

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657040

研究課題名(和文) 受容体複合体再構築系を用いたホルモン輸送体のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening of plant hormone transporters using receptor complexes

研究代表者

瀬尾 光範 (Seo, Mitsunori)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00512435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンは、生長、発生、分化、生殖、ストレス応答など、生活環のあらゆる場面において多岐にわたる生理作用を示す一群の低分子化合物である。これまでに多くの植物ホルモンの生合成、分解、受容、情報伝達に関わる因子が同定されているが、輸送に関わる因子、すなわち輸送体は、オーキシンやアブシシン酸(ABA)などの一部の植物ホルモンに関してしか明らかになっていなかった。本研究では、酵母two-hybridによる受容体複合体再構築系を利用した、ジベレリンの排出輸送体およびジャスモン酸取り込み輸送体の探索系の確立をおこなった。

研究成果の概要(英文)：Plant hormones are a group of bioactive small molecules that regulate various physiological responses throughout life cycles. Many factors involved in the biosynthesis, catabolism, perception and signal transduction of hormones have been identified. However, factors that regulate transport of hormones, namely transporters, have been identified only for some hormones such as auxin and abscisic acid. In the present study, we developed screening systems for gibberellin exporters and jasmonate importers by using modified yeast two-hybrid systems with the receptor complexes.

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：植物ホルモン 輸送体

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは、生体内に非常に低濃度 (10^{-9} ~ 10^{-6} M 程度) で存在し、生長、発生、分化、生殖、ストレス応答など、生活環のあらゆる場面において多岐にわたる生理作用を示す一群の低分子化合物である。植物ホルモンの生理作用は、その化合物の生体内における量に依存している場合が多いことから、生合成および分解 (不活性化) による「植物ホルモンの内生量制御機構」の解明は重要な研究課題である。これと同時に、受容体により植物ホルモンが認識されて、生理応答が引き起こされるまでの「植物ホルモンの情報伝達機構」の解明も、重要な研究課題である。植物ホルモンの生合成、分解、受容、情報伝達に関わる因子の多くが正遺伝学的手法、すなわち突然変異体の発見とその原因遺伝子の同定を起点に明らかにされてきた。一方で、植物ホルモンの「内生量制御」と「情報伝達」の間をつなぐ重要な要因である「輸送」に関しては、正遺伝学的手法が十分に有効でなく、オーキシン (主にインドール-3-酢酸; IAA) の例を除いて、その大部分が不明のままである。同位体標識した植物ホルモンを用いたトレーサー実験や、植物ホルモンを生合成できない突然変異体と野生型植物との間における接ぎ木実験等から、多くの植物ホルモンが植物体内を移動可能であることが報告されている。しかしながら、IAA の例を除いては、輸送の生理的意味や積極的な輸送制御機構の有無さえも、ほとんど明らかになっていなかった。

IAA 以外の植物ホルモンの輸送に関する突然変異体が同定されていない原因としては、複数の類似した遺伝子による機能重複性が考えられる。また、植物ホルモンの輸送に異常を持つ突然変異体が、生合成や情報伝達に関連した突然変異体とは異なる特殊な表現型を示すために、既知の植物ホルモンに関連した突然変異体として認識されていない可能性も考えられる。一方で、近年のゲノム情報や突然変異体や完全長 cDNA などのデータベース・バイオリソースの充実に伴い、逆遺伝学的手法による遺伝子機能解析が可能になってきている。しかしながら、ゲノム上に多数存在する輸送体遺伝子 (例えば、シロイヌナズナの場合には既知の輸送体に類似したタンパク質をコードする遺伝子が 800 以上存在し、またそれらと相同性の無い膜局在性タンパク質をコードする遺伝子を含めるとその数は約 6,500 にのぼるといわれている。) のなかから、植物ホルモンの輸送体候補を絞り込む作業は容易ではない。このような状況の中、研究代表者は植物ホルモン依存的な受容体複合体再構築系を利用した酵母 two-hybrid 系において、酵母内で発現させたタンパク質の植物ホルモン輸送活性を検出することにより、植物ホルモン輸送体を、スクリーニング方法を開発した。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者が開発した、植物ホルモン・アブシシン酸 (ABA) 受容体複合体再構築系を利用した改変酵母 two-hybrid スクリーニング法において、受容体複合体をジベレリン (GA)、ジャスモン酸 (ジャスモノイルイソロイシン; JA-Ile)、IAA 等の系に置き換えることで、これらの植物ホルモンの輸送体を、網羅的にスクリーニングすることを目的とした。

3. 研究の方法

近年、シロイヌナズナにおいて同定された ABA 受容体 PYR/PYL/RCAR ファミリー (PYR) は、ABI1 に代表される一群のプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) と ABA 依存的に複合体を形成することによって、下流の情報伝達を制御することが報告された。PYR と PP2C の ABA 依存的な複合体の形成は、酵母細胞内で再構築することが可能であり、two-hybrid 系を用いてその複合体の再構築をモニターすることができる。通常、酵母には ABA 輸送体が存在しないため、培地中の ABA は拡散などによって細胞内に取り込まれると考えられる。そのため、比較的低濃度の ABA を含む培地上では酵母内での PYR と PP2C の複合体が形成されないが、比較的高濃度の ABA を含む培地上では両者が複合体を形成する。PYR に特定の塩基配列 (UAS) を認識する DNA 結合ドメイン (DB) を、PP2C に GAL4 転写活性化ドメイン (AD) をそれぞれ付加し、UAS の下流でヒスチジン合成遺伝子 HIS3 の発現が制御される two-hybrid 系においては、比較的低濃度の ABA を含む選択培地上では酵母が生育できないが、比較的高濃度の ABA を含む選択培地上では酵母が生育可能になる。この系において、ABA を細胞内に積極的に取り込む輸送体を発現させた場合、通常相互作用が起きない低濃度の ABA 存在下でも細胞内 ABA 濃度が十分に高まり、PYR と PP2C の複合体形成が引き起こされ、選択培地上で酵母が生育可能になると期待される。また、これとは逆に、ABA を細胞外に排出する輸送体を発現させた場合には、通常 PYR と PP2C が複合体を形成する比較的高濃度の ABA 存在下での酵母の生育が阻害されると予想される。このような酵母 two-hybrid 系において、発現ベクターに組み込んだ cDNA ライブラリをランダムに形質転換し、低濃度の ABA 存在下での生育を可能にするクローンを選抜することで、新奇の ABA 取り込み輸送体を同定することに成功した。ABA の場合と類似して、GA、JA-Ile、IAA に関しても、それぞれの植物ホルモンに依存的に受容体が相互作用因子との複合体を形成することが知られている。本研究においては、ABA 受容体複合体を GA、JA-Ile、IAA のそれと置き換えることにより、これらの植物ホルモンの新奇輸送体を網羅的にスクリーニングする。

4. 研究成果

研究代表者は本研究開始までに、ABA および GA 取り込み輸送体のスクリーニングをおこない、それぞれのホルモンに対する輸送活性を示すタンパク質を同定していた。本研究では、JA-Ile、IAA に関して受容体複合体再構築系を利用した取り込み輸送体スクリーニングの適用を検討した。また、GA に関しては、これまでにおこなっていなかった排出輸送体のスクリーニングをおこなった。

(1) JA-Ile 取り込み輸送体スクリーニング法の検討

シロイヌナズナにおける JA-Ile 受容体 COI1 は、SCF 型 E3 コピキチンリガーゼ複合体を構成する F-box タンパク質であり、JA-Ile 依存的に JAZ タンパク質をプロテアソームによる分解へと導く。これまでに、JA-Ile 依存的な COI1 と JAZ の相互作用が、酵母 two-hybrid 系により再構築可能であることが報告されていたため、本研究においても同様の実験系の確立を試みた。シロイヌナズナには複数の JAZ タンパク質が存在するが、COI1 との JA-Ile 依存的な相互作用がすでに報告されている JAZ1 を用い、両者の JA-Ile 依存的相互作用を検討した。本実験には一般的な酵母 two-hybrid 用ベクター系を用いたが、100 マイクロ M と比較的高濃度の JA-Ile 存在下においても、COI1 と JAZ1 の JA-Ile 依存的な相互作用を検出することができなかった。この原因として、JAZ1 が COI1 との JA-Ile 依存的な相互作用により、酵母内でのプロテアソーム系によって分解を受ける可能性を考えた。そのため、プロテアソームによるタンパク質分解に関与すると予想されるドメインに、欠質やアミノ酸置換などの変異を導入した COI1 タンパク質を作成したが、いずれの場合にも JAZ1 との JA-Ile 依存的な相互作用は検出されなかった。さらに、JAZ1 以外に COI1 との JA-Ile 依存的相互作用が報告されている JAZ3 および JAZ10 を用いた結果、JAZ3 に関しては 100 マイクロ M の JA-Ile 存在下で COI1 と相互作用することが確認できた。

研究代表者が同定した ABA 輸送体は、NRT1/PTR FAMILY (NPF) と呼ばれるタンパク質である。これまでに、シロイヌナズナに存在する 53 の NPF タンパク質の中には、ABA 以外に GA や IAA などの植物ホルモンに対して輸送活性を示すメンバーが存在することが、研究代表者および他の研究グループによって報告されている。このことから、同様にシロイヌナズナに存在する 53 の NPF タンパク質のなかに、JA-Ile を基質とするものが存在すると予想した。これまでに cDNA をクローン化した 43 の NPF を、上記の COI1 と JAZ3 の JA-Ile 依存的な相互作用を検出する酵母 two-hybrid 系において発現させ、導入された NPF タンパク質の JA-Ile 輸送活性を検討した。その結果、数種の NPF に関しては、通常 COI1

と JAZ3 の相互作用を引き起こさない 10 マイクロ M の JA-Ile 存在下においても、両者の相互作用を有為に誘導することができることから、JA-Ile を細胞内に取り込む活性を有すると考えられた。このことから、本研究で構築した COI1 と JAZ3 を用いた酵母 two-hybrid 系を含む酵母においてランダムに cDNA ライブラリを発現させ、ごく低濃度の JA-Ile 存在下で両者の相互作用を誘導するクローンを選抜することで、新たな JA-Ile 輸送体のスクリーニングが可能であると考えられる。

(2) IAA 取り込み輸送体スクリーニング法の検討

IAA に関しては、PIN、AUX1、ABCB など、すでに複数の輸送体が同定されているが、本研究で確立を目指すスクリーニングにより、新たな輸送体を発見できる可能性は十分にあると考えられる。F-box タンパク質である TIR1/AFB が、転写抑制因子である Aux/IAA タンパク質と IAA 依存的に相互作用し、これにより Aux/IAA がプロテアソームによる分解を受けることが、IAA の受容と情報伝達の初期反応であることが知られている。TIR1/AFB と Aux/IAA の IAA 依存的な相互作用が、酵母 two-hybrid 系を用いて再構築可能であることが報告されているため、本研究においても同様の実験系の確立を試みた。複数存在する TIR1/AFB および Aux/IAA のうち、IAA 依存的な相互作用が比較的強いとされている TIR1 に対して IAA1、IAA3、IAA7 それぞれの組み合わせを用い、IAA 依存的な相互作用の検出を試みた。上記の COI1 と JAZ3 の JA-Ile 依存的な相互作用を検出した一般的な酵母 two-hybrid 系を用いたが、50 マイクロ M 程度の比較的高濃度の IAA 存在下においても、両者の IAA 依存的な相互作用を検出することができなかった。この原因として、COI1 と JAZ1 を用いた場合と同様に、Aux/IAA が TIR1/AFB との IAA 依存的な相互作用により、酵母内でのプロテアソーム系による分解を受ける可能性を考えた。しかしながら本研究の期間内では、それぞれのタンパク質に変異を導入する等の改良を検討することが出来ず、受容体複合体再構築系を用いた IAA 輸送体の活性検出系を確立するに至らなかった。

(3) GA 排出輸送体のスクリーニング

これまでに、シロイヌナズナにおける GA 受容体 GID1a と DELLA タンパク質である GAI の GA 依存的な相互作用を検出する酵母 two-hybrid 系を利用することで、GA 取り込み輸送体のスクリーニングをおこなっていた。従って、本研究においては、新たに GA 排出輸送体のスクリーニングを計画した。GA 排出輸送体を効率的にスクリーニングするには、ネガティブな選択マーカーを利用することが有効であると考えた。つまり、通常の酵母 two-hybrid 系に

においては、GID1aとGAIが相互作用した場合に酵母が選択培地上で生育可能になる。このため、GA取り込み輸送体を発現する酵母においては、比較的低濃度のGA存在下でGID1aとGAIの相互作用が誘導され、その結果選択培地上で生育可能なる、という指標によって輸送体の活性が検出される。しかし、GA排出輸送体を発現する酵母においては、輸送体を介さずに拡散等で細胞内に取り込まれたGAによって引き起こされるGID1aとGAIの相互作用を打ち消す、すなわち比較的高濃度のGA存在下での酵母の生育が阻害されるという形で、輸送活性が検出される。そのため、一般的なポジティブな選択マーカーを用いて、ネガティブな形質を指標とするスクリーニングをおこなうことは非効率的である。そこで、これまでとは異なる選択マーカーを使用することを検討した。酵母細胞内において、5-fluoroorotic acid (5-FOA) は、URA3の働きによって毒性のある5'-fluoro-uridine monophosphateに変換される。このため、5-FOAを含む培地上でURA3を選択マーカーとして用いれば、GA排出輸送体のポジティブなスクリーニングが可能になる。つまり、-FOAを含む培地上でURA3を選択マーカーとして用いた場合には、GA排出輸送体を発現する酵母は比較的高濃度のGA存在下においてGID1aとGAIの相互作用が起こりにくく、GA排出輸送体を発現しない酵母に比べて生育が良くなると考えられる。そこで、GID1aとGAIがGA依存的に相互作用することにより、URA3の発現を誘導する酵母two-hybrid系を作成した。しかしながら、通常GID1aとGAIの相互作用を、輸送体を発現しない場合においても十分に誘導できる1マイクロMのGA存在下においても、5-FOAによって酵母の生育が阻害されることが確認できなかった。さらに、GAを細胞内に取り込む活性が確認されていたNPFタンパク質(NPF4.1)を発現させた場合においても、GA存在下での5-FOAによる生育阻害効果が確認できなかった。これらのことから、ネガティブな選択マーカーを用いたポジティブなGA排出輸送体のスクリーニングは困難であると判断した。そのため、一般的なポジティブな選択マーカー(HIS3)を用いて、GA排出輸送体のスクリーニングを開始した。まず、GID1aとGAIのGA依存的相互作用を検出するtwo-hybrid系を含む酵母において、発現ベクターに組み込んだシロイヌナズナcDNAライブラリをランダムに導入し、一回の実験あたり1000程度の形質転換体を得た。得られた形質転換体を、0.5マイクロMのGAを含む選択培地、およびGAを含まない選択培地に移植し、GAを含む培地上のみで生育に阻害が見られる形質転換体を選抜した。合計約12,000の独立の形質転換体について一次選抜をおこない、二次選抜を経て72の陽性クローンを得た。得ら

れたクローンから直接PCRにより、発現ベクターに組み込まれたcDNAを増幅し、その塩基配列を決定した。そのなかには、輸送体とは関連しない機能を持つことがすでに報告されているタンパク質をコードするものが多数存在したが、明らかに輸送体としての機能が予想される既知のタンパク質をコードする遺伝子が1種、それ以外に膜局在が予想されるタンパク質をコードする遺伝子が10種類存在した。これらについてはGA取り込み輸送体として機能する可能性があると考え、新たにmRNAからcDNAをクローン化し、発現ベクターに組み込んだ後に酵母内で発現させ、GID1aおよびGAIのGA依存的な相互作用に対する影響を検討した。しかしながら、クローン化した11種の全ての候補に関して、GA存在下でGID1aとGAIの相互作用を阻害する効果は確認が確認できず、GA排出機能体としては機能しないと結論した。

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1件)

清水崇史、瀬尾光範. 輸送体研究における新たなアプローチ、植物の生長調節、査読無(印刷中). <http://www.jscrp.jp/category/book>

[学会発表](計1件)

清水崇史、千葉康隆、宮川慎也、菅野裕理、小柴共一、神谷勇治、瀬尾光範、シロイヌナズナNRT1/PTR FAMILY (NPF) のJA-Ile輸送への関与、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月20日、富山。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾 光範 (SEO, Mitsunori)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00512435