

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成28年度 博士課程進学  
氏名 野崎 翔平  
指導教員名 宮川 拓也

### 論文題目

植物ホルモン・ブラシノステロイドのマスター転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤

#### 1. 背景と目的

ブラシノステロイド (brassinosteroid; BR) は植物に普遍的に存在する植物ホルモンであり、植物において葉や茎などの器官成長促進、植物細胞分裂・伸長・分化の制御、受精促進、葉緑体制御から、植物の自然免疫やストレス耐性向上などの環境応答機構にも及ぶ多岐にわたる生理活性を有する。BR の生理作用には、BR 情報伝達のマスター転写因子 BZR ファミリー転写因子群によって引き起こされる特異的かつ多様な遺伝子応答が不可欠である。BZR 転写因子は植物間で極めて高度に保存される DNA 結合ドメインを介して、標的遺伝子のプロモーター領域上の特定の塩基配列を特異的に認識する。BZR 転写因子によって直接制御される BR 応答性遺伝子のプロモーター上には G-box 配列 (5'-CACGTG-3') や BR 応答配列 (5'-CGTG<sup>C</sup><sub>1</sub>G-3') が多く存在することがわかっていたが、BZR 転写因子の DNA 結合特異性はこれまで十分に理解されていなかった。そこで本研究では生化学的解析および構造生物学的手法を用いて、BZR 転写因子の DNA 結合特異性を詳細に理解することを目的とした。

#### 2. BZR 転写因子および bHLH 転写因子の生化学的解析

本研究では、BZR 転写因子の DNA 結合ドメインが、真核生物で広く保存されるヘリックス・ループ・ヘリックス (basic helix-loop-helix; bHLH) ファミリー転写因子 (典型的な G-box 配列結合型) と類似の二次構造および塩基配列認識モチーフをもつことに着目した。ゲルシフトアッセイ (EMSA) と等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いた *in vitro* 解析の結果、BZR 転写因子は G-box 配列 (5'-CACGTG-3') 中の C<sub>1</sub>A<sub>2</sub> 塩基に対する特異性が典型的 bHLH 転写因子に比べて緩められていることがわかった。またゲル濾過クロマトグラフィ

一と ITC の結果から、BZR 転写因子は一般的な bHLH 転写因子と同様に溶液中でホモ二量体として存在し、1つのコア塩基配列に対して二分子で認識することも明らかになった。

### 3. BIL1/BZR1 と標的 DNA の複合体の X 線結晶構造解析

BZR 転写因子の DNA 結合特異性を原子レベルで理解するために、シロイヌナズナにおける BR のマスター転写因子 BIL1/BZR1 と標的 DNA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。結晶化においては、結晶化促進タグとしてマルトース結合タンパク質 (MBP) を BIL1/BZR1 に融合させたキメラタンパク質を利用した。MBP と BIL1/BZR1 を繋ぐリンカーの長さ、および標的 DNA の長さ・形状・塩基配列を検討することで、高分解の X 線回折データを与える結晶の作製に成功した。構造既知の MBP を鋳型にした分子置換法により位相を決定し構造解析を行うことで、分解能 2.17 Å の MBP 融合 BIL1/BZR1 および標的 DNA との複合体の立体構造の決定に至った。これは植物間で高度に保存されている BZR 転写因子において初めて解明された立体構造である。

### 4. BIL1/BZR1 の標的 DNA 認識の構造基盤

BIL1/BZR1 の構造は bHLH 転写因子と同様にヘリックス・ループ・ヘリックスを基盤としたホモ二量体構造を形成し、 $\alpha$ ヘリックスを形成した塩基性領域 (DNA 認識ヘリックス) が DNA の主溝にはまり込む形で DNA に結合していた (図 1)。一方 BIL1/BZR1 においては bHLH 転写因子とは異なり、短いヘリックス 2 の C 末端側に  $\beta$ ヘアピン構造が形成されていた。この構造は BIL1/BZR1 の二量体界面に位置することで、DNA 認識ヘリックス間の角度を bHLH 転写因子よりも約  $20^\circ$  も広げていることがわかった (図 1)。

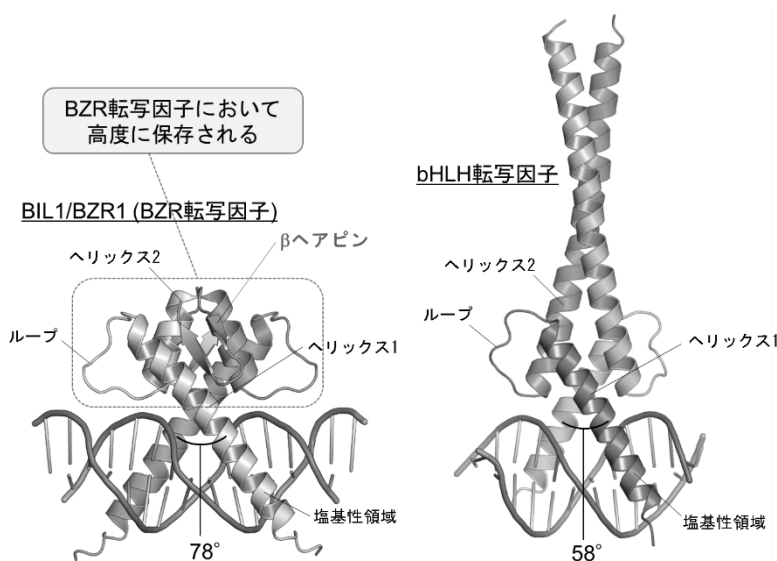
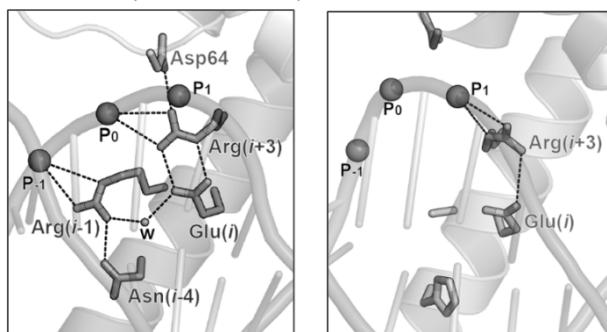


図 1  
BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子の全体構造.

シロイヌナズナ由来 BZR 転写因子 BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子 (図では例としてシロイヌナズナ由来 MYC2 の構造を表示) が標的 DNA を認識する複合体の立体構造がそれぞれ示されている。

BIL1/BZR1 の塩基認識について G-box 配列 (5'-CACGTG-3') を含む複合体構造を調べたところ、塩基認識に係わる残基は bHLH 転写因子と同様に DNA 認識ヘリックス上の Glu(*i*), Arg(*i*+3), Arg(*i*+4) であることがわかった。一方、BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子の構造比較では、Arg(*i*+4) による G<sub>4</sub> (C<sub>3</sub> の相補塩基) の認識様式は両者で共通であるのに対し、Glu(*i*) による C<sub>1</sub>A<sub>2</sub> (T<sub>5</sub>G<sub>6</sub> の相補塩基) の認識様式は Glu(*i*) の配向の変化により異なっていた。BIL1/BZR1 の Glu(*i*) は bHLH 転写因子と同様に Arg(*i*+3) および DNA を交えた相互作用ネットワークにより固定されていたが、ネットワーク形成様式や Arg(*i*+3) が相互作用する DNA のリン酸基が異なっていることがわかった (図 2)。以上の BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子間での構造的な違いは、DNA との相互作用に係わる残基の変異体や多様な塩基配列の DNA を用いた詳細な比較解析の結果によって裏付けられた。興味深いことに、DNA のリン酸基の位置は BIL1/BZR1 の大きく傾いたヘリックスとそれに伴うループの特徴的な配置によって空間的に制限されていた。以上の構造的知見は、BIL1/BZR1 の二量体形成領域におけるβヘアピン構造が、大きく傾いたヘリックスを通じて DNA の形状に制約を与え、DNA との相互作用ネットワークの形成様式を変化させることにより、Glu(*i*) の C<sub>1</sub>A<sub>2</sub> に対する特異的認識を緩めていることを強く示唆している。また BIL1/BZR1 の二量体形成や DNA との相互作用に係わる残基はいずれも、高等植物のみならずコケやシダを含む陸上植物の BZR 転写因子型 DNA 結合ドメインにおいても高度に保存されており、BZR 転写因子型 DNA 結合ドメインの最も重要な特徴であると考えられる (図 1, 2)。

BIL1/BZR1 (BZR転写因子)      典型的bHLH転写因子



BZR転写因子において  
高度に保存される。

図 2  
BIL1/BZR1 と典型的 bHLH 転写因子  
の相互作用ネットワーク様式の比較。

BZR 転写因子 BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子 (図では例としてシロイヌナズナ由来 MYC2 の構造を表示) における Glu(*i*), Arg(*i*+3), DNA が係わる相互作用ネットワークがそれぞれ示されている。小球 (w) は水分子を、大球 (P<sub>-1</sub>, P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub>) は DNA 主鎖のリン酸基を表す。

## 5. BIL1/BZR1 のコア塩基外の周辺配列に対する DNA 結合特異性の分子機構

本研究では、BIL1/BZR1 が G-box 配列を含めたコア塩基配列だけではなくその周辺配列に対しても DNA 結合特異性をもつことを見出した。転写因子を含めた DNA 結合タンパク

質は、特定の DNA 領域を特異的に認識するために主に 2 通りの方法を用いる。1 つは塩基の化学的性質を直接的に読み取る方法、そしてもう 1 つは塩基配列依存的に変化する DNA のコンフォメーションを読み取る方法である。BIL1/BZR1 も同様の DNA 結合特異性を有すると仮説を立て、DNA との相互作用に直接的または間接的に係わる残基の変異体を用いて特異性に寄与する残基の特定を行った。変異体の解析の結果、Glu37(*i*) と Asp64 が周辺塩基配列に対する特異性に関与していることが示唆された。Glu(*i*) および Asp64 はいずれも DNA との相互作用ネットワークの強化に必要な残基である。この相互作用ネットワークでは、Glu(*i*) および Asp64 残基との塩橋によって固定される 2 つの Arg 残基 Arg(*i*-1) および Arg(*i*+3) がコア配列周辺に位置する DNA リン酸基 P<sub>-1</sub> および P<sub>0</sub> をそれぞれ直接的に認識する (図 2)。これらのリン酸基の位置は塩基配列依存的に変化するため、BIL1/BZR1 を交えた相互作用ネットワーク内の水素結合・塩橋パターンに変化が生じ、結合自由エネルギーすなわち DNA 結合親和力に強弱が生まれていると考察される。

## 6. 総括

生体内では同一の塩基配列モチーフが数多くの転写因子によって認識されており、これが生命現象の複雑さを生み出す一因になっている。G-box 配列はこのような塩基配列の 1 つであり、植物のゲノム上に多数点在し bHLH 転写因子を含むさまざまなファミリーの転写因子に認識される。本研究における解析により、BZR 転写因子は典型的な bHLH 転写因子と同様に G-box 配列結合型の転写因子であり、bHLH 転写因子とは競合しうる関係にあることを明らかにした。また、BZR 転写因子は高度に保存される二量体構造と DNA との相互作用ネットワークを利用して、G-box 配列に対する塩基認識特異性を緩めており、さらに BZR 転写因子特有の新規な分子機構で周辺塩基配列への特異性を生み出していることがわかった。BR 情報伝達を担う BZR 転写因子は bHLH 転写因子と共通の塩基認識モチーフを有しながら、非典型的な二量体形成様式をとることにより、bHLH 転写因子が認識する遺伝子プロモーターだけでなく、bHLH 転写因子が認識しづらい遺伝子プロモーターの認識も可能にしていると推測される。本研究で明らかにした BZR 転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤は、BR 応答遺伝子の多様さを生み出す仕組みそのものであるといえ、多様な生理機能を制御する BR 情報伝達の理解に大きく貢献する知見と考えられる。

## 発表論文

Nosaki, S., Miyakawa, T., Xu, Y., Nakamura, A., Hirabayashi, K., Asami, T., Nakano, T. & Tanokura, M. (2018). Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1. *Nature Plants* 4, 771–776.