

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840092

研究課題名(和文)シロイヌナズナの重力屈性シグナルに関与するDGEの分子機能解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of DGE involved in gravitropic signaling in Arabidopsis

研究代表者

谷口 雅俊(Taniguchi, Masatoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：10467475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナの重力屈性時に起こる重力刺激の感受から組織の偏差成長に至るシグナル伝達機構に関わる分子メカニズムについては、ほとんどわかっていない。これまでの研究によりDGEs遺伝子は、重力屈性シグナルに関与していることを示してきた。しかし、これらの遺伝子のコードするタンパク質の分子機能については全くわかっていない。そこで、それらの相互作用タンパク質の機能解析を行うことにより、DGEsタンパク質の機能を間接的に明らかとすることを目的とした。本研究において、DGEsと相互作用タンパク質の相互作用が重力屈性に重要であることがわかったとともに、分子機能について参考になる情報が集まった。

研究成果の概要(英文)：In Arabidopsis, gravitropic response are mediated by signal transduction from gravity perception to asymmetric organ growth. The molecular mechanism of gravitropic signal transduction is not fully understood. I have revealed that DGE genes are involved in gravitropic signaling process. However little has been reported on the protein molecular mechanism of their coding proteins. So I tried to elucidate their molecular mechanism by analyzing the interacting proteins of DGE proteins. In this study, I have revealed that protein interaction of DGEs and their interacting proteins is necessary for gravitropic response, and we also have obtained some information about the molecular mechanism of DGE proteins.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：重力屈性 分子間相互作用 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

重力屈性とは、植物が地上部を重力とは反対方向に、地下部を重力と同じ方向に伸長させる現象である。この現象については、重力感受後の器官内に生じるオーキシン（植物ホルモン）濃度の偏差分布が器官を偏差成長させていることが知られているのみで、最も初期のステップである重力感受に関わる分子機構はほとんど分かっていない。そこで申請者は、シロイヌナズナの花茎における新奇重力屈性遺伝子の単離を行うため、重力感受組織である内皮の形成に関わる転写因子の欠損変異体（*sgr1/scr*、*sgr7/shr*）および機能低下変異体（*eal1*）を用いて重力感受細胞内で起こるイベントに関与する遺伝子の探索を行った。これら変異体の花茎において共通して発現が低下している DGE（*DOWN-REGULATED GENE IN EAL1*）遺伝子群の一つである DGE1 は、イネの重力屈性に関与する OsLAZY1 と相同性を示し、シロイヌナズナにおいても花茎重力屈性に関与すること分かった。さらに、DGE 遺伝子群には、DGE1 と C 末端の 14 アミノ酸において高い相同性を示す機能未知のタンパク質をコードする遺伝子 DGE2 が含まれていた。また、シロイヌナズナには、DGE2 と高い相同性を有するタンパク質をコードする DTL（*DGE TWO-LIKE GENE*）も存在した。これらの 3 つの遺伝子について機能欠損 T-DNA 挿入株を入手し多重変異体の解析を行った結果、DGE1、DGE2 および DTL（DGEs）は花茎および胚軸に、DGE2 および DTL は主根において互いに協調して重力屈性に関与していることが示された。また、DGEs は花茎および主根の感受細胞において、重力感受からオーキシンの偏差分布にかけてのシグナル伝達の中核を担っていることも明らかとなった（現在投稿準備中）。しかし、それらタンパク質に分子機能の手掛かりとなる既知のドメイン構造や細胞内局在に関わるシグナル配列がみられない為、直接分子機能を調べるには限界がある。そこで、DGEs の相互作用タンパク質を同定し、相互作用タンパク質の予測される機能から DGEs の分子機能および重力屈性シグナルにおける位置付けの手掛かりを得ることとした。まず、タグを付加した DGE2 および DTL をそれぞれ過剰発現させた植物体の粗抽出液を用いて免疫共沈降タンパク質のスクリーニングを行った。同時に DGE1、DGE2 および DTL をそれぞれ bait に用いた Yeast Two-Hybrid スクリーニングをシロイヌナズナの cDNA ライブラリーを用いて行った。その結果、興味深いことを行ったすべてのスクリーニングにおいて共通して RCC1（Regulator of Chromosome Condensation）ファミリータンパク質が合計 4 種類含まれていた（DIRs; DGE1, DGE2 and DTL Interacting RCCs）。

これら 4 種の DIRs は、RCC1 モチーフ以外に植物特融のタンパク質ドメイン構造をもち、系統分類上同一クレードに存在しておりお互いに類似した分子機能を有していると考えられる。また、タンパク質ドメイン構造として膜脂質 PI3P との結合に関わる FYVE ドメイン、およびホモ二量体もしくはヘテロ二量体形成に関わる BRX ドメインを有している。申請者の予備実験として、(1) DGEs の 14 アミノ酸は RCC ファミリータンパク質と Yeast Two-Hybrid 解析において相互作用する、(2) 14 アミノ酸を欠いた DGEs は DGEs の T-DNA 挿入多重変異体の重力異常を相補できない、といった 2 点を明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内輸送に着目し相互作用タンパク質として得られた DIRs（DGE1, DGE2 and DTL Interacting RCCs）がどのように重力屈性に関与しているのかを調べ、それらタンパク質の分子機能の解明を行う。具体的には、(1) DIRs の T-DNA 挿入遺伝子欠損植物体の主茎、胚軸および主根における重力屈性の解析、(2) DGEs の 14 アミノ酸と DIRs との相互作用部位の詳細な解析および DIRs ファミリー間の相互作用の確認、(3) DIRs プロモーター融合 GUS 形質転換体を用いた DIRs の詳細な組織発現部位の解析、(4) GFP 融合型 DIRs の細胞内局在の解析と DGEs との細胞内共局在の解析である。これらの実験により、DIRs が重力屈性に関与しているのかを明らかにするとともに、重力感受細胞において DGEs とどのように相互作用をして機能しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、DGEs の相互作用タンパク質として得られた 4 種の RCC1 タンパク質ファミリー；DIRs の重力屈性への関与を調べるとともに DGEs と DIRs の相互作用に狙いをつけた解析を行った。また、本研究ではシロイヌナズナの環境型コロニアを用いた。

(1) DIRs をコードする遺伝子の機能欠損植物の作出および多重変異体を作成したうえでの表現型解析

DIRs の機能欠損植物選出の為、T-DNA 挿入種子をストックセンターより取得し、挿入部の再確認および遺伝子発現の状態を確認した。4 種の DIRs についてはシロイヌナズナにおいて重複した機能をもっている可能性が考えられたので、多重変異体の作出も行った。作出した DIRs の機能欠損植物（多重変異体も含む）の主根の重力屈性の測定を行った（主茎および胚軸については、行うことができなかった）。

(2) DGEs と DIRs の詳細な相互作用部位の

詳細解析

DGEs をベイトにした Yeast Two-hybrid (Y2H) スクリーニングにおいて得られた DIRs クローンの配列は、DIRs の FYVE ドメインより後半の C 末端側半分のみであった。また、申請者の先行研究により DGEs の C 末端の 14 アミノ酸は、そのような DIRs の C 末端側半分と Y2H 解析により相互作用することをすでに明らかとしている。そこでさらに DIRs の C 末端半分のどの部分で DGEs と相互作用を行うのかを BRX ドメインとそれ以外の部分に着目して行った。

(3) DIRs のシロイヌナズナにおける組織発現部位の観察

DIRs の開始コドンから上流に存在する遺伝子(開始コドンもしくは終始コドン)までをプロモーター領域としてクローニングし、その下流に GUS 遺伝子を融合させたコンストラクトを作製し、野生型植物背景の形質転換体を作出した。作出した DIRs のプロモーター GUS 形質転換体の GUS 染色パターンを生育ステージや組織ごとに観察を行った。また、適宜必要な場合には樹脂包埋した組織の切片を作製し、詳細な発現部位についても観察を行った。

(4) DIRs の細胞内局在および DGEs と DIRs の共局在を観察するための DIRs の GFP 融合型遺伝子を導入した形質転換体の作製および観察(細胞系を用いた一過的発現による細胞内局在の観察)

DGEs については、赤色蛍光タンパク質である mCherry 融合型遺伝子を導入した形質転換体をすでに作出している。そこで、DGEs と DIRs の共局在を観察のために 4 種の DIRs には、赤色とは色の異なる緑色蛍光タンパク質である GFP を融合させて形質転換体を作出した。発現に用いるプロモータは、DIRs の開始コドン上流配列を用いた。形質転換に用いる植物体は、野生型および DGEs 多重変異体植物を用いた。蛍光タンパク質 GFP と融合させた DIRs (DIRs-GFP) の細胞内局在の観察を行った。

4. 研究成果

(1) DIRs をコードする遺伝子の機能欠損植物の作出および多重変異体を作成したうえでの表現型解析

DIRs の単一欠損変異体を観察したところ、特に目立った表現型を観察することはできなかった。しかし、三重および四重変異体において顕著な形態異常が観察された。また、二重変異体において主根の重力屈性が異常になることが明らかとなった。結果が前後するが、本結果はの原因遺伝子は根の感受細胞であるコルメラ細胞で発現している遺伝子であったことから、DGEs と非常に近い場所で機能している可能性が考えられてた。

(2) DGEs と DIRs の詳細な相互作用部位の詳細解析

Yeast Two-hybrid 解析により、DGEs と DIRs の詳細な相互作用部位の解析を行ったところ、DGEs の C 末端側の 14 アミノ酸と DIRs の C 末端付近に存在する BRX ドメインのみで十分に相互作用することが明らかとなった。また、DGEs の C 末端 14 アミノ酸と完全長の DIRs の相互作用について同様に確認を行ったところ、相互作用が確認されないことが分かった。このことから、酵母内においては完全長の DIRs は BRX 以外のドメインにより相互作用を阻害するような構造をとっていることが考えられ、DGEs と相互作用には DIRs の構造変化を誘導するシグナルが必要である可能性が考えられた。

(3) DIRs のシロイヌナズナにおける組織発現部位の観察

DIRs の発現部位の観察を行ったところ、前述にあるように、2 つの遺伝子については、主根の重力感受細胞であるコルメラ細胞で発現していることが分かった。根以外の部分においては、重力屈性との関与については分からないが、地上部においても発現している部位が観察されている。今後、地上部についても発現と重力屈性との関与についてさらなる解析の必要がある。

(4) DIRs の細胞内局在および DGEs と DIRs の共局在を観察するための DIRs の GFP 融合型遺伝子を導入した形質転換体の作製および観察(細胞系を用いた一過的発現による細胞内局在の観察)

DIRs の細胞内局在の解析のために作出した GFP 融合型 DIRs 発現形質転換体の観察を行ったところ、4 つの遺伝子のうち 1 つの遺伝子導入系統でしか蛍光が観察されていない。観察された GFP 融合型 DIR は、コルメラ細胞において細胞質に均質に存在しているようであった。このことは、DGEs のコルメラ細胞での局在が細胞膜近傍であることとは完全に一致しない。そのことから、タンパク質間相互作用している分子は、ごく一部である可能性がうかがえた。前後するが、本 GFP 融合 DIR タンパク質は、欠損変異体をコンプリできることから、機能的であることが分かっている。

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 1 件)

M. Taniguchi, M. Nakamura, M. Tasaka, MT. Morita (2014) Identification of gravitropism response indicator genes in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant Signal Behav*, 9, e29570. doi: 10.4161/psb.29570. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

M. Taniguchi, K. Baba, A. Yuasa, M. Tasaka, M. T. Morita. *DGE1*, *DGE2* and *DTL* genes are involved in gravity signaling in gravity sensing cells of Arabidopsis. 8th Plant Biomechanics International Conference (Nov. 30-Dec. 4, Nagoya, JAPAN)

M. Taniguchi, K. Baba, A. Yuasa, M. Tasaka, M. T. Morita. Functional analysis of *DGE1*, *DGE2* and *DTL* genes involved in gravitropism in Arabidopsis thaliana. The 26th International Conference on Arabidopsis Research (Jul. 05-09, Paris, FRANCE)

谷口雅俊、平野良憲、鈴木加奈子、箱嶋敏雄、森田（寺尾）美代。シロイヌナズナの DLLs-RLDs タンパク質間相互作用を介した重力シグナリング分子機構の解明、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~per/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 雅俊 (TANIGUCHI, Masatoshi)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・研究員

研究者番号：10467475

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし