

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24118004

研究課題名(和文)植物の成長制御エンハンソームの解析

研究課題名(英文)Analysis of enhanceosome that regulates plant growth

研究代表者

高橋 陽介(Takahashi, Yohsuke)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：90183855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物の主要な成長抑制因子DELLAによる転写制御機構を解析した。ジベレリン(GA)はDELLAの分解を介して転写活性化因子の抑制解除により転写を促進するとされてきた。しかしGAによる転写への影響は主に抑制的であるので、未知のメカニズムの存在が示唆された。我々はDELLAが転写因子GAF1のコアクティベーターとして機能すること、GAF1はコリプレッサーTPRとも結合することを明らかにした。GAF1転写促進複合体はGA刺激を受けると転写抑制複合体に機能転換する。すなわちDELLAはタイトレーションとコアクティベーションの二つの機能でGAに関連した二つの遺伝子群を統括制御しているのである。

研究成果の概要(英文)：DELLA proteins are major plant growth repressors. The mechanism of Gibberellin (GA)-dependent transcription has been explained by DELLA-mediated titration of transcriptional activators and their release through the degradation of DELLAs in response to GA. However, the effect of GA on genome-wide expression is predominantly repression, suggesting the existence of unknown mechanisms of GA function. In this study, we identified a DELLA binding transcription factor, GAF1. Furthermore, we found that GAF1 interacts with the corepressor TPR and that DELLAs and TPR act as coactivators and a corepressor of GAF1, respectively. GA converts the GAF1 complex from transcriptional activator to repressor via the degradation of DELLAs. These results indicate that DELLAs turn on or off two sets of GA-regulated genes via dual functions, namely titration and coactivation, providing a mechanism for the integrative regulation of plant growth and GA homeostasis.

研究分野：植物生理・分子

キーワード：植物 発現制御 信号伝達

1. 研究開始当初の背景

光エネルギーを化合物に転換することで、地球上における他のすべての生命を支える植物は、自らは移動せず、大地に根を張り、外部環境の激しい変化を克服して生育する。周囲の環境変化に適応し太陽光の捕捉効率を最適化するために、柔軟に形態を変化させる機構は陸上植物の繁栄に必須であった。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は外部環境との関連が深く、光や温度はGA生合成酵素遺伝子の発現に影響を与える。GA信号伝達のスイッチである DELLA タンパク質は、GA信号伝達の負の制御因子として同定されたが、むしろ成長抑制因子として捉えた方がより正確である。たとえば塩ストレスや植物ホルモンABAはDELLAの安定化により成長を抑制する。GAはDELLAのコビキチン化による分解を介して成長を促進する。したがってDELLAは複数の信号伝達経路のノード(node, 節点)である。

胚軸伸長において光は抑制的であり、GAは促進的である。光は受容体のフィトクロムを介して転写因子PIFを分解し、胚軸伸長を抑制する。一方DELLAはPIFと結合しその機能を抑制している。GAはDELLAの分解によりPIFの抑制を解除し胚軸の伸長を促進する。しかしPIFが分解される明条件においてもGAは明確な伸長成長を引き起こすので、PIF以外に、より重要な未知のDELLAの標的タンパク質が存在しているはずである。

2. 研究の目的

本研究では信号伝達のクロストークの分子実体を、転写因子複合体の再構成と捉え、未知のDELLA結合タンパク質を同定し転写制御における複合体の機能と動態の解析を目的とした。

3. 研究の方法

改変型酵母 two-hybrid 法を用いて DELLA

と特異的に相互作用する転写因子を同定する。その転写因子とDELLAの複合体に含まれる構成因子を明らかにし、GAなどの刺激が転写制御複合体の構成に与える影響を調べる。転写因子の標的遺伝子を次世代シーケンサーを用いたChIP-seqとRNA-seq法により同定する。標的遺伝子の欠損変異体の表現型を解析し、植物体における転写制御複合体の機能を明らかにする。

4. 研究成果

これまでGAによる転写制御はGAがDELLAによる転写活性化因子の抑制を解除し転写を促進するモデルで説明されてきた。しかしこのモデルはGAによる転写への影響は主に抑制的であるというゲノムワイドの解析結果と矛盾している他、GA生合成酵素遺伝子のフィードバック制御の分子機構を説明出来なかった。我々はDELLAが転写因子GAF1のコアクティベーターとして機能することを見出した。GAF1は植物のコリプレッサーTPRともin vivoにおいて結合することを明らかにした。さらにGAF1-DELLA転写活性化複合体はGA刺激を受けるとGAF1-TPR転写抑制複合体に機能転換することを明らかにした。GA生合成酵素遺伝子上のGAF1結合配列に変異を導入すると植物体

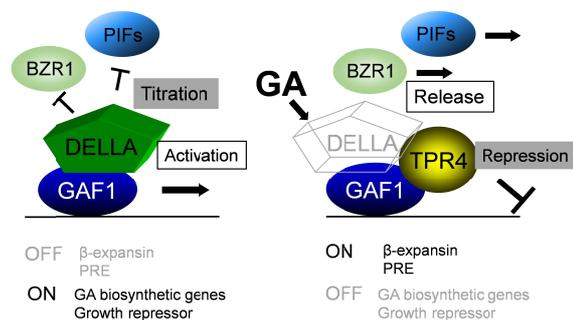


図1. DELLAによるGA依存的な正と負の転写制御モデル

GAの内生量が低い時DELLAはPIFなどの転写活性化因子と結合しDNAへの結合を阻害すると同時にGAF1と複合体を形成しGA生合成遺伝子などの転写を促進する。GAの内生量が増大すると、DELLAが分解されPIFなどは伸長成長に関与する遺伝子の転写が促進され、GAF1-TPR複合体によりGA生合成遺伝子などの転写が抑制される。

における GA 生合成酵素遺伝子のフィードバック制御が失われた。これらの結果は従来の GA による転写制御モデルの矛盾を一挙に解決するものである。すなわち DELLA はタイトレーションとコアクティベーションの二つの機能で GA に関連した二つの遺伝子群の一方を OFF に、他方を ON に、同時に統括制御しているのである (図 1)。

次に GAF1 複合体の花成における標的遺伝



図 2. GAF1 の標的遺伝子 ALP1059 の欠損変異体の表現型

GAF1 の標的遺伝子 ALP1059 が欠損した変異体は GA が投与されたかのような徒長形質を示し、花成も促進されていた。ALP1059 は成長と花成の抑制因子であり、GA は ALP1059 の転写抑制を介して成長と花成を促進していると考えられた。

子を探索した。花成は栄養成長から生殖成長への転換であり、植物の生活環において最も重要な局面の一つである。花成は 4 つの経路により制御されていると考えられており、その一つが GA 経路である。GAF1 の過剰発現体では花成の促進が、*gaf1 gaf2* 二重変異体では逆に花成の抑制が観察された。GA 刺激を受けると GAF1 は転写抑制複合体を形成するので、GAF1 は負の花成制御遺伝子の転写抑制を介して花成を促進すると予想された。花成制御における GAF1 の標的遺伝子を同定するために GAF1 の発現誘導後の RNA-seq と ChIP-seq を行った。GAF1 の標的遺伝子と考えられる ALP1059 (仮名) の機能喪失型変異体を取得して、その表現型を解析した。

ALP1059 の欠損により、植物体は GA を投与されたかのような徒長形質を示し、さらに花成が促進されていた。ALP1059 は GA による成長と花成の制御に関与する遺伝子と考えられた。

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 12 件)

1. Ito, T., Ishida, S., Oe, S., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2017) Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca^{2+} -dependent protein kinase1. *Plant Physiol.* in press. 査読有
2. Fukazawa, J., Mori, M., Watanabe, S., Miyamoto, C., Ito, T. and Takahashi, Y. (2017) DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of *GA20ox2* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* in press. 査読有.
3. Kohzuma, K., Sato, Y., Ito, H., Okuzaki, A., Watanabe, M., Kobayashi, H., Nakano, M., Yamatani, H., Masuda, Y., Nagashima, Y., Fukuoka, H., Yamada, T., Kanazawa, A., Kitamura, K., Tabei, Y., Ikeuchi, M., Sakamoto, W., Tanaka, A., and Kusaba, M. (2017) The non-Mendelian green cotyledon gene in soybean encodes a small subunit of photosystem II. *Plant Physiol* **55**:1763-71. DOI: 10.1093/pcp/pcu107 査読有.
4. Fukazawa, J. Ito, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2015) Binding of GID1 to DELLAs promotes dissociation of GAF1 from DELLA in GA dependent manner. *Plant Signal Behav.* **10**, e1052923. DOI:10.1080/15592324.2015.1052923 査読有.
5. Ito, T. and Takahashi, Y. (2015) Phosphatase protection assay: 14-3-3 binding protects the phosphate group of RSG from λ protein

- phosphatase. *Bio-Protocol*. **5**, e1395. bio-protocol.org/e1395. 査読有.
6. Ueda, H. and Kusaba, M. (2015) Strigolactone regulates leaf senescence in concert with ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **169**:138-147. 査読有.
7. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2014) Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode. *Plant Signal Behav.* **9**, e977721. DOI: 10.4161/15592324.2014.977721 査読有.
8. Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. and Takahashi, Y. (2014) DELLAs function as coactivators of GAI ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of GA homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 2920-2938. DOI: 10.1105/tpc.114.125690 査読有.
9. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2014) Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. *Plant Physiol.* **165**, 1737-1750. DOI: 10.1104/pp.114.236448 査読有.
10. Nakano, M., Yamada, T., Masuda, Y., Sato, Y., Kobayashi, H., Ueda, H., Morita, R., Nishimura, M., Kitamura, K., and Kusaba, M. (2014) A green-cotyledon/stay-green mutant exemplifies the ancient whole-genome duplications in soybean. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1763-1771. DOI: 10.1093/pcp/pcu107 査読有.
11. Kusaba, M., Tanaka, A. and Tanaka, R. (2013) Stay-green plants: what do they tell us about the molecular mechanism of leaf senescence. *Photosynth. Res.* **117**: 221-234. DOI: 10.1007/s11120-013-9862-x 査読有.
12. Yamatani, H., Sato Y., Masuda, Y., Kato, Y., Morita, R., Fukunaga K., Nagamura, Y., Nishimura, M., Sakamoto, W., Tanaka, A. and Kusaba, M. (2013) NYC4, the rice ortholog of *Arabidopsis* THF1, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence. *Plant J.* **74**:652-662. DOI: 10.1111/tpj.12154 査読有.
- [学会発表](計 39件)
1. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン合成酵素遺伝転写制御 第74回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13. 優秀発表賞受賞.
2. 森 亮太, 藤井麻耶, 伊藤 岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 DELLA を介したジベレリンとジャスモン酸のクロトック制御 第74回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13.
3. 大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御 第74回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13. 優秀発表賞受賞.
4. 中村駿志, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ホメオドメインタンパク質によるジベレリン合成遺伝子の転写制御機構の解析 第74回中国四国植物学会 高知大学 2017.5.13.
5. 深澤壽太郎, 大橋由紀, 森亮太, 高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体による新たな標的遺伝子の制御 日本植物生理学会 第58回年会 鹿児島大学 2017.3.17
6. Fukazawa, J., Ito, T., Takahashi, Y. DELLA-GAF1/IDD2 complex regulates gibberellin homeostasis and signaling. 22nd International Plant Growth Substances Association Conference, Toronto, Canada, June 21-25, 2016.
7. 深澤壽太郎, 高橋竜平, 藤井麻弥, 高橋陽介 (2016) DELLA-GAF1 複合体によるジベレリン信号伝達の制御機構 第73回中国四国植物学会 米子コンベンションセンター(鳥取県) 2016.5.15
8. 伊東裕太, 伊藤岳, 高橋陽介 (2016) ジベ

レリンとオーキシンによる茎部の伸長制御機構の解析 第73回中国四国植物学会 米子コンベンションセンター(鳥取県) 2016年5月14日 優秀発表賞受賞

9. 勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2016) GAF1 複合体による GA 生合成酵素遺伝子の転写抑制機構の解析 第73回中国四国植物学会 米子コンベンションセンター(鳥取県) 2016年5月14日 優秀発表賞受賞
10. 伊藤岳, 石田さらみ, 高橋陽介 (2016). カルシウム依存性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57回日本植物生理学会(岩手大学) 2016年3月19日
11. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 (2015). EPR1 の新規転写抑制モチーフの機能解析 第38回日本分子生物学会(神戸ポートアイランド, 兵庫県) 2015年12月3日
12. 深澤壽太郎, 高橋竜平, 藤井麻弥, 三島由佳, 高橋陽介 (2015) ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体の標的遺伝子の探索 植物化学調節学会 第50回大会 東京大学 2015.10.25
13. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 (2015). EPR1 の新奇転写抑制モチーフの機能解析 第56回日本植物生理学会(東京) 2015年3月17日 東京農業大学
14. 深澤壽太郎, 森雅彦, 宮本知佳, 三島由佳, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 DELLA-GAF1/IDD2 複合体による GA 信号伝達とフィードバック制御機構 第56回日本植物生理学会 東京農業大学 2015.3.18
15. 伊藤岳, 大江翔太, 石田さらみ, 高橋陽介 (2014). ジベレリン信号伝達に関するカルシウム依存性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37回日本分子生物学会 2014年11月25-27日 パシフィコ横浜(神奈川県)
16. 深澤壽太郎, 森雅彦, 宮本知佳, 三島由佳, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 DELLA-GAF1 複合体による GA 信号伝達とフィードバック制御機構の解析 第49回植物化学調節学会 京都大学 2014年10月19日
17. Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Mishima Y, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. (2014) “GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN HOMEOSTASIS AND SIGNALING” 25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver Canada, 2014.7.28-8.1
18. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., and Takahashi, Y. (2014). Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. Plant Biology 2014, Portland, Oregon, USA, July 12-16, 2014.
19. 岡村僚太, 伊藤岳, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 植物の新奇転写抑制モチーフ - 真核生物に保存された転写抑制機構の解析 - 第71回中国四国植物学会 2014年5月10日 岡山理科大学
20. 三島由佳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 翻訳後修飾によるジベレリン信号伝達制御の解析 第71回中国四国植物学会 2014年5月10日 岡山理科大学 優秀発表賞受賞
21. 伊藤岳, 岡村僚太, 佐久間哲史, 山本卓, 高橋陽介 植物の新奇転写抑制モチーフ - 真核生物に保存された転写抑制機構の解析 - 22. 第55回日本植物生理学会 2014年3月19日 富山大学
23. 森雅彦, 渡辺哲史, 深澤壽太郎, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* のフィードバック制御機構の解析 55回日本植物生理学会 2014年3月18日 富山大学
24. 深澤壽太郎, 森雅彦, 増谷優次, 宮本知佳, 高橋陽介 ジベレリンの転写代謝システム及翻訳後修飾制御機構 転写研究会ワークショップ 磯部ガーデン(群馬県) 2014年2月1日
25. 伊藤岳, 岡村僚太, 高橋陽介 植物の新奇転写抑制ドメイン - 真核生物に保存された転写抑制機構の解析 - 第36回日本分子生物学会(神戸, 兵庫県) 2013年12月3-6日
26. Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1,

- a DELLA Interacting Protein, Regulates Gibberellin Homeostasis and Signaling” International Symposium on Transcription and Metabolism, Awaji City, Hyogo, Japan 2013.11.11-13.
27. Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN SIGNALING IN ARABIDOPSIS” 21th International Plant Growth Substances Association Conference, Shanghai, China 2013.6.21.
28. 岡田佳那子, 伊藤岳, 高橋陽介 Ca²⁺を介する新しい GA 信号伝達経路の探索 第 70 回中国四国植物学会 2013 年 5 月 12 日 徳島大学 優秀発表賞受賞
29. 宮本知佳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリンによる転写制御に關与する GAF1 の解析 第 70 回中国四国植物学会 2013 年 5 月 11 日 徳島大学 優秀発表賞受賞
30. 寺脇綾香, 伊藤岳, 高橋陽介 DELLA と SCL3 による GA 生合成酵素遺伝子の転写制御機構の解析 第 70 回中国四国植物学会 2013 年 5 月 11 日 徳島大学
31. 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 年 3 月 22 日 岡山大学
32. 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關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 年 3 月 22 日 岡山大学
33. 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(栃木県) 2013 年 1 月 25 日
34. 伊藤岳, 大江翔太, 石田さらみ, 高橋陽介 プロテインキナーゼ NtCDPK1 から転写因子 RSG への 14-3-3 の転移モデルの検証 - NtCDPK1 のスキヤフォールド機能 - 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡国際会

議場(福岡県) 2012 12/14

35. 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(福岡県) 2012 12/14
36. 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), Gent, Belgium, 2012 10/4

その他 3 件

〔図書〕(計 1 件)
植物生理学概論第二版 桜井英博、柴岡弘郎、高橋陽介、小関良宏、藤田知道 培風館 印刷中

〔その他〕
ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ppclab/takahashi.html>

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)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