

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440148

研究課題名(和文)ジベレリン信号伝達における翻訳後修飾のクロストーク

研究課題名(英文)Analysis of post-translational modification of GAF1 complex in GA signaling

研究代表者

深澤 壽太郎 (Fukazawa, Jutarou)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：90385550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジベレリン(GA)は、発芽、成長、開花を制御する植物ホルモンである。GA信号伝達においてDELLAタンパク質は抑制因子としたはたらき、GA依存的に分解される。DELLA相互作用因子としてGAF1転写因子を単離し、さらにGAF1は、コリプレッサーであるTPRとも相互作用することを明らかにした。GA依存的にGAF1複合体が転写促進複合体から、転写抑制複合体に変化することを示し、この制御は、GAフィードバック制御において主要なはたらきすることを明らかにした。また、翻訳後修飾制御が関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Gibberellins (GAs) are essential regulators of plant development, including seed germination, stem elongation and flowering. In GA signaling, DELLA protein are negative regulators and degraded by GA. We identified a DELLA-binding transcription factor GAF1. We found that GAF1 interact with corepressor TOPLESS RELATED (TPR) and that DELLAs and TPR act as coactivator and a corepressor of GAF1, respectively. GA converts the GAF1 complex from transcriptional activator to repressor via degradation of DELLAs. This complex is a major components in GA feedback regulation. We found that post-translational modification of GAF1 complex might be involved in GA signaling.

研究分野：生物学・植物生理学・分子生物学

キーワード：植物ホルモン 信号伝達 転写因子 成長生理

1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンは、植物の形態形成や環境応答の制御において中心的な役割を果たしている。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 信号伝達系を介した 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。これまでに GA 内生量を制御する bZIP 型転写因子 RSG を単離し解析を行ってきた。1. RSG は、GA 生合成酵素遺伝子の発現を正に制御する (*Plant Cell* 2000, 2004)。2. GA 内生量の増減に伴い 14-3-3 タンパク質の結合部位がリン酸化/脱リン酸化され、RSG の細胞内局在が変化し、GA の恒常性を維持する (*Plant Cell* 2001, 2004, 2008, *Plant J* 2010)。3. GA 内生量に応じて、GA20ox プロモーター上のヒストンのアセチル化修飾が変動する (*Plant J* 2010) を明らかとしてきた。

一方、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(写真)。

GA は、ユビキチン-26S プロテアソーム系

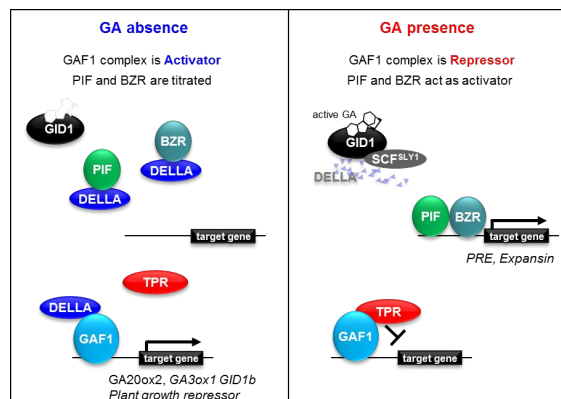


を介して DELLA の分解を促進することで植物の成長を誘導する。また、SPY は、その構造から GlcNAc 転移酵素としての機能が予測されているが、具体的な標的タンパク質が明らかになっておらず、その機能は明らかとな

っていない。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。

2. 研究の目的

ジベレリン (GA) は、発芽、成長、開花を制御する植物ホルモンである。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 信号伝達では核内信号伝達抑制因子 DELLA タンパク質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 等が同定されていたが、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 (モデル図)



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。DELLA と結合する新しい転写因子として GAF1 を単離した。さらに GAF1 と相互作用する複数の因子を同定しこれらは複合体を形成すると考えられた、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 タンパク質は、抑制因子として知られている。

DELLA タンパク質の相互作用因子 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。GAF1 は、さらに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。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。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、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、植物体における GAF1 タンパク質の翻訳後修飾の有無を解析した。解析の結果、GAF1 は、リン酸化修飾される可能性が見出されたため、予想修飾部位へに変異導入を行い、リン酸化部位を特定した。また、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。

4. 研究成果

myc 抗体を用いたウェスタンブロット解析などより、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、リン酸化予想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、リン酸化を模した GAF1 変異タンパク質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、転写活性化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。リン酸化部位への変異導入した GAF1 タンパク質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。

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 5 件)

Fukazawa, J., Mori, M., Watanabe, S., Miyamoto, C., Ito, T., and Takahashi, Y. DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of *GA20ox2* in Arabidopsis. *Plant physiology*. in press (2017) 査読有

Fukazawa, J., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y.

Binding of GID1 to DELLAs Promotes Dissociation of GAF1 from DELLA in GA Dependent Manner *Plant Signaling and Behavior*. 10, e1052923 (2015) 査読有

Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y.

Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode. *Plant Signal Behav.* 9, e977721. (2014) 査読有

Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y.

DELLAs function as coactivators of GAI ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of GA homeostasis and signaling in Arabidopsis. Plant Cell. 26, 2920-2938. (2014) 査読有

Ito, T., Nakata, M., **Fukazawa, J.**, Ishida, S. and Takahashi, Y.
Scaffold function of Ca²⁺-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. Plant Physiol. 165, 1737-1750. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

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 (鹿児島県、鹿児島市) 2017.3.16-18

Fukazawa J., Ito T, Takahashi Y.
“DELLA-GAF1/IDD2 COMPLEX REGULATES GIBBERELLIN HOMEOSTASIS AND SIGNALING”
22th International Plant Growth Substances Association Conference, Toronto Canada
2016.6.21-25

深澤壽太郎、高橋竜平、藤井麻弥、高橋陽介
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 (米子市、鳥取県) 2016.5.15

深澤壽太郎、高橋竜平、藤井麻弥、三島由佳、高橋陽介
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 (文京区、東京都) 2015.10.23-25

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

日本植物生理学会 第 56 回年会 東京農業大学 (世田谷区、東京) 2015.3.16-18

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
植物化学調節学会 第 49 回大会 京都大学 (京都市、京都府) 2014.10.18-19

Fukazawa J., Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Mishima Y, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y.
“GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN HOMEOSTASIS AND SIGNALING” 25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver Canada, 2014.7.28-8.1

〔図書〕(計 0 件)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
深澤 壽太郎 (FUKAZAWA JUTAROU)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：90385550

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()