

2022 年 12 月 28 日

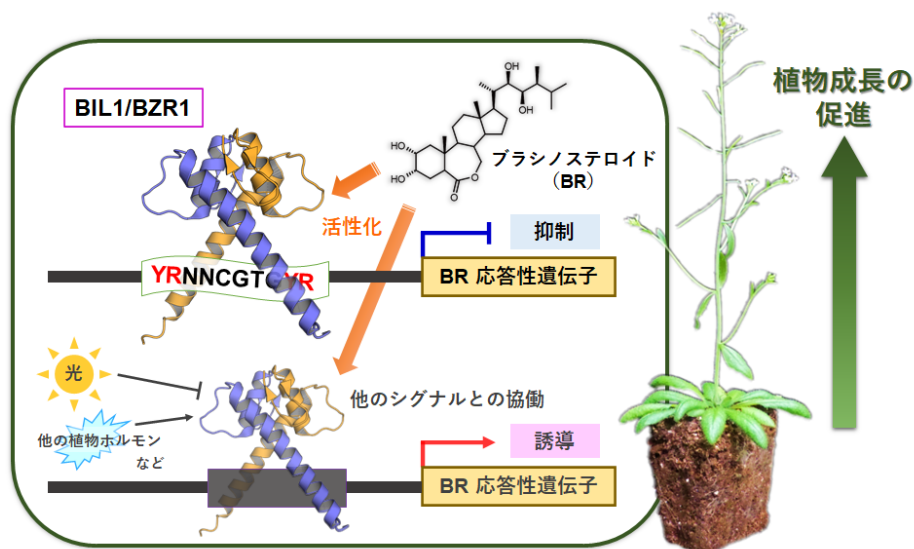
植物の成長を促す植物ホルモンの遺伝子発現調節の新しい仕組み —転写因子の DNA 形状読み取りが遺伝子発現の方向を決める—

概要

ブラシノステロイド (BR) は、植物の器官伸長や維管束形成など、成長を促進的に調節する植物ホルモンです。BR の生理機能は、細胞膜受容体への BR の結合に始まるシグナル伝達によって活性化されたマスター転写因子が、成長プロセスの各段階に応じてゲノム上の約 3000 種と多種類の遺伝子の発現制御を行うことで発揮されますが、これほど多数の BR 応答性遺伝子の誘導または抑制の双方向での発現がどのようにコントロールされているのかなど、詳しい分子機構は明らかにされていませんでした。

京都大学大学院生命科学科 宮川拓也 准教授 (前任: 東京大学 特任准教授)、中野雄司 同教授らと、東京大学 田之倉優 名誉教授、筑波大学生命環境系 野崎翔平 助教 (前任: 東京大学 特任研究員)、産業総合技術研究所生物プロセス研究部門 光田展隆 副研究部門長らの共同研究グループは、各機関の密接な連携により、マスター転写因子の BIL1/BZR1 が遺伝子プロモーター上の標的塩基配列への結合に影響を与える「DNA 形状を読み取る仕組み」を解明しました。さらに、BIL1/BZR1 はこの仕組みによってプロモーターに単独で強く結合が可能な場合に遺伝子の転写を抑制することが分かりました。今回得られた知見は、BR に特異的に応答する遺伝子と、光などの環境刺激や他の植物ホルモンと協働して BR に応答する遺伝子の発現が、BIL1/BZR1 の標的塩基配列への結合様式の違いにより、ダイナミックに調節される可能性を示唆し、その全体像の解明に迫るための重要な手掛かりとして期待されます。

本研究成果は、2022 年 12 月 15 日 (現地時間) に英国の国際学術誌「*Nature Plants*」にオンライン掲載されました。



植物成長の促進的調節に働くブラシノステロイドの BIL1/BZR1 を介した双方向の遺伝子発現制御の概要

1. 背景

植物ホルモン^{※1}のブラシノステロイド (BR) は、植物に固有のステロイドホルモンとして、陸上植物に普遍的に存在しています。BR は植物の器官伸長や維管束形成などの成長に関わる多くのプロセスで必須の役割を担い、成長を促進的に調節しています。植物の成長プロセスで適宜合成された BR は、細胞膜の受容体型キナーゼ^{※2}に作用し、細胞内シグナル伝達経路を介して植物特異的な転写因子を活性化します。我々は以前に、この BR の生理機能の発現で鍵となる転写因子 (マスター転写因子) の BIL1/BZR1 が、真核生物に広く保存されている bHLH 転写因子^{※3}とは異なる非正規な二量体化構造を形成することにより、G-box モチーフと呼ばれる塩基配列 (CACGTG) の 5'側 2 塩基 (下線) の配列を厳密に認識しないこと、すなわち NN-BRRE-core モチーフと名付けた 6 bp の配列 (NNCGTG: N は 4 種類の塩基のいずれか) に結合することを報告しました (Nosaki et al., Nature Plants, 4: 771-776, 2018)。しかし、このように G-box モチーフに対する認識が緩いにもかかわらず、BIL1/BZR1 が bHLH 転写因子と同程度に限られたゲノム DNA 上のプロモーター領域に結合できる仕組みは未解明であり、また、多数の BR 応答性遺伝子の誘導または抑制の双方向での発現がどのようにコントロールされているのかなど、詳しい分子機構は明らかにされていませんでした。

2. 研究手法・成果

本研究では、植物の成長を支えるステロイド型植物ホルモン BR がマスター転写因子を介して遺伝子発現を調節する仕組みで不可欠な 2 つの新たな知見が得られました。

近年、単独の転写因子の結合配列をゲノム DNA 上で探索するために DNA アフィニティー精製-配列決定 (DNA affinity purification-sequencing: DAP-seq) 法^{※4}が開発され、植物の多数の転写因子の DAP-seq データが公開されています。このデータから得られる結合配列は、ゲノム DNA に対する転写因子の物理的親和性だけで決定されており、実際の生理機能とどのように関連しているかは不明でした。そこで研究グループは、BIL1/BZR1 の DAP-seq データと、BIL1/BZR1 を介して発現が制御される BR 応答性遺伝子の DNA マイクロアレイ^{※5}データを統合し、BIL1/BZR1 の生理的意義のあるプロモーター上の結合配列を解析しました。その結果、BIL1/BZR1 単独のプロモーターへの結合は、BR 応答性遺伝子の発現誘導ではなく抑制に必要であることが明らかになりました (図 1)。また、BIL1/BZR1 の結合配列に対する親和性は、NN-BRRE-core モチーフ (NNCGTG) の 6 塩基を挟む片側各 2 塩基 (以降、隣接 2 塩基) の配列に大きく依存し、この隣接 2 塩基が共に YR (Y はピリミジン塩基の T または C、R はプリン塩基の A または G) のときに、BIL1/BZR1 は単独で NN-BRRE-core モチーフに強く結合できることがわかりました (図 1)。

さらに本研究では、隣接 2 塩基の配列を変えた様々な DNA 断片と BIL1/BZR1 との複合体の構造を X 線結晶構造解析^{※6}により決定し、得られた構造情報から各アミノ酸残基の DNA 断片との相互作用への寄与を変異解析により評価しました。その結果、BIL1/BZR1 と隣接 2 塩基の間に相互作用は見られない一方、BIL1/BZR1 は DNA の形状を歪めて DNA 主鎖^{※7}の複数のリン酸基と広範な相互作用ネットワークを形成していました (図 2)。隣接 2 塩基の配列の組み合わせのうち、YR は DNA の二重らせん構造中で塩基間の接触面積が最も小さく相互作用が緩いことから、隣接 2 塩基に対する選択性は、DNA の歪み易さに基づく BIL1/BZR1 の「DNA 形状を読み取る仕組み」によって達成されていることが明らかになりました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、BIL1/BZR1 が NN-BRRE-core モチーフを直接識別するにもかかわらず、実際にはその中から、より選択的にプロモーター上の結合位置を決定し、BR 応答性遺伝子の発現を抑制する仕組みを突き止めるこ

とに成功しました。この仕組みは、bHLH 転写因子などの G-box モチーフに結合する他の転写因子との競合を避け、BR 特異的な応答に関わる遺伝子の発現を調節するのに役立つと考えられます。一方、BIL1/BZR1 は bHLH 転写因子の PIF4 などと相互作用することが知られています。このような転写因子との相互作用は、BR 応答性遺伝子のプロモーターへの新たな結合選択性を生み出すことで、光などの環境刺激や他の植物ホルモンに協調して誘導される BR 応答性遺伝子の発現を調節している可能性が示唆されます。今後は、本研究で解明した BIL1/BZR1 の標的塩基配列への結合性と転写因子間相互作用を手掛かりに、BR 応答性遺伝子の発現調節の全体像のさらなる解明が期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、以下の研究費の支援を受けて実施されました。

日本学術振興会 科学研究費助成事業 (21H02114, 19H04855, 19K23658, 18H02140, 17H05835)、日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) (JP20am0101077, JP21am0101107)

<用語解説>

※1 **植物ホルモン**: 植物により合成され、特定の受容体タンパク質への作用を介して植物の成長や環境応答などの制御に関わる低分子の有機化合物のこと。現在までに、ブラシノステロイドを含めて9種が植物ホルモンとして認知されている。

※2 **受容体型キナーゼ**: 細胞膜などの生体膜に局在し、多くは1本の α ヘリックス(タンパク質に特徴的な右巻きのらせん構造)からなる膜貫通ドメイン(タンパク質を構成する機能単位)をもつI型膜タンパク質である。細胞外または細胞小器官の内腔に植物ホルモンなどのリガンド分子を結合するドメインをもち、生体膜を挟んで細胞質側にタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)の活性を有するドメインをもつ。

※3 **bHLH 転写因子**: bHLH は basic-Helix-Loop-Helix (塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス) の略で、DNA との相互作用に関わる塩基性残基に富んだ領域を含む α ヘリックスと二量体形成を担う α ヘリックスがグループ領域を介して連結した立体構造をとる。この構造は、植物を含む真核生物において、転写因子の典型的な DNA 結合ドメインの一つとして広く使われている。

※4 **DAP-seq 法**: 磁気ビーズに固定した転写因子と断片化したゲノム DNA を混合し、転写因子との結合により磁気ビーズ上に濃縮された DNA 断片の配列を次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法。これにより、転写因子が単独で結合可能な配列とゲノム DNA 上の位置情報が得られる。

※5 **DNA マイクロアレイ**: 個体・組織・細胞における遺伝子発現量を測定する方法の一つ。植物などの生体試料から抽出した mRNA を鋳型として蛍光色素などで標識した cDNA 断片を合成する。各遺伝子に特異的な相補配列のオリゴヌクレオチドを配置したプレートに、合成した標識 cDNA をハイブリダイゼーションさせ、プレート上に検出される蛍光強度比から遺伝子発現量比を解析する。

※6 **X 線結晶構造解析**: タンパク質や DNA などの生体高分子や低分子化合物の立体構造を原子分解能で決定する方法の一つ。目的の分子または分子複合体の単結晶に様々な角度から X 線を照射して得られる X 線回折像を解析し、結晶中の X 線散乱源である電子密度の空間分布から分子モデルを構築する。

※7 **DNA 主鎖**: DNA の 4 種類のヌクレオチドに共通する 5'リン酸基と 2'-デオキシ-D-リボースからなる構造部分。

<論文タイトルと著者>

タイトル Brassinosteroid-induced gene repression requires specific and tight promoter binding of BIL1/BZR1 via DNA shape readout (ブラシノステロイドによる遺伝子抑制には、DNA形状の読み取りを介したBIL1/BZR1の特異的かつ強固なプロモーター結合が必要である)

著者 Shohei Nosaki, Nobutaka Mitsuda, Shingo Sakamoto, Kazuki Kusubayashi, Ayumi Yamagami, Yuqun Xu, Thi Bao Chau Bui, Tohru Terada, Kenji Miura, Takeshi Nakano, Masaru Tanokura, Takuya Miyakawa

掲載誌 *Nature Plants*

DOI <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01289-6>

<お問い合わせ先>

宮川 拓也 (みやかわ たくや)

所属・職位: 生命科学研究科・准教授

TEL: 075-753-6384 FAX: 075-753-6398

email: miyakawa.takuya.7j@kyoto-u.ac.jp

<報道・取材に関するお問い合わせ先>

京都大学 総務部広報課国際広報室

Tel: 075-753-5729 Fax: 075-753-2094

email: comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

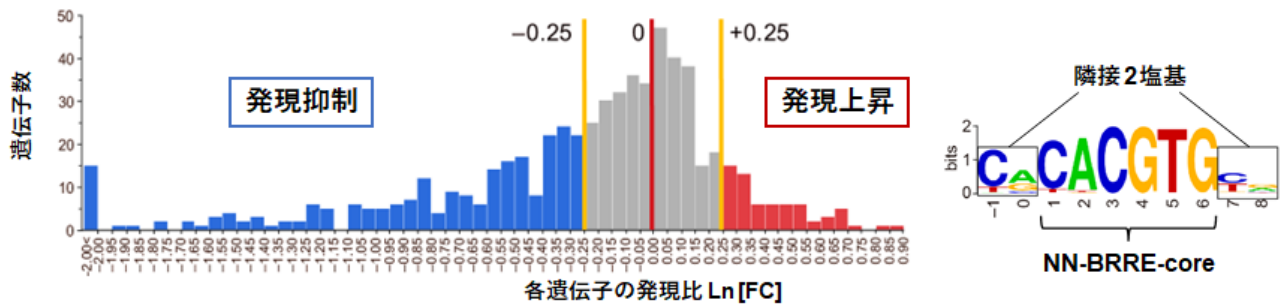
筑波大学 広報局

Tel: 029-853-2040 Fax: 029-853-2014

email: kohositu@un.tsukuba.ac.jp

<参考図表>

■ プロモーター上に BIL1/BZR1 の DAP-seq ピークを「もつ」遺伝子



■ プロモーター上に BIL1/BZR1 の DAP-seq ピークを「もたない」遺伝子

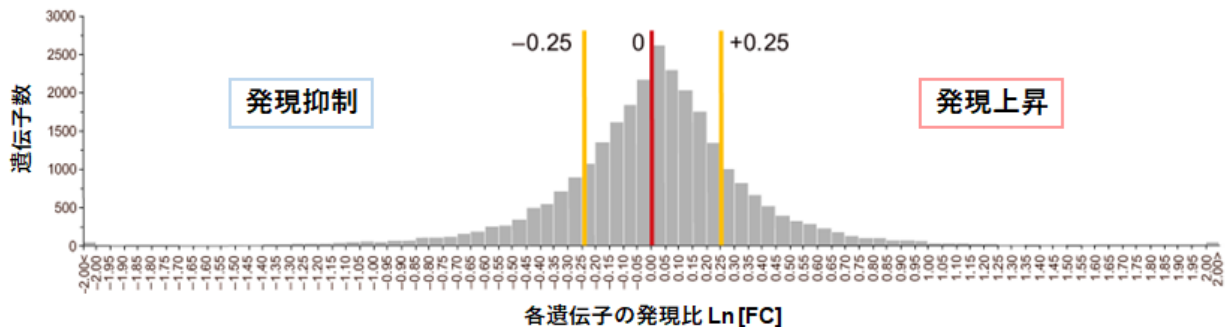


図 1. BIL1/BZR1 が単独でプロモーターに強く結合した遺伝子の発現抑制

グラフ横軸の各遺伝子の発現比は、DNA マイクロアレイのデータから得られた数値 Ln[FC]で表されており、これは BR 処理群の各遺伝子の発現量を対照群の同遺伝子の発現量で割った値 Fold Change (FC) の常用対数を示している。縦軸は各 Ln[FC]の範囲の値をもつ遺伝子の総数である。プロモーター上に BIL1/BZR1 の結合を示す DAP-seq ピークをもつ遺伝子では、発現比が負の値 (BR 処理で発現抑制) を示すものが統計的に有意に多く存在する。右上の塩基配列は、各遺伝子プロモーター上の BIL1/BZR1 の DAP-seq ピーク位置から解析された BIL1/BZR1 の結合配列の特徴を示している。

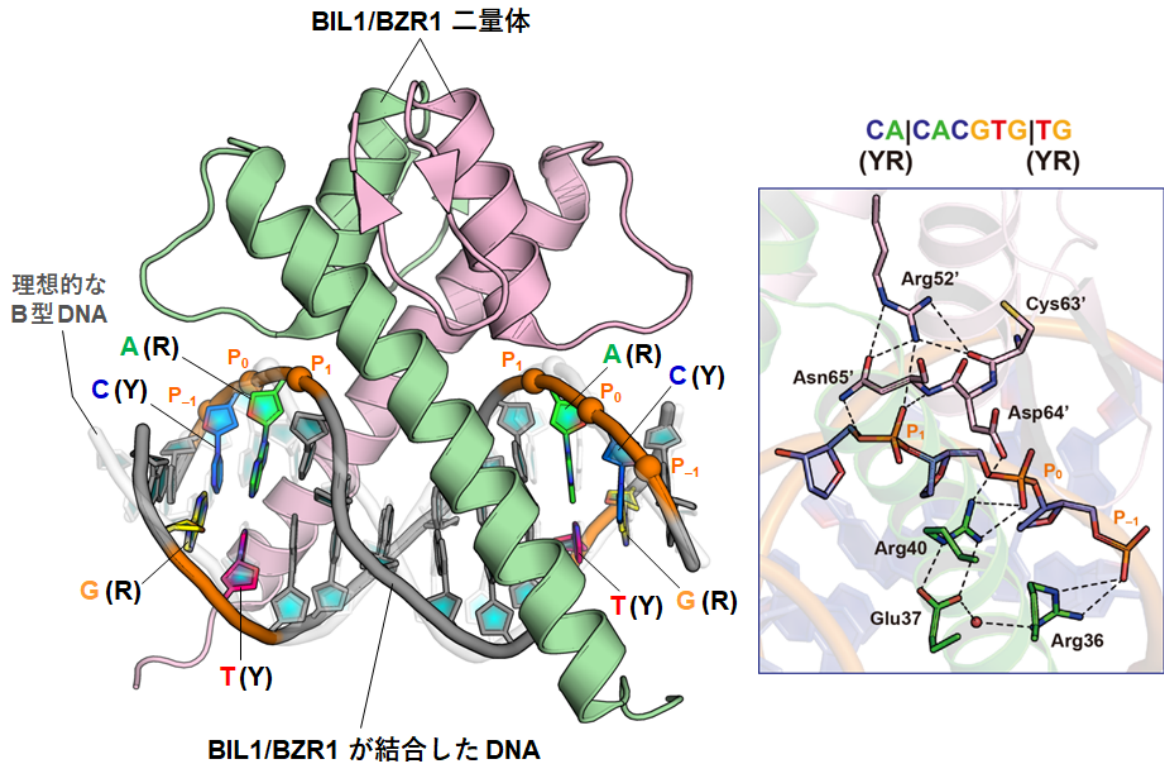


図 2. BIL1/BZR1 の結合に伴う DNA の歪みと相互作用ネットワークの形成

BIL1/BZR1 は二量体（緑とピンクはそれぞれ異なる分子）を形成し、DNA の主溝に結合する。BIL1/BZR1 が結合した DNA は、理想的な B 型 DNA と比較して歪んだ形状をとる（左図）。この歪みを許容するために、隣接 2 塩基に対応する塩基の位置が大きく変化している。BIL1/BZR1 の結合に伴う DNA の歪みは、BIL1/BZR1 のアミノ酸残基と DNA 主鎖のリン酸基 (P_{-1} , P_0 , P_1) の相互作用ネットワークの形成に必要である（右図）。右図の破線は相互作用ネットワークを構成する水素結合を示し、Glu37 と Arg36 の間の赤い球は水分子を表している。また、BIL1/BZR1 二量体を構成する各分子のアミノ酸残基は、左図に対応する緑とピンクのスティックモデルで示されている。