

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650101

研究課題名(和文)新しい転写抑制モチーフERDを用いた転写研究の新展開

研究課題名(英文)Development of transcriptional study using new transcriptional repression motif ERD

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MYB型転写因子EPR1は植物だけでなく酵母と動物細胞においても転写を抑制することができる。本研究では植物、酵母、動物におけるEPR1の転写抑制モチーフを解析し、真核生物において高度に保存された転写抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。解析の結果、EPR1は二つの転写抑制モチーフをもつことが判明した。C末側に存在するE領域は動物では転写を抑圧できなかった。N末側に存在するA領域は、植物、酵母、動物において転写活性化因子の機能を抑圧できることが明らかになった。EPR1の生物界を超えた転写抑制能は、作用機構の異なる二つの独立したモチーフに依存すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Plant MYB transcription factor EPR1 can repress transcription in yeasts and animal cells as well as in plant cells. In this study, we aim to identify the transcriptional repression motifs of EPR1 in plants, yeasts, and animals, respectively and clarify the molecular mechanisms of transcriptional repression conserved in eukaryotes. Our analysis showed that EPR1 has two transcriptional repression motifs. The domain D in the C-terminal region cannot suppress the transcriptional activity in animal cells, while domain A in the N-terminal region suppress the transcriptional activity in plants, yeasts, and animal cells. Transcriptional repression of EPR1 across kingdoms might depend on two independent motifs with different mechanisms.

研究分野：植物生理・分子

キーワード：植物 発現制御

1. 研究開始当初の背景

生命は遺伝子の秩序正しい発現により成り立っている。遺伝子発現の律速は多くの場合最初のステップである転写の開始とされ、適切なタイミングと場所で個々の遺伝子の転写を促進する転写活性化因子の研究が進んだ。酵母の GAL4 やヘルペスウイルスの VP16 の転写活性化領域は植物界、菌界、動物界を問わず機能するので、転写活性化の基本メカニズムは真核生物内で保存されていると考えられた。最近の大規模な発現解析から非コード鎖や遺伝子外の領域を含めゲノムのほとんどの領域が転写されていることが示された。したがって調和のとれた遺伝子発現には、不適切な転写を積極的に抑制するメカニズムが転写促進のそれと同様に重要なのである。ところが転写活性化因子とは異なり、転写抑制因子の抑制領域が厳密に決定されたものは少ない。数少ない例の一つが植物固有の転写因子 ERF から見出された EAR モチーフである。これを加工した 12 アミノ酸からなる SRDX は転写活性化因子に接続するとその機能を抑制できることから、機能重複した植物転写因子の解析の有力な手段 (CRES-T 法) として広く用いられている。

MYB 型転写因子 EPR1 は伸長成長制御に関与する転写抑制因子であるが、既知の EAR モチーフは存在しない。我々は SRDX は酵母と動物の培養細胞では転写抑制能を示さないが、EPR1 は植物だけでなく酵母と動物細胞でも転写を抑制することを見出した。

2. 研究の目的

EPR1 は植物だけでなく動物、酵母でも転写を抑制するので、その抑制のメカニズムは、進化の過程で真核生物が植物界、菌界、動物界に分化する以前に誕生したと考えられる。真核生物で共通に機能する転写抑制モチーフが確定すれば、その配列を基本に生物種ごとに容易に最適化することができる。さらにそのモチーフを用いて任意の DNA 配列に対

する人工リプレッサー系を確立することが可能となる。本研究では真核生物全般における転写活性化因子の機能抑制系を確立するため、EPR1 の転写抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

EPR1 の転写抑制領域を植物細胞、動物細胞、酵母それぞれにおいてルシフェラーゼまたはβ-ガラクトシダーゼをレポーターに用いて決定した。植物細胞としてはシロイヌナズナの葉肉細胞プロトプラストを、動物細胞としてはヒト培養細胞 HEK 239T を、酵母は pJ69-4A 株を用いた。

4. 研究成果

植物細胞を用いたトランジェントアッセイの結果、EPR1 には少なくとも二つの転写抑制モチーフが存在することが明らかになった。そこでまず C 末側の E 領域に関して、転写抑制に必要な最小配列を決定した。様々な欠失変異タンパク質を作製して解析した結果、12 アミノ酸で転写活性化因子の機能を抑圧できることが示された。これは SRDX と同じ長さであり、転写抑制活性も同等であった (図 1)。しかし E 領域と SRDX の配列に相同性は認められなかった。E 領域の配列と植物の転写抑制モチーフを詳細に比較する

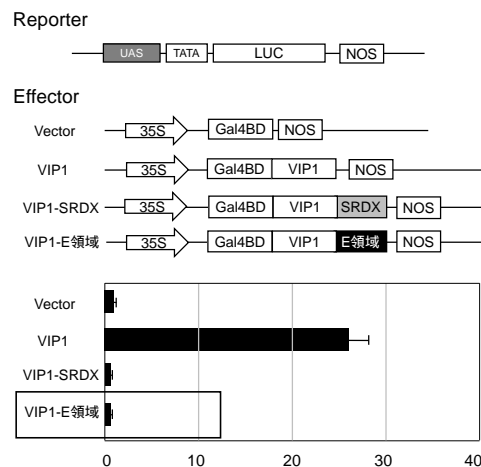


図 1. E 領域の同定。
E 領域は 12 アミノ酸で SRDX と同程度の転写抑制活性を示した。植物細胞を用いたトランジェントアッセイ。

と BRD との部分的な相同性が認められた。しかし EPR1 の E 領域と BRD のコンセンサス配列には明らかな違いが存在するので、E 領域を BRD のサブタイプとする場合は BRD のコンセンサス配列を修正する必要がある。

EPR1 の C 末側に存在する A 領域は E 領域、BRD、SRDX との相同性は認められなかった。植物細胞において A 領域は E 領域と同等の転写抑制活性を示した。次に酵母における転写抑制について解析した。その結果、A 領域は E 領域同様に酵母においても強い転写抑制活性を示した (図 2)。一方、SRDX は酵母では転写抑制活性をもたず、むしろ転写を促進した。EPR1 の A 領域と E 領域は SRDX とは異なり酵母にも存在するメカニズムにより転写を抑制していると考えられた。

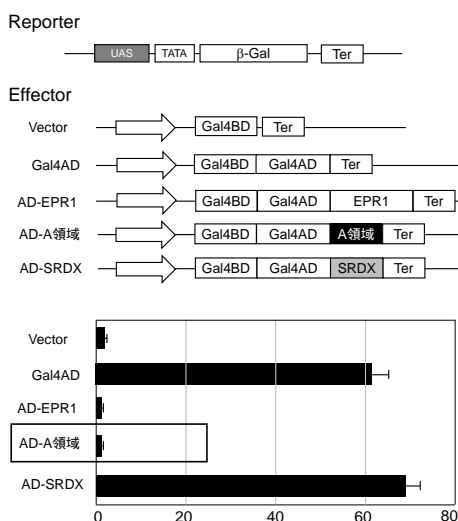


図 2. 酵母における A 領域の転写抑制の解析。EPR1 の A 領域は酵母においても転写抑制活性を示した。酵母 pJ69-4A を用いた解析。

次に動物細胞における転写抑制活性を調べた。この解析では佐久間哲史博士と山本卓教授 (広島大学) の支援を受けた。全長の EPR1 は動物細胞においても強い転写抑制活性を示した。E 領域単独では顕著な転写抑制は観察されなかった。A 領域は単独でも強い抑制活性を示したが、SRDX は動物細胞における転写に影響を与えなかった (図 3)。した

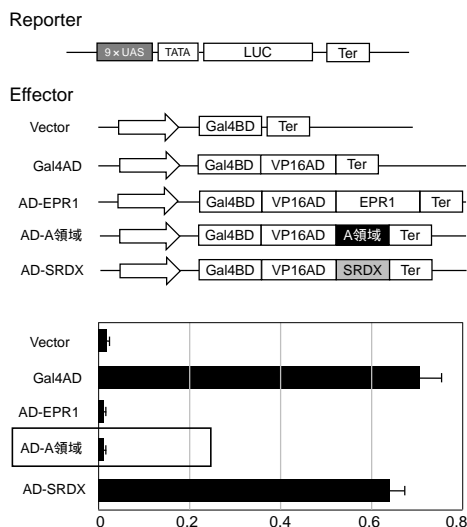


図 3. 動物細胞における A 領域の転写抑制の解析。EPR1 の A 領域は動物細胞においても転写抑制活性を示した。培養細胞 HEK239T を用いた解析。

がって A 領域は菌界、植物界、動物界において共通して機能する転写抑制モチーフであることが示唆された。E 領域は植物と酵母において転写抑制能を示すが、動物では機能しなかった。SRDX は植物でのみ転写抑制活性を示し、植物固有のメカニズムにより転写を抑制すると考えられた。

これまで SRDX を使った CRES-T 法は機能の重複した転写因子の機能解析の有効な研究手法として広く用いられてきた。しかし SRDX との融合タンパク質のクローン化や発現が成功しない転写因子や、SRDX の効果が不明確なものも少なくない。本研究で明らかになった E 領域は SRDX と同じ長さで同等の抑制能を示し、かつ作用機構が異なるので SRDX を用いた CRES-T 法では解析の難しかった植物転写因子の解析に有効と期待される。また SRDX が植物以外では機能せず、動物では短い転写抑制モチーフが見出されていないことから、これまで植物以外への CRES-T 法の適用は実現しなかった。本研究で明らかとなった A 領域を用いれば動物でも CRES-T 法を用いた解析が可能になると期待される。

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 6 件)

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y. (2014) Scaffold function of Ca^{2+} -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.

〔学会発表〕(計 20 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生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ウク制御 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生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 (島根県) 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 (島根県) 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 (島根県) 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關与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

〔図書〕(計 1 件)
植物生理学概論第二版 (2017 年) 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