

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2012  
 課題番号：21370022  
 研究課題名（和文）新しいジベレリン信号伝達経路の解明

研究課題名（英文） A study of new gibberellin signal transduction pathway

研究代表者

高橋 陽介（TAKAHASHI YOHSUKE）

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90183855

研究成果の概要（和文）：本研究ではこれまでに知られていないジベレリン（GA）信号伝達経路の解析を行った。我々は植物に GA 刺激を与えると未知の信号伝達経路を介して細胞内カルシウム濃度が上昇することを見出した。GA 信号伝達の抑制因子 DELLA と結合する転写因子 GAF1 を同定し解析した。DELLA は GAF1 のコアクティベーターとして GAF1 の標的遺伝子の転写を促進することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed a new gibberellin (GA) signal transduction pathway. We found that the concentrations of intracellular  $Ca^{2+}$  are increased through a new signaling pathway in response to GAs. Furthermore, we found and analyzed a transcription factor GAF1 that specifically binds to DELLA proteins, negative regulators of GA signaling. Our biochemical studies suggest that DELLA proteins promote target genes of GAF1 as coactivators of GAF1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：植物分子生物学

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：信号伝達、転写制御、キナーゼ、カルシウム

### 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 細胞内信号伝達の研究は、分子遺伝学的手法により大きく進展した。GA 受容により GA 受容体が活性化されると、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因子が機能し、GA 信号が伝達されると考えら

れる。GA の受容による負の制御因子の分解という枠組みはオーキシンのそれと同一であり、GA 信号伝達の概要は解明されたかと思われた。しかし、このモデルの中心となる DELLA タンパク質の標的タンパク質が、未だに同定されていない。さらに、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 タンパク質の分解には Ca<sup>2+</sup>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。さらに生理学の実験が予言した膜上の GA 受容体の存在は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

我々は GA 内生量調節の転写制御系の解析を行っている。これまでに bZIP 型転写因子 RSG が GA 生合成酵素遺伝子を標的遺伝子とし GA の内生量調節に関与していること明らかにした。14-3-3 は RSG の Ser-114 のリン酸化を認識して結合し RSG を細胞質に隔離することでその機能を負に制御する。さらに RSG の細胞内局在は GA 内生量によって制御されること、RSG の機能を阻害すると GA 合成酵素遺伝子 *NtGA20ox* のフィードバック制御が抑制されることを見いだした。さらに、GA 依存的に RSG の Ser-114 のリン酸化を触媒するキナーゼはカルシウム依存性タンパク質キナーゼ (NtCDPK1) であることを明らかにした。さらに我々は、これまで機能の実体が不明であった DELLA が転写のコアクティベーターとして機能すること、Ca<sup>2+</sup>阻害剤が GA 応答の一部を遮断することを明らかにした。DELLA の標的タンパク質として新たに転写因子 GAF1 を同定した。

本研究では GA 信号伝達系の未知部分の解明を目的とし、以下の研究を行う。

①Ca<sup>2+</sup>依存的な GA 信号伝達系を解析する。Ca<sup>2+</sup>依存的な GA 応答遺伝子を同定し解析する。Ca<sup>2+</sup>依存的な経路は DELLA を介する経路と独立なのか、それとも DELLA の分解により Ca<sup>2+</sup>シグナリングの引き金が引かれるかを調べる。

②DELLA と相互作用する GAF1 の機能を解析する。GAF1 の標的遺伝子を同定し、DELLA が GAF1 のコアクティベーターとして標的遺伝子の活性化に関与するか調べる。GA による GAF1 の機能制御を調べる。

## 3. 研究の方法

### ①Ca<sup>2+</sup>と GA 信号伝達の解析

Ca<sup>2+</sup>濃度指示薬または Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質を用いて GA 刺激受容後の Ca<sup>2+</sup>濃度変化を調べる。すべての DELLA 遺伝子を欠損したシロイヌナズナ五重変異体を用いて GA 依存的な Ca<sup>2+</sup>濃度変化が DELLA に依存するか調べる。

②DELLA と相互作用する GAF1 の機能解析  
GAF1 の標的遺伝子を探索し、DELLA をコアクティベーターとして GAF1 がその遺伝子の発現を制御するかトランジェントアッセイにより調べる。クロマチン免疫沈降法により *in vivo* における GAF1 と標的遺伝子の結合を調べる。BiFC 法と免疫沈降法により DELLA と GAF1 の *in vivo* における相互作用

を調べる。GAF1 には相同性の高い遺伝子 GAF2 が存在するので *gaf1* の表現型は穏やかである。*gaf1 gaf2* の二重変異体を作製し表現型を解析する。

## 4. 研究成果

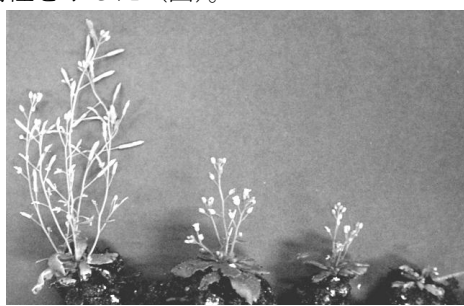
### ①Ca<sup>2+</sup>と GA 信号伝達の解析

これまで GA による Ca<sup>2+</sup>の一過的上昇は Ca<sup>2+</sup>指示薬を用いて観察され、GA 投与後 5 時間後とされてきた。GA 信号伝達のスイッチとされる DELLA の分解は GA 投与約 30 分後に観察されるので、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が GA 信号伝達そのものに関与しているのか、単なる二次的な応答なのかは判別できなかった。申請者らは Ca<sup>2+</sup>信号伝達阻害剤により *AtGA20ox1* などの GA 生合成酵素遺伝子の GA による転写調節が抑制されることを見出した。さらに GA による RSG キナーゼ NtCDPK1 の Ca<sup>2+</sup>による自己リン酸化は GA 投与後、1 時間以内に起こることを明らかにした。これらの結果は GA による Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は GA 投与後に速やかにおこり、GA 信号伝達に関与することを示唆する。Ca<sup>2+</sup>指示薬は有効な検出系だが、動物細胞に最適化されている。そのため植物細胞への取り込みには問題があると考え、我々は Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナを用いて細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。その結果、GA 投与後数分で細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観察された。一方、不活性型 GA の GA<sub>9</sub>-Me の投与では Ca<sup>2+</sup>濃度変化は認められなかった。これらの結果は活性型 GA 特異的に Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が起こり、しかもそれは DELLA の分解よりも明らかに早いことを示している。GA は DELLA の分解を介さず Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることが示唆された。GA 信号伝達では DELLA の分解がスイッチと考えられてきた。本研究で得られた結果は DELLA に依存しない未知の GA 信号伝達経路の存在を示唆しており、興味深い。今後はすべての DELLA を欠損した五重変異体やすべての GA 核内受容体を欠損した三重変異体などを用いて GA 信号伝達経路における Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の経路を明らかにしてゆく予定である。

②DELLA と相互作用する GAF1 の機能解析  
DELLA は DNA 結合領域をもたず、転写における機能は不明であった。我々は DELLA は酵母内で転写促進活性を示すことなどから、DELLA は植物細胞内でも転写促進の機能を有していると予想した。実際に一過性の発現系による解析で、GAF1 による *AtGA20ox* の転写活性化は DELLA により著しく促進された。したがって DELLA は PIF などの転写因子と結合し機能を抑制するだけでなく転写のコアクティベーターとして機能すると考えられた。クロマチン免疫沈降法による解析の結果、GAF1 は *AtGA20ox* と *in vivo* において結

合していることが明らかになった。また BiFC 法と免疫沈降法による解析の結果、GAF1 と DELLA の結合は GA によって制御されていることが明らかになった。

GAF1 には相同性の高い遺伝子 GAF2 が存在しており *gaf1* の表現型は穏やかである。そこで *gaf1 gaf2* の二重変異体を作製して解析したところ、半矮性の表現型を示すことが明らかになった。GA 欠損変異体 *gal-3* は矮性をしめすが、GA 投与により表現型が回復する。しかし、*gaf1 gaf2* 二重変異体は GA を投与しても成長の回復が認められなかった。この結果は *gaf1 gaf2* 二重変異体は GA 感受性が低下していることを示唆している。一方、GAF1 過剰に発現する形質転換体は、野生型植物に比べて顕著に背丈が高く、GA を投与されたかのような形質を示し、GA 阻害剤に耐性を示した (図)。



GAF1OX Wt  
(図) GAF1 過剰発現体は GA 阻害剤に耐性を示す。

これらの結果は GAF1 がこれまで知られていなかったメカニズムにより GA 信号伝達において重要な役割を果たしてい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 8 件)

1. Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2011) The mechanism of substrate recognition of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases. *Plant Signal Behav.* **6**, 924 - 926. 査読有.
2. Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Matushita, A., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2011) bZIP transcription factor RSG controls the feedback regulation of *NtGA20ox1* via intracellular localization and epigenetic mechanism. *Plant Signal Behav.* **6**, 26-28. 査読有.

3. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2010) Alteration of substrate specificity: The variable N-terminal domain of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase is important for the substrate recognition. *Plant Cell* **22**, 1592-1604. 査読有.
  4. Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2010) The transcription factor RSG regulates negative feedback of *NtGA20ox1* encoding GA 20-oxidase. *Plant J.* **62**, 1035-1045. 査読有.
  5. Nakata, M., Yuasa, T., Takahashi, Y. and Ishida, S. (2009) CDPK1, a calcium-dependent protein kinase, regulates transcriptional activator RSG in response to gibberellins. *Plant Signal Behav.* **4**, 372-374. 査読有.
  6. Kusaba, M., Maoka, T. Morita, R. and Takaichi, S. (2009) A novel carotenoid derivative, lutein 3-acetate, accumulates in senescent leaves of rice. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1573-1577. 査読有.
  7. Morita, R., Sato, Y., Masuda, Y., Nishimura, M., and Kusaba, M. (2009) Defect in NON YELLOW COLORING 3, an  $\alpha/\beta$  hydrolase-fold family protein, causes a stay green phenotype during leaf senescence in rice. *Plant J.* **59**: 940-952. 査読有.
  8. Sato, Y. Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A., and Kusaba, M. (2009) Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-Harvesting complex II degradation during senescence in Rice. *Plant J.* **57**: 120-131. 査読有.
- [学会発表] (計 27 件)
1. 大江翔太、伊藤岳、石田さらみ、高橋陽介 ジベレリン信号伝達に関与する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 54 回日本植物生理学会 2013/3/22 岡山大学

2. 中田克, 光田展隆, 高木優, 高橋陽介 JA シグナルを負に制御する bHLH 型転写因子 JAM1 の解析 第 54 回日本植物生理学会 2013/3/22 岡山大学

3. 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 “ジベレリンの転写代謝システム及び成長制御機構の解析” 若手ワークショップ@鬼怒川 (転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム共催) ホテル鬼怒川御苑 2013/1/25

4. 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 “ジベレリンによる DELLA-GAF1 複合体を介した転写調節制御機構の解析” 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ 福岡国際会議場 2012/12/12 招待講演.

5. Fukazawa J, Murakoshi S, Teramura H, Nasuno K, Nishida N, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y, “GAF1, A DELLA interacting protein, regulates gibberellin signaling in Arabidopsis” *Frontiers in plant biology: From discovery to applications* (Nature conference), Ghent Belgium, 2012/10/4

6. 竹尾紘一, 伊藤岳, 高橋陽介 シロイヌナズナの転写因子 VIP1/AtRSG の細胞内局在についての研究 69 回中国四国植物学会 2012/5/12 島根大学 優秀発表賞受賞

7. 森雅彦, 渡邊哲史, 深澤壽太郎, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* のフィードバック制御機構の解析 第 69 回中国四国植物学会 2012/5/11 島根大学

8. 大江翔太, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に関与する  $Ca^{2+}$  依存性タンパク質リン酸化酵素 NtCDPK1 の機能制御の解析 第 69 回中国四国植物学会 2012/5/11 島根大

学

9. 伊藤岳, 安部悠理, 石田さらみ, 高橋陽介 プロテインキナーゼ NtCDPK1 による 14-3-3 の転写因子 RSG への転移モデルの検証 第 53 回日本植物生理学会 2012/3/16 京都産業大学

10. Fukazawa, J., Murakoshi, S., Teramura, H., Nasuno, K., Nishida, N., Yoshida, M., Kamiya, Y., Takahashi, Y. and Yamaguchi, S. (2012) DELLA-GAF1 complex regulates gibberellin signaling in Arabidopsis. Symposium in 53<sup>rd</sup> annual meeting of Japanese society of plant physiologists. Kyoto, Japan, 17<sup>th</sup> March. 招待講演.

11. 高橋陽介 CDPK の基質認識機構と機能制御 日本生化学会シンポジウム 一次代謝と高次制御を結ぶタンパク質アセチル化・メチル化ネットワーク 2011/9/22 国立京都国際会館 招待講演

12. 岡田 佳那子, 伊藤 岳, 高橋 陽介 ジベレリン信号伝達に関与する  $Ca^{2+}$  依存的リン酸化酵素 NtCDPK1 の解析、中国四国植物学会、2011/5/14 香川大学

13. 藤木敬大, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達に関与する転写因子 GAF1 による新たな転写調節モデルの検証、中国四国植物学会、2011/5/14 香川大学

14. 兼外瑞穂, 渡邊哲史, 伊藤岳, 高橋陽介 *AtGA20ox1* のフィードバック制御における転写因子 ATHB31 の機能解析、中国四国植物学会、2011/5/14 香川大学

15. 小野晴香, 渡邊哲史, 高橋陽介 転写因子 GAF1 による *AtGA3ox1* の転写制御機構の解析、中国四国植物学会、2011/5/14 香川大学

16. 竹尾 紘一, 伊藤 岳, 高橋 陽介 シロイヌナズナの転写因子 VIP1/AtRSG の機能解析、中国四国植物学会、2011/5/15 香川大学

17. 渡邊哲史, 伊藤岳, 藤木敬大, 深澤壽太郎, 高橋陽介 転写因子 GAF1 による GA 合成酵素遺伝子の転写制御機構の解析 第52回日本植物生理学会、2011年3月20-22日、東北大
18. Fukazawa, J., Murakoshi, S., Teramura, H., Nasuno, K., Nishida, N., Yoshida, M., Kamiya, Y., Takahashi, Y. and Yamaguchi, S. (2011) Analysis of transcriptional regulation by GAF1 complex in GA signaling. In functional role of the negative regulators in plants. Symposium in 52<sup>nd</sup> annual meeting of Japanese society of plant physiologists. Sendai, Japan, 21<sup>st</sup> March. 招待講演.
19. Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2010) The transcription factor RSG regulates negative feedback of *NtGA20ox1* encoding GA 20-oxidase. 20<sup>th</sup> International conference of Plant Growth Substances (IPGSA), Tarragona (Spain) 28th June - 2nd July 2010
20. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., and Takahashi, Y. (2010) Alteration of substrate specificity: The variable N-terminal domain of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase is important for the substrate recognition. 21<sup>st</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, June 6 - 10, 2010.
21. Nakata, M., Mitsuda, N., Takahashi, Y. and Takagi, M. (2010) Identification of Transcription Factors Involved in Jasmonic Acid Signaling in *Arabidopsis*. DECODE Winter Workshop 2010, Niigata, January 18-20, 2010.
22. Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2010) Alteration of substrate specificity of a protein kinase: The variable N-terminal domain of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase is important for the recognition of the substrate, transcription factor RSG. DECODE Winter Workshop 2010, Niigata, January 18-20, 2010. <<DECODE prize>>
23. Fukazawa, J., Murakoshi, S., Teramura, H., Nasuno, K., Nishida, N., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2010) GAF1, GAI Associated Factor 1, is a novel transcriptional factor regulates GA signaling in *Arabidopsis*. DECODE Winter Workshop 2010, Niigata, January 18-20, 2010.
24. 伊藤岳, 中田克, 石田さらみ, 高橋陽介 プロテインキナーゼの基質特異性の操作: カルシウム依存性プロテインキナーゼ NtCDPK1 の N 末端非保存領域は転写因子 RSG の基質認識において重要である 第51回日本植物生理学会、2010/3/18、熊本大学
25. 安部悠理, 伊藤岳, 石田さらみ, 高橋陽介 GA フィードバック制御に機能するキナーゼ NtCDPK1 のリン酸化部位の解析 第51回日本植物生理学会、2010/3/19、熊本大学
26. Ito, T., Nakata, M., Abe, Y., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2009) The variable N-terminal domain of NtCDPK1 is required for the recognition of the target protein RSG that regulates transcription of GA biosynthetic genes. Plant Biology 2009, Honolulu, Hawaii, July 18-22, 2009.
27. Fukazawa, J., Ishida, S., Nakata, M., Ito, T. and Takahashi, Y. (2009) RSG, a bZIP transcription factor, is involved in the feedback regulation of the GA 20-oxidase gene. TERPNET 2009, 9<sup>th</sup> International meeting Biosynthesis and Function of Isoprenoids. Tokyo, May, 25-29, 2009.
- [図書] (計2件)
1. Takahashi, Y. and Ito, T. (2011) Structure and function of CDPK: A sensor responder of calcium. In Coding and Decoding Calcium Signals in Plants. S. Luan, ed., Signaling and

Communication in Plants 10, 129-146, Berlin:  
Springer-Verlag. DOI:

10.1007/978-3-642-20829-4\_9.

2. 渡邊哲史, 石田さらみ, 高橋陽介 (2010) ジ  
ベレリン応答における遺伝子発現制御 植物  
のシグナル伝達—分子と応答—、119-125、共  
立出版

[その他]

ホームページ

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/PMOLPHYS/t  
akahashi.htm](http://home.hiroshima-u.ac.jp/bio/PMOLPHYS/takahashi.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 陽介 (TAKAHASHI YOHSUKE)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90183855

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

草場 信 (KUSABA MAKOTO)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20370653