

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07449

研究課題名(和文) 翻訳後修飾酵素による拮抗したジベレリン信号伝達制御

研究課題名(英文) Regulation of GA signaling by post translational modification

研究代表者

深澤 壽太郎 (Fukazawa, Jutarou)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教

研究者番号：90385550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ジベレリン(GA)信号伝達においてDELLAは抑制因子として知られている。これまでにDELLAの相互作用因子として転写因子GAF1の単離に成功し、DELLAタンパク質がGAF1と相互作用することによって、下流の標的遺伝子の制御を行っていることを明らかにしてきた。GAは、DELLAの分解を介してGAF1複合体をアクチベーターからリプレッサーに変換することで、標的遺伝子の発現を調節している。本研究課題において、植物体内におけるGAF1の翻訳後修飾の有無を検討するため、形質転換植物を作製し解析を行った。その結果、翻訳後修飾によりGAF1複合体の構成が制御される可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジベレリン(GA)は、発芽、伸長、開花を促進する植物ホルモンである。GAの信号伝達において抑制因子であるDELLAタンパク質が分解されることが重要であることが報告されており、GAの信号がいかんしてDELLAの分解を介して遺伝子発現調節を行なうかを明らかにすることを目的として研究している。これまでに、DELLA、TPRといったタンパク質が転写因子GAF1と複合体を形成し、これらの組み合わせによりGA信号伝達が制御されることを明らかにしてきた。本研究では、GAF1の翻訳後修飾に注目して解析を行ない、GA信号伝達において、新たなGAF1の翻訳後修飾がGA信号伝達に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：DELLA is a negative regulator in gibberellin (GA) signaling. I have isolated a transcription factor GAF1 as an interacting protein of DELLA. GA regulates target gene expression by converting functions of GAF1 complex from an activator to a repressor through degradation of DELLA. In this study, I have investigate the regulation of GA signaling by post translational modification of GAF1 using transgenic plants. As a result, it was shown that the post-translational modification of GAF1 might involve in the control of formation of GAF1 complex in GA signaling.

研究分野：植物生理学

キーワード：ジベレリン 転写因子 信号伝達 翻訳後修飾

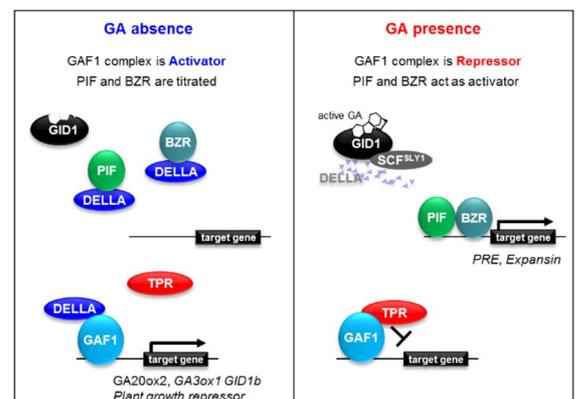
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジベレリン (GA) は、種子発芽、伸長成長、開花を制御するホルモンである。GA 内生量は、GA 信号伝達経路を介した GA 代謝酵素遺伝子群の転写レベルでのフィードバック制御によって厳密に調節されている。シロイヌナズナを用いた、分子遺伝学的な解析から GA 信号伝達経路が明らかになりつつある。GA 信号伝達における抑制因子として DELLA タンパク質と SPY タンパク質が相次いで発見された。DELLA は、機能未知の核タンパク質であり下流の信号伝達を抑制している。DELLA が核内に蓄積すると、成長が抑制され著しい矮化、花成遅延を誘引する。GA は、ユビキチン-26S プロテアソーム系を介して DELLA の分解を促進することで植物の成長を誘導する。また、SPY は、その構造から GlcNAc 転移酵素としての機能が予測されていたが、具体的な標的タンパク質が明らかになっておらず、その機能は明らかとなっていなかった。さらに、DELLA タンパク質は、リン酸化、SUMO 化修飾を受けることが報告されており、GA 信号伝達には複数の翻訳後修飾が関与すると考えられている。ジベレリン (GA) 内生量は、フィードバック制御により恒常性が維持され、GA 生合成と信号伝達は密接に関連している。フィードバック制御では GA 信号伝達系を介して GA 代謝酵素遺伝子群の発現が調節される。GA 信号伝達において核内信号伝達抑制因子 DELLA の分解が鍵反応である。GA 受容体と SCF 複合体による GA 依存的な DELLA の分解機構が明らかにされたが、DELLA の下流に位置する転写因子は不明であった。これまでに、DELLA と相互作用する転写因子として PIF 等が同定されており、DELLA は、PIF の DNA 結合を抑制することで標的遺伝子の発現を抑制する抑制モデルが報告されていた。しかしながら、GA 応答遺伝子の多くは、GA の投与により発現が減少する遺伝子が多く、また ChIP 解析より、DNA 結合能をもたない DELLA が DNA に結合することから、別の転写因子が存在すると考えられた。本研究者は、植物ホルモンジベレリン (GA) の信号伝達研究をする過程で、GA 信号伝達の抑制因子 DELLA と相互作用する転写因子 GAF1 を発見した。

2. 研究の目的

GAF1 過剰発現体は、開花時期の促進、胚軸、茎の伸長、葉の展開といった野生型に GA を投与したような表現型を示した。対照的に、*gaf1 gaf2* 変異体は、GA 非感受性の矮化、花成遅延等の表現型を示した。その後の解析より、DELLA がコアクチベーターとしてはたらくことを明らかとし、DELLA-GAF1 複合体は、転写活性化複合体としてはたらく、GA 依存的に DELLA が分解されると GAF1 は、もう一つの相互作用因子であるコリプレッサー-TOPLESS 様タンパク質 (TPR) と複合体



を形成し、標的遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。この発見によって、GA が如何にして標的遺伝子の発現のオン・オフを切り替える新たなモデルを提唱した。この制御モデルは、GA フィードバック制御に合致し、実際に GA 生合成遺伝子が DELLA-GAF1 複合体によって制御されることを明らかにした (Plant Cell 2014) (右上図)。さらに、GUS 形質転換体を用いた解析から、GA フィードバック制御には GAF1 複合体が主要な役割を果たすことを明らかにした (Plant Physiol. 2017)。

多くの転写因子は、翻訳後修飾によって、転写活性化能や、細胞局在、相互作用因子の結合の有無が制御されることが知られている。GAF1 及び GAF2 のアミノ酸配列を比較検討し

たところ、GAF1 のアミノ酸配列内にリン酸化修飾を受ける可能性が高い部位が見つかったことから、本研究では、GAF1 複合体による GA 信号伝達機構を明らかにすることを目的とし、特に翻訳後修飾制御に着目し、形質転換体を作製し、翻訳修飾の部位や、その生物学的な意義の解明を目的として解析を行なった。

3 . 研究の方法

GA 信号伝達において DELLA タンパク質と相互作用する因子として GAF1 転写因子を同定した。DELLA タンパク質が、GAF1 のコアクチベーターとしてはたらき下流の標的遺伝子の制御を行っていることを明らかにしてきた。また、GAF1 は、コリプレッサーである TOPLESS 様タンパク質 TPR と相互作用することが明らかとなった。DELLA タンパク質はコアクチベーターとして、TPR はコリプレッサーとして機能する。GAF1 複合体は、GA 依存的にその構成を変化させることによって標的遺伝子の発現の ON/OFF を制御することを明らかにしてきた。本研究では以下の方法で、GAF1 の翻訳後修飾の部位の同定、修飾の意義を検証した。

(1) 酵母ツーハイブリッド法、植物細胞を用いたトランジェント解析により、DELLA または TPR タンパク質が GAF1 内のどの領域と結合するのかを deletion 変異体タンパク質を複数作成し詳細に解析し、GAF1 内の各相互作用因子との結合に必要な領域を同定した。多くの転写因子は、翻訳後修飾によって、転写活性性能、相互作用因子との親和性、タンパク質の安定性などが制御されることが報告されている。GAF1 タンパク質も植物体内において翻訳後修飾を受ける可能性が考えられた。特に、GAF1 及び GAF2 のアミノ酸配列を比較検討すると、保存性が高く、リン酸化修飾等を受ける可能性が高い領域が見出された。

(2) GAF1 の翻訳後修飾の有無を検討するため、myc タグを付加した GAF1 タンパク質発現する形質転換植物を作製した。作製した形質転換植物を用いて、Phos-tag ゲル及び、myc 抗体を用いたウェスタンブロットにより、GAF1 タンパク質の翻訳後修飾(リン酸化の有無)を検証した。

(3) GAF1 のリン酸化部位を同定するため、GAF1、GAF2 の保存部位、ならびに各相互作用因子との結合に重要な領域から、複数のリン酸化部位を予測した。リン酸化予測部位に変異導入を行い、myc タグを付加した GAF1 (野生型)と同様に、リン酸化部位に変異を導入した mtGAF1 タンパク質を発現する形質転換体を複数種類作製した。Phos-tag ゲル、myc 抗体を用いたウェスタンブロットにより、変異導入と GAF1 のリン酸化の消失の有無を比較検討した。

(4) 変異型 GAF1 タンパク質を作製し、非リン酸化型 GAF1 タンパク質と、擬似リン酸化 GAF1 タンパク質を培養細胞や、植物体に発現させ、リン酸化修飾による制御を調べた。また、GAF1 に結合し、翻訳後修飾に関わるような新たな相互作用因子の同定を試みた。

4 . 研究成果

Phos-tag ゲル、myc 抗体を用いたウェスタンブロット解析より、特定のバンドシフトが検出されることから GAF1 タンパク質が植物体内でリン酸化修飾を受けている可能性が示された。GAF1 内のリン酸化部位を同定するために、リン酸化予測部位に変異を導入した変異型 GAF1 を作製し、ウェスタンブロット解析を行なったところ、特定のバンドシフトが消失したことから、この領域が、GAF1 のリン酸化部位と考えられた。リン酸化を受けない GAF1 変異タンパク質(非修飾型)、リン酸化を模した GAF1 変異タンパク質(擬似リン酸化型)を用いたトランジェント解析では野生型の GAF1 に対して異なる転写活性性能を示した。これらの解析により、GAF1 は、リン酸化修飾を介して、相互作用因子、転写活性性能を変化させることで、標的遺伝子の発現を制御する可能性が示された。GAF1 は、DELLA および、TPR と相互作用することから、GAF1 のリ

ン酸化修飾がリン酸化部位への変異導入による DELLA や TPR の GAF1 への結合の親和性を変化させる可能性が示唆された。GAF1 のリン酸化部位に変異を導入し、リン酸化を受けない GAF1 変異タンパク質(非修飾型 GAF1)、リン酸化を模した GAF1 変異タンパク質(擬似リン酸化型 GAF1)を発現する形質転換植物を作製し、表現型の比較により、GAF1 のリン酸化修飾の生物学的な意義の検証を行なっている。また、リン酸化とは別の酵素活性をしめす GAF1 相互作用タンパク質を同定した。この因子を用いて、トランジェント解析を行ったところ、GAF1 複合体の転写活性化能に影響を及ぼすことから、これまでに明らかにしてきた GAF1 のリン酸化制御とならび、翻訳後修飾制御による GAF1 複合体の制御機構が存在すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J. and Takahashi, Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1445933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15592324.2018.1445933.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukazawa, J., Mori, M., Watanabe, S., Miyamoto, C., Ito, T. and Takahashi, Y.	4. 巻 175
2. 論文標題 DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA 20-oxidase 2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1395-1406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.17.00282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada, K., Ito, T., Fukazawa, J. and Takahashi, Y.	4. 巻 175
2. 論文標題 Gibberellin induces an increase in cytosolic Ca ²⁺ via a DELLA-independent signaling pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1536-1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.17.01433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito, T., Ishida, S., Oe, S., Fukazawa, J. and Takahashi, Y.	4. 巻 174
2. 論文標題 Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca ²⁺ -dependent protein kinase1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 2457-2468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.17.00515	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J. and Takahashi, Y	4. 巻 13
2. 論文標題 DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signal Behav.	6. 最初と最後の頁 e1445933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1445933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Fukazawa J, Ohashi Y, Ito T, Takahashi Y.
2. 発表標題 DELLA-GAF1 complex involved in gibberellin flowering pathway
3. 学会等名 Gibberellins 2019 Current progress in Gibberellin Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukazawa J, Ohashi Y, Ito T, Takahashi Y.
2. 発表標題 Regulation of flowering via gibberellin signaling
3. 学会等名 23th International Plant Growth Substances Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西航一郎、森亮太、伊藤岳、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 DELLAとJAZを介したジベレリンとジャスモン酸のクロストークの解析
3. 学会等名 第76回 中国四国植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中林誠太郎、伊藤岳、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるDELLA複合体によるABA感受性の制御機構
3. 学会等名 第76回 中国四国植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤岳、勝部隆義、深澤壽太郎、高橋 陽介
2. 発表標題 GAF1とその相互作用因子によるジベレリン生合成酵素遺伝子の転写制御
3. 学会等名 第76回 中国四国植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田有理花、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 新奇GAF1標的遺伝子GFRによるジベレリン生合成と成長制御機構
3. 学会等名 第76回 中国四国植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜添菜、深澤壽太郎、高橋陽介
2. 発表標題 茎頂におけるKNOX, BLHによるジベレリン内生量制御機構の解析
3. 学会等名 第76回 中国四国植物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深澤 壽太郎、大橋 由紀、中居 可奈子、高橋 竜平、伊藤 岳、高橋 陽介
2. 発表標題 ジベレリンによる花成制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 岳、勝部 隆義、深澤 壽太郎、高橋 陽介
2. 発表標題 GAF1とその相互作用因子によるジベレリン生合成遺伝子の転写制御
3. 学会等名 日本植物生理学会 第60回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 岳、石田 さらみ、深澤 壽太郎、高橋 陽介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本植物学会 第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深澤 壽太郎、大橋 由紀、中居 可奈子、高橋 竜平、伊藤 岳、高橋 陽介
2. 発表標題 ジベレリンによる花成制御機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会 第53大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大橋 由紀, 高橋 竜平, 伊藤 岳, 深澤 壽太郎, 高橋 陽介
2. 発表標題 ジベレリンによる花成制御機構の解析
3. 学会等名 第75回 中国四国植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 岳, 深澤 壽太郎, 高橋 陽介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第75回 中国四国植物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深澤 壽太郎, 藤井 麻弥, 西, 航一郎, 森 亮太, 高橋 陽介
2. 発表標題 ジベレリンとジャスモン酸によるクロストーク制御機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会 第52回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 亮太, 藤井麻弥, 伊藤 岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介
2. 発表標題 DELLA を介したジベレリンとジャスモン酸のクロストーク制御
3. 学会等名 第74回 中国四国植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤 岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介
2. 発表標題 ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御
3. 学会等名 第74回 中国四国植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村駿志, 深澤壽太郎, 高橋陽介
2. 発表標題 ホメオドメインタンパク質によるジベレリン生合成遺伝子の転写制御機構の解析
3. 学会等名 第74回 中国四国植物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukazawa J, Mori M, Ito T, Takahashi Y.
2. 発表標題 DELLA-GAF1 Complex is a Main Component in Gibberellin Feedback Regulation of GA20ox2 in Arabidopsis
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukazawa J, Ito T, Takahashi Y.
2. 発表標題 DELLA-GAF1 Complex Regulates Gibberellin Homeostasis and Signaling in Arabidopsis
3. 学会等名 5th International symposium Plant Signaling and Behavior 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----