

令和元年6月6日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15143

研究課題名（和文）GAF1-GRASタンパク質複合体による転写抑制機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of transcriptional repression by GAF1-GRAS complex

研究代表者

伊藤 岳 (Ito, Takeshi)

広島大学・理学研究科・研究員

研究者番号：30636139

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：GAF1-DELLA複合体はジベレリン（GA）生合成酵素遺伝子の転写を活性化する。GRXはGAF1-DELLAによる転写活性化を抑制することが明らかになった。GRXはGAF1とDELLAの相互作用を競合的に阻害するのではなく、GRX自身の転写抑制能によりGAF1-DELLAの転写活性化を抑制した。GRXはTOPLESS非依存的に転写を抑制することが示唆された。また、GAF1の存在下でGRXの転写抑制能が強化されることを示した。さらにGRXはDELLAの存在下でも転写抑制能を示すことを明らかにした。GAF1、DELLA、GRXは三者複合体を形成し、転写を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GAの内生量はフィードバック制御により一定の範囲内に保たれている。植物は、環境に応じて適切に成長が制御されており、例えば、乾燥や塩、低温などのストレス条件下では、GA生合成酵素遺伝子の発現が低下し、植物は成長を抑制する。このような状況では、DELLAタンパク質が蓄積するにも関わらず、GA生合成酵素遺伝子の発現の上昇は見られない。したがって、フィードバック制御を一時的に抑制し、GA生合成酵素遺伝子の発現を抑圧する上位の制御が存在すると推定された。本研究により、このような制御の分子メカニズムの一部が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：GAF1-DELLA complex activates the transcription of gibberellin biosynthetic genes. GRX almost completely suppresses the transcriptional activity of GAF1-DELLA. The aim of this study was to clarify the mechanism of transcriptional repression by GRX. GRX repressed the transcriptional activity of GAF1-DELLA complex by the repression activity of GRX itself, but not by competitive inhibition of the interaction between GAF1 and DELLA. GRX repressed the transcription in a TOPLESS-independent manner. The repression activity of GRX was enhanced in the presence of GAF1. GRX exerted the repression activity even in the presence of DELLA. GRX may repress the transcription by forming a ternary complex with GAF1 and DELLA.

研究分野：植物生理学・分子生物学

キーワード：転写抑制 転写制御 遺伝子発現制御 ジベレリン DELLA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【研究の学術的背景】

ジベレリン (GA) は種子発芽、茎部伸長、花芽形成などに関与する植物ホルモンである。GA 生合成酵素遺伝子と GA 不活性化酵素遺伝子の一部は GA 内生量に応じた転写レベルの制御を受けている。活性型 GA の内生量が低下すると、GA 生合成酵素遺伝子の転写は促進され、GA 不活性化酵素遺伝子の転写は抑制される。一方、活性型 GA の内生量が上昇すると、GA 生合成酵素遺伝子の転写は抑制され、GA 不活性化酵素遺伝子の転写は促進される。このような GA によるフィードバック制御によって植物の活性型 GA 量は一定の範囲で維持されている。

GA 信号伝達において DELLA は負の制御因子として機能する。シロイヌナズナには RGA、GAI、RGA-LIKE1 (RGL1)、RGL2、RGL3 の 5 つの DELLA が存在する。GA 受容体である GID1 は GA と結合すると、DELLA タンパク質と相互作用する。GID1-GA 複合体によって認識された DELLA は、ポリユビキチン化された後、26S プロテアソーム系で分解される。その結果、GA 信号が下流に伝わる。クロマチン免疫沈降法による解析から、DELLA がいくつかの GA 関連遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写制御に関与することが報告された。しかし、明確な DNA 結合領域をもたない DELLA がどのようにプロモーターに結合しているのかは不明であった。研究代表者らは、DELLA と相互作用する因子として zinc finger 型の転写因子 GAF1 を単離し、GAF1 が GA 生合成酵素遺伝子のプロモーターに結合することを明らかにした (文献)。GAF1 と DELLA は、それぞれ単独では GA 生合成酵素遺伝子の転写を活性化しなかったが、共発現させた場合、活性化することが示された。したがって、DELLA は GA 信号伝達の負の制御因子として機能するだけでなく、転写のコアクチベーターとして機能することを見出した。また、GAF1 と DELLA の相互作用には GAF1 の PAM モチーフと DELLA の SAW モチーフが重要であることが明らかになった。続いて、GAF1 と相互作用する因子として TOPLESS (TPL) を単離した。GAF1 は TPL の結合に必要なアミノ酸配列 EAR モチーフをもっており、TPL は GAF1 のコリプレッサーとして機能することが示された。GAF1-DELLA 複合体が GA 生合成酵素遺伝子の発現を誘導し、その結果、産生された活性型 GA が DELLA の分解を引き起こし、続いて GAF1-TPL 複合体が形成されることにより GA 生合成酵素遺伝子の転写が抑制されるモデルが考えられた (図 1)。すなわち、活性型 GA は GAF1 複合体を DELLA の分解を介して転写活性化複合体から転写抑制複合体に機能転換することで GA 生合成酵素遺伝子の発現量を制御し、内生量を調節していることが示唆された。

DELLA は GRAS ファミリーに属している。GRAS ファミリーは植物に特異的なタンパク質群で、シロイヌナズナのゲノムには少なくとも 33 の遺伝子が存在する。また、GRAS タンパク質は GA だけでなく、オーキシン、ブラシノステロイド、ジャスモン酸など様々な植物ホルモンの信号伝達に関与し、茎部の伸長、側枝や根の発生、ストレス応答など多くの植物の成長制御に関わることが報告されている。GRAS タンパク質は N 末端側に非保存領域、C 末端側に GRAS ドメインをもつ。研究代表者らは、GRAS タンパク質の 1 つ GRX が GAF1-DELLA 複合体の転写活性を抑制することを見出した。

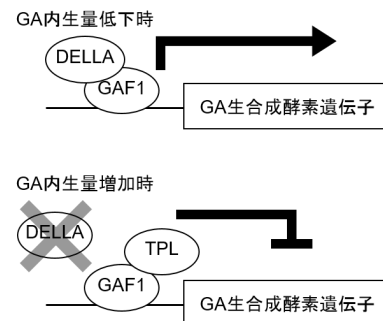


図1. GAフィードバック制御モデル

2. 研究の目的

DELLA はジベレリン (GA) 信号伝達において負の制御因子として機能するだけでなく、転写因子 GAF1 のコアクチベーターとして GA 生合成酵素遺伝子の転写を活性化する。GA の内生量はフィードバック制御により一定の範囲内に保たれている。GA は GAF1-DELLA 複合体を DELLA の分解を介して転写活性化複合体から転写抑制複合体に機能転換することで GA 生合成酵素遺伝子の発現量を制御し、GA 内生量を調節している。研究代表者らは、DELLA と同じ GRAS ファミリーに属するタンパク質 GRX が GAF1-DELLA 複合体による転写活性をほぼ完全に抑圧することを見出した。したがって、フィードバックよりも上位の制御の存在が示唆された。本研究は、GRX が GAF1 または DELLA と強く結合することで GAF1 と DELLA の結合を競合的に阻害しているのか、あるいは GRX 自身が強い転写抑制能をもつのかを調べることで、GRX がどのように GAF1-DELLA 複合体の転写活性化能を抑制するのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

GRX は DELLA と同じ GRAS ファミリーに属するタンパク質で、GAF1 と DELLA による転写活性化を抑制することが明らかになった。本研究は、GAF1-DELLA 複合体の転写活性化能をどのように GRX が抑制するのかを解明することを目的とし、以下の実験を行った。

(1) GRX の競合的な結合による抑制モデルの検証

GRX は GAF1 あるいは DELLA と強く結合することで GAF1 と DELLA の相互作用を阻害し、GAF1-DELLA の転写活性化能を抑制する可能性が考えられた。そこで、GAF1 が DELLA より GRX と強く相互作用するか、また、DELLA が GAF1 より GRX と強く相互作用するかを調べた。HA タグや Myc タグを融合した GAF1、RGA、GRX を発現するプラスミドを作製し、プロトプラスチ化したシロイヌナズナの葉肉細胞に導入し、発現したタンパク質を用いて共免疫沈降法を行い、結合

強度を比較した。

(2) GRX の転写抑制能の検証と転写抑制能に必要な領域の解析

GRX は GAF1 と DELLA の相互作用を競合的に阻害しなかったため、GRX の転写抑制能を調べた。酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインに GRX を融合したタンパク質を発現するコンストラクト (GAL4BD-GRX) を作製した。レポーターには、ルシフェラーゼ遺伝子 (LUC) の上流に 5 つの GAL4 の結合配列 UAS と、さらにカリフラワーモザイクウイルス CaMV 35S プロモーターを結合した (35S-5×UAS:LUC) を用いた。これらのコンストラクトをプロトプラスト化したシロイヌナズナの葉肉細胞に導入し、5×UAS に結合した GAL4BD-GRX が CaMV 35S プロモーターの転写活性を抑制できるかを調べた。また、ヘルペスウイルスの転写活性化因子 VP16 の転写活性化能を GRX が抑制できるかを調べることで、転写活性化因子の転写活性の抑制能についても検証した。GAL4 の DNA 結合ドメインに VP16 の転写活性化ドメインを融合したものと (GAL4BD-VP16AD)、さらに GRX を融合した (GAL4BD-VP16AD-GRX) の転写活性化能を比較することで、GRX がどの程度 VP16 の転写活性化能を抑制できるかを調べた。続いて、GRX の転写抑制能に必要な領域を同定するため、GRX を N 末端非保存領域と C 末端側の GRAS 領域に分割し、それぞれの転写抑制能を調べた。RGA とのドメインスワッピングを用いて GRX の転写抑制能に必要な領域の解析も並行して行った。

(3) GAF1-DELLA-GRX 三者複合体による転写抑制モデルの検証

GRAS タンパク質はヘテロ二量体を形成することが報告されている。一過的な発現系を用いて植物細胞内でタンパク質を発現させ、共免疫沈降法を用いて DELLA と GRX の相互作用を調べた。続いて、Blue-Native PAGE を用いて GAF1、DELLA、GRX の三者複合体形成の解析を試みた。

4. 研究成果

共免疫沈降法を用いた解析から、GAF1 と GRX が結合することが示された。GAF1 と GRX の結合には GAF1 の PAM モチーフと GRX の SAW モチーフが重要であることが示された。したがって、GAF1 と DELLA、GAF1 と GRX の結合様式は同じであることが示唆された。続いて、GRX の GAF1 や DELLA に対する結合親和性を比較したところ、GAF1 は GRX よりも DELLA と強く結合し、DELLA は GRX よりも GAF1 と強く結合することが明らかになった。GRX は CaMV の 35S プロモーターの転写活性を抑制した。また、GRX を融合することで VP16 の転写活性が抑制された。これらの結果から、GRX は GAF1 と DELLA の相互作用を競合的に阻害するのではなく、GRX 自身の転写抑制能により GAF1-DELLA の転写活性化能を抑制することが示された。続いて、GRX の転写抑制領域の同定を試みたところ、C 末端の GRAS ドメインが転写抑制能を示すことが明らかになった。また、DELLA タンパク質の一つ RGA とのドメインスワッピングを行ったが、いずれのキメラタンパク質においても RGA の転写活性化能、および GRX の転写抑制能が失われた。GAF1 は DELLA の非存在下で GAF1 の EAR モチーフを介してコリプレッサー-TPL と結合し、標的遺伝子の転写を抑制するが、GRX の転写抑制には EAR モチーフは必要ないことが示された。したがって、GRX は TPL 非依存的に転写を抑制することが示唆された。また、GAF1 の存在下で GRX の転写抑制能が強化されることを示した。さらに GRX は DELLA の存在下でも転写抑制能を示すことを明らかにした。GAF1 と DELLA、DELLA と GRX、GAF1 と GRX がそれぞれヘテロ二量体を形成したことから、GAF1、DELLA、GRX は三者複合体を形成し、転写を抑制している可能性が示唆された (図 2)。研究代表者らのこれまでの研究により、GA フィードバック制御より上位の制御機構の存在が示唆されていたが、詳しい分子機構は不明であった。本研究により、GRX が DELLA 存在下でも転写抑制能を示すこと、また GRX による転写抑制には TPL を必要としないことが示され、分子機構の一部を明らかにすることができた。また、DELLA とともに転写活性化複合体として働く GAF1 が GRX の転写抑制能を強化したことから、GAF1 にはまだ明らかにされていない機能が存在することが示唆された。GAF1 は TPL を介した転写抑制と GRX を介した転写抑制を使い分けている可能性が考えられた。今後、これらの転写抑制機構が生理的にどのように使い分けられているのかを明らかにしていく必要がある。

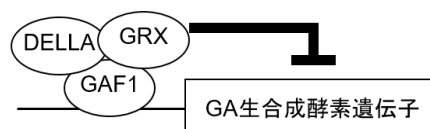


図2. 三者複合体による転写抑制モデル

< 引用文献 >

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 gibberellin homeostasis and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 26: 2920-2938.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Ito, T., Ishida, S., and Takahashi, Y. (2018). Autophosphorylation of Ser-6 via an intermolecular mechanism is important for the rapid reduction of NtCDPK1 kinase activity

for substrate RSG. PLOS ONE 13: e0196357. 査読有り, DOI: 10.1371/journal.pone.0196357

Ito, T., Okada, K., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2018). DELLA-dependent and -independent gibberellin signaling. *Plant Signal. Behav.* e1445933. 査読無し, DOI: 10.1080/15592324.2018.1445933

Okada, K., Ito, T., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2017). Gibberellin induces an increase in cytosolic Ca²⁺ via a DELLA-independent signaling pathway. *Plant Physiol.* 175: 1536-1542. 査読有り, DOI: 10.1104/pp.17.01433

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 GA20 oxidase 2. *Plant Physiol.* 175: 1395-1406. 査読有り, DOI: 10.1104/pp.17.00282

Ito, T., Ishida, S., Oe, S., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2017). Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase1. *Plant Physiol.* 174: 2457-2468. 査読有り, DOI: 10.1104/pp.17.00515

[学会発表](計13件)

伊藤岳, 勝部隆義, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2019). GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン合成酵素遺伝子の転写制御 日本植物生理学会 (名古屋) 2019年3月13-15日

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 (2019). ジベレリンによる花成制御機構の解析 日本植物生理学会 (名古屋) 2019年3月13-15日

伊藤岳, 石田さらみ, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2018). 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 日本植物学会 (広島) 2018年9月14-16日

伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2018). 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 中国四国植物学会 (山口) 2018年5月12-13日

大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2018). ジベレリンによる花成制御機構の解析 中国四国植物学会 (山口) 2018年5月12-13日

中林誠太郎, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2018). 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 中国四国植物学会 (山口) 2018年5月12-13日

岡田佳那子, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2018). ジベレリン信号伝達における DELLA 非依存的な細胞質カルシウムイオンの上昇経路 日本植物生理学会 (札幌) 2018年3月28-30日

Ito, T., Ishida, S., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2017). Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase NtCDPK1. *Taiwan-Japan Plant Biology 2017, Taipei, Taiwan, November 3-6, 2017.*

Fukazawa, J., Ito, T., and Takahashi, Y. (2017). DELLA-GAF1 complex regulates gibberellin homeostasis and signaling in Arabidopsis. *5th International symposium on Plant Signaling and Behavior 2017, Matsue, Japan, June 27-July 1 2017.*

Ito, T., Ishida, S., Fukazawa, J., and Takahashi, Y. (2017). Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase NtCDPK1. *Plant Biology 2017, Honolulu, Hawaii, June 23-28, 2017.*

大橋由紀, 高橋竜平, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2017). ジベレリンによるシロイヌナズナの花成制御 中国四国植物学会 (高知) 2017年5月13-14日

勝部隆義, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2017). GAF1 とその相互作用因子によるジベレリン合成酵素遺伝子の転写制御 中国四国植物学会 (高知) 2017年5月13-14日

森亮太, 藤井麻弥, 伊藤岳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 (2017). 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 中国四国植物学会 (高知) 2017年5月13-14日

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。