を有し、対照的に WDR は転写抑制因子として機能することが明らかになった。また、BiFC 解析より、GAF1 と GAI タンパク質は、核内で相互作用することを明らかにした。さらに、この相互作用は、ジベレリンの投与による GAI タンパク質の分解に伴い消失することが明らかとなった。これらの結果から、GA 信号伝達における DELLA タンパク質下流の制御機構として、GA は、DELLA タンパク質の分解を促進し、GAF1 相互作用因子を変化させることにより GAF1 複合体の転写活性化能を調節し、GAF1 標的遺伝子の遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

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 2 件)

- ① Ioki, M., Takahashi, S., Nakajima, N., Fujikura, K., Tamaoki, M., Saji, H., Kubo, A., Aono, M., Kanna, M., Ogawa, D., Fukazawa, J., Oda, Y., Yoshida, S., Watanabe, M., Hasezawa, S., and Kondo, N. An unidentified ultraviolet-B-specific photoreceptor mediates transcriptional activation of the cyclobutane pyrimidine dimer photolyase gene in plants. *Planta*. (2008) Dec;229(1):25-36 査読有

②

Ito I, Fukazawa J, Yoshida M.
Post-translational methylation of high mobility group box1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. J Biol Chem. (2007) Jun 1;282(22):16336-44.
査読有

[学会発表] (計6件)

①

深澤 壽太郎、石田 さらみ、高橋 陽介
(理研PSC、東京大学、広島大学)
bZIP型転写因子RSGによるジベレリン生合成フィードバック制御機構の解析
植物化学調節学会第42回大会 2007年10月 静岡

②

深澤 壽太郎、村越 悟、寺村 浩、那須野慶、西田 尚敬、吉田 充輝、山口 信次郎、神谷 勇治、高橋 陽介
(理研PSC、東京理科大学、広島大学)
GAI相互作用因子GAF1によるジベレリン信号伝達機構の解析
第49回 植物生理学会年会 2008年3月 札幌

③

Jutarou Fukazawa, Sarahmi Ishida, Yohsuke Takahashi.
(RIKEN.PSC, Tokyo univ. Hiroshima Univ.)
RSG, bZIP transcriptional factor, controls feedback regulation of gibberellin biosynthesis. 19th International Conference on Arabidopsis Research july, 2008 montreal CANADA

④

深澤 壽太郎、村越 悟、寺村 浩、那須野慶、西田 尚敬、吉田 充輝、山口 信次郎、神谷 勇治、高橋 陽介
(理研PSC、東京理科大学、広島大学)
新奇ジベレリン信号伝達因子GAF1の機能解析
植物化学調節学会第43回大会 2008年10月 筑波

⑤

深澤 壽太郎、村越 悟、寺村 浩、那須野慶、西田 尚敬、吉田 充輝、神谷 勇治、山口 信次郎、高橋 陽介
(理研PSC、東京理科大学、広島大学)
新奇ジベレリン信号伝達因子GAF1の機能解析
第50回 植物生理学会年会 2009年3月 名古屋

⑥

伊藤岳 渡邊哲史 竹尾紘一 山口理絵
深澤壽太郎 高橋陽介
(広島大学、理研PSC)
転写因子AtRSGによるGA生合成酵素遺伝子の転写制御機構の解析
第50回 植物生理学会年会 (2009年3月) 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者 深澤 壽太郎 (FUKAZAWA JUTAROU)
独立行政法人理化学研究所・促進制御研究チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号：90385550