ジベレリンによる 転写調節因子の機能制御

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 石田さらみ
広島大学大学院理学研究科生物科学専攻 高橋陽介

1. はじめに

光エネルギーを化合物に転換することで、地球上における他のすべての生命を支える植物は、自らは移動せず、大地に根を張り、その生存の領域を広げ、外部環境の激しい変化を克服して生育する。そのために植物は柔軟な形態形成のメカニズムを発達させてきた。細胞の形を自在に変化させ、その細胞を積み上げて個体を形成するシステムは、植物が4億年前に陸上に進出する際に獲得したものである。周囲の環境変化に適応し太陽光の捕捉効率を最適化するために、自在に背丈を変化させる機構は陸上植物の繁栄に必須であった。ゲノムに刻まれた発生のプログラムから形態形成制御に至る経路と環境情報から形態形成制御への経路はともに植物ホルモンを介している。植物の柔軟な形態形成を理解するためには植物ホルモンの作用機構を解明しなければならない。

ジベレリン (GA) は植物の発芽、節間の成長などに顕著な促進作用を示す植物ホルモンである。GA は生物学上の、あるいは農業上の歴史的偉業に深くかかわってきた。メンデルが遺伝学の基本法則を見いだす際に用いた背丈の低い形質のエンドウは、実は GA 生合成酵素遺伝子の変異体であった。世界の人口はこの100年間で約40億増加したが、1960年代に目覚ましい収穫率の向上をもたらした、現在の人類の食を支えている「緑の革命」のコムギ、イネの新品種はいずれも GA 関連の突然変異体である。GA が植物の形や生活環にいかにか大きな影響を与えているかがわかる。

動物と植物の間のゲノムや信号伝達の比較から受け

る印象は、形態や生存戦略の差を反映した両者の違いよりはむしろ類似性であった。例えば、GA 応答は、RGA (repressor of *gal-3*) など信号伝達の負の制御因子が GA 刺激によりユビキチン-プロテアソームの系で分解されることにより引き起こされる¹⁾。この経路の基本構造は、個々のタンパク質のモチーフの違いはあるものの、免疫系の転写因子 NF- κ B の活性化の経路に同じといってよい。植物ゲノムの特徴の1つは遺伝子機能の重複性である。シロイヌナズナの遺伝子は約26000程度と推定されているが、そのうち6割の遺伝子には相同性の高い関連遺伝子 (パラログ) が存在する。シロイヌナズナでは現在、ほとんどの遺伝子の挿入変異体が入手可能になっているが、遺伝子の機能重複のため重要な遺伝子の機能喪失変異体であっても明確な表現型を示さないものがある。

転写因子に関しても、シロイヌナズナでは約2000個の存在が予想されているが、機能重複のため従来の遺伝学的手法だけでは機能解析に限界がある。最近、高木らのグループはエチレン応答に関する転写抑制因子 ERF3 内の12アミノ酸からなる EAR モチーフを他の転写活性化因子に接続すると、これをリプレッサーに変換できることを見いだした。機能重複のみられる転写活性化因子 (CUC や AtMYB23) に EAR モチーフを接続して植物体に導入すると、関連遺伝子の機能がすべて抑制されたと考えられる表現型を示した²⁾。この抑制システムは転写因子の機能解析系として有望と思われる。

活性型 GA はプラスチド、小胞体、細胞質での多段階の反応により合成される。GA の主要な生合成反応は6種類の酵素により触媒される。矮性変異体のうち GA の投与により成長の回復するものは、GA 生合成酵素遺伝子のいずれかに欠損のあるものが多い。メンデルのエンドウは、GA 生合成の最終段階を触媒する GA 3-酸化酵素をコードする遺伝子の変異体である。

植物の安定した成長のためには植物体の GA 量が一定に維持されることが望ましい。植物体の GA 量が変わると、植物はフィードバック制御を発動させ GA 量を調整する。例えば、GA 生合成阻害剤を用いて植物体の GA 量を人為的に低下させると、GA 生合成反応の終盤を触媒する2つの合成酵素の遺伝子発現が転写レベルで上昇し、GA 分解酵素の遺伝子発現が減少する。逆

Functional Regulation of a Plant Transcription Factor by Gibberellin Levels

Sarahmi ISHIDA¹ and Yohsuke TAKAHASHI²

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

²Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University

Fig. 1 Phenotypes of transgenic tobacco plants expressing the dominant negative form of RSG. Comparison of SR1 (*Nicotiana tabacum* cv Petit Havana SR1) tobacco (left) and the transgenic tobacco harboring the dominant negative form of RSG (right).

に、植物体に過剰のGAを投与すると、GA合成酵素遺伝子の発現は抑制され、GA分解酵素の遺伝子発現が上昇する。この正負の協調したフィードバック制御によりGAの恒常性は維持されると考えられる¹⁾。GAフィードバック制御機構の解明では、植物体のGA量変化を感知して機能を変化させるタンパク質を同定することが重要になる。

2. bZIP型転写因子RSG

RSG (repression of shoot growth) は、塩基性領域ロイシンジッパー (bZIP) 構造をもつタバコの転写活性化因子である。RSGは350アミノ酸残基からなり、bZIP構造の他に、転写の活性化に関与すると考えられる酸性アミノ酸に富む領域、セリンに富む領域およびグルタミンのクラスターをもつ。直接の標的遺伝子の1つはGA合成系の*ent*-カウレン酸化酵素遺伝子である。シロイヌナズナではRSGと顕著な相同性を示す遺伝子が13存在していて、機能的な重複が予想された。実際、1つの遺伝子へのT-DNA (transferred DNA) 挿入変異では際だった形態の変化は認められなかった。そこでドミナントネガティブ型RSGによる植物体のRSGの機能抑制を試みた。すると、GA合成系の*ent*-カウレン酸

化酵素遺伝子の発現低下により活性型GA量が約1/10に減少し、植物の成長が著しく阻害され矮性を示した (Fig. 1)。この矮化した形質転換植物にGAを投与すると成長が回復した。RSGは植物体のGA量調節を介して植物の成長を制御しているのである³⁾。

3. RSGと相互作用する14-3-3タンパク質

RSGの機能制御機構を調べるためにRSGと特異的に相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により探索した。同定されたタンパク質の1つのグループは14-3-3とよばれるもので、動物、植物、菌類など真核生物に広く存在する制御因子であった⁴⁾。免疫沈降法による解析からRSGと14-3-3は植物細胞内で実際に複合体を形成していることが示された。14-3-3タンパク質そのものには、特定の機能や酵素活性は認められていない。14-3-3タンパク質は多くの場合二量体を形成し、他のさまざまなタンパク質と結合して、その活性や細胞内局在を調節している。細胞周期を制御するCDC25、細胞死を促進するBAD、孔辺細胞のH⁺-ATPaseなどが14-3-3の標的タンパク質として有名である⁵⁾。

14-3-3の結合配列のうち、さまざまな生物種で保存されているのはリン酸化セリンを中心とするモチーフ (RSXpSXP) である。RSGと14-3-3との結合にはRSGの114番目のセリン残基が必須であった。合成リン酸化ペプチドを用いたブルダウンアッセイ⁶⁾などから、このセリン残基のリン酸化によりRSGと14-3-3との結合が制御されていることが明らかになった⁶⁾。RSGの114番目のセリン残基をアラニンに置換した変異型RSG (S114A) は、植物細胞内で野生型RSGよりも強い転写活性化能をもつので、14-3-3は転写活性化因子RSGの機能を負に制御していると考えられた。

GFP (green fluorescent protein) との融合タンパク質を用いてRSGの細胞内分布と14-3-3との結合の関連を調べてみると、RSG-GFPは細胞全体に散在するのに対し14-3-3と結合できないRSG (S114A)-GFPは核に局在していた⁴⁾。したがって、14-3-3によるRSGの負の機能制御の実体は細胞内局在制御である。すなわち、14-3-3はRSGに結合し細胞質に拘束することで核内の標的遺伝子から空間的に隔離しているのである。核外輸送担体exportin 1/CRM1の阻害剤レプトマイシンBを用いた実験から、RSGは核と細胞質をシャトルしている転写因子であることが示された。14-3-3はRSGと結合するとRSGの核内輸送を抑制するか核外輸送を促進すると考えられた。14-3-3による核-細胞質シャトルタンパク質の制御の例としてはアフリカツメガエルのCDC25、哺乳類のFKHRL1、ヒストン脱アセチル化酵素、TAZなどがある。

Fig. 2 GAs regulate the intracellular localization of RSG. (a) The effect of uniconazole P on the growth of tobacco. The control untreated tobacco plant is at left, the uniconazole P-treated tobacco plant is in the center, and the GA-treated tobacco plant after treatment with uniconazole P is at right. (b) to (d) Confocal microscopic images of GFP fluorescence in leaves of transgenic tobacco plants expressing RSG-GFP. To inhibit GA biosynthesis, the transgenic plants were treated with uniconazole P (c) and then with GA_3^* (d). The control indicates normal growth conditions without any treatment (b). (e) to (g) Confocal microscopic images of GFP fluorescence in leaves of transgenic tobacco plants expressing S114A-GFP. The transgenic plants were treated with uniconazole P (f) and then treated with GA_3 (g). The control indicates normal growth conditions without any treatment (e). Uni, plants treated with uniconazole P for 7 days; Uni $\rightarrow$ GA, plants treated with uniconazole P for 7 days and then with GA_3 . Bar = 100 μ m.

4. GAによるRSGの機能制御

それではRSGの細胞内局在を制御する刺激とは何だろうか？ それを調べるためにRSG-GFPを発現する形質転換植物にさまざまな植物ホルモンなどを与えて、影響を調べた。その結果、GAの合成阻害剤ユニコナゾールを投与して植物体のGA量を低下させるとRSGは核に蓄積し（Fig. 2の(c)ではドット状のGFP蛍光がRSGの核局在を示している）、逆にGAを投与するとRSGは核から消失する事を見いだした（Fig. 2）。この結果は、GA合成酵素遺伝子の転写調節に関与するRSGの細胞内局在が、GAによって制御されていることを示し

Fig. 3 A model for the functional regulation of RSG by GAs. We propose that GA levels regulate the intracellular localization of RSG by 14-3-3 binding. Dissociation of RSG from 14-3-3 in response to a decrease in GA levels promotes nuclear accumulation of RSG. Active GAs cause cytoplasmic migration of RSG through phosphorylation of Ser-114 of RSG and 14-3-3-binding. RSGK, RSG kinase.

ている⁶⁾。

次にGA量によるRSGの細胞内局在制御が14-3-3との結合を介しているのかどうかを調べた。先に述べたように変異型RSG (S114A)は14-3-3との結合能力を失い、核に局在する。RSG (S114A)は野生型RSGと異なりGAの刺激を受けても核から消失せず、核に局在したままであった。すなわち、GAによるRSGの細胞内局在制御には14-3-3との結合が必要であることが明らかになった。GA信号伝達系の負の調節因子RGA, GAIなどは、GA信号を受容するとユビキチン修飾を受け26Sプロテアソーム系により分解され、核から消失する。そこでGAによるRSGの核からの消失にもタンパク質分解が関与しているのかどうかを調べるため、GA投与後のRSG-GFP融合タンパク質および内源性RSGの量的変動をウエスタン法により調べた。その結果、GA量を低下させても、GAを投与しても、RSGタンパク質の顕著な量的変動は認められないことが判明した⁶⁾。したがって、GAによるRSGの核からの消失において主要な役割を果たしているのはタンパク質分解ではなく、14-3-3との結合を介した細胞内局在調節と考えられる（Fig. 3）。

植物体のGA量は、生合成酵素と分解酵素の協調的な転写調節によるフィードバック制御により一定範囲内に維持されると考えられている。植物体のGA量低下時に核に蓄積し、GAを投与すると細胞質へ移動するというRSGの挙動は、この転写因子がGAのフィードバック制御に関与することを示唆する。これまでの解析で、RSGの直接の標的遺伝子の1つはGA合成系の

ent-カウレン酸化酵素遺伝子であることが明らかにされている。ところが、この遺伝子は GA フィードバック制御を受けていない。

それでは、植物体の GA 量低下時に RSG は核に局在してどのような遺伝子を制御しているのだろうか？ GA フィードバック制御を受けるのは 2 つの GA 生合成酵素（GA 20-酸化酵素，GA 3-酸化酵素）遺伝子である。そこで，RSG の機能を抑制した形質転換植物における GA 20-酸化酵素と GA 3-酸化酵素のフィードバック制御に変化がないか調べた。その結果，GA 3-酸化酵素遺伝子のフィードバック制御は RSG の機能を抑制した形質転換植物においても正常であったが，GA 20-酸化酵素遺伝子のフィードバック制御は顕著に抑制されていた⁶⁾。すなわち RSG の機能抑制により GA 20-酸化酵素遺伝子のフィードバック制御が失われたのである。RSG は植物体の GA 量が低下したときは，核内で新たな複合体を形成して直接あるいは間接的に GA 20-酸化酵素遺伝子の転写を促進しているのではないだ

ろうか。また RSG の 114 番目のセリン残基をリン酸化するキナーゼは GA 信号伝達の下流に位置し，RSG と 14-3-3 の結合，RSG の細胞内局在，ひいては標的遺伝子の転写を制御すると予測される。この RSG キナーゼが GA による RSG の機能制御の要と考えられ，その実体の解明が待たれる。

文 献

- 1) Fleet C. M. and Sun, T.-P. (2005) *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 77-85.
- 2) Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T. and Ohme-Takagi, M. (2003) *Plant J.* **34**, 733-739.
- 3) Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y. and Takahashi, Y. (2000) *Plant Cell* **12**, 901-915.
- 4) Igarashi, D., Ishida, S., Fukazawa, J. and Takahashi, Y. (2001) *Plant Cell* **13**, 2483-2497.
- 5) Roberts, M. R. (2003) *Trends Plant Sci.* **8**, 218-223.
- 6) Ishida, S., Fukazawa, J., Yuasa, T. and Takahashi, Y. (2004) *Plant Cell* **16**, 2641-2651.

石田さらみ（いしだ さらみ）

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻助手

連絡先：〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

E-mail: ishida@biol.s.u-tokyo.ac.jp

高橋陽介（たかはし ようすけ）

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻教授

連絡先：〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1

E-mail: ytakahas@hiroshima-u.ac.jp