

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号: 12601

研究種目: 基盤研究(C)

研究期間: 2010~2012

課題番号: 22570036

研究課題名(和文)

植物の伸長成長を制御する新たなジベレリン情報伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文)

Analysis of Novel Signal Transduction Network of Gibberellins

研究代表者

石田 さらみ(Ishida Sarahmi)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号: 20282725

研究成果の概要(和文):

これまでの研究により、ジベレリン内生量情報伝達に関わる転写活性化因子 RSG の機能制御機構の解明に成果を上げてきた。その機能制御機構の実体は負の制御因子・14-3-3 タンパク質との複合体形成を介した細胞内局在制御であった。ジベレリン内生量が上昇すると、CDPK1 により RSG の S114 がリン酸化され、リン酸化 S114 を介して RSG は 14-3-3 と複合体を形成し核外に輸送される結果、ジベレリン生合成酵素遺伝子の転写が抑制される。

本年度は CDPK1 に着目し、CDPK1-RSG/14-3-3 経路の上流を探る解析を試みた。RSG にジベレリン内生量情報を伝達するカルシウム依存性タンパク質キナーゼである CDPK1 はジベレリンによりリン酸化を受ける事を明らかにしている。このリン酸化の意義を探るため、ジベレリンによりリン酸化される CDPK1 のアミノ酸の同定に着手した。又、CDPK 群は自己リン酸化を受ける事が多く報告されている。そこで、まず大量精製が可能なリコンビナント GST-CDPK1 を大腸菌内で過剰発現させ、GST タグを用いて精製して *in vivo* 自己リン酸化反応を行い、SDS-PAGE にて精製後、質量分析による自己リン酸化部位の同定を行った。その結果、CDPK1 が特異的基質を認識する領域であるの N 末端 variable 領域の 6 番目のセリン残基と 21 番目のスレオニン残基にリン酸基が導入されている事を明らかとした。

研究成果の概要(英文):

The spatiotemporal regulation of the endogenous level of a phytohormone Gibberellins (GA) by the feedback mechanism keeps GA homeostasis in plant cells and leads to the adequate morphogenesis of plants to adapt their ever fluctuating environment. We consider the feedback regulation which containing both of biosynthesis and signal transduction of GA as a convergent site of signals from internal developmental program and external environment, and proceed the investigation into the molecular mechanism of GA feedback regulation.

Until now, we identified the signal transduction pathway of GA feedback regulation comprised of a bZIP transcription factor REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG) which transcribes an enzyme of GA biosynthesis, a 14-3-3 protein which regulates RSG activity via intracellular localization, and a Ca²⁺-dependent protein kinase, CDPK1 which phosphorylates the S114 of RSG and promotes the interaction between RSG and the 14-3-3 protein. To understand the signal transduction of feedback regulation of GA, we focused on the CDPK1 that receives the GA signal and transduce it to RSG.

1. Substrate recognition mechanism of CDPK1

In plants, CDPKs form a large family consisting 34 genes in Arabidopsis and 31 genes in rice, play a central role in Ca²⁺ signaling in plants which do not encode C-kinases. CDPKs are consisted of 4 domains, that is, N-terminal, kinase, autoinhibitory and calmodulin-like regions and thought to be evolved through fusion between calmodulin kinase and calmodulin. To understand how one isotype of CDPKs can recognize its specific physiological substrate in this situation, we analyzed the mechanism by which CDPK1

recognize its specific substrate RSG. As results, we elucidated that the N-terminal domain of CDPK1 functions in the substrate recognition and mutation of only one amino acid residue, R10, in this region eliminates its activity for substrate recognition. Furthermore, we succeeded to demonstrate that another isotype of CDPKs which cannot congenitally phosphorylate RSG could be converted to a RSG-kinase by addition of N-terminal region of CDPK1 to its N-terminus instead of its innate N-terminal region. We estimate that this results is of great interest because it not only identifies the N-terminal region of unknown function until then as the substrate recognition domain but also reveal that the domains for substrate recognition and phosphorylation can be discretely divided in CDPKs.

2. Identification of phosphorylation sites in CDPK1

CDPK1 was phosphorylated upon the signal of excess GA. To elucidate the significance of this phosphorylation on CDPK1 catalytic activity, we started the identification of phosphorylation sites in CDPK1. Many CDPKs were reported to phosphorylate themselves until now. Accordingly, we tried to identify autophosphorylation sites of CDPK1 with recombinant CDPK1 protein by mass spectrometry and succeeded to identify S6 and T21 in N-terminal region as autophosphorylation sites. To confirm these results, we prepared a dephosphomimic mutant of CDPK1 (S6A T21A) and demonstrated that the S6A T21A mutant could not be autophosphorylated any longer. Next, we searched the relationship between autophosphorylation and substrate recognition. Pull down assay with recombinant RSG and CDPK1 demonstrated that dephosphomimic mutant of CDPK1 had low affinity to substrate RSG. This result suggests a series of phosphorylation reaction by CDPK1, that is, CDPK1 autophosphorylates these sites after phosphorylates substrate RSG leading dissociation of RSG from them by decreasing affinity between RSG and them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理科学

キーワード：ジベレリン、情報伝達、タンパク質キナーゼ、カルシウム、フィードバック

1. 研究開始当初の背景

植物の背丈は、遺伝的背景、即ち、内在する発生プログラムだけでは決定されない。動く事の出来ない植物は、生息地に対応し太陽光の捕捉効率を最適化して他個体との競争を勝ち抜くために、環境及びその変動を感知し、遺伝的に支配される背丈を周囲の環境に適応させるという優れた柔軟性を進化の過程において獲得してきた。

この柔軟な伸長成長は、これを調節するホルモン・GAの内生量を時空間的に、且つ、厳密に制御する機構であるフィードバック制

御により達成される。即ち、発生プログラムから発せられる内在性・先天的シグナルと環境変動から受容する外来性・後天的シグナルは、生合成系と情報伝達系を内包するフィードバック制御機構に於いて統合され収束し、最適なGA内生量へと変換され、その結果、環境に適応した最適な形態形成が導かれている。

私は、植物の優れた環境適応能である柔軟な伸長成長を理解するための要としてGAフィードバック制御機構を捉え、分子レベルでの解析に取り組んできた。

2. 研究の目的

負の制御因子 DELLA の分解を中核とする GA 情報伝達系が明かるとされている。しかしながら、生理学的実験から示されている Ca^{2+} シグナルやプロテインキナーゼの関与、細胞表面受容体の存在、網羅的遺伝子解析から示された抑制的な GA による転写制御等はこの系だけでは説明されない。

申請者らは GA フィードバック制御の情報伝達において、 Ca^{2+} 情報下流に位置する CDPK1-RSG/14-3-3 経路の解明に成功している。この成果を発展させ、GA 情報伝達系の未解明領域を解明し、古典生理学との統合的理解を目指して、研究を行う。

特に、転写因子 RSG に GA 内生量シグナルを伝達する、植物界に特異的なカルシウム依存性タンパク質キナーゼ、CDPK1 と GA 情報の関連について着目し、集中的に解析を行う。

3. 研究の方法

転写因子 RSG に GA 内生量シグナルを伝達するカルシウム依存性タンパク質キナーゼ、CDPK1 が如何に GA により制御を受けるかについて検討を行った。CDPK1 は、GA 依存的にリン酸化される事を明らかにしている。この GA 依存的リン酸化が CDPK1 を如何に制御するのかを解明するために、リン酸化部位の同定を試みた。

これまでの知見より、CDPK のリン酸化は自己リン酸化である可能性が高い。そこで、まず大量精製が可能なリコンビナントタンパク質を用いて、インビトロ自己リン酸化反応によりリン酸化 CDPK1 タンパク質を作成し、これを SDS-PAGE により精製し、質量分析法を用いてリン酸化部位の同定を進めた。

4. 研究成果

質量分析法を用いた解析より、CDPK1 は N 末端可変領域は S6 と T21 が自己リン酸化される事が明らかとなった。両セリン残基をアラニン残基に変換した SA 変異体では、自己リン酸化されない事を確認した。

CDPK1 の N 末端可変領域は特異的基質である RSG の認識部位である。このことから、S6 及び T21 のリン酸化により、CDPK1 と RSG の親和性が変化するのではないかと考えている。

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 2 件)

① Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and Takahashi, T. (2011) The mechanism of substrate recognition of Ca^{2+} -dependent

protein kinases.

Plant Signaling & Behavior 6, 924-926.

② Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and Takahashi, T. (2010) Alteration of Substrate Specificity: The Variable N-Terminal Domain of Tobacco Ca^{2+} -Dependent Protein Kinase Is Important for Substrate Recognition.

The Plant Cell 22, 1592-1604.

[学会発表] (計 9 件)

① **大江翔太、伊藤岳、石田さらみ、高橋陽介 (2013)** ジベレリン信号伝達に関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

日本植物生理学会、岡山

② **伊藤岳、安部悠理、石田さらみ、高橋陽介 (2012)** プロテインキナーゼ NtCDPK1 による 14-3-3 の転写因子 RSG への転移モデルの検証

日本植物生理学会

③ **Fukazawa, J., Nakata, M., Ito, T., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2010)** The transcription factor RSG regulates negative feedback of NtGA20ox1 encoding GA 20-oxidase.

20th International conference of Plant Growth Substances (IPGSA), Tarragona (Spain) 28th June - 2nd July, 2010.

④ **Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S., and Takahashi, Y. (2010)** Alteration of substrate specificity: The variable N-terminal domain of Ca^{2+} -dependent protein kinase is important for the substrate recognition. 21st International Conference on Arabidopsis Research, Yokohama, Japan, June 6-10, 2010.

⑤ **安部悠理、伊藤岳、石田さらみ、高橋陽介 (2010)** GA フィードバック制御に機能するキナーゼ・CDPK1 のリン最下部位の解析

日本植物生理学会、熊本

⑥ **伊藤岳、中田克、石田さらみ、高橋陽介 (2010)**

プロテインキナーゼの基質特異性の操作：カルシウム依存性プロテインキナーゼ NtCDPK1 の N 末端費保存領域は転写因子 RSG の基質認識において重要である

日本植物生理学会、熊本

⑦ **Ito, T., Nakata, M., Ishida, S. and**

Takahashi, Y. (2010) Alteration of substrate specificity of a protein kinase: The variable N-terminal domain of Ca²⁺-dependent protein kinase is important for the recognition of the substrate, transcription factor RSG.

DECODE Winter Workshop, Niigata, January 18-20, 2010. <<DECODE prize>>

⑧ **Ito, T., Nakata, M., Abe, Y., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2009)** The variable N-terminal domain of NtCDPK1 is required for the recognition of the target protein RSG that regulates transcription of GA biosynthetic genes.

Plant Biology, Honolulu, Hawaii, July 18-22, 2009

⑨ **Fukazawa, J., Ishida, S., Nakata, M., Ito, T. and Takahashi, Y. (2009)** RSG, a bZIP transcription factor, is involved in the feedback regulation of the GA 20-oxidase gene.

TERPNET 2009, 9th International Meeting of Biosynthesis and Function of Isoprenoids. Tokyo, May 25-29, 2009

[図書] (計1件)

① **渡邊哲史, 石田さらみ, 高橋陽介**
植物におけるシグナル伝達 -分子と応答-
「ジベレリン応答における遺伝子発現制御」
共立出版 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 さらみ (Ishida Sarahmi)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：20282725

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：