

博士論文 (要 約)

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

野崎 翔平

目次

略語表

第1章 序論	1
1-1 植物ホルモン・ブラシノステロイド.....	2
1-2 主要な BR 情報伝達経路.....	2
1-3 BZR ファミリー転写因子.....	4
1-4 BIL1/BZR1 および BES1 による遺伝子制御.....	5
1-5 BZR 転写因子の DNA 結合特異性.....	6
1-6 本研究の目的.....	7
図表.....	8
第2章 BZR 転写因子および bHLH 転写因子の生化学的解析	13
2-1 本章の概要.....	14
2-2 実験方法.....	15
2-2-1 各タンパク質の発現ベクターの構築.....	15
2-2-2 各 MBP 融合タンパク質の調製.....	16
2-2-3 ゲルシフトアッセイ (EMSA).....	18
2-2-4 等温滴定量熱測定 (ITC).....	20
2-3 結果・考察.....	22
2-3-1 各タンパク質および二重鎖 DNA の調製.....	22
2-3-2 EMSA および ITC による生化学的解析.....	22
2-3-3 まとめ.....	24
図表.....	25
第3章 BIL1/BZR1 の X 線結晶構造解析	37
3-1 本章の概要.....	38
3-2 実験方法.....	40
3-2-1 結晶化促進 MBP 融合用の発現ベクターの構築.....	40
3-2-2 BIL1/BZR1 の結晶化コンストラクト作製.....	41
3-2-3 MBP 融合 BIL1/BZR1 および共結晶化用 DNA の調製.....	42

3-2-4	MBP 融合 BIL1/BZR1 と標的 DNA との共結晶化.....	43
3-2-5	スクリーニング結晶の X線結晶構造解析.....	43
3-2-6	結晶化条件の最適化と構造解析.....	44
3-3	結果・考察.....	22
3-3-1	MBP 融合 BIL1/BZR1 および共結晶化用 DNA のコンストラクション.....	45
3-3-2	結晶化スクリーニングおよび X線構造解析.....	46
3-3-3	結晶化条件の最適化と構造決定.....	47
3-3-4	まとめ.....	49
	図表.....	50
第4章	BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する複合体構造.....	66
4-1	本章の概要.....	67
4-2	実験方法.....	67
4-2-1	三次元構造解析.....	67
4-2-2	BIL1/BZR1 および PIF4 の点変異体の調製.....	67
4-2-3	ゲルシフトアッセイ (EMSA).....	68
4-3	結果・考察.....	68
4-3-1	BIL1/BZR1 の全体構造および二量体形成様式.....	68
4-3-2	BIL1/BZR1 の DNA 認識様式.....	70
4-3-3	BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の DNA 結合様式の比較.....	72
4-3-4	BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の塩基認識特異性.....	74
4-3-5	まとめ.....	76
	図表.....	77
第5章	BIL1/BZR1 のコア配列周辺の塩基配列に対する DNA 結合特異性.....	101
5-1	本章の概要.....	102
5-2	実験方法.....	102
5-2-1	BIL1/BZR1 の変異体調製.....	102
5-2-2	ゲルシフトアッセイ (EMSA).....	103
5-3	結果・考察.....	103
5-3-1	BIL1/BZR1 のコア配列周辺の塩基配列に対する DNA 結合特異性.....	103

5-3-2	BIL1/BZR1 の DNA 結合特異性を打ち消す変異体.....	104
5-3-3	周辺配列の特異性に係わる構造基盤.....	106
5-3-4	まとめ.....	108
	図表.....	110
第 6 章	総合討論.....	116
6-1	本研究の概要.....	117
6-2	BZR 転写因子のパラログ間の比較.....	119
6-3	他の転写因子ファミリーとの DNA 結合特異性の違い.....	123
6-4	BZR 転写因子と他の転写因子ファミリーの相互作用.....	124
6-5	今後の課題と展望.....	127
	図表.....	128
	引用文献.....	133

謝辞

略語表

ARF	<u>AUXIN RESPONSE FACTOR</u>
BAK1	<u>BR1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1</u>
BAM	β - <u>amylase-like protein</u>
BEH	<u>BES1/BZR1 HOMOLOG</u>
BES1	<u>BR11-EMS SUPPRESSOR 1</u>
bHLH	<u>basic helix-loop-helix</u>
BEE1	<u>BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION 1</u>
BIL1	<u>BRZ-INSENSITIVE LONG HYPOCOTYL 1</u>
BIM1	<u>BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1</u>
BIN2	<u>BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2</u>
BKI1	<u>BR11 KINASE INHIBITOR 1</u>
BOP1	<u>BLADE-ON-PETIOLE 1</u>
BR	<u>brassinosteroid</u>
BR1	<u>BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1</u>
BRRE	<u>brassinosteroid-responsive element</u>
BSK1	<u>BRASSINOSTEROID-SIGNALLING KINASE 1</u>
BSS1	<u>BRZ-SENSITIVE SHORT HYPOCOTYL 1</u>
BSU1	<u>BR11 SUPPRESSOR 1</u>
bZIP	<u>basic leucine zipper</u>
BZR	<u>BRASSINAZOLE-RESISTANT</u>
CDG1	<u>CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1</u>
ChIP	<u>chromatin immunoprecipitation</u>
DAP-seq	<u>DNA affinity purification sequencing</u>
DNA	<u>deoxyribonucleic acid</u>
DTT	<u>dithiothreitol</u>
EAR	<u>ETHYLENE RESPONSE FACTOR-associated amphiphilic repression</u>
EDTA	<u>ethylenediaminetetraacetic acid</u>
EMSA	<u>electrophoretic mobility shift assay</u>
GSK3	<u>Glycogen synthase kinase 3</u>
HY5	<u>HYPOCOTYL 5</u>
IPTG	<u>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</u>
ITC	<u>isothermal titration calorimetry</u>
LB	<u>lysogeny broth</u>

MBP	<u>m</u> altose- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein
MCS	<u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite
NAC	<u>n</u> o apical meristem, <i>Arabidopsis</i> transcription activation factor and <u>c</u> up-shaped cotyledon
OD₆₀₀	optical <u>d</u> ensity at <u>600</u> nm
PAGE	poly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis
PCR	polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PDB	<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
PF	<u>P</u> hoton <u>F</u> actory
PIF4	<u>P</u> HYTOCHROME <u>I</u> NTERACTING <u>F</u> ACTOR <u>4</u>
PEG	poly <u>e</u> thylene glycol
PP2A	Protein <u>P</u> hosphatase <u>2A</u>
RD26	<u>R</u> ESPONSIVE TO <u>D</u> ESICCATION <u>26</u>
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid
SDS	sodium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
TCEP	tris(2- <u>c</u> arboxy <u>e</u> thyl)phosphine
TPL	<u>T</u> OP <u>L</u> ESS
Tris	<u>t</u> ris(hydroxymethyl)aminomethane
WT	<u>w</u> ild <u>t</u> ype
Y2H	yeast <u>t</u> wo- <u>h</u> ybrid

第 1 章

序論

1-1 植物ホルモン・ブラシノステロイド

ブラシノステロイド (brassinosteroid; BR) は植物ホルモンの一種であり、ブラシノライド (brassinolide) やカスタステロン (castasterone) を代表とする共通のステロイド骨格および生理作用をもつ化合物の総称である (図 1-1) (Grove *et al.* 1979, Zhao & Li 2012). BR は非常に多くの植物種に普遍的に存在しており、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およぶ多岐にわたる生理活性を有する (Li & Chory 1990, Krishna 2003, Ashraf *et al.* 2010, Ye *et al.* 2010, Gudesblat & Russinova 2011, Wang *et al.* 2012, Miyaji *et al.* 2014). これらの生理作用の多くは他の植物ホルモンと相互作用 (クロストーク) することで協同的あるいは拮抗的に働いている (Nemhauser *et al.* 2006, Santner *et al.* 2009, Depuydt & Hardtke 2011). 例えば、BR は他の植物ホルモンであるジベレリン (gibberellin) やオーキシシン (auxin) とクロストークすることで伸長成長を協同的に促す. 近年、BR の生合成経路や情報伝達経路に関与する因子が次々と同定され、その主経路が解明されつつある.

1-2 主要な BR 情報伝達経路

BR の情報伝達は、BR が細胞膜上に局在する受容体キナーゼ BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1) の細胞質外ドメインに結合することで開始される (図 1-2) (Li & Chory 1997, Wang *et al.* 2001, Kinoshita *et al.* 2005). BR を受容した BRI1 は、同じく受容体キナーゼである (BAK1) をリクルートする (Li *et al.* 2002, Nam & Li 2002). 最も活性の強い BR であるブラシノライドは、この BRI1 と BAK1 を繋ぐ「のり」としての機能が強い. BR 非存在下では BRI1 KINASE INHIBITOR 1 (BKI1) が BRI1 の細胞内キ

ナーゼドメインに結合し BRI1 のキナーゼ活性を抑制しているが、BR 存在下ではリクルートされた BAK1 が BKI1 を競合的に BRI1 から解離にさせることで、BRI1 および BAK1 のキナーゼドメイン同士による自己リン酸化を引き起こす (Wang & Chory 2006). これらの詳細な作用機序は、構造生物学的解析および生化学的解析によって裏付けられた (Hothorn *et al.* 2011, She *et al.* 2011, Santiago *et al.* 2013, Wang *et al.* 2014). 自己リン酸化によって活性化した BRI1 は、抑制因子 BKI1 をリン酸化することで不活性化すると同時に、細胞膜にアンカリングされる BRASSINOSTEROID-SIGNALLING KINASE 1 (BSK1) / CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1 (CDG1) をリン酸化する。リン酸化修飾を受けた BSK1 / CDG1 は、BRI1 SUPPRESSOR 1 (BSU1) 脱リン酸化酵素と結合しリン酸化する (Tang *et al.* 2008, Kim *et al.* 2009, Kim *et al.* 2011). リン酸化された活性型 BSU1 は Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 様キナーゼ BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) に結合できるようになり、BIN2 を脱リン酸化することで不活化させる (Kim *et al.* 2009, Kim *et al.* 2011).

BR 非存在下では、BR 情報伝達のマスター転写因子 BRZ-INSENSITIVE LONG HYPOCOTYL 1 / BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BIL1/BZR1) およびそのパラログの BES1/BZR2 (BRI1-EMS SUPPRESSOR 1 / BZR2) が BIN2 によりリン酸化修飾を受ける (図 1-2) (Li & Nam 2002, He *et al.* 2002, Yin *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002). リン酸化された BIL1/BZR1 および BES1 は 14-3-3 タンパク質によって細胞質内に保持され、ユビキチン-プロテアソーム系による分解へと導かれる (Vert & Chory 2006, Gampala *et al.* 2007, Ryu *et al.* 2007, Bai *et al.* 2007). 最近では、BRZ-SENSITIVE SHORT HYPOCOTYL 1 (BSS1) / BLADE-ON-PETIOLE 1 (BOP1) というタンパク質が BR 非存在下で集合して顆粒を形成し、14-3-3 タンパク質と同様に BIL1/BZR1 を捕捉し細胞質内に保持することが明らかになった (Shimada *et al.* 2015).

BR 存在下では、上述のように BIN2 キナーゼが不活化され、さらに脱リン酸化酵素

Protein Phosphatase 2A (PP2A) が BIL1/BZR1 および BES1 を脱リン酸化状態へ促す (図 1-2) (Tang *et al.* 2011). 脱リン酸化状態の BIL1/BZR1 および BES1 は 14-3-3 タンパク質から解放され, さらに BSS1 による捕捉も解除されることで, 細胞質から核への移行が促される (Vert & Chory 2006, Gampala *et al.* 2007, Ryu *et al.* 2007, Bai *et al.* 2007, Shimada *et al.* 2015). 核へ移行した BIL1/BZR1 および BES1 は, モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において数千種の BR 応答遺伝子を直接制御することで, 多岐にわたる BR 応答を引き起こす (Yin *et al.* 2002, Wang *et al.* 2002, Asami *et al.* 2003, Yin *et al.* 2005, He *et al.* 2005, Sun *et al.* 2010, Yu *et al.* 2011).

1-3 BZR ファミリー転写因子

BIL1/BZR1 および BES1 は植物特異的に保存されており, このホモログは BZR ファミリー転写因子 (あるいは BES1 ファミリー, BES1/BZR1 ファミリー) と呼ばれるファミリーを形成する. BZR 転写因子は, N 末端の DNA 結合ドメイン, 被リン酸化領域, PEST 様領域, C 末端領域から構成される (図 1-3). BZR 転写因子の DNA 結合ドメインは植物間で極めて高度に保存されており, 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と類似したアミノ酸配列モチーフをもつ (Buck & Atchley 2003, Yin *et al.* 2005, Pires & Dolan 2010, Carretero-Paulet *et al.* 2010, Feller *et al.* 2011). 被リン酸化領域には BIN2 キナーゼによってリン酸化される Ser 残基および Thr 残基が 20 残基以上存在している (Vert & Chory 2006, Gampala *et al.* 2007, Ryu *et al.* 2007, Bai *et al.* 2007). PEST 様領域は脱リン酸化酵素 PP2A が結合する領域である (Tang *et al.* 2011). 暗所下で BR 生合成阻害剤 Brz への耐性を示す獲得機能型変異体 *bill-1D/bzr1-1D* においては, BIL1/BZR1 の PEST 様領域内にある 234 番目の Pro (BES1 では 233 番目) が Leu に変異している (Yin *et al.* 2002, Wang

et al. 2002, Asami *et al.* 2003). この P234L 変異体は PP2A との結合力が強まっているため、脱リン酸化を受けやすくなり細胞内で安定に存在することができる (Tang *et al.* 2011). C 末端領域はコアクチベーターやコリプレッサーとの結合に必要な転写調節領域と BIN2 キナーゼ結合サイトを含んでいる (He *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002, Oh *et al.* 2014). PEST 様領域を除く領域はいずれも高等植物間で広く保存されている (図 1-4).

1-4 BIL1/BZR1 および BES1 による遺伝子制御

クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation; ChIP) と DNA マイクロアレイ (microarray) を組み合わせた ChIP-chip 法 (Park 2009) により、シロイヌナズナでは BIL1/BZR1 は 3410 個の遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合し、そのうち少なくとも 935 個の遺伝子を直接制御することが報告されている (Sun *et al.* 2010). 別のグループによって報告された ChIP-chip 解析の結果より、BES1 制御下の遺伝子の多くが BIL1/BZR1 制御下の遺伝子と重複していることが明らかにされた (Yu *et al.* 2011).

BIL1/BZR1 および BES1 は、*IAA19*, *SAUR15*, *PRE1* 等の伸長促進遺伝子の転写を促進する (Yin *et al.* 2005, He *et al.* 2005, Sun *et al.* 2010, Yu *et al.* 2011, Oh *et al.* 2012, Oh *et al.* 2014). 一方で *CPD*, *DWF4*, *BR6OX* 等の BR 生合成遺伝子の転写を抑制するという真逆の転写調節機能も示す (Yin *et al.* 2002, Wang *et al.* 2002, Yin *et al.* 2005, He *et al.* 2005, Sun *et al.* 2010, Yu *et al.* 2011, Oh *et al.* 2014).

遺伝学的な解析より、BIL1/BZR1 および BES1 の単独の機能は転写リプレッサーであると考えられている (Oh *et al.* 2014). C 末端に存在する ETHYLENE RESPONSE FACTOR-associated amphiphilic repression (EAR) モチーフを介して、コリプレッサー TOPLESS (TPL) をリクルートすることで BR 生合成遺伝子の転写を抑制する (Causier *et al.* 2012, Oh *et al.* 2014). 一方で、伸長成長遺伝子に対しては BZR 転写因子単独で制

御するわけではなく、PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) を代表とする様々な転写因子と協同的に働くことで転写を促す (Yin *et al.* 2005, Oh *et al.* 2012, Bai *et al.* 2012). PIF4 は bHLH ファミリー転写因子に属し、光や温度などの環境シグナル制御下であり、暗所および高温で活性化する因子である (Huq and Quail 2002, Nozue *et al.* 2007, Castillon *et al.* 2007, Lorrain *et al.* 2008, Koini *et al.* 2009, Kumer *et al.* 2012). PIF4 との協同的な遺伝子の転写活性化には、BIL1/BZR1 および BES1 の EAR モチーフが必須である (Oh *et al.* 2014). 従って PIF4 特異的にリクルートされる未知のコアクチベーター、または PIF4 が直接的に EAR モチーフに結合し、コリプレッサー-TPL を競合的に排他する可能性がある。いずれにせよ BIL1/BZR1 (BES1) と PIF4 の二者による協同的な遺伝子活性化機構は未だ不明な点が多い。

1-5 BZR 転写因子の DNA 結合特異性

先行研究による ChIP-chip 解析の結果、BIL1/BZR1 および BES1 は植物内で G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), E-box 配列 (CANNTG), BR 応答性エレメント (brassinosteroid-responsive element; BRRE) 配列 (5'-CGTG^C/T^G-3') の認識に係わっていることがわかっている (Sun *et al.* 2010, Yu *et al.* 2011). また、PIF4 と協同的に活性化する遺伝子のプロモーター領域には G-box 配列および E-box 配列が、BIL1/BZR1 および BES1 が主となり制御する遺伝子のプロモーター領域には BRRE 配列が含まれていた (Oh *et al.* 2012). ChIP-chip 解析の原理を考えると、BIL1/BZR1 および BES1 がこれらの塩基配列モチーフに必ずしも単独かつ直接的に認識するわけではないことに留意しなければならない。

また *in vitro* ゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay: EMSA) を用いた解析より、BIL1/BZR1 は BRRE 配列 (5'-CGTG^C/T^G-3') のうち 5'-CGTG-3' を強く認識していることがわかっている (He *et al.* 2005). この BRRE コア配列 (5'-CGTG-3') は

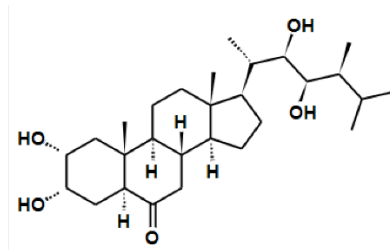
E-box 配列 (5'-CANNTG-3') 同様に, G-box 配列 (5'-CACGTG-3') 中に含まれる配列である.

最近では, コムギ胚芽無細胞で合成した転写因子と脱メチル化処理したゲノム DNA 断片を用いた網羅的な *in vitro* 解析法である DNA affinity purification sequencing (DAP-seq) 法が考案され, シロイヌナズナ由来の主要転写因子に対する DAP-seq 解析結果が報告された (O'Malley *et al.* 2016). この結果から構築された Plant Cistrome Database (<http://neomorph.salk.edu/PlantCistromeDB>) によると, BIL1/BZR1 や BES1 を含む BZR 転写因子は単独で G-box 配列を含む DNA 断片に強く結合することが示唆されている (Ezer *et al.* 2017). また, G-box 配列だけでなく BRRE コア配列を含む DNA 断片にも強く結合していることがわかった (Ezer *et al.* 2017).

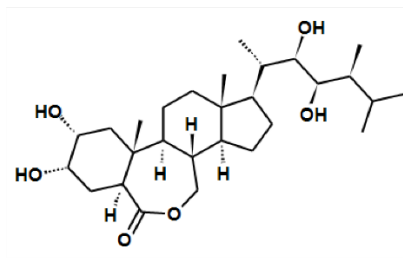
上述のようにこれまで様々な手法により, BZR 転写因子の DNA 結合特異性が解析されてきたが, これらの結果は明確には統合されていない.

1-6 本研究の目的

BR のマスター転写因子である BZR 転写因子は植物特異的な DNA 結合ドメインを介して, BR 特有の多様な遺伝子応答を引き起こす. BZR 転写因子は典型的な bHLH 転写因子と同様に G-box 配列を認識する転写因子であると予想されるが, これらは生体内で同一の遺伝子プロモーター領域を認識しているわけではなく, BZR 転写因子は典型的な bHLH 転写因子とは異なる DNA 結合特異性をもつと考えられる. 本研究では構造生物学的解析および生化学的解析を組み合わせることで, BZR 転写因子がもつ特有の DNA 結合特異性の構造基盤を解明し, BZR 転写因子が BR 特有の多様な遺伝子応答を引き起こす仕組みを理解することを目的とした.



ブラシノライド (brassinolide)



カスターステロン (castasterone)

図 1-1 植物ホルモン・ブラシノステロイドの化学構造

植物ホルモン・ブラシノステロイド (brassinosteroid; BR) の代表であるブラシノライド (brassinolide) とカスターステロン (castasterone) の化学構造が示されている。ブラシノステロイドは現在知られている中で最も生理活性が強い BR である。

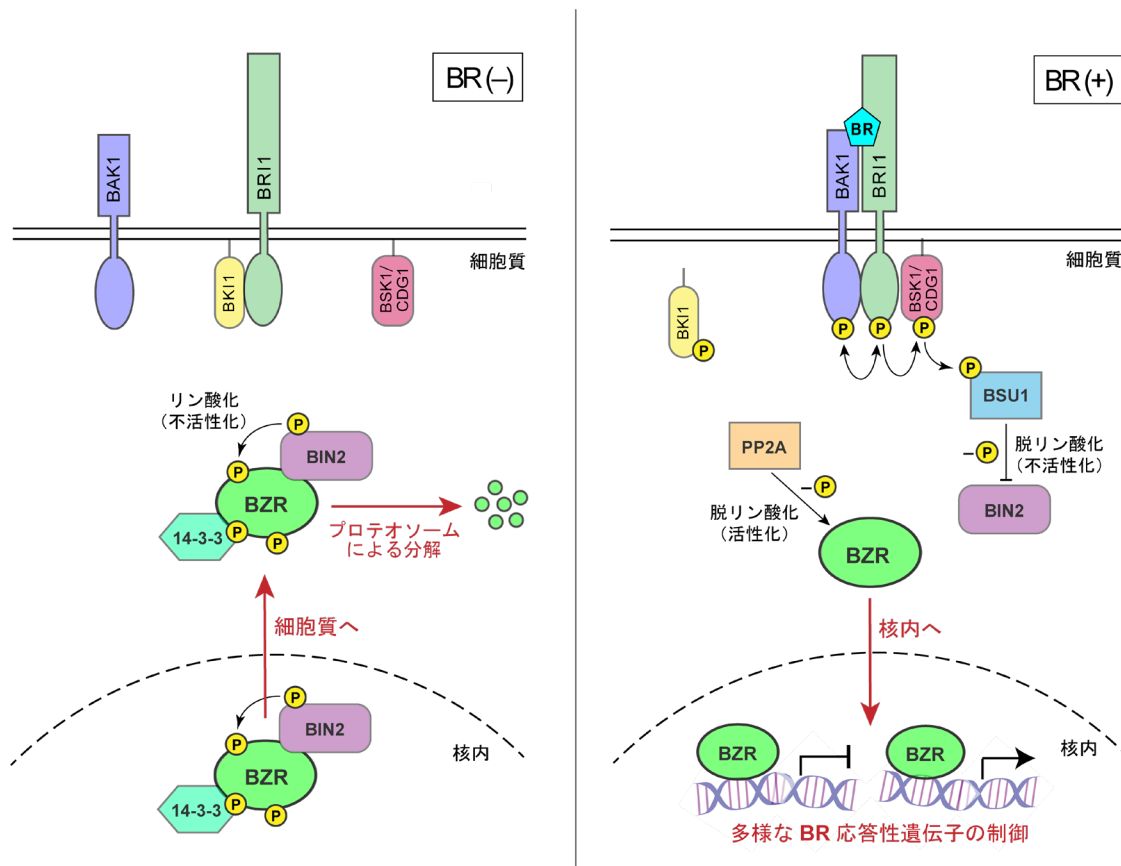


図 1-2 主要な BR 情報伝達経路

主要な BR 情報伝達経路の模式図が示されている。左側のパネルは BR 非存在下の主要シグナル伝達因子の状態を、右側のパネルは BR 存在下の状態を示す。BR 非存在下では、マスター転写因子である BZR 転写因子が BIN2 キナーゼによってリン酸化された後に 14-3-3 タンパク質によって細胞質に運ばれ、プロテオソームによる分解を受ける。BR 存在下では、BR が BRI1 に結合することで始まる情報伝達によって BIN2 が不活性化される。また、BZR 転写因子は PP2A によって脱リン酸化され、核への移行が促され、核内で BR 応答性遺伝子のプロモーターを認識して遺伝子調節を行う。

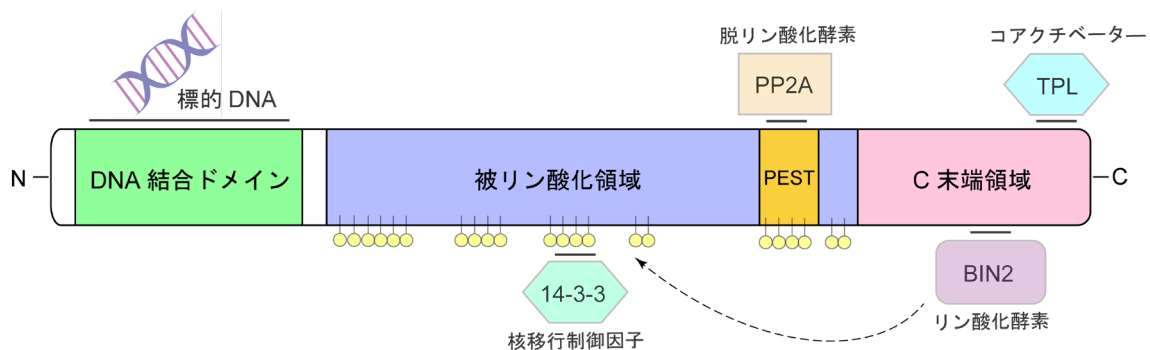


図 1-3 BZR ファミリー転写因子のドメイン構成

BZR ファミリー転写因子のドメイン構成が図示されている。BZR 転写因子は、N 末端の DNA 結合ドメイン、被リン酸化領域、PEST 様領域、C 末端領域から構成される。BIN2 キナーゼによってリン酸化される被リン酸化領域上の Ser 残基および Thr 残基を黄色の球で示している。また、被リン酸化領域には 14-3-3 結合サイト (リン酸化依存的に結合)、PEST 様領域には PP2A 結合サイト、C 末端領域には BIN2 結合サイトおよび TPL 結合サイトが存在している。

DNA 結合ドメイン

1 1q 2q 3q 4q 5q
AtBIL1/BZR1 M TSDGA TSTSAAAA AAAAAAAR R K P S W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I Y T G L
AtBES1/BZR2 M TSDGA TSTSAAAA A A A M A T R R K P S W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I Y T G L
Mt11413515 M T G G G S S G R L P T W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I Y S G L
NtLOC107792445 M M W E G G G S P A T S S A G G G G A G G A M G S S S S G R R K P S W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I Y A G L
LOC_Os01g10610 M A T G G G G G G G M G G G G V G G G A G A A G V G V G G R M P T W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I F A G L
LOC_02g13900 M M N G G G G G R V P T W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I Y A G L
Zm100194109 M A S G G G G G L G A A G A G C R M P T W R E R E N N R R R E R R R R R A V A A K I F A G L

6q 7q 8q 9q 10q
AtBIL1/BZR1 R A O G D V N L P K H C D N N E V L K A L C V E A G W V V E P D G T T Y R K G C K . P L . . P G E I A G T S S R V T P
AtBES1/BZR2 R A O G N Y N L P K H C D N N E V L K A L C S E A G W V V E P D G T T Y R K G H K . P L . . P G D M A G S S S R A T P
Mt11413515 R A O G N F K L P K H C D N N E V L K A L C S E A G W V V E P D G T T Y R K G S K R P L . . P N E M G G T P T N M S A
NtLOC107792445 R A O G N Y N L P K H C D N N E V L K A L C A E A G W V V E P D G T T Y R K G C S R P T . . P M E I G G T S A N I T P
LOC_Os01g10610 R A H G G Y K L P K H C D N N E V L K A L C N E A G W V V E P D G T T Y R K G Y K P P E . . R M E V I G C S V S P S P
LOC_02g13900 R A V G N Y T L P K H C D N N E V L K A L C N E A G W V V E P D G T T Y R K G C K P P A S E L A D Q L G R S P S A S P
Zm100194109 R A H G G Y K L P K H C D N N E V L K A L C N E A G W V V E P D G T T Y R K G S K P M E . . R M D P I G C S V S P S P

被リン酸化領域

11q 12q 13q 14q 15q 16q
AtBIL1/BZR1 Y S S Q N Q S P L S S A F Q S P I P S Y Q V S P S S S F P S P S R G E P N N M S S T F F P F L R N . G G I P S S .
AtBES1/BZR2 Y S S H N Q S P L S S T F D S P I L S Y Q V S P S S S F P S P S R V G D P H N I . S T I F P F L R N . G G I P S S .
Mt11413515 C S S M Q P S P Q S S S F P S P Q S S S F P S P I P S Y P T S P T R M D G I T N P S S F L L P F I R N I T S I P T N .
NtLOC107792445 S S S R H P S P P S S Y F A S P I P S Y Q P S P T S S S F P S P S R G D A N . . M S S H P F A F L H . . S S I P S S .
LOC_Os01g10610 C S S Y Q P S P R A S Y N A S P T S S S F P S G A S S P F L P H P N M A N G V D G N P I L P W L K T L S N S P S S .
LOC_02g13900 C S S Y Q P S P R G T S S F P S S G S S S Q I T . . L G G G G G E G S S L I P W L K T L S S A C V G I
Zm100194109 C S S Y Q P S P R A S Y N A S P T S S S F P S G A S S P F L P . P N E M P N G I D G N P I L P W L K T F S N G T P S .

17q 18q 19q 20q
AtBIL1/BZR1 L P S L R I S N S C P V T P P V S S P T S K N P K P L P N W E S I A K Q S M A I . A
AtBES1/BZR2 L P P L R I S N S A P V T P P V S S P T S R N P K P L P T W E S F T K Q S M S M A A
Mt11413515 L P P L R I S N S A P V T P P L S S P R S S K R K A D . . F E S L C N
NtLOC107792445 L P P L R I S N S A P V T P P L S S P T R L P K Q . T F N L E T L A
LOC_Os01g10610 K K H P Q L P P L L I H G G S I S A P V T P P L S S P T A R T P R M K T D W D E S N V Q P T W T
LOC_02g13900 G G G S S S K F P . A H Y S Y F G G G S I S A P V T P P S G S P P R T P R L K T A A W E Y H H H H A G S V L P P W A
Zm100194109 K K H P L L P P L L I H G G S I S A P V T P P L S S P S A R T P R M K T D W D E A A V Q P P W H

PEST 様領域

21q 22q 23q 24q 25q 26q
AtBIL1/BZR1 . . K Q S M A S F N Y P F Y A V S A P A S P T H R H Q F H T P A T I P E C D E S D S S T V D S G H W I S F Q K F A Q Q
AtBES1/BZR2 . . K Q S M T S L N Y P F Y A V S A P A S P T H R H Q F H A P A T I P E C D E S D S S T V D S G H W I S F Q K F A Q Q
Mt11413515 . . G S F N S S F R H P L F A T S A P S S P S R R N H L . P P S T I P E C D E S D A S T V D S G R W V S F Q T T T A H
NtLOC107792445 . . R E S M S A L N I P F F A A S A P T S P T R G Q R F . T P A T I P E C D E S D S S T I D S G Q W M S F Q K Y A T .
LOC_Os01g10610 G S N S P C V V N S T P P S P G R T M L P D P A W L A G I Q I
LOC_02g13900 T V G A S Y A Y A A S S S L P N S T P P S P R R K V A A A A A A A G G G N D A A A W L A G F Q I . . .
Zm100194109 G A S P T I V N S T P P S P G R P I A P D E A W L A G I Q I . . .

C 末端領域

27q 28q 29q
AtBIL1/BZR1 Q P F S A S M V P T S P T F N L V K P A P Q M S P N T
AtBES1/BZR2 Q P F S A S M V P T S P T F N L V K P A P Q L S P N T
Mt11413515 G A A P P S P T F N L M K P A M Q I T P Q S S M D M K H M N E A M Q W S
NtLOC107792445 N G V P T S P T F N L I R P A A Q R I P S N D
LOC_Os01g10610 S S T S P S P T F S L V S S N P F S V F K D A I L V G N . . S S R M C T P G Q S G T C S P A I P G M A H
LOC_02g13900 S S A G P S S P T Y S L V A P P P N P F G A A A A A A G S S S R V M S G A C S P V A G
Zm100194109 S S T S P N S P T F S L V S T N P F G V F K E S I P V G G G D S S R M C T P G Q S G A C S P A I P G M P R H

30q 31q 32q 33q
AtBIL1/BZR1 . . A A F Q E I G Q S S E F K F E N S Q V K . P W E G E R I H D . V G M E D L E L L T L G N G K A R G . .
AtBES1/BZR2 . . A A I Q E I G Q S S E F K F E N S Q V K . P W E G E R I H D . V A M E D L E L L T L G N G K A H S . .
Mt11413515 . . A G S A T E R G R G S D F D F E N G R V V K P W E G E R I H E . V G M E D L E L L T L G F G K A
NtLOC107792445 . . M I I D K G K S V E F D F E N V S V K A A W E G E K I H E . V G L D D L E L L T L G S G S G R M . .
LOC_Os01g10610 P D I H M M D A V S D E F A F G S S T N G G H Q A A G L V R A W E G E R I H E D S G S D D L E L L T L G S S R T R A A A
LOC_02g13900 G D V Q M A D A A R R E F A F G G E . . G K M T G L V K A W E G E R I H E E C G S D D L E L L T L G S S M T R G D R
Zm100194109 S D V H M M D V V S D E F A F G S S T N G A Q Q A A G L V R A W E G E R I H E D S G S D D L E L L T L K L

図 1-4 高等植物間における BZR 転写因子のアミノ酸配列保存性

様々な植物種に存在する BZR 転写因子のアミノ酸配列のアライメントが示されている。アライメントに用いたのは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 AtBIL1/BZR1, AtBES1, タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来 NtLOC107792445, ウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) 由来 Mt11413515, イネ (*Oryza sativa*) 由来 LOC_Os01g10610, 02g13900, トウモロコシ (*Zea mays*) 由来 Zm100194109 である。各タンパク質のアミノ酸配列は UniProt (<https://www.uniprot.org/>) より抽出した。CLUSTAL OMEGA (Sievers *et al.* 2011) を用いてアミノ酸配列アライメントを行い, ESPript 3.0 (Gouet *et al.* 1999) を用いて結果を描画した。

第 2 章

BZR 転写因子及び典型的な bHLH 転写因子
の生化学的解析

2-1 本章の概要

本研究ではまず、植物特異的な BZR 転写因子の DNA 結合ドメインが、真核生物に広く保存される典型的な bHLH 転写因子の DNA 結合ドメインと類似したモチーフをもつことに着目した (図 2-1).

bHLH 転写因子は、DNA 結合領域である塩基性 (basic) 領域と二量体形成に係わるヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 領域から構成され、特有の立体構造を共通してもつ (図 2-2A, B) (Ferré-D'Amaré *et al.* 1993, Ferré-D'Amaré *et al.* 1994, Shimizu *et al.* 1997, Nair & Burley 2003, Toledo-Ortiz *et al.* 2003, Jones 2004, Pongenberg *et al.* 2012, Wang *et al.* 2013, Lian *et al.* 2017). 最も典型的な bHLH 転写因子は、塩基性領域上の i 番目のグルタミン酸残基 Glu (i), $i+3$ 番目のアルギニン残基 Arg ($i+3$), $i+4$ 番目のアルギニン残基 Arg ($i+4$) を用いて G-box 配列 (5'-CACGTG-3') と呼ばれる回文構造の塩基配列を選択的に認識する. G-box 配列のうち, C₃塩基 (相補塩基対の G₄塩基) は Arg($i+4$) 残基によって緩く認識される一方で, C₁A₂ 塩基 (T₅G₆ 塩基) は Glu (i) および Arg ($i+3$) の2つの残基によって厳密に認識される (図 2-2C).

BZR 転写因子の DNA 結合ドメインはそのアミノ酸配列から塩基性領域と HLH 領域より構成されていると予測されている (Yin *et al.* 2005). また塩基性領域中には Glu (i), Arg ($i+3$), Arg ($i+4$) から成る G-box 配列認識モチーフも存在していた (Yin *et al.* 2005) (図 2-1). 先行研究における ChIP-chip 法や DAP-seq 法などの網羅的な解析結果も, BZR 転写因子が G-box 配列を最も強く認識することを示した (Sun *et al.* 2010, Ezer *et al.* 2017). しかしながら, BZR 転写因子は 5'-NNCGTG-3' (NN-BRRE コア配列, NN は CA 以外) を認識しているという点で, 典型的 bHLH 転写因子とは異なっていることも示唆された (He *et al.* 2005, Sun *et al.* 2010, Ezer *et al.* 2017).

本章では、BZR 転写因子と典型的な bHLH 転写因子の塩基配列認識特異性の違いを、ゲルシフトアッセイ (EMSA) および等温滴定カロリメトリー (isothermal titration calorimetry; ITC) を用いた生化学的解析により詳細な評価を行った。実験にはシロイヌナズナにおける BR のマスター転写因子 BIL1/BZR1 および BES1 の DNA 結合ドメインを調製して用いた。また比較のために典型的な bHLH 転写因子であるシロイヌナズナ由来の PIF4, BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION 1 (BEE1), BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1 (BIM1) の DNA 結合ドメインを用いた。PIF4 は第 1 章で述べたように、光や温度の制御下にあるマスター転写因子であり、標的遺伝子の大部分を BIL1/BZR1 および BES1 と共有している (Oh *et al.* 2012)。BEE1 および BIM1 はいずれも BR 情報伝達を正に制御する転写因子である (Friedrichsen *et al.* 2002, Yin *et al.* 2005)。EMSA および ITC の結果、BZR 転写因子は G-box 配列 (5'-CACGTG-3') の C₁A₂ 塩基に対する認識が緩められていることがわかった。

2-2 実験方法

2-2-1 各タンパク質の発現ベクターの構築

シロイヌナズナ由来 BZR1 (At1g75080; UniProt ID: Q8S307), BES1 (At1g19350; UniProt ID: Q9LN63), PIF4 (At2g43010; UniProt ID: Q8W2F3), BEE1 (At1g18400; UniProt ID: Q8GZ13), BIM1 (At5g08130; UniProt ID: Q9LEZ3) の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子断片をそれぞれ、マルトース結合タンパク質 (Maltose-binding protein; MBP) 融合タンパク質の細胞質発現用ベクター pMAL-c2X (NEW ENGLAND Biolabs) の BamHI 制限酵素サイトに挿入した。

BIL1/BZR1 (21-104) をコードする遺伝子断片は、ジェンスクリプトジャパン株式会

社の人工遺伝子合成委託サービスに委託して、大腸菌 B 株用にコドン最適化を行った。BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインに該当する領域に点変異を導入することで BES1 (20–103) の遺伝子断片を作製した (表 2-1)。また、PIF4 (253–319)、BEE1 (146–235) および BIM1 (270–351) の遺伝子断片は、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TAKARA) を用いて *Arabidopsis* Total RNA (Bio chain) より逆転写を行うことでクローニングした (表 2-1)。シーケンス解析を株式会社ファスマックに依頼し、いずれの遺伝子断片も pMAL-c2X ベクターに正しく挿入されていることを確認した。

2-2-2 各 MBP 融合タンパク質の調製

タンパク質発現用大腸菌株 BL21(DE3) (Novagen) を宿主として、MBP-linker-BIL1/BZR1 (21–104) または BES1 (20–103) が挿入された pMAL-c2X ベクターによる形質転換を行った。得られたコロニーを終濃度 100 µg/mL ampicillin を含む 2 本の lysogeny broth (LB) 液体培地に植菌し 30 °C で一晩培養した。終濃度 100 µg/mL ampicillin を含む 2 L の LB 菌体培地に前培養液を加え、600 nm の吸光度 (optical density at 600 nm; OD₆₀₀) が 0.8–1.0 になるまで 37 °C で振盪培養した。β-ガラクトシダーゼ活性の誘導物質 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1.0 mM になるように加え、37 °C で 2 時間振盪培養した。5000 rpm で 10 分間遠心分離し菌体を回収し、使用するまで–80 °C で保存した。同様に大腸菌株 Rosetta(DE3) (Novagen) を宿主として、MBP-linker-PIF4 (253–319)、BES1 (20–103) または BIM1 (270–351) が挿入された pMAL-c2X ベクターによる形質転換を行い、上記と同様に培養を行った。抗生物質には終濃度 100 µg/mL ampicillin および 34 µg/mL kanamycin を使用した。

破砕・結合・洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5% glycerol) 70 mL で、菌体 2 L 培

養分を溶解させた。その後、超音波破碎機 SONIFIER Model 250D (BRANSON) を用いて菌体の超音波破碎を行った。破碎後の溶液を $40,000\times g$ および $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ の条件で 30 分間遠心分離を行った。

まず、MBP 融合タンパク質を特異的に吸着させることが可能な Amylose Resin (NEW ENGLAND BioLabs) でアフィニティー精製を行った。破碎液上清と平衡化済みの 2 mL Amylose Resin を混合し、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌した後、エコノパック®カラム (BIO-RAD) に樹脂を充填した。100 mL のバッファーで洗浄した後、20 mL の溶出バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM maltose, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol) で溶出させた。

溶出された画分を 2 L の透析バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 5% glycerol) で脱塩を行った。透析膜には Spectra/Por® 1 Dialysis Membrane (MWCO 6,000–8,000) (SPECTRUM) を用いた。透析後のタンパク質溶液に対し、 $10,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ の条件で遠心分離を行い、沈殿物や不純物を取り除いた。上清を Mono Q HR10/10 (GE Healthcare) カラムに供し、ÄKTA pure (GE Healthcare) システムを用いて陰イオン交換クロマトグラフィー精製を行った。バッファーA (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 5% glycerol) とバッファーB (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol) の濃度勾配をかけることでタンパク質をカラムから溶出させた。クロマトグラムでピークがある画分を SDS-PAGE にかけて、精製度が高い画分を回収した。

回収した画分を VIVASPIN 20 (MWCO 30,000) (sastorius) で濃縮した後、Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) に供し、ÄKTA pure を用いてゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。ゲル濾過のバッファーの組成は 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol である。目的タンパク質を含む画分を回収して、VIVASPIN 6 (MWCO 10,000) (sastorius) で $80\text{ }\mu\text{M}$ まで濃縮し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。その際、タンパク質濃度は NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) を用いて

280 nm の吸光波長により測定した。各 MBP 融合タンパク質の分子量およびモル吸光係数 ϵ_{280} は以下に示した。

タンパク質名	分子量	吸光係数 ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)
MBP-linker-BIL1/BZR1	52,753	81.8
MBP-linker-BES1	52,794	81.8
MBP-linker-PIF4	51,116	73.3
MBP-linker-BEE1	53,336	70.8
MBP-linker-BIM1	53,003	81.8
MBP-linker (コントロール)	43,101	66.4

各タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーの溶出位置 V_e から、式 2-1 を用いて分配係数 K_{av} を算出した。

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (\text{式 2-1})$$

なお、 V_0 は排除体積、 V_t はカラム体積を表す。Gel Filtration Standard (BIO-RAD) より分配係数 K_{av} と分子量の検量線を作成し、各タンパク質のみかけの分子量を求めた。

2-2-3 ゲルシフトアッセイ (EMSA)

EMSA 実験には、NN-BRRE コア配列 (5'-CCCGTG-3') を含む CPD 遺伝子のプロモーター断片 (-93 から -64 の領域) およびその変異体を用いた。各 DNA 断片のセンス鎖の 5'末端側を carboxyfluorescein hydrate (FAM) により蛍光標識した。ユーロフィンジェノミクス社から購入した各種一本鎖オリゴ DNA (蛍光標識 DNA も含む) をそれぞれ 200 μM になるよう TNE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) で溶解し、相補鎖同士を等量ずつ混合した。混合液を 95 °C の湯浴で温め、室温まで

ゆっくり温度を下げることによりアニーリングした。実験に用いた DNA 断片の配列を以下に示した。TNE バッファー下で Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) に供しゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。

DNA の名称	配列 (センス鎖のみ記載)
G-box in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CACGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
CT-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CTCGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
CC-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CCCGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
CG-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CGCGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
AA-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>AAACGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
TA-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>TACGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
GA-BRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CACGTGTG</u> CCCACTCTCCCC-3'
mBRRE-core in pCPD	5'-GCAGAAACCC <u>CAAATG</u> CCCACTCTCCCC-3'

EMSA 実験においては、以下の組成で反応液 20 μ L を調製した (下表の上から順に混合した)。

物質名	添加量
Milli-Q 水	1 μ L
10 \times binding buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.5 M KCl)	2 μ L
1 M KCl	1 μ L
50% glycerol	1 μ L
200 mM EDTA	1 μ L
1 μ g/ μ L poly(dI-dC): poly(dI-dC)	1 μ L
0–80 μ M 各タンパク質	1 μ L
5 μ M FAM 蛍光標識二重鎖 DNA	1 μ L

これらタンパク質 : DNA 混合溶液を常温で 20 分間静置した後、0.5 \times TBE (45 mM Tris, pH 8.3, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA) を含む 10%アクリルアミド電気泳動に充填し、

0.5×TBE バッファー中で 5 °C, 100 V 定電圧で電気泳動を行った。165 分後に泳動を止め、LAS4000mini (富士フイルム) を用いて蛍光標識 DNA の蛍光を観察した。FAM の励起には 460 nm を主波長とする青色 LED 落射光源を利用した。

2-2-4 等温滴定熱量測定 (ITC) による相互作用解析

等温滴定熱量測定 (ITC) は、一定温度条件においてリガンド溶液を高分子溶液に滴定する時に生じる微小な熱量変動を観測することで分子間相互作用を検出し、熱力学パラメータを得る方法である。試料の固定化や化学修飾を必要としないため、より天然に近い状態で測定することができるという利点がある (Cedervall *et al.* 2007)。

測定には 2-2-4 と同様に、CPD 遺伝子プロモーターの NN-BRRE コア配列を含む遺伝子断片およびその変異体を使用した。非標識の一本鎖オリゴ DNA を 2-2-4 と同様の方法でアニーリングした。ITC 測定用バッファー (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM KCl) 下で、Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) に供しゲルろ過クロマトグラフィー精製を行った。2-2-3 で調製した MBP-linker-BIL1/BZR1 (21-104) および MBP-linker-PIF4 (253-319) についても同様にゲル濾過に供してバッファー交換を行った。ゲル濾過後、タンパク質および二重鎖 DNA の濃度をそれぞれ 100 μ M および 5 μ M に調製した。

ITC 測定には等温滴定型マイクロカロリメーター iTC₂₀₀ (GE Healthcare) を用いた。シリンジ側には 100 μ M のタンパク質を、セル側には 5 μ M の二重鎖 DNA を入れて滴定を開始した。各タンパク質の希釈による希釈熱を考慮し、タンパク質溶液をシリンジから、DNA を含まないバッファーに滴下したものをブランクとした。DNA 溶液への滴定の際の反応熱からブランクを差し引くことで、タンパク質と DNA の反応熱を算出した。測定はいずれも以下のパラメータで行った。

Experimental Parameters

Total Injections	37 times
Cell Temperature	20 °C
Reference power	11 µcal/sec
Syringe Concentration	0.1 mM
Cell Concentration	0.005 mM
Initial Delay	60 sec
Stirring Speed	750 rpm

Injection Parameters

Volume	0.4 µl × 1 time, 1.0 µl × 36 times
Duration	0.2 µl × 1time, 0.5 µl × 36 times
Spacing	150 sec
Filter Period	5 sec

Feedback Mode/Gain

High

得られた ITC 測定データは Origin 7 データ解析ソフトウェアにより, One Set of Sites のモデルを用いてフィッティングさせ, 結合比 N , 解離定数 K_D およびエンタルピー変化 ΔH が求められた. 式 2-3 の関係からギブズ自由エネルギー変化 ΔG を求め, 式 2-3 の関係からエントロピー変化 (ΔS) を算出した.

$$\Delta G = -RT \ln (1/K_D) \quad (\text{式 2-2})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{式 2-3})$$

ここで, R は理想気体定数 ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T は温度 (K) を表す.

2-3 結果・考察

2-3-1 各タンパク質および二重鎖 DNA の調製

MBP を融合させた BIL1/BZR1, BES1, PIF4, BEE1 および BIM1 タンパク質を大腸菌で異種発現させ, Amylose アフィニティー精製, 陰イオン交換クロマトグラフィー精製, およびゲル濾過クロマトグラフィー精製を順に行った. ゲル濾過精製のクロマトグラムを図 2-4 に示した. SDS-PAGE 解析の結果より, いずれも高純度の目的タンパク質を得たことを確認した. また, アニールした DNA 溶液をゲル濾過クロマトグラフィーに供することで二重鎖 DNA のみの回収を行った.

ゲル濾過クロマトグラフィーにおける溶出位置より, 各タンパク質のみかけの分子量を求めた (図 2-4). その結果, BZR 転写因子 BIL1/BZR1, BES1 および bHLH 転写因子 PIF4, BIM1 はホモ二量体を, bHLH 転写因子 BEE1 はホモ四量体を形成していることが示唆された. bHLH 転写因子の DNA 結合ドメインは一般的に, ホモ二量体またはヘテロ二量体を形成して標的 DNA を認識する. 例外として, シロイヌナズナにおけるジャスモン酸 (jasmonic acid) 情報伝達のマスター転写因子 MYC2 はホモ四量体を形成する (Lian *et al.* 2017). MYC2 は四量体を形成することで標的遺伝子プロモーターとの DNA 結合親和力を高め, かつプロモーター領域のルーピングを促し, 転写活性を上げることが明らかになっている (Lian *et al.* 2017). 同じくホモ四量体を形成するがわかった BEE1 も, MYC2 と同様の転写活性化機構を有しているかもしれない.

2-3-2 EMSA および ITC による生化学的解析

調製した各タンパク質および蛍光標識二重鎖 DNA を用いて EMSA 解析を行った。BZR 転写因子 BIL1/BZR1, BES1 および典型的 bHLH 転写因子 PIF4, BEE1, BIM1 はいずれも G-box 配列 (5'-CACGTG-3') を含む DNA を認識していた (図 2-5)。G-box 配列のうち A₂ が C₂ に置き換わった NN-BRRE コア配列 (5'-CCCGTG-3') を含む DNA を用いて比較実験を行った。bHLH 転写因子群の NN-BRRE 配列に対する結合力は G-box 配列に比べて大きく低下した一方、BZR 転写因子群の NN-BRRE コア配列に対する親和力は G-box 配列に比べてわずかに減少するのみであった (図 2-5)。G-box 配列の C₁ または A₂ を他の 3 塩基に置き換えた NN-BRRE コア配列に対しても、同様の結果が得られた (図 2-6)。

また ITC を用いた解析によって、BZR 転写因子 BIL1/BZR1 または典型的 bHLH 転写因子 PIF4 と各 DNA 断片との間の解離定数 K_D および結合比 N を算出した。BIL1/BZR1 の G-box 配列および NN-BRRE コア配列 (A₂→C₂) を含む DNA 断片に対する解離定数 K_D はそれぞれ 12.0 nM および 36.9 nM であり、PIF4 においてはそれぞれ 98.9 nM および 882 nM であった (表 2-3, 図 2-7)。これらの値より G-box 配列の A₂ を C₂ に置き換えた際の自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$)、すなわち塩基特異性を示す絶対的な指標を求めたところ、BIL1/BZR1 においては $\Delta\Delta G (A_2 \rightarrow C_2) = 0.65 \pm 0.11$ kcal/mol、PIF4 においては $\Delta\Delta G (A_2 \rightarrow C_2) = 1.30 \pm 0.09$ kcal/mol と算出された。この結果より BIL1/BZR1 の A₂ と C₂ の間の特異性は PIF4 よりも低いことが示された。また、室温における揺らぎエネルギー $k_B T$ (k_B : ボルツマン定数, T : 温度) が約 0.6 kcal/mol であることを考慮すると、BIL1/BZR1 によって認識される A₂ と C₂ の間の親和性の違いは熱力学的にほとんどないといえ、EMSA 解析の結果とも一致していた。以上の結果より BIL1/BZR1 の C₁A₂ に対する特異性は典型的 bHLH 転写因子より低いことが示された。また ITC 解析より、1 つのコア塩基配列モチーフに対する BIL1/BZR1 の結合数は、PIF4 と同じく 2 分子であることがわかった。

2-3-3 まとめ

生化学的解析の結果、BZR 転写因子 BIL1/BZR1, BES1 の DNA 結合ドメインは、典型的 bHLH 転写因子と同様にホモ二量体を形成し、コア塩基配列モチーフを認識していることがわかった。また、標的コア塩基配列を 1 塩基置換した比較解析により、BZR 転写因子は典型的な bHLH 転写因子と同じく G-box 配列 (5'-CACGTG-3') を最も強く認識することが示された。これは、先行研究で報告された DAP-seq 解析の結果と一致していた (O'Malley *et al.* 2016, Ezer *et al.* 2017)。一方で、この 2 つの転写因子群においては G-box 配列中の C₁A₂ 塩基への認識の厳密さが異なるという明確な違いが見出された。典型的 bHLH 転写因子は Glu(*i*), Arg(*i*+3) 残基モチーフを用いて C₁A₂ 塩基を厳密に認識することが知られている。BZR 転写因子も同じモチーフ Glu(*i*), Arg(*i*+3) をもつにも関わらず、bHLH 転写因子に比べ C₁A₂ 塩基への認識が緩められていた。

生体内では同じ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 配列は植物の生長制御遺伝子や環境応答遺伝子のプロモーター上に極めて高度に保存されており、bHLH ファミリー転写因子や塩基性ロイシンジッパー (basic leucine zipper; bZIP) ファミリー転写因子等の様々な転写因子に認識され、多種多様な遺伝子応答の仲介役を担う塩基配列モチーフである (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 1997, Jakoby *et al.* 2002, Heim *et al.* 2003, Toledo-Ortiz *et al.* 2003, Ezer *et al.* 2017)。BZR 転写因子の DNA 認識の特異性は、G-box 配列認識によって他の植物ホルモンや光や温度等の環境シグナルと協調的に働くブラシノステロイドの生理作用に加え、NN-BRRE コア配列認識によって bHLH ファミリー転写因子等と競合しない他の遺伝子応答を制御することができるといった生理学的意義があると考えられる (図 2-8)。

表 2-1 実験に用いた転写因子の DNA 結合ドメインの配列情報

転写因子	配列情報
<p>BIL1/BZR1 (21-104)</p>	<p>➤ 塩基配列 (コドン最適化)</p> <p>GCTCGTCGCAAACCGTCCTGGCGTGAACGCGAAAACAATCGTC GCCGTGAACGCCGTCGCCGTGCAGTGGCAGCCAAAATTTATAC CGGCCTGCGTGCTCAGGGTGATTACAATCTGCCGAAACATTGCG ACAACAATGAAGTTCTGAAAGCGCTGTGTGTCGAAGCCGGCTG GGTGGTTGAAGAAGATGGCACCACGTATCGCAAAGGTTGCAAA CCGCTGCCGGGCGAAATTGCCGGTACCAGCTCTCGT</p> <p>➤ アミノ酸配列</p> <p>ARRKPSWRERENRRRRERRRRRAVAAKIYTGLRAQGDYNLPKHCD NNEVLKALCVEAGWVVEEDGTTYRKGCKPLPGEIAGTSSR</p>
<p>BES1 (20-103)</p>	<p>➤ 塩基配列 (コドン最適化)</p> <p>ACCCGTCGCAAACCGTCCTGGCGTGAACGCGAAAACAATCGTC GCCGTGAACGCCGTCGCCGTGCAGTGGCAGCCAAAATTTATAC CGGCCTGCGTGCTCAGGGTAATTACAATCTGCCGAAACATTGCG ACAACAATGAAGTTCTGAAAGCGCTGTGTAGCGAAGCCGGCTG GGTGGTTGAAGAAGATGGCACCACGTATCGCAAAGGTCACAAA CCGCTGCCGGGCGATATGGCCGGTTCCAGCTCTCGT</p> <p>➤ アミノ酸配列</p> <p>TRRKPSWRERENRRRRERRRRRAVAAKIYTGLRAQGNYNLPKHCD NNEVLKALCSEAGWVVEEDGTTYRKGHKPLPGDMAGSSSR</p>
<p>PIF4 (253-319)</p>	<p>➤ 塩基配列</p> <p>GGATCAAACCGAAGGAGTCGAGCAGCTGAAGTTCATAATCTCT CCGAAAGGAGGAGGAGAGATAGGATCAATGAGAGAATGAAGG CTTTGCAAGAACTAATACCTCACTGCAGTAAACTGATAAAGCT TCGATTTTAGACGAAGCCATAGATTATTTGAAATCACTTCAGTTA CAGCTTCAAGTGATGTGGATGGGGAGTGAA</p>

表 2-1 (続き)

<p>PIF4 (253–319)</p>	<p>➤ アミノ酸配列</p> <p>NRRSRAAEVHNLSERRRRDRINERMKALQELIPHCSKTDKASI LDEAIDYLKSLQLQLQVMWMSGMH-</p>
<p>BEE1 (146–235)</p>	<p>➤ 塩基配列</p> <p>AGAGCCAGAAGAGGCCAAGCCACTGATAGCCACAGCTTAGCA GAACGGGTTCGGCGAGGGAAAATAAACGAGAGATTAAGATGCT TGCAAGATATGGTGCCCGGATGTTATAAGGCTATGGGAATGGCT ACGATGCTTGACGAGATAATTAATTATGTCCAGTCTCTACAGAAT CAAGTCGAGTTCCTCTCGATGAACTCACTGCAGCAAGTTCGTT TTATGACTTTAACTCAGAGACAGATGCAGTTGATTCCATGCAGA GAGCAAAG</p> <p>➤ アミノ酸配列</p> <p>RARRGQATDSHSLAERVRRGKINERLRCLQDMVPGCYKAMGMA TMLDEIINYVQSLQNQVEFLSMKLTAASSFYDFNSETDAVDSMQR AK</p>
<p>BIM1 (270–351)</p>	<p>➤ 塩基配列</p> <p>AACGATCAAAAGCTGAACACACCTAGGTCTAAACATTCTGCTAC AGAGCAACGGAGAAGGAGCAAGATCAATGATAGATTTTCAGATG TTGAGACAATAACCTAACAGCGACCAAAAGCGGGATAAGG CCTCCTTCTTACTAGAGGTTATCGAGTATATTCAATTCTTACAAG AGAAAGCAGACAAGTATGTGACCTCTTACCAAGGATGGAATCA CGAACCTGCGAAGCTATTGAATTGGCAGTA</p> <p>➤ アミノ酸配列</p> <p>NDQKLNTPRSKHSATEQRRRSKINDRFQMLRQLIPNSDQKRDKAS FLLEVIEYIQFLQEKADKYVTSYQGWNHEPAKLLNWQ</p>

表 2-2 ITC 解析によって得られた熱力学的パラメータ

Protein	DNA	K_D (nM) ^a	N	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	ΔG (kcal mol ⁻¹)
BIL1/ BZR1	G-box	12.0 (0.4) ^b	2.05 (0.06)	-6.63 (0.08)	4.17 (0.06)	-10.80 (0.02)
	BRRE- core	36.9 (5.9)	2.09 (0.11)	-8.50 (1.01)	1.65 (1.07)	-10.15 (0.09)
	mBREE- core	4320 (410)	2.00 ^c	-7.02 (0.60)	0.72 (0.08)	-7.73 (0.53)
PIF4	G-box	98.9 (10.6)	2.00 (0.12)	-7.46 (0.51)	2.10 (0.51)	-9.56 (0.06)
	BRRE- core	882 (44)	2.25 (0.08)	-6.60 (0.15)	1.66 (0.13)	-8.26 (0.03)
	mBREE- core	3630 (930)	1.93 (0.46)	-4.30 (0.76)	3.14 (0.91)	-7.44 (0.15)

- a) K_D は解離定数, N は結合比, ΔH はエンタルピー変化, T は絶対温度, ΔS はエントロピー変化, ΔG はギブズ自由エネルギー変化を表す
- b) 各熱力学的パラメータの値は, 3 回の試行に対する平均値 \pm 標準偏差として算出した. 標準偏差の値は括弧の中に示した.
- c) N の値を 2.00 に固定してカーブフィッティングを行った.

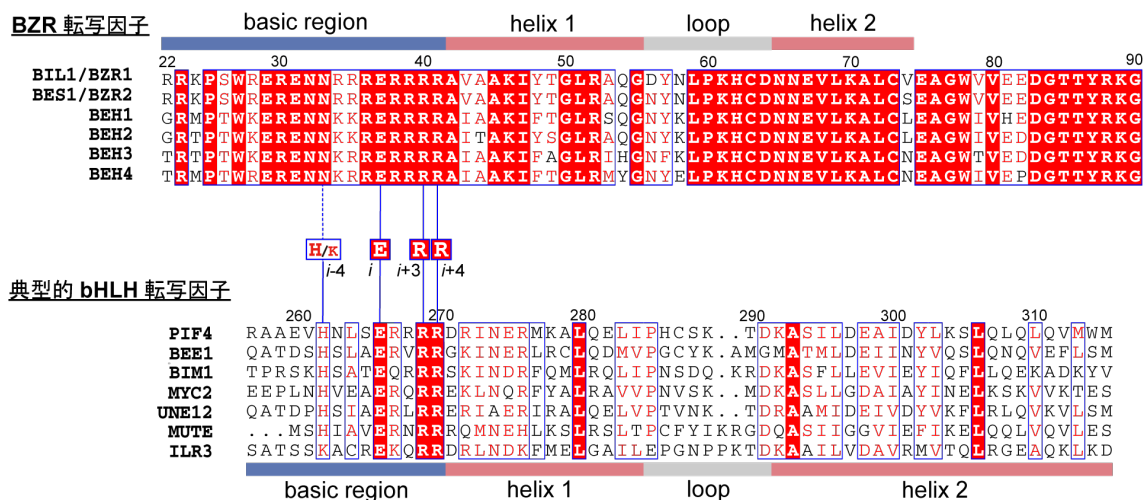
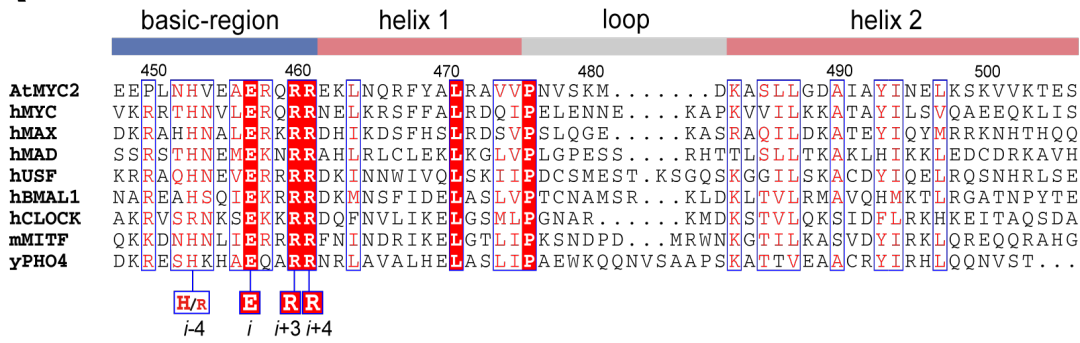


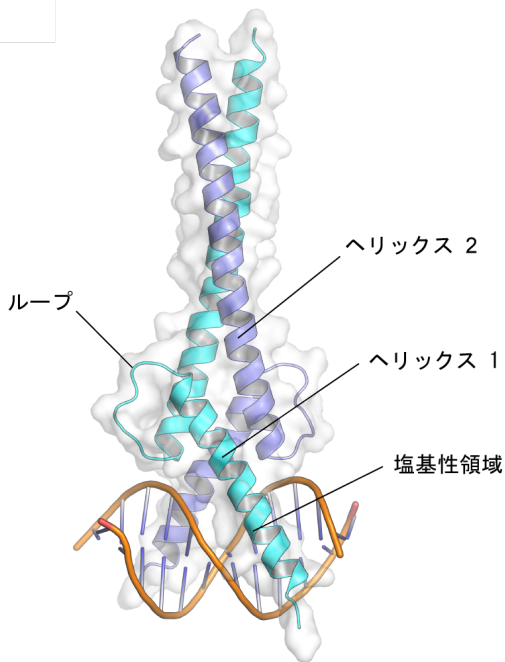
図 2-1 BZR 転写因子と典型的 bHLH 転写因子の共通モチーフ

シロイヌナズナ由来の BZR 転写因子または典型的な G-box 配列結合型の bHLH 転写因子のアミノ酸配列アライメントが示されている。BZR 転写因子のアライメントには BIL1/BZR1 (At1g75080; UniProt ID: Q8S307), BES1/BZR2 (At1g19350; UniProt ID: Q9LN63), BEH1 (At3g50750; UniProt ID: Q9S7F3), BEH2 (At4g36780; UniProt ID: Q94A43), BEH3 (At4g18890; UniProt ID: O49404), BEH4 (At1g78700; UniProt ID: Q9ZV88) を, 典型的 bHLH 転写因子には PIF4 (At2g43010; UniProt ID: Q8W2F3), BIM1 (At5g08130; UniProt ID: Q9LEZ3), BEE1 (At1g18400; UniProt ID: Q8GZ13), MYC2 (At1g32640; UniProt ID: Q39204), UNE12 (At4g02590, UniProt ID: O22768), MUTE (At3g06120, UniProt ID: Q9M8K6), ILR3 (At5g54680, UniProt ID: Q9FH37) を用いた。BZR 転写因子の二次構造は XtalPred Server (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>) を用いて予測した。共通の G-box 配列認識モチーフ Glu(*i*), Arg(*i*+3), Arg(*i*+4) を青線で繋いだ。

A



B



C

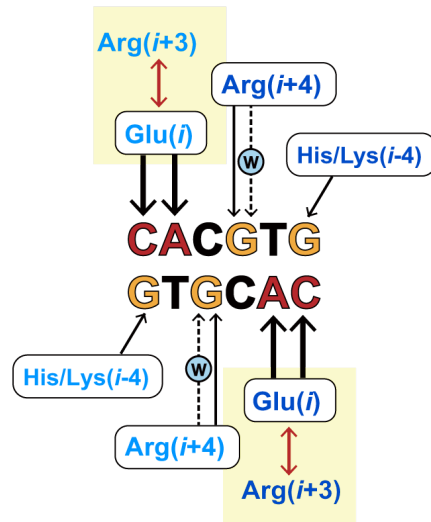


図 2-2 典型的 bHLH 転写因子の構造および G-box 配列認識の模式図

- (A) 構造既知の典型的な G-box 配列結合タンパク質のアミノ酸配列アライメントが示されている。アライメントには *Arabidopsis* MYC2 (UniProt ID: Q39204), human MYC (UniProt ID: P01106), human MAX (UniProt ID: P61244), human MAD (UniProt ID: Q05195), human USF (UniProt ID: P22415), human BMAL1 (Q00327), human CLOCK (UniProt ID: O15516), yeast PHO4 (UniProt ID: P07270) を用いた。
- (B) 典型的 bHLH 転写因子が共通してもつ立体構造が示されている。例としてシロイヌナズナ由来 MYC2 のコア二量体の構造が示されている (PDB: 5GNJ)。2つの鎖はそれぞれ異なる色分けをされている。
- (C) 典型的 bHLH 転写因子による G-box 配列 (5'-CACGTG-3') の塩基認識の模式図が示されている。分子間の水素結合を黒の矢印、塩橋相互作用を赤の矢印で示した。また W は水分子を表す。Arg(*i*+3) と塩橋を形成した Glu(*i*) は C₁A₂ のみを特異的に認識することができる。

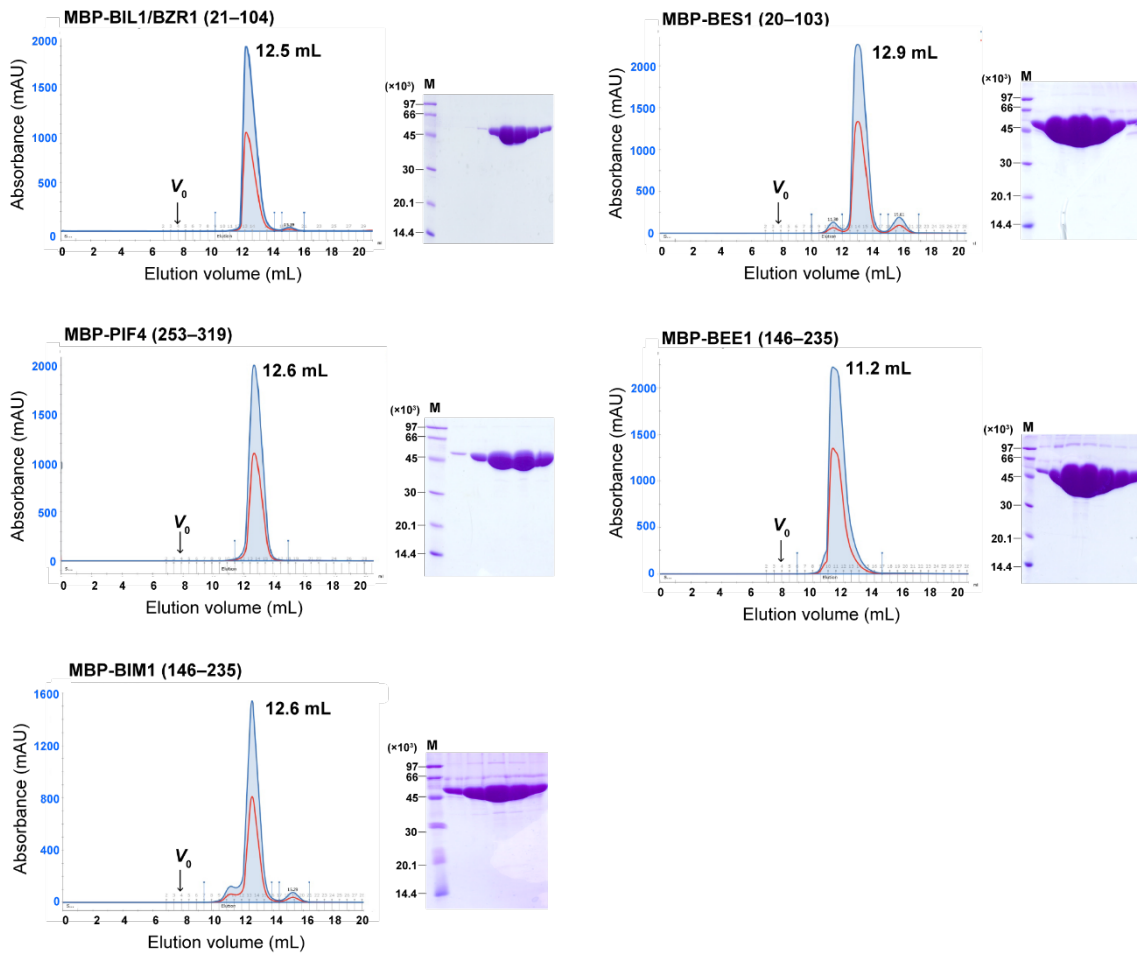


図 2-3 各タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー精製の結果

MBP 融合 BIL1/BZR1, BES1, PIF4, BEE1 および BIM1 をゲル濾過クロマトグラフィー精製 (カラム: Superdex 200 10/300 GL) に供した際のクロマトグラムが示されている。280 nm および 260 nm における吸収スペクトルをそれぞれ青線および赤線で示した。 V_0 (= 7.8 mL) は Superdex 200 10/300 GL カラムの排除体積を表す。また各メインピーク画分の SDS-PAGE 解析の結果が示されている。M は分子量マーカーを示す。

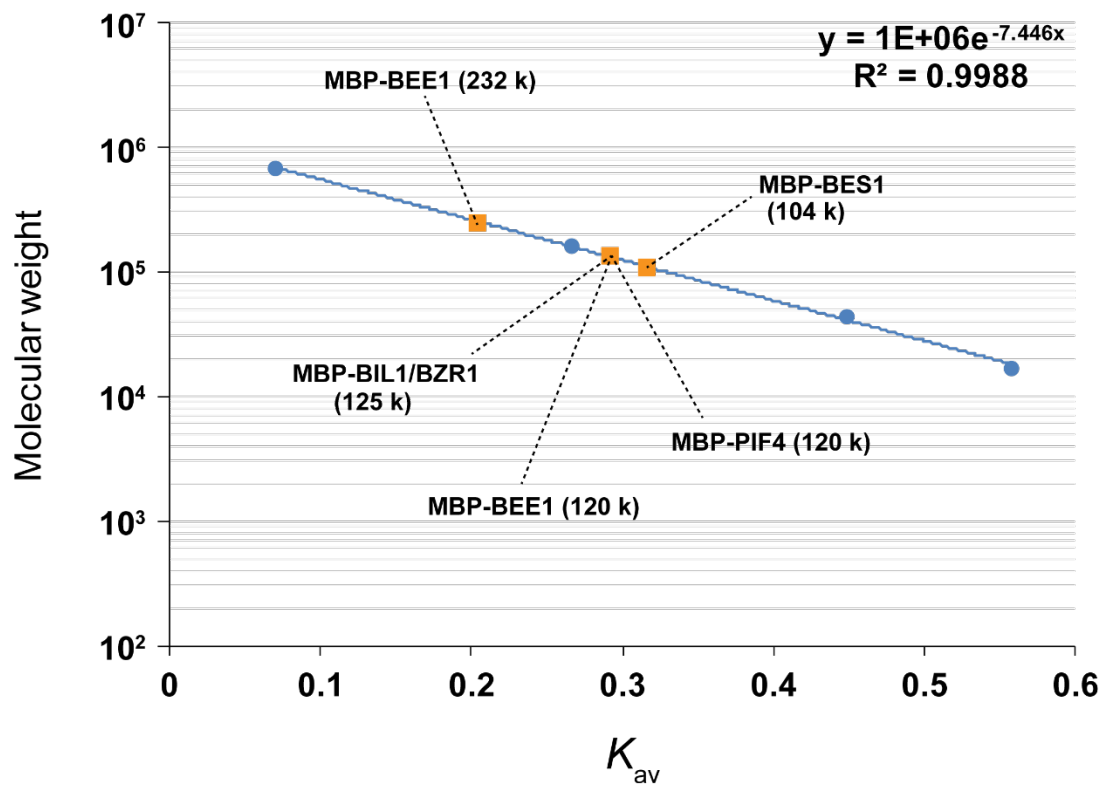


図 2-4 ゲル濾過解析により求めた見かけの分子量

ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分配係数 K_{av} および見かけの分子量の検量線が示されている。キャリブレーションには Thyroglobulin (分子量: 670×10^3), γ -globulin (分子量: 158×10^3), Ovalbumin (分子量: 44×10^3) および Myoglobin (分子量: 17×10^3) を用いた。溶出体積より算出した MBP 融合 BIL1/BZR1, BES1, PIF4, BEE1 および BIM1 の見かけの分子量をグラフ中に示した。

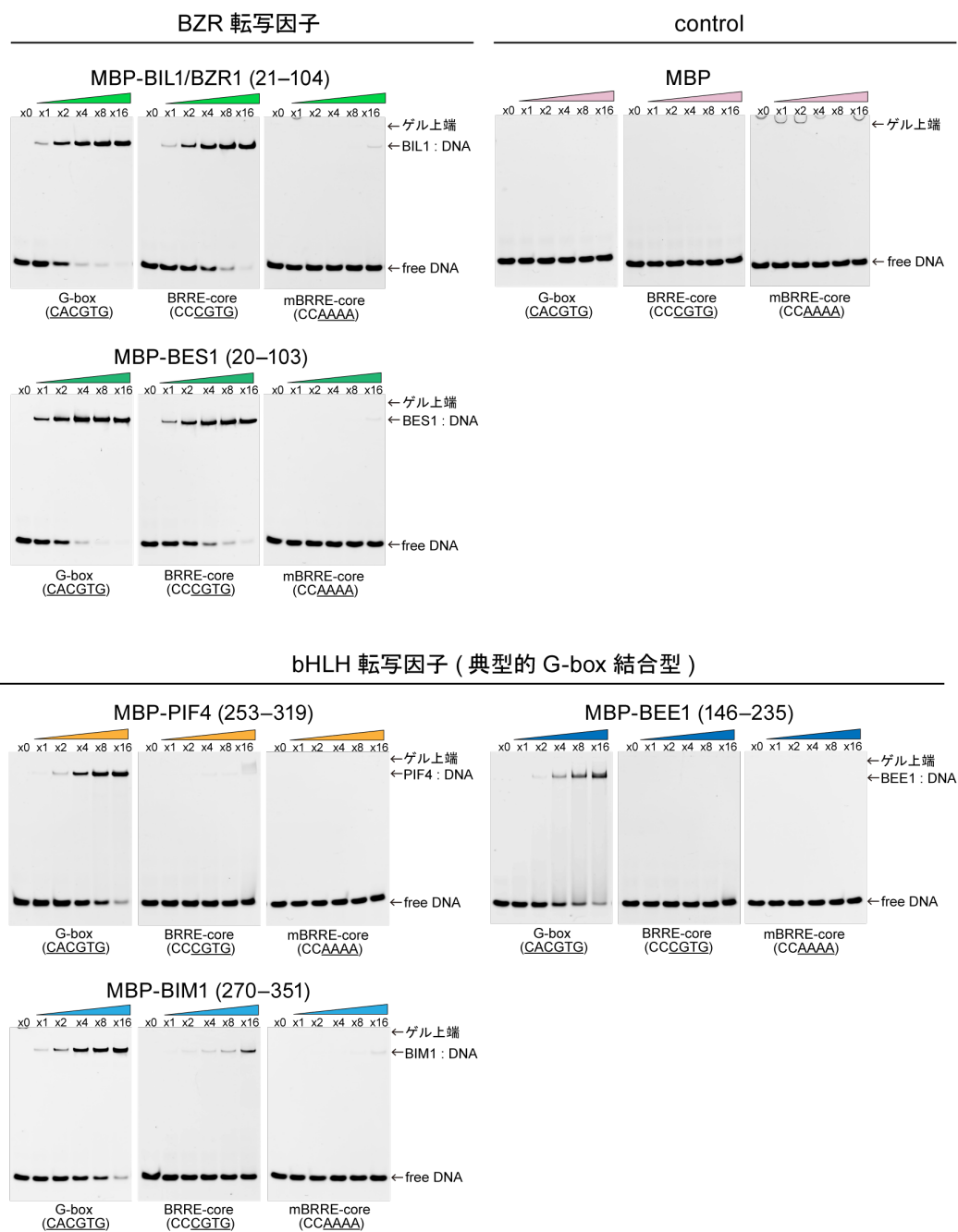


図 2-5 各タンパク質に対する EMSA 解析結果

MBP 融合 BIL1/BZR1, BES1, PIF4, BEE1 および BIM1 に対する EMSA 解析結果. ネガティブコントロールとして MBP についても同様に解析した. 蛍光標識 DNA は G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), NN-BRRE コア配列 (5'-CCCGTG-3'), または mBRRE コア配列 (5'-CCAAAA-3') を含んでおり, いずれも CPD プロモーターの DNA 断片を改変したものである. DNA に対するタンパク質のモル比はゲル上に示した.

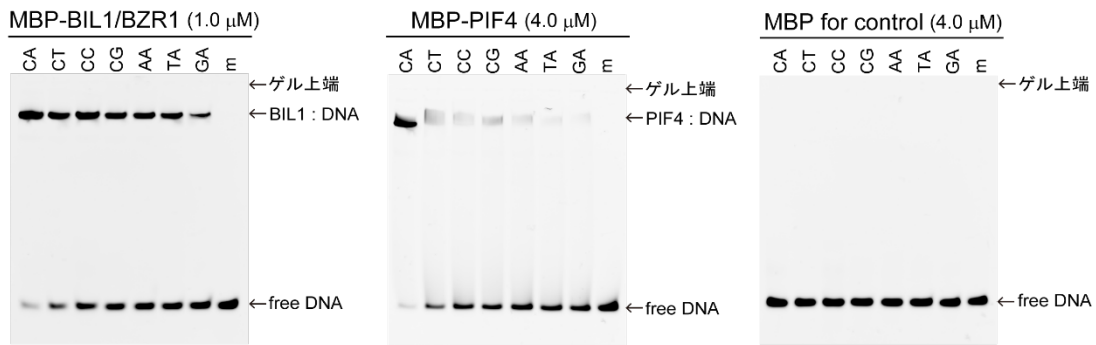
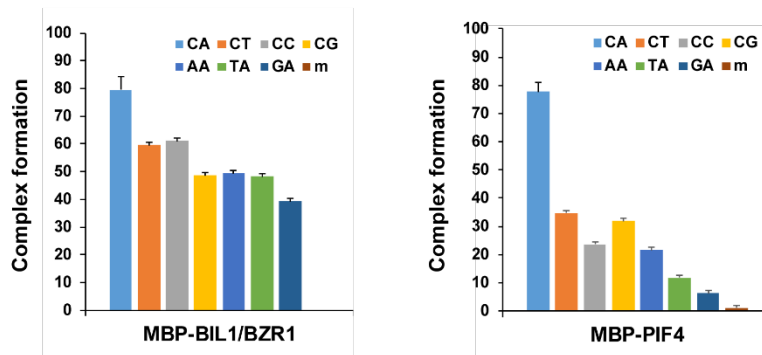
A**B**

図 2-6 BIL1/BZR1 および PIF4 の C₁A₂ 塩基に対する特異性

- (A) MBP 融合 BIL1/BZR1 および PIF4 の 5'-CCCCGTG-3'以外の NN-BRRE コア配列に対する EMSA 解析の結果が示されている。蛍光標識 DNA は G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), NN-BRRE コア配列 (5'-CCCCGTG-3'), または mBRRE コア配列 (5'-CCAAAA-3') を含んでおり、いずれも CPD プロモーターの DNA 断片を改変したものである。BIL1/BZR1 は標識 DNA (終濃度 0.25 μ M) の 4 倍のモル濃度の 1.0 μ M で、PIF4 および MBP は標識 DNA の 16 倍のモル濃度の 4.0 μ M で解析を行った。
- (B) A の結果に基づいて、タンパク質と複合体を形成した標識 DNA の割合の平均値が棒グラフで図示されている。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す。

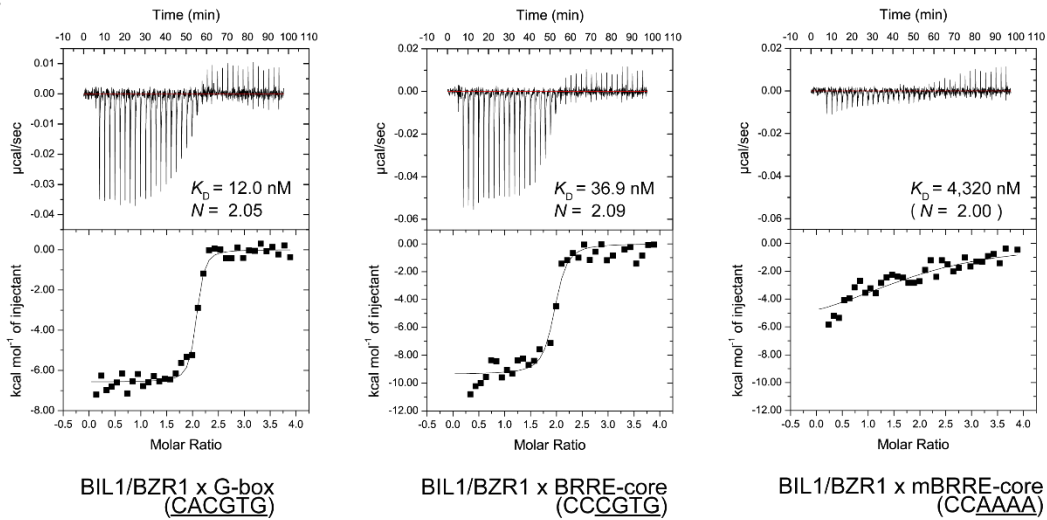
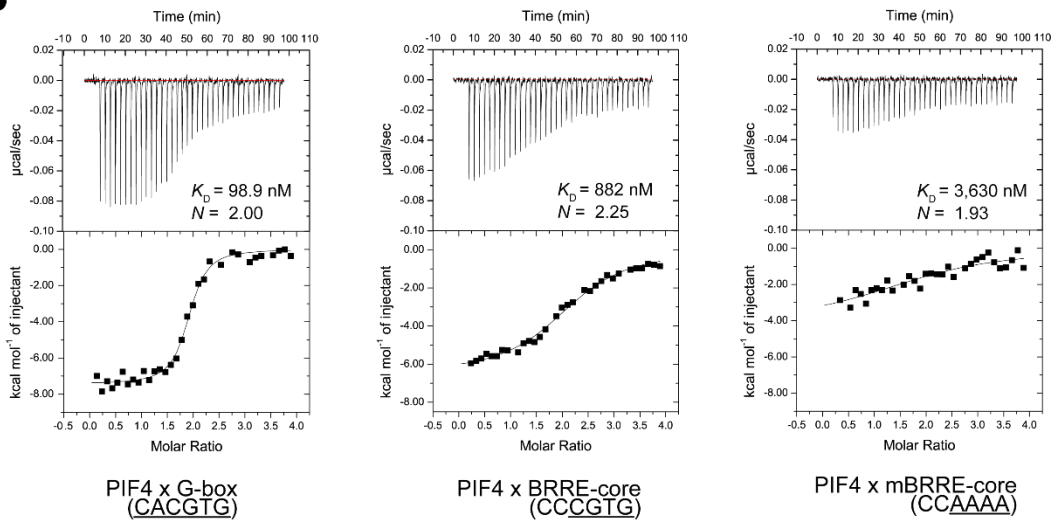
A**B**

図 2-7 各 DNA 断片に対するタンパク質滴定の ITC 解析の結果

G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), NN-BRRE コア配列 (5'-CCCGTG-3') または mBRRE コア配列 (5'-CCAAAA-3') を含む非標識 DNA に対し, MBP 融合 BIL1/BZR1 (A) および PIF4 (B) を滴定した ITC の結果が示されている. 各滴定の熱量がプロットされている. また, One Set of Sites モデルのフィッティングから得られた解離定数 K_D および DNA に対するタンパク質の結合比 N が示されている.

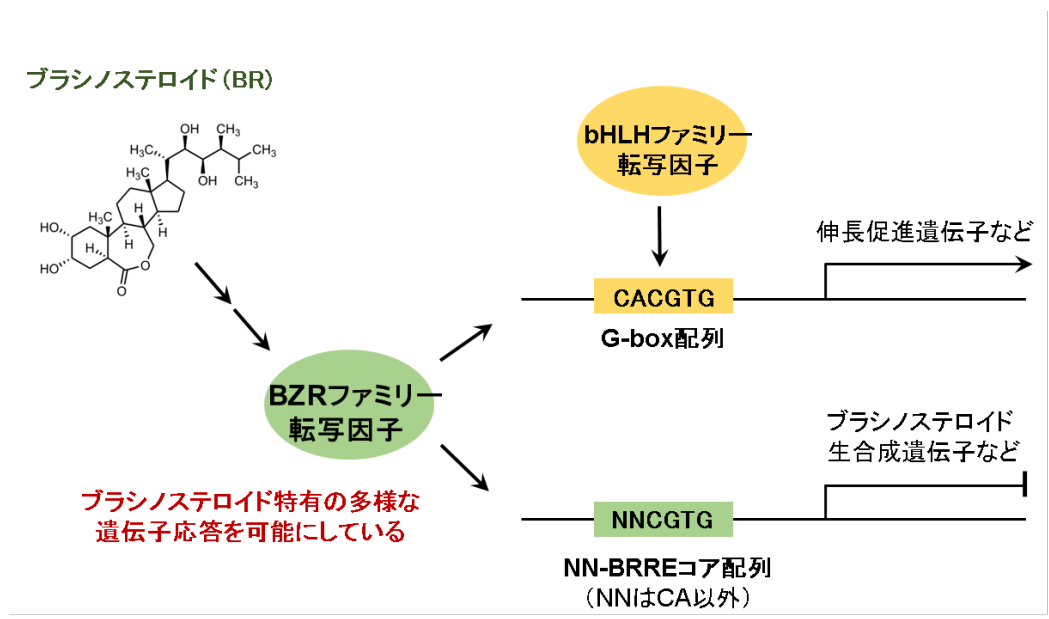


図 2-8 BZR ファミリー転写因子を介した BR 特有の遺伝子応答モデル

BR の情報は BZR ファミリー転写因子を刺激する。活性化された BZR ファミリー転写因子は標的遺伝子のプロモーター領域上の標的配列を認識し、BR 応答性遺伝子を直接制御する。BZR ファミリー転写因子は、G-box 配列認識によって他の植物ホルモンや環境シグナルと協調的に働くブラシノステロイドの生理作用に加え、NN-BRRE コア配列認識によって bHLH ファミリー転写因子等と競合しない他の遺伝子応答を制御することができる。

第 3 章

BIL1/BZR1 の X 線結晶構造解析

3-1 本章の概要

本章では、BZR 転写因子であるシロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 および標的 DNA との複合体の結晶化および X 線構造解析について述べる。

筆者は、修士論文 (野崎 2015) で BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメイン (21-104) と標的 DNA 断片の複合体の結晶化に成功したことを報告した (図 3-1)。その後、結晶化条件の最適化を行ったが結晶の高品質化、すなわち更なる高分解の X 線回折データを与える結晶を作製することは極めて困難であった。そこで本研究では、目的タンパク質に安定なタンパク質を融合させたキメラタンパク質を用いることで、結晶化条件が異なる高品質な結晶の作製を試みた。

融合タンパク質を利用した結晶化には様々なメリットがある (Smyth *et al.* 2003, Derewenda 2010, Bukowska & Grutter 2013)。目的タンパク質の性状が悪い (沈澱化または凝集化しやすい等) 場合、安定な目的タンパク質を付加することで性状が改善する可能性がある。また、結晶化が難しいタンパク質は分子が規則正しく積み重なりづらい分子表面を有している場合が多いため、結晶化しやすい融合タンパク質を付加することにより、分子が積み重なるための新たな土台が構築され、結晶化を促進することができる。X 線回折実験で収集する X 線回折像は構造因子の位相 (角度) 情報が得られないため、構造解析では何らかの方法で位相を決定する必要がある。既に類似タンパク質の構造が明らかになっている場合、分子置換法という簡便な方法が利用できる。構造既知の融合タンパク質は、それを鋳型にした分子置換法で利用できるため、容易に位相を決定できる利点もある。これにより、新規構造をもつ目的タンパク質の構造解析を迅速化することが可能である。

本研究では、結晶化促進のための融合タンパク質として MBP を用いた。MBP は最も実績のある結晶化促進融合タンパク質であり、MBP を融合させたキメラタンパク質

の結晶構造は 2018 年現在 Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) までに 200 件以上報告されている。MBP 融合タンパク質のコンストラクションにおいては、MBP の表面残基エントロピーを減少させること、および MBP と目的タンパク質を繋ぐリンカーを短くすることが有効とされている (Moon *et al.* 2010)。

タンパク質表面に分布するサイズの大きな親水性残基は、側鎖の立体配座エントロピーが高く (揺らぎが大きく)、結晶形成において分子が積み重なる際のエネルギー障壁を大きくしてしまう。そこで、これらの残基を Ala などの小さな残基に変異させることにより、側鎖の立体配座エントロピーを小さくすることができる。また、タンパク質表面の凸凹が減ることで分子同士が物理的に積み重なりやすくなることも期待できる (Goldschmidt *et al.* 2007, Moon *et al.* 2010, Drewenda 2011)。

2つ以上の独立したタンパク質ドメインが柔軟なリンカーペプチドによって繋がっている場合、分子全体の揺らぎが大きいため、結晶化させることは極めて困難になる。リンカーの長さをできるだけ短くし、独立したタンパク質ドメイン間の揺らぎを最小限に抑えることで、結晶化する可能性を上げることが期待される。

以上の工夫を BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインに施し、さらに MBP と BIL1/BZR1 を繋ぐリンカーの長さの検討、また共結晶化の用いる DNA の長さ・末端の形状の検討を行うことで、高分解の回折データを与える結晶の作製に成功した。また MBP を鋳型とした分子置換によって、BIL1/BZR1 の DNA 複合体の構造を解き明かした。

3-2 実験方法

3-2-1 結晶化促進 MBP 融合用の発現ベクターの構築

本研究では、大腸菌における MBP 融合タンパク質の発現用ベクター pMAL-c2X を改変することにより、結晶化促進変異型 MBP (mMBP) を融合させた結晶化用コンストラクトを 1 ステップで構築可能な発現ベクターを作製した。塩基の点変異・挿入・欠失が容易なインバース polymerase chain reaction (PCR) 法により、以下の順番で改変を行った。インバース PCR 法は、通常の PCR の場合のようにプライマーを互いに向かい合わせにするのではなく、変異導入箇所を起点にしてプライマーを互いに離れるような向きに設計することで、プラスミド断片を丸ごと増幅させる方法である。

- ① 目的タンパク質の C 末端側に 6 残基の His 配列 (6×His タグ) を融合できるように、マルチクローニングサイト (multiple cloning site; MCS) の 3'末端側に His タグをコードする塩基配列とストップコドンが付加させた。大腸菌で目的タンパク質を過剰発現する際、内在性のプロテアーゼにより分解反応を受けるため、完全長のタンパク質と混ざって分解物が混入してしまう場合がある。N 末端および C 末端に精製タグを付加し、対応する 2 つのアフィニティー精製を組み合わせることで、完全長の目的産物を得ることが期待できる。
- ② MBP と目的タンパク質を繋ぐリンカーペプチドをコードする領域、およびその 3'末端側に続く MCS の改変を行った。
- ③ 表面残基エントロピーを減少させるために、MBP 中の 8 つの残基 (Asp82, Lys83, Glu172, Asn173, Lys239, Glu359, Lys362, Asp363) を Ala に置換した。

インバース PCR 法を用いた変異導入は以下の手順で行った。まず、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (TAKARA)、鋳型となるプラスミドベクター、そして対応する 2 種類のプライマーを混合して PCR 反応を行い、線状のベクター断片を増幅させた。この PCR 反応液に *Dpn* I (TAKARA) を添加し反応させることで、大腸菌 (*dam*⁺ 菌株) より抽出した鋳型ベクターのみを分解した。*Dpn* I 処理後の溶液に T4 polynucleotide kinase (TAKARA) と Ligation high Ver.2 (TOYOBO) を同時に添加し反応させることで、線状のベクター断片の末端をリン酸化、そしてベクター断片を環状化させた。リン酸化およびライゲーション後の溶液を用い、大腸菌 XL1-Blue コンピテントセル (Stratagene) をヒートショック法により形質転換した後、抗生物質 ampicillin を含む LB 寒天培地に撒き一晩静置培養した。得られたコロニーを LB 液体培地で一晩振盪培養し、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドベクターを抽出した。抽出したプラスミドベクターのシーケンス解析を株式会社ファスマックに依頼し、目的の変異が導入されていることを確認した。

3-2-2 BIL1/BZR1 の結晶化コンストラクト作製

作製した改変型 pMAL-c2X ベクター (図 3-2) の *Not* I 制限酵素サイト (5'-GCGGCCGC-3') 中に、In-Fusion 法を用いてシロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子断片とストップコドンを挿入した。まず改変型 pMAL-c2X ベクターに対して *Not* I (TAKARA) 処理を行った後、PCR 産物とベクターをアガロースゲル電気泳動により分離し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて目的ベクター断片を抽出した。インサート DNA の増幅には、鋳型 DNA として大腸菌 B 株用にコドン最適化した BIL1/BZR1 の遺伝子断片を、ポリメラーゼとして PrimeSTAR[®] MAX DNA Polymerase を用いた。アガロースゲル電気泳動で目的遺伝子断

片がシングルバンドで増幅されていることを確認後、In-Fusion® HD Cloning Kit の Cloning Enhancer で前処理を行った。インサート DNA の前処理後、Not I 処理した改変型 pMAL-c2X 断片および 5×In-Fusion HD Enzyme Premix を添加して In-Fusion 反応を行った。反応後、2-2-1 と同様の方法で大腸菌の形質転換を行い、プラスミドベクターを抽出した後、目的遺伝子が挿入されていることを確認した。

上記の mMBP-AAA-BIL1/BZR1 (21-104) をコードするベクターを鋳型として、リンカーの Ala の数を 3 個から 0-2 個に欠失させるような変異導入をそれぞれ行った。3-2-1 と同様にインバース PCR 法を用いて欠失させた。

3-2-3 MBP 融合 BIL1/BZR1 および共結晶化用 DNA の調製

mMBP 融合 BIL1/BZR1 (21-104) は 2-2-3 に記述した MBP 融合タンパク質と同様の方法で調製した。各結晶化促進 MBP 融合タンパク質の分子量およびモル吸光係数 ϵ_{280} は以下に示した。また、後述の構造解析に成功した mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) のアミノ酸配列を表 3-1 に示した。

タンパク質名	分子量	吸光係数 ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)
mMBP-Ala×0-BIL1/BZR1 (21-104)	49686	81.8
mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104)	49757	81.8
mMBP-Ala×2-BIL1/BZR1 (21-104)	49828	81.8
mMBP-Ala×3-BIL1/BZR1 (21-104)	49899	81.8

共結晶化にあたり、外濾過膜 VIVASPIN 20 (MWCO 30,000) を用いて結晶化用バッファー (20 mM Bis-Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM KCl, 0.5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), 1 mM maltose) に置換し、800 μ M (約 40 mg/ml) まで濃縮した。MBP はリガンドである maltose と結合することで揺らぎの少ない (結晶化しやすい) 閉構造を取るため、結晶化用バッファーには maltose を添加した。結晶化スクリーニングでは NN-BRRE コア配列 (5'-GGCGTG-3') を含む 12 種類の長さ・形状の DNA を用いた (表 3-2)。各種一本鎖オリゴ DNA をそれぞれ 600 μ M になるよう結晶化バッファーで溶解させ、2-2-4 と同様の方法でアニーリングを行った。

3-2-4 MBP 融合 BIL1/BZR1 と標的 DNA との共結晶化

バッファー交換後の mMBP-BIL1/BZR1 およびアニーリング後の DNA 溶液を等量混合した後、20 °C, 15,000 \times g の条件で 30 分間遠心分離を行い、沈殿物等を取り除いた。シットティングドロップ法を用いて、3-2-3 で調製した mMBP-BIL1 / DNA 混合溶液を核酸結晶化スクリーニングキット The Nucleix Suite (QIAGEN) 全 96 条件に供した。結晶化スクリーニングには MRC 結晶化スクリーニングプレート (96 条件・2 ドロップ) (WAKEN) を使用した。結晶化ドロップを仕込んだプレートを 20 °C で静置させ、数日ごとに観察を行った。

3-2-5 スクリーニング結晶の X 線結晶構造解析

結晶化スクリーニングで得られた結晶を、放射光科学研究施設 Photon Factory (PF) に持ち込み、ビームライン BL-17A で X 線回折実験を行った。各結晶を 26% ethylene glycol (抗凍結剤) を含んだリザーバー溶液に数秒浸した後、95 K の窒素ガスで凍結さ

せた。凍結させた結晶に波長 1.0000 Å の X 線を照射し、回折像を検出器 Pilatus 2M-F で検出した。露光時間 0.5 秒、振動角 0.5° で 360 枚の回折像データを取得した。X 線回折データ処理用のソフトウェア XDS (Kabsch 2010) および AIMLESS (Evans & Murshudov 2013) を用いてデータセットの指数付け・積分とスケーリングを行った。以下の式で Matthews 係数 (V_M) (Matthews 1968) を求め、 V_M が 1.7–3.5 (Å³/Da) に収まるのを目安にし、結晶中の非対称単位中の分子数を見積もった。

$$V_M (\text{Å}^3/\text{Da}) = \frac{\text{単位格子の体積 (Å}^3\text{)}}{\text{分子質量} \times \text{単位格子中の非対称単位数} \times \text{非対称単位中の分子数 (Da)}}$$

maltose 結合型 MBP (PDB ID: 5IQZ) の構造を鋳型にし、解析統合プログラム Phenix (Adams *et al.* 2010) 中のソフトウェア Phaser-MR (McCoy *et al.* 2007) を使用して分子置換を行った。位相決定後、CCP4 プログラム (Vinn *et al.* 2011) のソフトウェア BUCCANEER (Cowtan 2006) で BIL1/BZR1 の自動モデル構築を行った。

3-2-6 結晶化条件の最適化と構造解析

G-box 配列を中央に含むオリゴ DNA をアニーリングし、両末端が一塩基突出した回文構造 DNA を調製した (表 3-2)。660 μM の二重鎖 DNA と 880 μM MBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21–104) を混合し、The Nucleix Suite の No.23 (0.2 M KCl, 0.01 M MgCl₂, 0.05 M sodium cacodylate, pH 6.5, 10% (w/v) PEG 4000) および No.24 (0.2 M ammonium acetate, 0.01 M CaCl₂, 0.05 M sodium cacodylate, pH 6.5, 10%(w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000) の条件で結晶化を行った。また、3-2-5 と同様の手順で X 線回折実験および構造解析を行った。なお、X 線回折実験は PF のビームライン AR-NE3A で行った。窒素ガスで瞬間冷却した結晶を常温まで戻し再度瞬間冷却するというアニーリング法を施した。

露光時間 0.2 秒, 振動角 0.2°で 1800 枚の回折像データを取得した. MBP (PDB ID: 5IQZ) と 3-2-5 でモデル構築した BIL1/BZR1 と DNA の複合体を鋳型にした分子置換により位相決定した後, PHENIX. REFINE (Adams *et al.* 2002) による自動精密化と COOT (Emsley & Cowtan 2004) による手動精密化を交互に行い, 構造の妥当性を示す指標の 1 つである $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ の値で評価した. さらに RAMPAGE (Lovell *et al.* 2003) および wwPDB Validation Service (<https://validate-rcsb-1.wwpdb.org/>) で構築したモデルの評価を行った.

3-3 結果・考察

3-3-1 MBP 融合 BIL1/BZR1 および共結晶化用 DNA のコンストラクション

これまで PDB に報告されている MBP 融合キメラタンパク質のリンカーのほとんどが Ala-Ala-Ala (Ala \times 3) または Ala-Ala-Ala-Glu-Phe であり, リンカーの長さは検討されてこなかった. 例えば, α -ヘリックスにおいては 1 残基ごとにらせん中で 100° 向きを変え, らせん軸方向に 1.8 Å 移動する. したがって, リンカーの長さが 1 残基変わることで最も報告例の多い Ala \times 3 リンカーに加えて, 長さを 1 残基ずつ短くした 0-2 個の Ala リンカーをもつ MBP 融合 BIL1/BZR1 を結晶化スクリーニングに供した. いずれの MBP 融合 BIL1/BZR1 についても結晶化に供するのに十分な純度まで精製することができた (図 3-3, 後述の構造解析に成功した mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 の結果を示した). また, MBP と BIL1/BZR1 との間のリンカーを短くしたことによる BIL1/BZR1 の DNA 結合特異性への影響の有無を確認した. EMSA 解析の結果, 短いリンカーで繋がれた結晶化促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 は, タグを切断した BIL1/BZR1 および MBP-linker-

BIL1/BZR1 と同様の塩基認識特異性を保持していることが確認された (図 3-4, 後述の構造解析に成功した mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 の結果を示した).

筆者はまず, 非回文構造の NN-BRRE コア配列を含む DNA に対し BIL1/BZR1 が非対称なホモ二量体構造で結合する可能性を考えた. また, BIL1/BZR1 との親和力が G-box 配列と差がある NN-BRRE コア配列ほど, BIL1/BZR1 の構造を非対称に歪めるのではないかと仮説を立てた. 2-3-2 の結果 (図 2-5) を参考にし, 最初の結晶化スクリーニングでは G₁G₂ の NN-BRRE コア配列 (5'-GGCGTG-3') を含む DNA 断片を用いた. まず, 二重鎖 DNA の両端の形状を突出させることで, 結晶中で DNA 同士が規則正しく積み重なりやすくなるような形状の非回文構造 DNA を 6 種類デザインした (図 3-5A). また, 二重鎖 DNA の片方のみを突出末端にし, 同一分子同士で相補的に積み重なるような非回文構造 DNA を 6 種類デザインした (図 3-5). 結晶中で疑似的な回文構造 DNA を形成しやすくなり, 複合体分子全体の対称性が上がることで結晶化が促進されると期待できる.

3-3-2 結晶化スクリーニングおよび X 線構造解析

結晶化スクリーニングの結果, mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) および DNA 断片 A-2 の組み合わせ (図 3-5) に対し, The Nucleix Suite の No. 23 (0.2 M KCl, 0.01 M MgCl₂, 0.05 M sodium cacodylate, pH 6.5, 10% (w/v) PEG 4000) および No. 24 (0.2 M ammonium acetate, 0.01 M CaCl₂, 0.05 M sodium cacodylate, pH 6.5, 10%(w/v) PEG 4000) の 2 条件において結晶が得られた (図 3-6). mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) および DNA 断片 A-2 を混合したときのみ結晶ができること (単独では結晶ができないこと) を確認した後, 結晶を X 線回折実験に供した. XDS および AIMLESS でデータセットを処理し, MBP による分子置換で位相決定を行った (表 3-3). 結晶の空間群は C121 であり, 格子定

数は $a = 108 \text{ \AA}$, $b = 91 \text{ \AA}$, $c = 100 \text{ \AA}$, $\beta = 104^\circ$ であった (表 3-3). また, Matthews 係数 (V_M) は $2.14 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ であり非対称単位中に MBP-BIL1/BZR1 と DNA 中の鎖 1 本が 2 分子ずつ存在すると見積もられた. 位相決定後の電子密度マップにおいて, MBP 間に BIL1/BZR1 と標的 DNA の複合体の電子密度が観測された (図 3-7).

モデル構築を行った結果, 非対称単位中には MBP 融合 BIL1/BZR1 が 2 つ (片方の BIL1/BZR1 のみモデル構築可), 二重鎖 DNA の片方の鎖が存在していた (図 3-8). 結晶化に用いた DNA には, 結晶中で DNA 同士が規則正しく積み重なりやすくなるような形状を付与していたが, 実際には 2 つの MBP 間に DNA が挟まれるようなパッキング様式をとっていた. 結晶学的な対称性に着目すると, 結晶化に用いた DNA は非回文構造であったにもかかわらず, 結晶中では DNA が回文構造として扱われていた (図 3-8). また, 電子密度を基に構築した DNA は, 結晶化に用いた DNA よりも 1 塩基分長くなっていた. 以上の結果を統合すると, 結晶中では非回文構造 DNA が図 3-9A のように 2 つの向きをランダムにとっており, それに伴い DNA の電子密度が平均化されていると推測された. また一方でこの結晶構造は, BIL1/BZR1 は対称なホモ二量体として NN-BRRE コア配列 (5'-NNCGTG-3') を含む非回文構造 DNA を認識しうることを示唆している.

3-3-3 結晶化条件の最適化と構造決定

結晶構造において DNA の塩基構造が一義的に決まるように, 中央に G-box 配列 (5'-CACGTG-3') を含む回文構造 DNA の設計を行った (図 3-9B). また, 結晶中で MBP に対する BIL1/BZR1 : DNA 複合体分子の揺らぎを最小限に抑えるため, MBP との隙間を完全に埋めるような長さ・形状を付与した (図 3-9B). 非回文構造 DNA と同じ結晶化条件で結晶化を行い, 同じ形状の結晶を取得することができた (図 3-10). X線照射

実験により最高分解能 2.17 Å の回折データを取得した (表 3-4, 図 3-10). 結晶の空間群は $P2_1$, 格子定数は $a = 102.7 \text{ \AA}$, $b = 92.6 \text{ \AA}$, $c = 112.0 \text{ \AA}$, $\beta = 100.4^\circ$, Matthews 係数 (V_M) は $2.32 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ であり非対称単位中に MBP-BIL1/BZR1 と DNA 中の鎖 1 本が 4 分子ずつ存在すると見積もられた. モデル構築を行った結果, 最終的に $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.217/0.244$ で分解能 2.17 Å の結晶構造を決定した (表 3-4, 図 3-11). 非対称単位中に MBP 融合 BIL1/BZR1 が 4 つ (ホモ二量体が 2 つ) とそれらに認識される二重鎖 DNA が 2 つ存在していた (図 3-11A). 空間群の種類および非対称単位中における MBP 融合 BIL1/BZR1 : DNA 複合体の分子数は、非回文構造 DNA との共結晶とは異なっていた. この違いは、MBP との隙間を完全に埋める形状をした DNA を用いたことにより、隣り合う MBP の相対的な位置関係にわずかなズレが生じたためであると考えられる. この MBP の相対配置のズレによる BIL1/BZR1 ホモ二量体構造への影響は確認されなかった. また、回文構造 DNA を用いたことにより、結晶中における DNA の塩基構造をすべて一義的に決定することができた. 非対称単位中にある 2 つの BIL1/BZR1 ホモ二量体と DNA の複合体 (BIL1/BZR1 : DNA 複合体) は電子密度の明瞭さが異なっており、分子の揺らぎの程度を示す温度因子 B-factor の平均値はそれぞれ 47.7 \AA^2 , 73.6 \AA^2 であった (B-factor が高いほど分子の揺らぎが大きい) (図 3-12A). 結晶中における各 BIL1/BZR1 : DNA 複合体の周辺環境を比較すると、隣接する MBP との相対位置関係が全く異なることがわかった. 電子密度が明瞭な (B-factor が低い) BIL1/BZR1 は DNA 認識ヘリックス (塩基性領域) 上の表面残基を介して MBP と相互作用しており、一方で電子密度が不明瞭な BIL1/BZR1 (B-factor が高い) は MBP と相互作用していなかった (図 3-12B). MBP との相互作用の有無によって結晶中での分子の揺らぎ、すなわち電子密度の明瞭さに違いが生じたと考えられる. この MBP との相互作用による BIL1/BZR1 の主鎖構造の変化は確認されなかったため、5 章以降では電子密度が明瞭な BIL1/BZR1 : DNA の複合体構造を用いて議論を行う.

3-3-4 まとめ

本章では、シロイヌナズナ由来の BZR 転写因子 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと標的 DNA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

タンパク質の性状の改善および DNA との複合体の結晶化にあたり、BIL1/BZR1 の DNA 結晶化促進タグとして N 末端側に結晶化促進タグ MBP を付加させた。タグを切断した BIL1/BZR1 は低塩濃度条件下および低温条件下でゲル状化しやすい、さらに標的 DNA と高濃度で混合すると沈殿を生じやすい、といった性状を示していた。MBP を融合させたところ、BIL1/BZR1 の上記の性状は改善され、*in vitro* 解析や結晶化をする上で非常に扱いが容易になった。

結晶化においては MBP と BIL1/BZR1 が 0-3 個の連続した Ala リンカーで繋がる計 4 種類のキメラタンパク質を用いて検討を行った。結果、Ala が 1 個のリンカーを介した MBP 融合 BIL1/BZR1 において結晶が得られ、高分解の回折データを取得し構造解析にまで至った。最近では MBP と目的タンパク質のリンカーの長さを 2-8 個の間で検討することにより、結晶化および構造決定にまで至る確率が上がったという報告もされた (Tengchuan *et al.* 2017)。従って、融合キメラタンパク質を結晶化する場合においては、リンカーの長さを検討することが極めて有効であると考えられる。

核酸結合タンパク質が核酸の塩基を認識する上で、水分子を介した水素結合は極めて重要な要素である (Rohs *et al.* 2012)。水分子は分解能が 2.5 Å 以下ではないと電子密度が見えてこないため、核酸結合タンパク質：核酸複合体間の相互作用を仲介する水分子を判別するために、MBP のような融合タグを付加して結晶性を改善することも有効な手段であると考えられる。

表 3-1 結晶化促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 (21-104) の配列情報

配列の種類	配列情報
塩基配列	<p>atgaaaatcgaagaaggtaaactggtaactctggattaacggcgataaaggctataacgggtctcgctgaagtcggt aagaaatcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttgagcatccggataaactggaagagaaattcccaca ggttgcggcaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacacgaccgcttggggctacgctcaatctggc ctgttggtgaaatcacccggcagcagcgttccaggacaagctgtatccgtttacctgggatgccgtactgttaca acggcaagctgattgcttaccgatcgtgttgaagcgttatcgtgattataacaaagatctgctgccgaacccg ccaaaaacctgggaagagatccggcgctggataaagaactgaaagcgaaggttaagagcgcgctgatgttca acctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatcggttcaagatgcacggcgca agtacgacattaaagacgtggcgctggataacgctggcgcaagcgggtctgaccttctggtgacctgatta aaaacaaacatgaatgcagacaccgattactccatcgagaagctgaccttaataaaggcgaacagcgtg accatcaacggccctgggatggtccaacatgcaccagcGCAgtgaattatggtgaacggtactgccg acctcaagggtcaaccatccaaccgttcgttggcgctgctgagcgcaggtattaacgccgccagtccaacaaa gagctggcaaaagagttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcgggttaataaagacaacccg ctgggtgccgtagcgtgaagtcttacaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatgaaaa cgcccagaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgcagatgtccgcttctggtatgccgtgctactgcgggtgat caacgccccagcggctgctcagactgctgatgcaccctggcagccgcgcagactaatgcggctcgtcgcgaaa <u>ccgtcctggcgtgaacgcgaaaaaatcgtcgcgctgaacgccgtcggcgtgagtgccgcaaaatttatac</u> <u>cggcctgctgctcaggggtgattacaatctgccgaacattgcgacaacaatgaagtctgaaagcgtggtgct</u> <u>gaagccggctgggtggttgaagaagatggcaccacgtatcgaaggttgcgaaaccgtccggggcgaattg</u> <u>ccgttaccagctctcgt</u></p>
アミノ酸配列	<p>MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEF PQVAATGDGPDIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPAAAFQDKLYPFTWDA VRYNGKLIAYPIAVEALSIIYKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSA LMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYAAGKYDIKDVGVNDNAGAKAGLT FLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSVN YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGL EAVNKDKPLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAF WYAVRTAVINAASGRQTVDAALAAAQTNAARRKPSWRERENRRRER <u>RRRAVAAKIYTGRLAQGDYNLPKHCDNNEVLKALCVEAGWVVEEDGT</u> <u>TYRKGCKPLPGEIAGTSSR</u></p>

※ BIL1/BZR1 (21-104) に該当する領域には下線を引いた。

表 3-2 MBP 融合 BIL1/BZR1 との共結晶化に用いた DNA 配列

DNA の名称	各一本鎖オリゴ DNA の配列
A-1_GG-BRRE	5'-AAAGGGCGTGTGAAA-3' 5'-TTCACACGCCCTTT-3'
A-2_GG-BRRE	5'-AAGGGCGTGTGAAA-3' 5'-TTCACACGCCCTTT-3'
A-3_GG-BRRE	5'-AGGGCGTGTGAAA-3' 5'-TCACACGCCCTT-3'
A-4_GG-BRRE	5'-AAGGGCGTGTGAA-3' 5'-TCACACGCCCTTT-3'
A-5_GG-BRRE	5'-AGGGCGTGTGAA-3' 5'-CACACGCCCTT-3'
A-6_GG-BRRE	5'-GGGCGTGTGAA-3' 5'-CACACGCCCT-3'
B-1_GG-BRRE	5'-AGTGGGCGTGAAATTT-3' 5'-CACGCCACT-3'
B-2_GG-BRRE	5'-GTGGGCGTGAAATTT-3' 5'-CACGCCAC-3'
B-3_GG-BRRE	5'-TGGGCGTGAAATTT-3' 5'-CACGCCA3'
B-4_GG-BRRE	5'-AGTGGGCGTGAATT-3' 5'-CACGCCACT-3'
B-5_GG-BRRE	5'-GTGGGCGTGAATT-3' 5'-CACGCCAC-3'
B-6_GG-BRRE	5'-TGGGCGTGAATT-3' 5'-CACGCCA-3'
Optimized_G-box	5'-TTCACACGTGTGAAA-3' (1 種類でアニーリング)

表 3-3 MBP 融合 BIL1/BZR1 と非回文構造 DNA の複合体の X 線回折データ

Data collection	
Beamline	PF-BL17A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	C 1 2 1
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	107.6, 90.6, 100.0
β (°)	104.3
Resolution (Å)	45.30–2.51 (2.62–2.51)
R_{meas}	0.094 (0.721)
$I/\sigma(I)$	10.8 (2.2)
Unique reflections	31125 (3295)
Completeness (%)	98.1 (92.9)
Redundancy	3.4 (3.4)
CC(1/2)	0.997 (0.810)

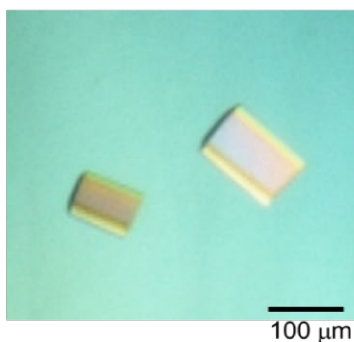
表 3-4 MBP 融合 BIL1/BZR1 と回文構造 DNA の複合体の X 線回折データ
および統計値

Data collection	
Beamline	PF-AR NE3A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	$P2_1$
Cell dimensions	
<i>a, b, c</i> (Å)	102.7, 92.6, 112.0
β (°)	100.4
Resolution (Å)	47.33–2.17 (2.21–2.17)
R_{meas}	0.061 (0.578)
R_{pim}	0.033 (0.320)
$I/\sigma(I)$	21.2 (3.5)
Unique reflections	109100 (5420)
Completeness (%)	99.9 (100)
Redundancy	6.8 (6.3)
CC(1/2)	0.999 (0.897)
Refinement	
Resolution (Å)	43.60–2.17
Unique reflections	109005
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0.217/0.244
No. atoms	
Protein	13381
DNA	1220
Solvent	311
Ligand (maltose)	92
B -factors (Å ²)	
Protein	51.0
DNA	52.2
Solvent	37.0
Ligand	34.9
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	0.786
Ramachandran plot (%)	
Favoured region	98.5
Allowed region	1.5

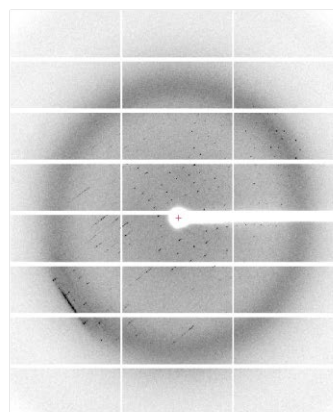
A

GTGGGGCGTGTGTGATC
CACCCGCACA

NN-BRRE コア配列

B

0.05 M Bis-Tris, pH 5.7
8% (w/v) PEG 4000
0.2 M ammonium acetate
0.01 M CaCl₂

C

最高分解能 2.95 Å

図 3-1 BIL1/BZR1 (タグ切断) と非回文構造 DNA の複合体の結晶

- (A) 結晶が得られた BIL1/BZR1 (タグ切断) および 非回文構造 DNA の組み合わせが図示されている。BIL1/BZR1 の N 末端側に付加している GPLE ペプチドは、発現ベクター pGEX-6p-3 由来のものである。
- (B) A の組み合わせで得られた結晶の写真および結晶化条件。
- (C) B の結晶より取得した X 線回折像。PF のビームライン AR-NE3A で X 線照射を行い、Pilatus 2M-F で回折像を検出した。

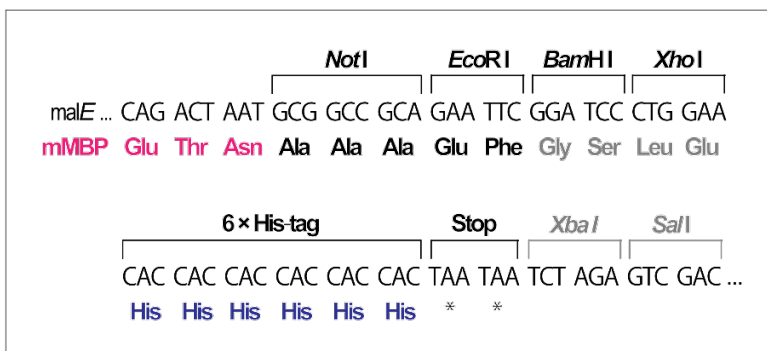
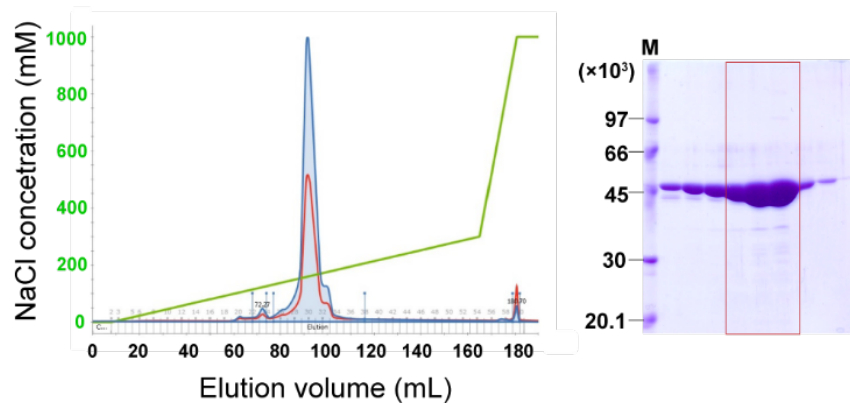
A**B**

図 3-2 pMAL-c2X 発現ベクターの改変

改変前 (A) および改変後 (B) の pMAL-c2X ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) 周辺の配列情報.

A 陰イオン交換クロマトグラフィー (カラム : MonoQ HR 10/10)



B ゲル濾過クロマトグラフィー (カラム : Superdex 200 10/300 GL)

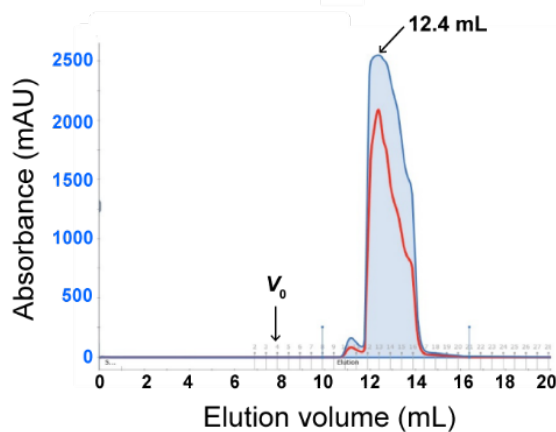


図 3-3 結晶化促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 の精製結果

(A) mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 (21-104) を陰イオン交換クロマトグラフィー (カラム: Mono Q HR10/10) 精製に供した際のクロマトグラムが示されている。280 nm および 260 nm における吸収スペクトルをそれぞれ青線および赤線で示し、NaCl の濃度勾配 (0-1000 mM) を黄緑線で示した。また、メインピーク画分の SDS-PAGE の結果を示した。M は分子量マーカーを示す。ゲル濾過クロマトグラフィー用に回収した画分を赤枠で囲った。

(B) mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 (21-104) をゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: Superdex 200 10/300 GL) 精製に供した際のクロマトグラムが示されている。 V_0 (= 7.8 mL) は Superdex 200 10/300 GL カラムの排除体積を表す。

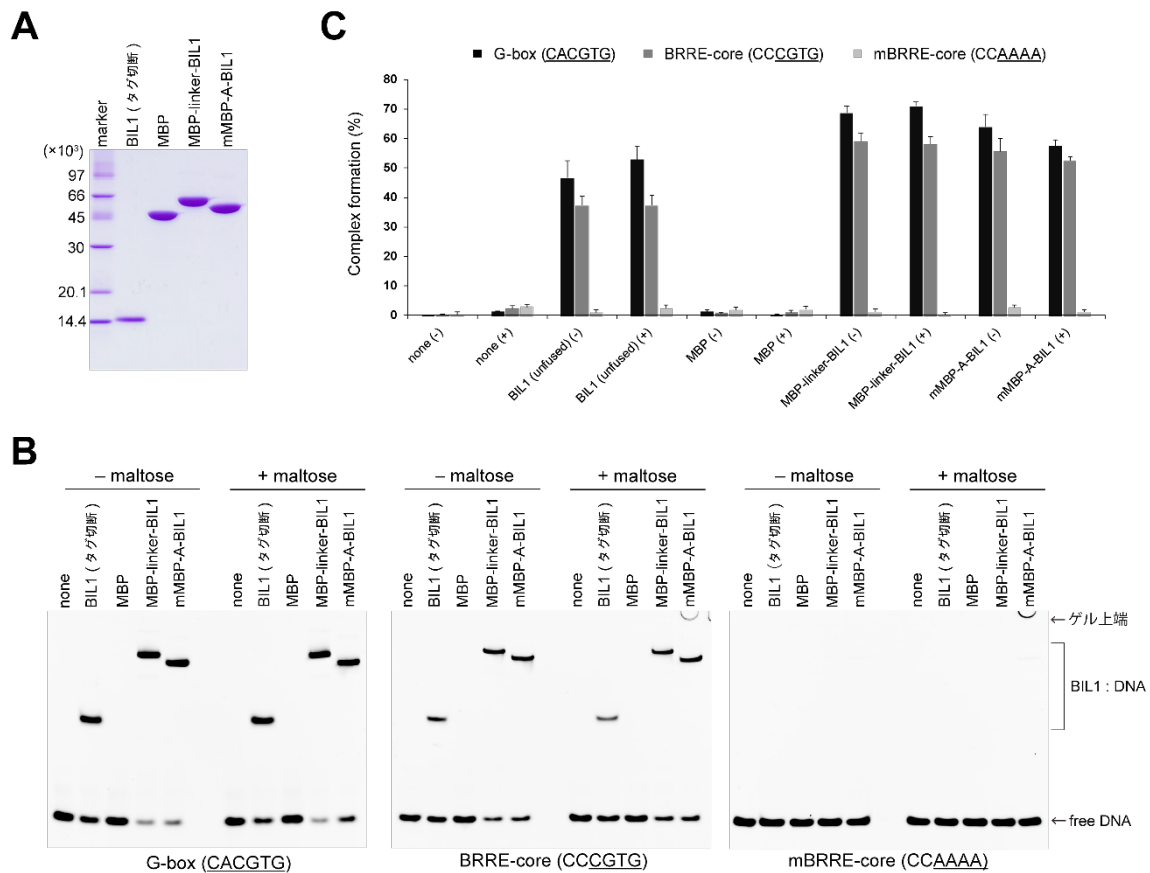


図 3-4 結晶化促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 の DNA 結合特異性

- (A) 調製したタグ切断 BIL1/BZR1 (21–104), MBP, MBP-linker-BIL1/BZR1(21–104) および mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 (21–104) の SDS-PAGE 解析の結果.
- (B) G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), NN-BRRE 配列 (5'-CCCGTG-3'), または mBRRE 配列 (5'-CCAAAA-3') を含む標識 DNA と各タンパク質の EMSA 解析の結果. EMSA 実験における, 各タンパク質の終濃度は標識 DNA (終濃度 0.25 μ M) の 4 倍のモル濃度の 1.0 μ M である. それぞれの実験は 3 回ずつ行われた.
- (C) B の結果に基づいて, タンパク質と複合体を形成した標識 DNA の割合の平均値が棒グラフで図示されている. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.

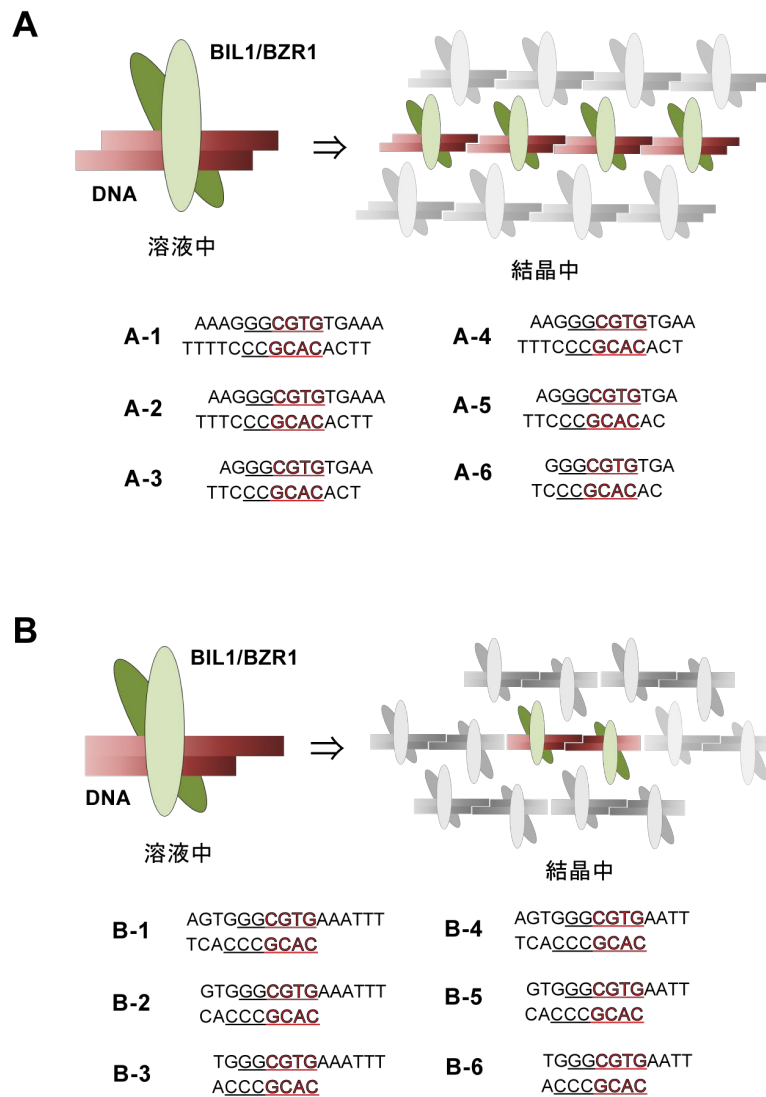


図 3-5 結晶化に用いた非回文構造 DNA の形状および配列

- (A) 二重鎖 DNA の両端の形状を突出させ、結晶中で DNA 同士が規則正しく積み重なりやすくなるようにデザインした非回文構造 DNA. また、スクリーニングに用いた 6 つの DNA 断片が示されている.
- (B) 二重鎖 DNA の片方のみを突出末端にし、同一分子同士で相補的になるような塩基配列を付与した非回文構造 DNA. 分子全体の対称性を上げることで結晶化の促進を図った. また、スクリーニングに用いた 6 つの DNA 断片が示されている.

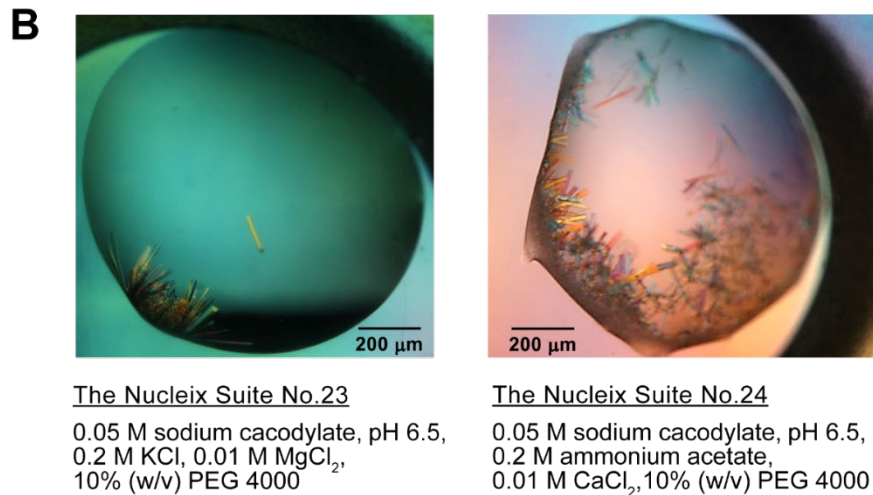
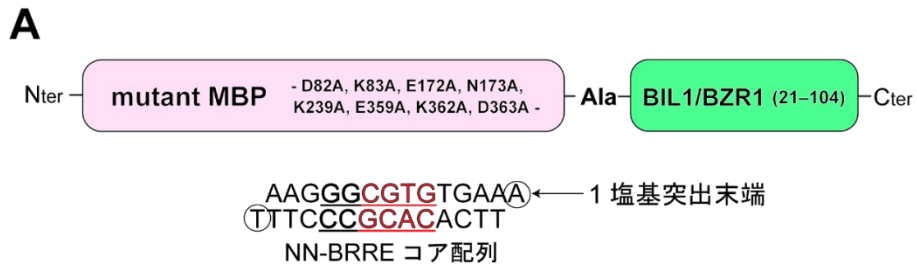
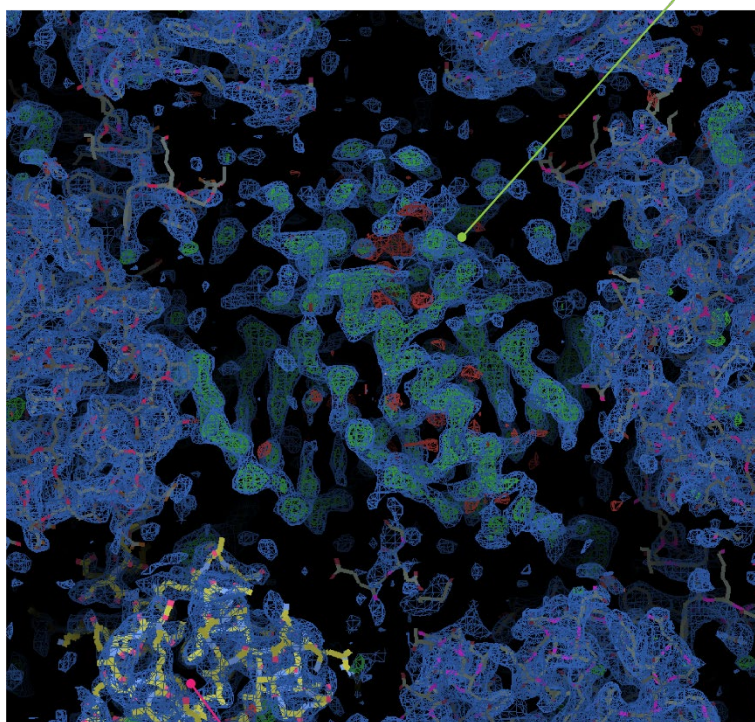


図 3-6 結晶促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 と非回文構造 DNA の複合体の結晶

- (A) スクリーニングで結晶が得られた結晶促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 および非回文構造 DNA (図 3-5 の A-2) のコンストラクトの組み合わせ.
- (B) A の組み合わせで得られた結晶の写真およびその結晶化条件.

BIL1/BZR1 : DNA 複合体の電子密度



鋳型に用いた MBP の構造と
結晶中の MBP の電子密度

図 3-7 MBP 融合 BIL1/BZR1 と非回文構造 DNA 複合体の電子密度

mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) と非回文構造 DNA の複合体の電子密度マップが示されている。青は $2F_o-F_c$ マップで電子の存在位置を示す。緑は正の F_o-F_c マップで構造モデルを置くべき位置を示す。またスティックモデルはいずれも鋳型に用いた MBP (PDB ID: 5IQZ) の構造を表している。

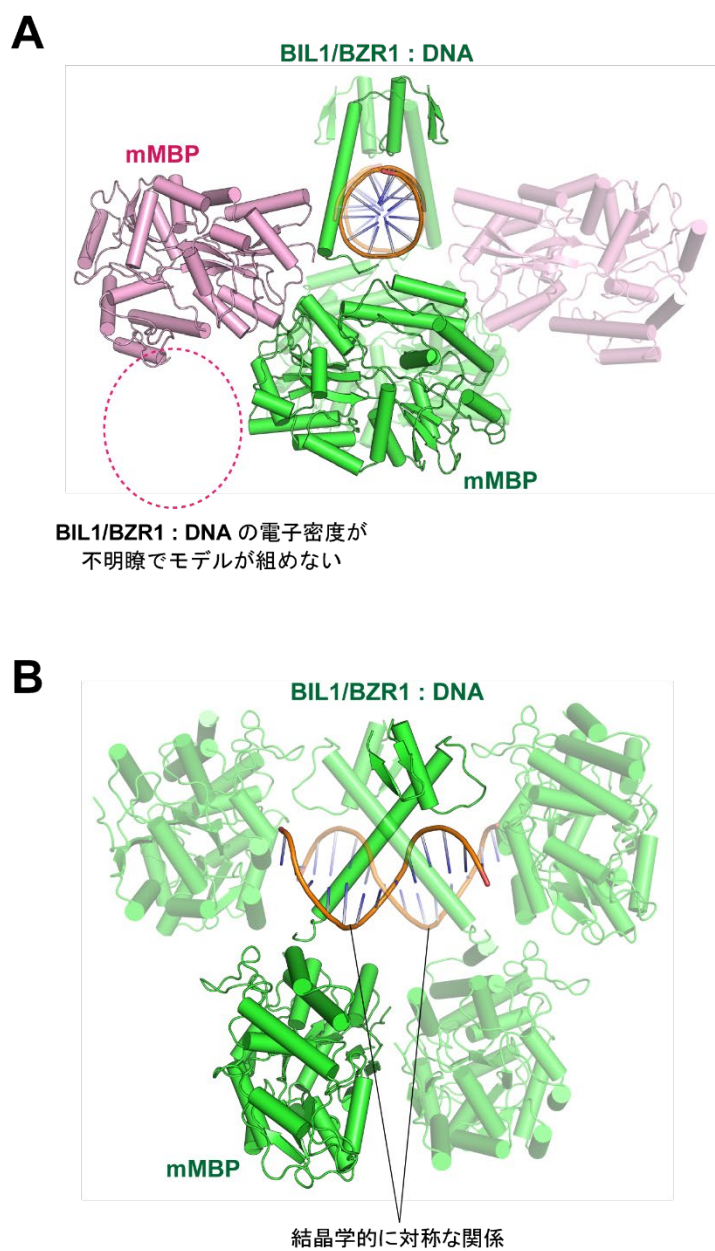


図 3-8 MBP 融合 BIL1/BZR1 と非回文構造 DNA 複合体の立体構造

- (A) mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) と非回文構造 DNA の複合体の結晶構造が示されている。異なる鎖はそれぞれ異なる色で示している。非透過モデルは非対称単位中の結晶構造を示す。
- (B) 正面からの BIL1/BZR1 : DNA 複合体、その周りに位置する mMBP が示されている。非対称単位中のものは非透過モデルで表示され、それと対称関係にあるものは透過モデルで表示されている。

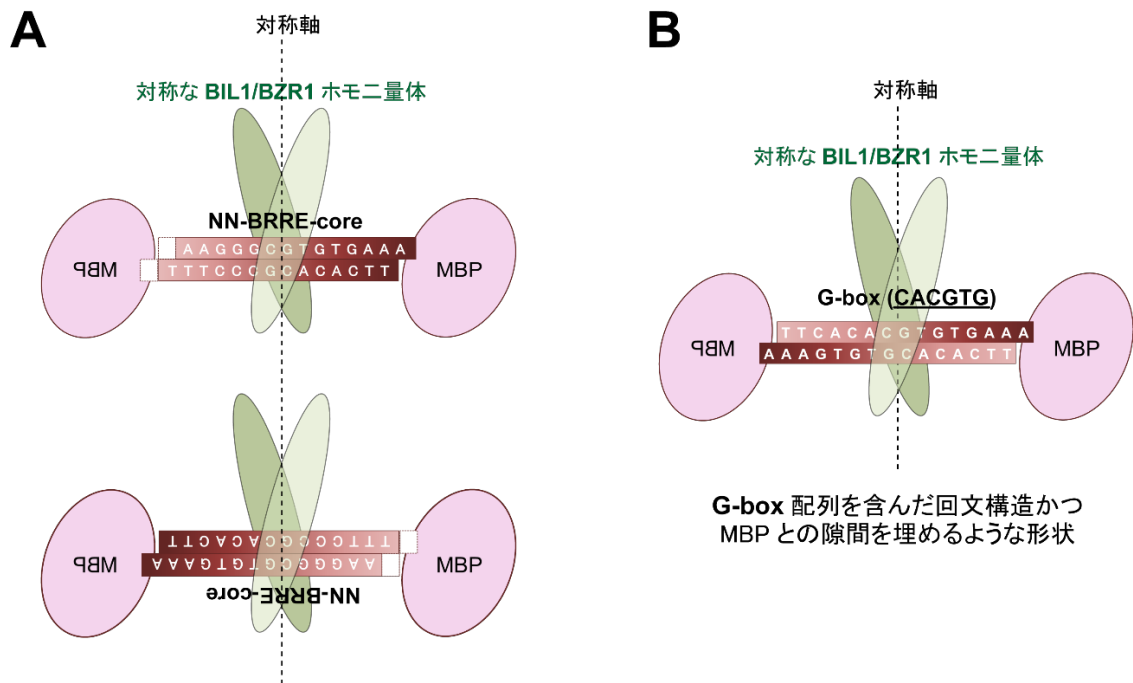


図 3-9 共結晶化用 DNA の長さ・形状の最適化

- (A) mMBP-Ala×1-BIL1/BZR1 (21-104) と非回文構造 DNA の複合体の結晶構造においては、非回文構造 DNA が2つの向きをランダムにとっていると考えられる。また、BIL1/BZR1 は対称なホモ二量体構造で非回文構造 DNA を認識していた。
- (B) A を踏まえて、G-box 配列が対称軸の中心に位置する回文構造、かつ MBP との隙間を完全に埋めるような形状をもつ共結晶化用 DNA を新たに設計した。

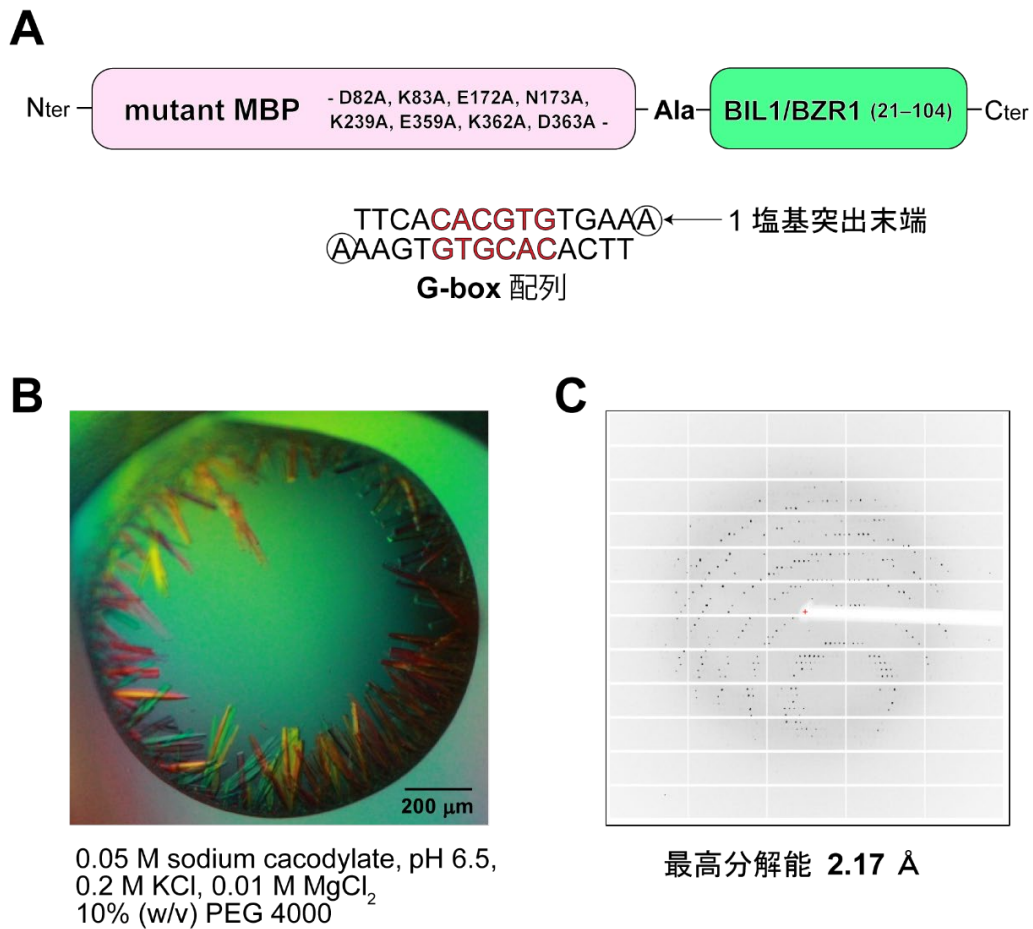


図 3-10 最適化後の MBP 融合 BIL1/BZR1 と回文構造 DNA の複合体の結晶

- (A) 結晶促進 MBP 融合 BIL1/BZR1 および最適化後の回文構造 DNA のコンストラクトの組み合わせ.
- (B) A の組み合わせで得られた結晶の写真, および結晶化条件.
- (C) B の結晶より取得した X 線回折像. PF のビームライン AR-NE3A で X 線照射を行い, Pilatus 2M-F で回折像を検出した.

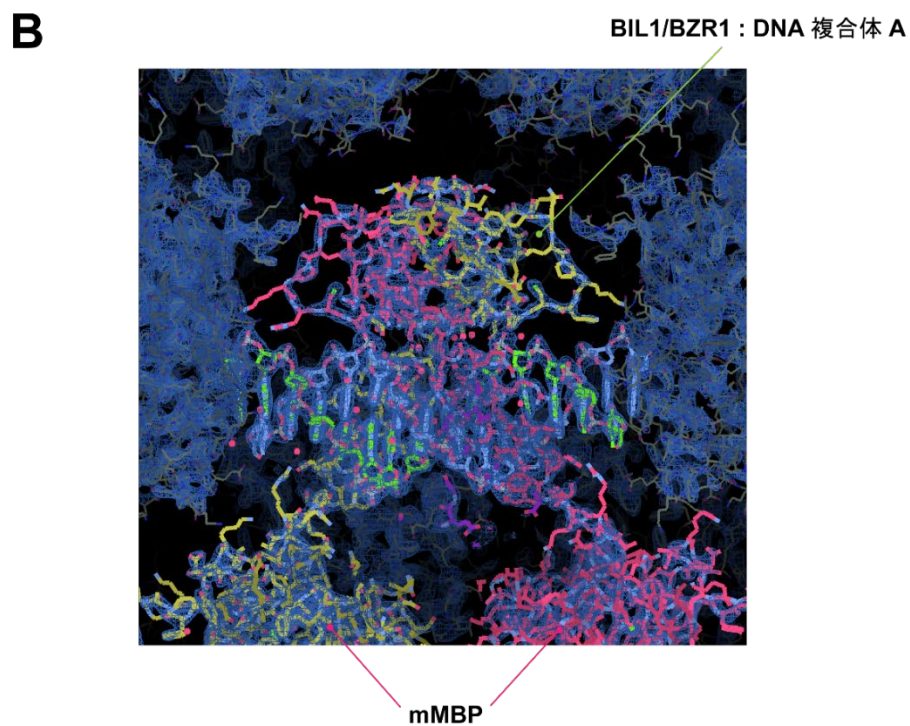
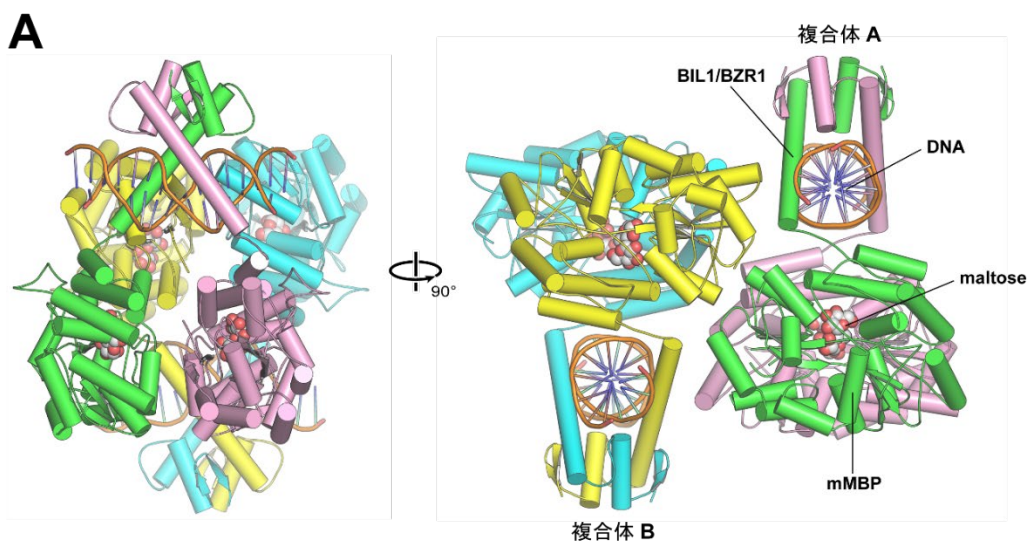


図 3-11 最適化後の MBP 融合 BIL1/BZR1 と回文構造 DNA の複合体構造

- (A) 非対称単位における mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 (21-104) と回文構造 DNA との複合体の結晶構造 (PDB : 5ZD4). 異なる鎖はそれぞれ異なる色で示した.
- (B) BIL1/BZR1 : DNA 複合体 A およびその周辺分子のモデル構造がスティックモデルで表示され, またそれらの電子密度が $2F_o - F_c$ マップ (3σ レベル) で示されている.

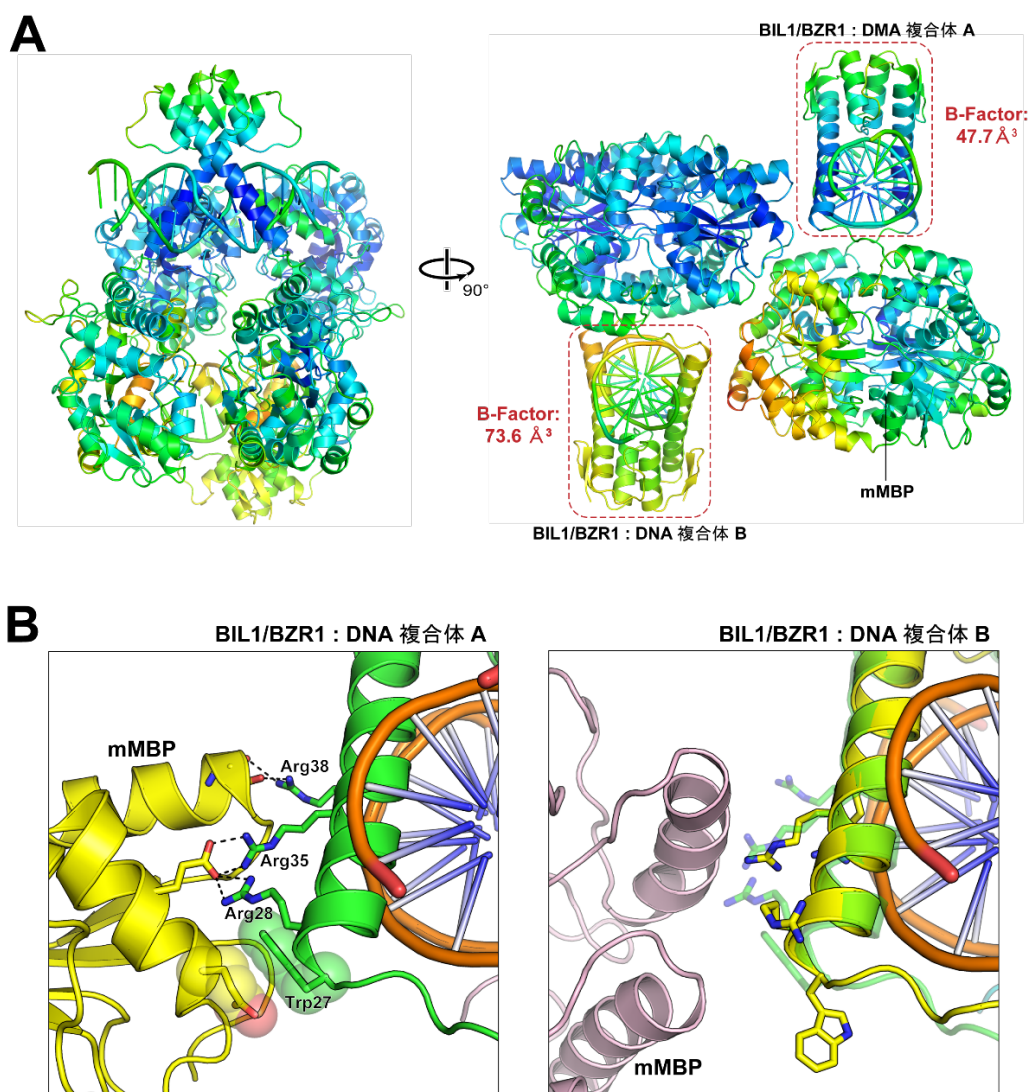


図 3-12 結晶中における分子の揺らぎ

- (A) 非対称単位における mMBP-Ala \times 1-BIL1/BZR1 (21-104) と回文構造 DNA との複合体の結晶構造が示されている。温度因子 B-Factor によって色分けされており、温度因子が高い (原子の揺らぎが大きい) ほど暖色、温度因子が低い (原子の揺らぎが小さい) ほど寒色に色分けられている。また 2 つの BIL1/BZR1 : DNA 複合体の B-Factor の平均値を図中に示した。
- (B) 結晶中における異なる BIL1/BZR1 の DNA 認識ヘリックス (塩基性領域) と、それらに近接する mMBP の相対的な位置関係、および表面残基同士の相互作用が示されている。黒線は水素結合または塩橋を示す。ファンデルワールス相互作用に係わる残基については、球状モデルで表示した。

第 4 章

BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する 複合体構造

4-1 本章の概要

第3章において、シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 とその標的 DNA の複合体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。これは高等植物で高度に保存されている BZR ファミリー転写因子において初めて解明された三次元構造である。

本章では、BIL1/BZR1 の二量体形成様式および標的 DNA との相互作用様式の構造基盤を明らかにすることを目的とした。さらに、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 を用いて典型的 bHLH 転写因子との比較解析を行うことで、両者の塩基配列認識特異性の詳細な理解を試みた。

4-2 実験方法

4-2-1 三次元構造解析

立体構造表示は PyMOL ソフト (Version 1.8 Schrödinger, LLC) を使用した。また原子間の距離およびヘリックス間の角度は PyMOL 上で算出した。主溝および副溝の幅は CURVES+ (Blanchet *et al.* 2011) を用いて算出した。

4-2-2 BIL1/BZR1 および PIF4 の点変異体の調製

pMAL-c2X ベクターに挿入された BIL1/BZR1 および PIF4 に対し点変異導入を行った。3-2-1 と同様にインバース PCR 法で目的の変異を導入した。作製した各変異体を以下に記した。また、各 MBP 融合タンパク質の調製は 2-2-3 と同様の方法で行った。

タンパク質	点変異体
BIL1/BZR1	R30A, N33A, R34A, R36A, E37A, E37D, E37Q, R40A, R41A, R52A, K61A, H62A, D64A, N65A
PIF4	E266A, E266D, E266Q

4-2-3 ゲルシフトアッセイ (EMSA)

2-2-4 と同じ実験系で EMSA 解析を行った。MBP 融合 BIL1/BZR1 変異体は標識 DNA (終濃度 0.25 μM) の 4 倍のモル濃度の 1.0 μM で、MBP 融合 PIF4 変異体は標識 DNA の 16 倍のモル濃度の 4.0 μM で解析を行った。

4-3 結果・考察

4-3-1 BIL1/BZR1 の全体構造および二量体形成様式

BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインは、シロイヌナズナ由来 MYC2 やヒト由来 CLOCK: BMAL1 等の構造既知の bHLH 転写因子と同様にヘリックス 1・ループ・ヘリックス 2 から成り (Wang *et al.* 2013, Lian *et al.* 2017), ホモ二量体の形成により N 末端側の塩基性領域が主溝にはまり込む形で DNA に結合していた (図 4-1A, B)。DNA の主溝にはまり込んだ塩基性領域は、ヘリックス 1 に繋がる形で α ヘリックス構造を形成していた (以後この塩基性領域から成るヘリックスを DNA 認識ヘリックスと呼称する)。一般的な bHLH 転写因子のヘリックス 2 は 5 巻以上であるのに対し、BIL1/BZR1 のヘリックス 2 は 3 巻と短く、さらにその C 末端側には局所的な β ヘアピン構造が形成されていた (図 4)。

BIL1/BZR1 の β -ヘアピンは同一鎖のヘリックス 2 および隣接鎖のヘリックス 1 に覆い被さっており、さらに β -ヘアピン上の Trp78 残基はこれら 2 つのヘリックス間に挿入されていた (図 4-2A)。Trp78 残基は隣接鎖のヘリックス 1 上の Leu51 残基とファンデルワールス相互作用および CH- π 相互作用を形成し、またループ上の Tyr57 残基およびヘリックス 2 上の Glu58 残基と水素結合を形成していることがわかった (図 4-2A)。Trp78 残基は BZR 転写因子間で高度に保存されており、BIL1/BZR1 のホモ二量体構造形成において極めて重要な残基であると考えられる (図 4-3A)。BIL1/BZR1 の二量体形成様式は、ヘリックスのみで束を形成し二量体構造を維持する bHLH 転写因子とは大きく異なるものであった (図 4-2A)。

詳細な構造比較から、BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子の疎水性コア構造の形成様式も大きく異なっていることがわかった (図 4-2B)。例えば、BZR 転写因子および bHLH 転写因子はヘリックス 1 上に高度に保存された Leu 残基をそれぞれもつが、BIL1/BZR1 の Leu51 残基は bHLH 転写因子の Leu 残基 (MYC2 では Leu471) に比べ、中央からより離れた位置に存在していた。また、BZR 転写因子特異的に保存される Leu72 残基は、Leu51 残基間の空間を埋める形で、疎水性コア構造の形成に寄与していた。

興味深いことに、上記のような二量体形成様式の違いに伴い、DNA 認識ヘリックスの配向に変化が生じていた。典型的な bHLH 転写因子のヘリックス間の角度が 60° 前後であるのに対し、BIL1/BZR1 の角度は 78° であり、約 20° も広める形で BIL1/BZR1 は DNA の主溝にはまり込んでいることがわかった (表 4-1, 4-2C)。また BIL1/BZR1 と結合した DNA は、広がった DNA 認識ヘリックスの隙間を埋めるように構造を変化させており、理想的な B 型 DNA のみならず bHLH 転写因子と結合した DNA に比べても、主溝や副溝の幅に大きな変化が生じていた (図 4-4)。

4-3-2 BIL1/BZR1 の DNA 認識様式

BIL1/BZR1 は 14 bp にわたる広範な範囲で DNA の主鎖と相互作用をしていた (図 4-5, 4-6). BIL1/BZR1 の DNA 認識ヘリックス上にある 5 つの Arg 残基 (Arg30, Arg34, Arg36, Arg40 および Arg52) は DNA のリン酸基と直接的に相互作用していた. 同じヘリックス上の Arg41 残基は水分子を介して DNA リン酸基と水素結合を形成していた. ループまたはヘリックス 2 上の Lys61, His62 および Asn65 も DNA の主鎖リン酸基と相互作用していた.

一般的に, DNA 結合タンパク質は DNA 塩基配列を特異的に認識するために, 塩基の立体構造および化学的性質のパターンの違いを読み取る (Harteis *et al.* 2014). A / G のプリン (purine) 塩基と C / T のピリミジン (pyrimidine) 塩基は骨格が異なることに加え, 特有の位置に水素結合ドナーまたはアクセプターが存在する (図 4-7A). また, T 塩基は主溝側に疎水性のメチル基をもつ. これらの性質により, 主溝側では 4 塩基がそれぞれ異なる化学的性質をもち (4 パターン), 副溝側では A と T, または G と C が似た化学的性質をもち (2 パターン)(図 4-7B). DNA 結合タンパク質の多くは主溝側から塩基の違いを読み取ることで塩基認識特異性を高める. BIL1/BZR1 においても, 主溝にはまり込んだ DNA 認識ヘリックス上の残基が DNA 塩基を認識していた. BIL1/BZR1 は G-box 配列 (5'-CACGTG-3') 中の塩基を特異的に認識しており, Arg41(*i*+4) 残基を介して G₄塩基 (C₃の相補塩基対) を, Glu37(*i*) 残基を介して C₁A₂塩基 (T₅G₆の相補塩基対) を認識していることがわかった (図 4-5). Arg41(*i*+4) は直接的に G₄ の 7 位の窒素原子を, 水分子を介して G₄ の 6 位のカルボニル酸素を認識していた (図 4-8A). 一方, Glu37(*i*) は直接的に C₁ と, また水分子を介して間接的に A₂ のカルボニル基と相互作用していた (図 4-8B). また, Glu37(*i*) は Arg40(*i*+3) 残基と塩橋を, Arg36(*i*-1) 残基とは水分子を介した水素結合を形成していた. Arg40(*i*+3) 残基

は 0 位のリン酸基 P_0 および隣接鎖のループ上にある Asp64 とも相互作用しており, Arg36($i-1$) は DNA リン酸基 P_{-1} および Asn33($i-4$) と相互作用していた.

各残基の DNA 結合親和性への寄与度を評価するために, DNA との相互作用に係わると考えられる残基の Ala 置換変異体を作製し, EMSA を用いて DNA との相互作用解析を行った (図 4-9). DNA の主鎖との相互作用のみに関わっている Arg30, Arg34, Lys61, His62 および Asn65 の Ala 置換変異体では, DNA との結合力において野生型 (wild type; WT) と大きな変化は見られなかった. これらの残基は少なくとも EMSA 解析で用いた CPD プロモーター断片に対する結合親和性にはほとんど関与していないと考えられる. 2位のリン酸基 P_2 と相互作用する Arg52 の Ala 置換体は, DNA への結合力が明らかに低下したため, Arg30, Arg34, Lys61, His62, Asn65 よりも DNA 結合親和性に寄与していると考えられる. G_4 塩基および DNA リン酸基との間で多数の水素結合を形成していた Arg41($i+4$) の Ala 置換体では, DNA への結合は見られなかった. この結果は, Arg41($i+4$) が DNA との親和性に必要不可欠な残基であることを示唆している. また, DNA 主鎖との間で相互作用ネットワークを形成していた Asn33($i-4$), Arg36($i-1$), Glu37(i), Asn40($i+3$) および Asp64 の変異体については (図 4-8C), いずれも DNA との結合親和性が大きく減少した. Asn33($i-4$) および Asp64 は DNA とは直接的に相互作用しないが, この相互作用ネットワーク形成を強化することで間接的に DNA との結合親和性に寄与していると考えられる. また, この相互作用ネットワークの中心にある Arg40($i+3$) は, 上述の Arg41($i+4$) と同様に DNA 結合親和性に最も寄与する残基であることがわかった.

4-3-3 BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の DNA 結合様式の比較

BIL1/BZR1 は典型的な G-box 配列結合型の bHLH 転写因子と同様に, Arg(*i*+4) 残基で G₄塩基を, また Glu(*i*) 残基で C₁A₂塩基を特異的に認識していた. BIL1/BZR1 と典型的 bHLH 転写因子との間で Arg(*i*+4) の配向を比較したところ, G₄に対する Arg(*i*+4) の相対的な配向に大きな違いは見出されなかった (図 4-10). 水分子の電子密度は分解能が 2.5 Å 以下になると見え始め, 2.5 Å より低い分解能ではほとんど見えない. そのため Arg(*i*+4) と DNA リン酸基間にある水分子の有無に関しては, それぞれの結晶構造の分解能が異なっているため比較はできなかった (図 4-10). BIL1/BZR1 または構造既知の bHLH 転写因子間において, Arg(*i*+4) と DNA のリン酸基および塩基の相対位置はほぼ変化しないにも関わらず, G₄塩基および DNA リン酸基との水素結合パターンにわずかな違いが認められた (図 4-10). これは, Arg 残基が柔軟でコンフォメーション変化しやすい残基であり, G₄塩基や DNA リン酸基に対しても経時的に水素結合パターンを変化させているからだと予想される. この特徴は, G₄が他の塩基に置き換わった場合においても, Arg(*i*+4) が柔軟に配向を変化させることで, それぞれの塩基に対して最適な水素結合ネットワークを形成することに適していると考えられる. 実際に BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子は, G₄ (または相補鎖の C₃) に対する塩基認識特異性が比較的緩く, ChIP-chip 解析や DAP-seq 解析からも G-box 配列 (5'-CACGTG-3') のみでなく E-box 配列 (5'-CANNTG-3') も認識することがわかっている.

一方で, BIL1/BZR1 と bHLH 転写因子の Glu(*i*) 残基の配向が異なることが見出された (図 4-11). 両者の Glu(*i*) の C_α原子の C₁A₂塩基に対する相対的位置には大きな違いはなかった. しかしながら, bHLH 転写因子の Glu(*i*) は C₁および A₂の両者を直接的に認識する配向をとっているのに対し, BIL1/BZR1 の Glu37(*i*) は C₈原子の位置を約 2 Å 変化させ, bHLH 転写因子とは異なる角度で C₁のみを直接認識するような配向を

とっていた。また、BIL1/BZR1 の Glu37(*i*) は水分子を介して A₂ を間接的に認識していることがわかった。

典型的 bHLH 転写因子の Glu(*i*) は、Arg(*i*+3) と塩橋を形成することで、C₁A₂ 塩基に対する特異性が高められている。この Arg(*i*+3) は DNA 主鎖の 1 位のリン酸基 P₁ と水素結合を形成し、bHLH 転写因子と DNA 主鎖との間の相互作用ネットワークを仲介する (図 4-12)。4-2-2 で上述したように、BIL1/BZR1 の Arg40(*i*+3) も Glu37(*i*) と塩橋を形成し、また DNA 主鎖との相互作用ネットワークを仲介していたが、bHLH 転写因子とは異なり 0 位の DNA リン酸基 P₀ と相互作用していた (図 4-12)。以上の構造情報から、Glu(*i*) の配向の違いは Arg(*i*+3) の配向の違いによって生じていると考えられる。

BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子 MYC2 が認識する DNA 同士で構造アライメントを行ったところ、DNA 認識ヘリックスの配向に伴い Arg(*i*+3) の C_α の位置が 2 Å 異なっていた (図 4-13A)。また、BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子 (MYC2) の片側の DNA 認識ヘリックスで構造アライメントを行ったところ、BIL1/BZR1 が結合した DNA のリン酸基 P₀ および P₁ は、大きく傾いたヘリックス 1 およびループによって物理的な制限を受けていることがわかった (図 4-13B)。この空間的制限に伴い BIL1/BZR1 は、bHLH 転写因子と同様の Arg(*i*+3) 残基と DNA リン酸基の間の相互作用様式をとることが物理的に困難になっていると考えられる。さらに BIL1/BZR1 の Arg(*i*+3) 残基の配向は、BIL1/BZR1 特異的な配置をとるループ上の Asp64 によって塩橋を介して固定されていた (図 4-12)。以上の構造的知見は、BIL1/BZR1 の βヘアピン構造に特徴づけられる二量体形成様式が、大きく傾いた DNA 認識ヘリックスおよびループを通じて DNA との相互作用ネットワークの形成様式を変化させ、Glu(*i*) 残基の C₁A₂ 塩基に対する配向を変えていること強く示唆している。

4-3-4 BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の塩基認識特異性

BIL1/BZR1 と典型的 bHLH 転写因子の Glu(*i*) 残基を介した DNA 結合特異性を詳細に理解するために、Glu(*i*) 変異体を用いた比較解析を行った。Glu 残基の側鎖を削った Ala 残基、同じ酸性電荷をもつ側鎖の炭素が 1 つ短い Asp 残基、またヒドロキシ基をアミノ基に置き換えた Gln 残基へと変異させた。また BIL1/BZR1 の比較として、典型的 bHLH 転写因子であるシロイヌナズナ由来 PIF4 を EMSA 解析に用いた。

BIL1/BZR1 および PIF4 の E→A 変異体および E→Q 変異体ではいずれも、C₁A₂ 塩基に対する塩基配列特異性が乱されていることがわかった (図 4-14)。この結果は、BIL1/BZR1 が bHLH 転写因子同様に Glu(*i*) を介して C₁A₂ 塩基への特異性を生み出すことを裏付けている。しかしながら、BIL1/BZR1 の E37A および E37Q 変異体は C₁A₂ と同様に他の塩基配列に対する結合力が低下した一方で、PIF4 の E266A および E266Q 変異体は C₁A₂ 以外の塩基に対する結合力が増加し完全に特異性が失われたという真逆の結果が得られた。bHLH 転写因子の Glu(*i*) は C₁A₂ 以外の塩基を空間的・電荷的に排斥しているわけではなく、Ala 置換および Gln 置換による DNA 結合親和力の増加は、DNA 塩基の相互作用と無関係である可能性が高い。bHLH 転写因子の Glu(*i*) は Arg(*i*+3) と塩橋を形成しているが、Glu(*i*) が中性の残基に置き換わると塩橋が消失し、Arg(*i*+3) の正電荷が回復するのに加え、柔軟な配向をとることができるようになる。この変化によって Arg(*i*+3) と負電荷に帯びた DNA リン酸基との結合力が増加し、C₁A₂ を含まない DNA への結合力が増加したと考えられる。一方、BIL1/BZR1 の Glu37(*i*) は Arg40(*i*+3) と相互作用するだけでなく、BIL1/BZR1 特有の強固な相互作用ネットワークを仲介する (図 4-11)。Glu37(*i*) 残基が中性の残基に置き換わると Arg40(*i*+3) 残基の正電荷が高まりリン酸基との相互作用は強まる可能性はあるが、それ以上に DNA 結合親和力に寄与していた相互作用ネットワークが緩まってしまうため、

塩基非依存的に DNA 結合親和力が低下したと考えられる。また、BIL1/BZR1 および PIF4 の E→D 変異体は共に DNA 結合親和性が見られなくなった (図 4-14)。これは側鎖の炭素が 1 つ短い Asp 残基と Arg(*i*+3) との間で本来とは異なる塩橋が形成され、DNA 結合親和力に寄与する相互作用ネットワークが崩れてしまったためであると考察される。

以上の変異体解析より、次のような BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の塩基認識特異性の分子機構が推察された。bHLH 転写因子においては Glu(*i*) と Arg(*i*+3) のペアがお互いを制限し合うことで非特異的な DNA への結合が抑えられている。C₁ と A₂ の塩基が揃った場合、すなわち Glu(*i*) が C₁ および A₂ の両方のアミノ基と水素結合を形成した場合のみ、図 4-11 のような DNA 主鎖との相互作用ネットワークが強化される。このような分子機構により bHLH 転写因子においては、C₁A₂ とその他の塩基で DNA 結合親和力の差が生み出されている。さらに典型的 bHLH 転写因子の多くは His / Lys / Arg(*i*-4) 残基を有しており、C₁ の相補塩基対である G₆ を認識することで特異性をより高めている (図 4-15)。

一方、BIL1/BZR1 では 1 位と 2 位の塩基の種類によらず、DNA 主鎖とのネットワークが形成されており、それに伴い Glu37(*i*) の配向が固定される。実際に G₁G₂ を含む非回文構造 DNA との結晶構造においても、Glu37(*i*) は一義的な配向をとっていた。水素結合の強さは結合角度や誘電率などの環境に依存することが知られているが、BIL1/BZR1 特有の相互作用ネットワークにより Glu(*i*) の局所的誘電率が弱められ、また水素結合が形成されにくい結合角度に固定されることにより、C₁A₂ への特異性が緩められている可能性がある。また EMSA 解析の結果より、BIL1/BZR1 の A₂ に対する特異性は C₁ に対する特異性よりもさらに低いことが示唆された (図 4-14)。これは A₂ が水分子を介して Glu(*i*) 残基に認識されており、他の塩基に置き換わったとしても水分子を仲介とした水素結合が維持されるためであると考えられる (図 4-8B)。

4-3-5 まとめ

本章では、BZR 転写因子 BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する複合体構造より、BIL1/BZR1 の二量体形成様式とコア塩基配列認識様式を詳細に明らかにすることができた。BIL1/BZR1 のホモ二量体構造は、ヘリックス 1・ループ・ヘリックス 2 領域に加え、それに続く β ヘアピン領域が基盤となることで形成されており、既知の bHLH 転写因子の二量体形成様式とは全く異なるものであった (図 4-1, 4-2A, B)。この二量体構造の違いに伴い、BIL1/BZR1 の DNA 認識ヘリックス間の角度は bHLH 転写因子に比べ約 20°も広められていることがわかった (図 4-2C)。さらに BIL1/BZR1 特有の二量体構造は、大きく傾いたヘリックスを通じて 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*) 残基の C₁A₂ 塩基に対する認識 (水素結合形成) を緩めていることが明らかになった (図 4-11, 4-12, 4-16)。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 4-17)。

表 4-1 BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子の DNA 認識ヘリックス間の角度

Protein (PDB ID)	ヘリックス間の角度 (°)
BIL1/BZR1 (5ZD4)	78.4
hMYC-hMAX (1NKP)	53.1
hMAD-hMAX (1NLW)	54.3
hMAX (1AN2)	53.4
hUSF (1AN4)	54.0
hCLOCK : hBMAL1 (4H10)	56.8
mMITF (4ATK)	60.2
yPHO4 (1A0A)	56.2
AtMYC2 (5GNJ)	58.2

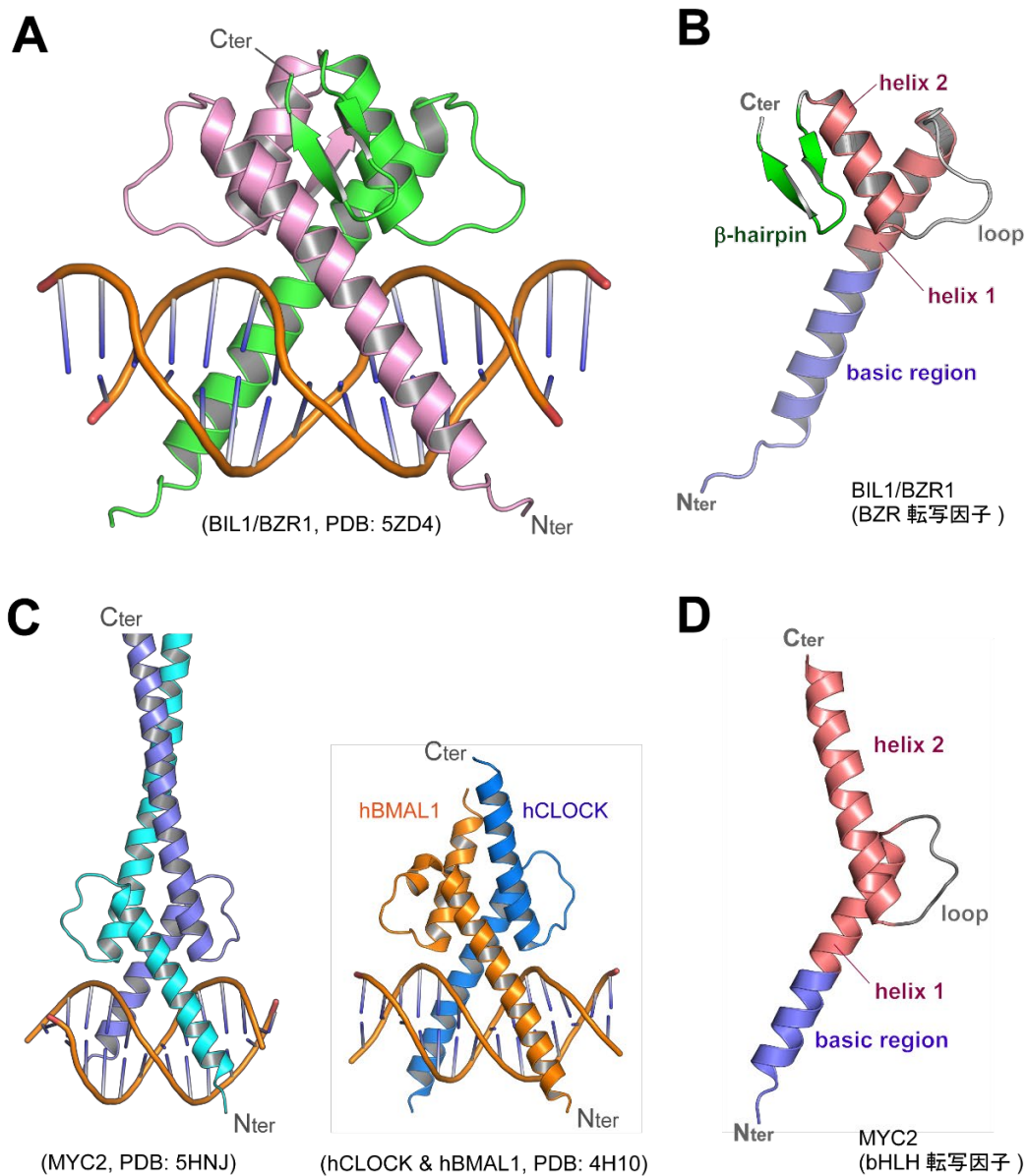
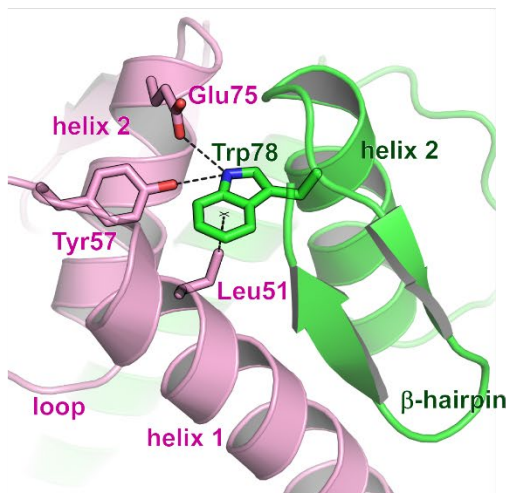


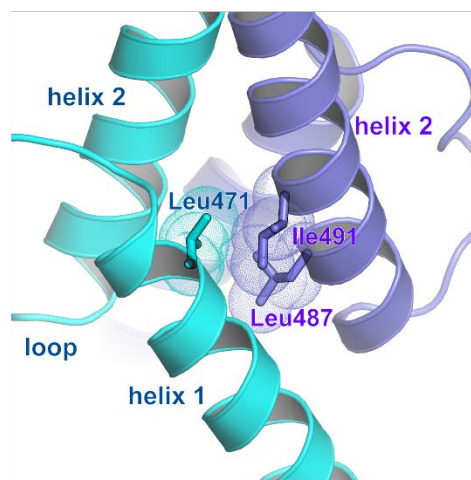
図 4-1 BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する複合体構造

- (A) 標的 DNA を認識するシロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 (BZR 転写因子) の全体構造 (PDB: 4ZD4).
- (B) シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 (BZR 転写因子) のプロトマー構造.
- (C) 典型的 bHLH 転写因子であるシロイヌナズナ由来 MYC2 のコア二量体 (PDB: 5GNJ), およびヒト由来 CLOCK : BMAL1 ヘテロ二量体 (PDB: 4H10) の全体構造.
- (D) シロイヌナズナ由来 MYC2 (bHLH 転写因子) のプロトマー構造.

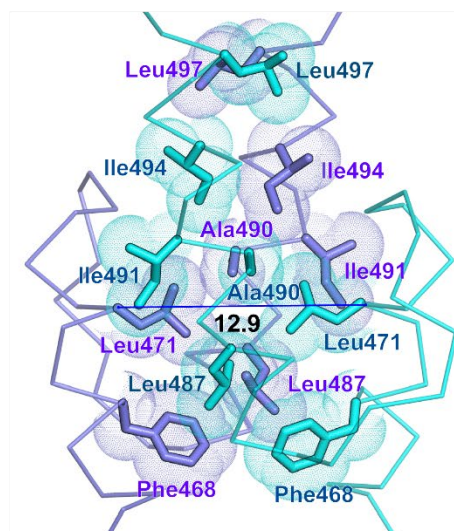
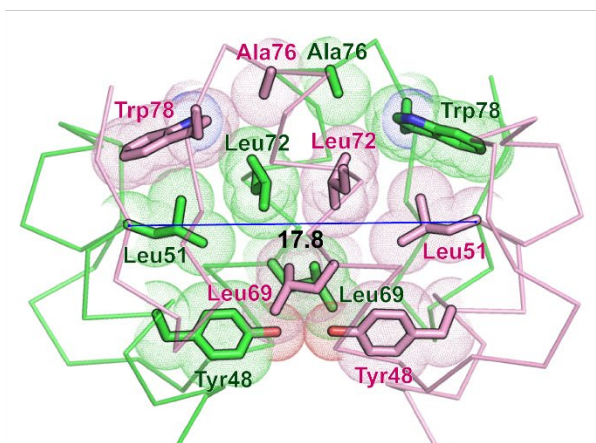
A BIL1/BZR1 (BZR 転写因子)



MYC2 (bHLH 転写因子)



B



C

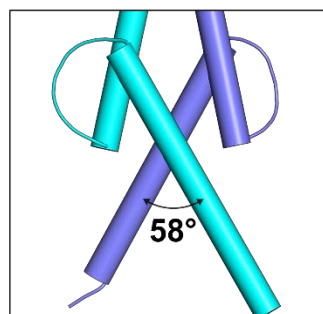
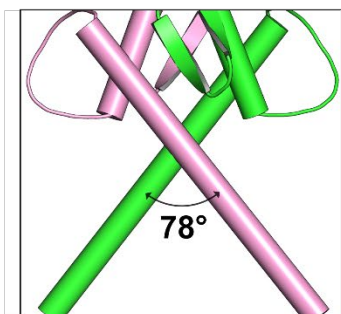


図 4-2 二量体形成様式および DNA 認識ヘリックスの傾き

- (A) BIL1/BZR1 (BZR 転写因子) および MYC2 (bHLH 転写因子) のヘリックス 1 と隣接鎖のヘリックス 2 との間の相互作用が示されている。BIL1/BZR1 においては β ヘアピン上の Trp78 が、ヘリックス 1 と隣のプロトマーのヘリックス 2 との間に挿入されていた。黒の破線は水素結合および CH- π 相互作用を示す。疎水性相互作用に係わる残基はドットモデルで表示されている。
- (B) BIL1/BZR1 および MYC2 の疎水性コア構造。BIL1/BZR1 の異なるプロトマー上の Leu51 間、またアミノ酸配列アライメント上で対応する MYC2 の Leu471 間の距離 (Å) がそれぞれ図示されている。
- (C) BIL1/BZR1 および MYC2 それぞれの DNA 認識ヘリックス間の角度。

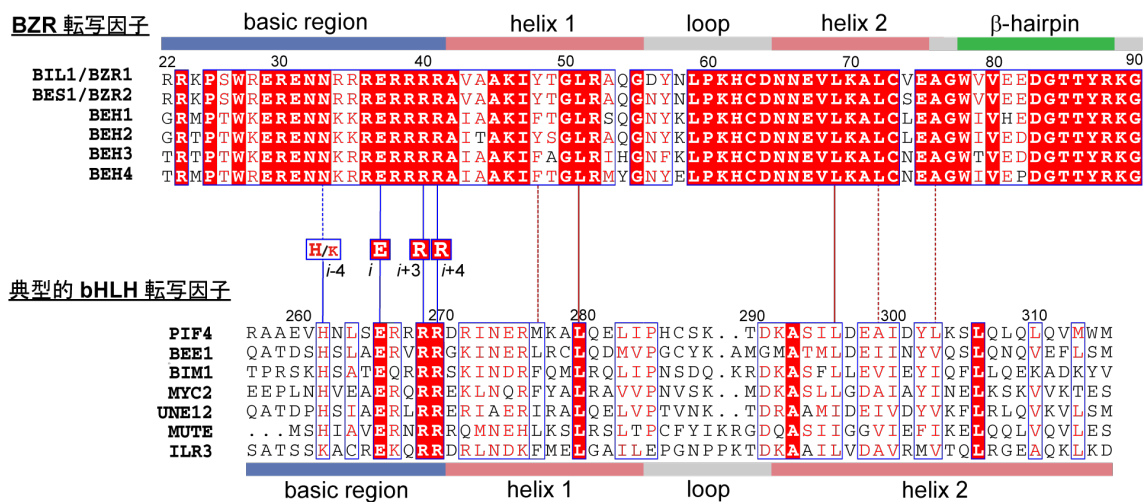


図 4-3 結晶構造から明らかになった BZR 転写因子の二次構造

結晶構造から明らかになった BZR 転写因子および bHLH 転写因子の二次構造がそれぞれのアミノ酸配列アライメント上に示されている。BZR 転写因子と bHLH 転写因子との間で対応する残基同士を線で繋いだ (疎水性コア構造形成に係わる残基には赤線, DNA 塩基認識に係わる残基には青線を用いた)。

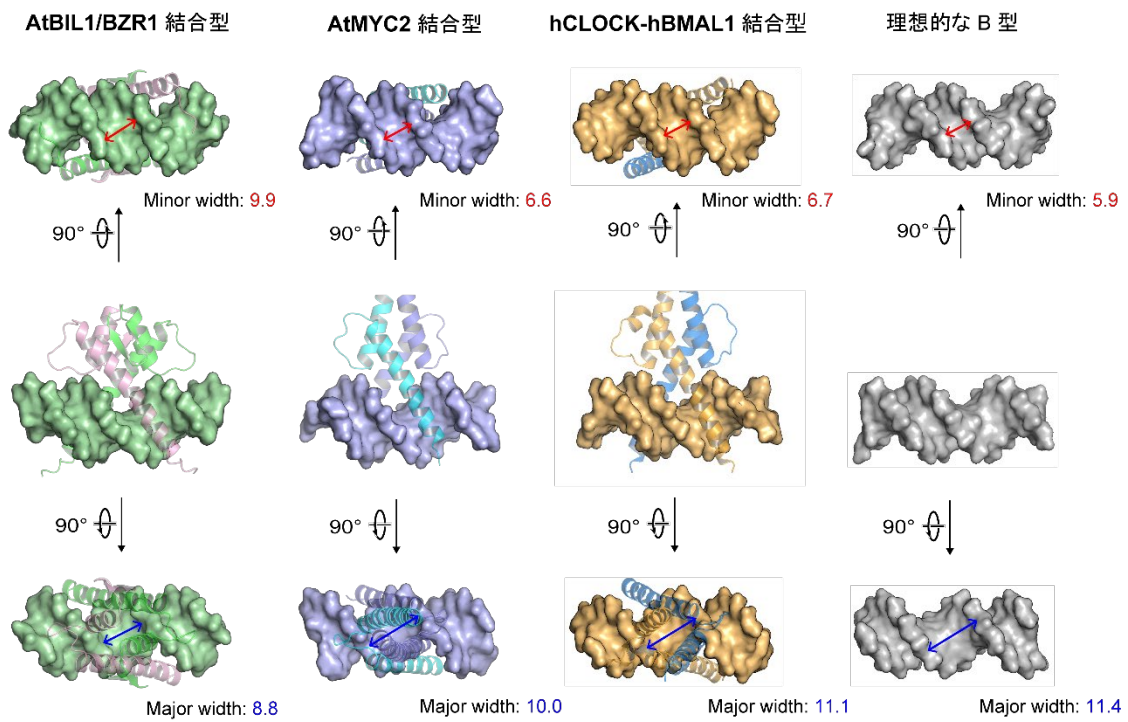


図 4-4 BIL1/BZR1 および bHLH 転写因子が結合した DNA の形状

シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1, シロイヌナズナ由来 MYC2, またはヒト由来 CLOCK : BMAL1 が結合した DNA の結晶構造, および理想的な B 型 DNA の構造が示されている. 各 DNA の主溝の幅 (Major width) および副溝の幅 (Minor width) の長さ (Å) はそれぞれ青色および赤色で示されている.

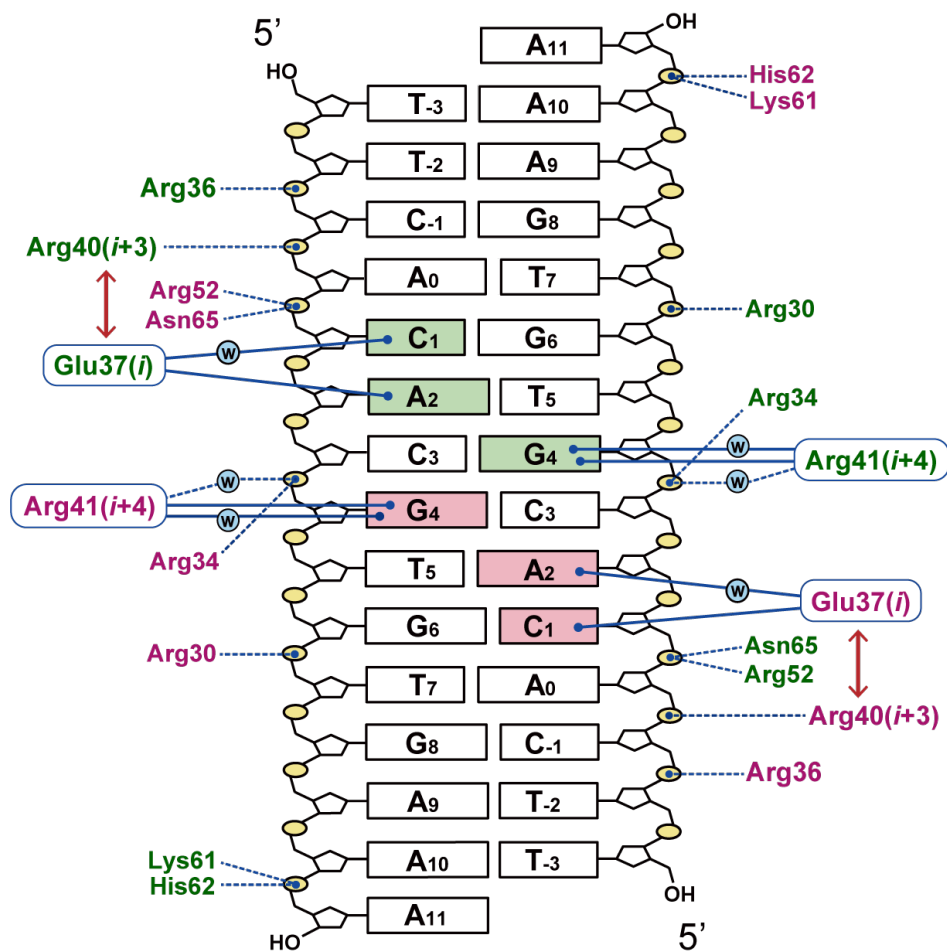


図 4-5 BIL1/BZR1 と DNA の相互作用様式

結晶構造における BIL1/BZR1 と DNA の相互作用様式の模式図が示されている。BIL1/BZR1 の残基はプロトマーごとに異なる色で示した。水素結合は青の点線で、塩橋は赤の実線で示した。DNA 上の黄色の丸はリン酸基を、W は水分子を表す。また、BIL1/BZR1 によって特異的に認識されている DNA 塩基には色をつけた。

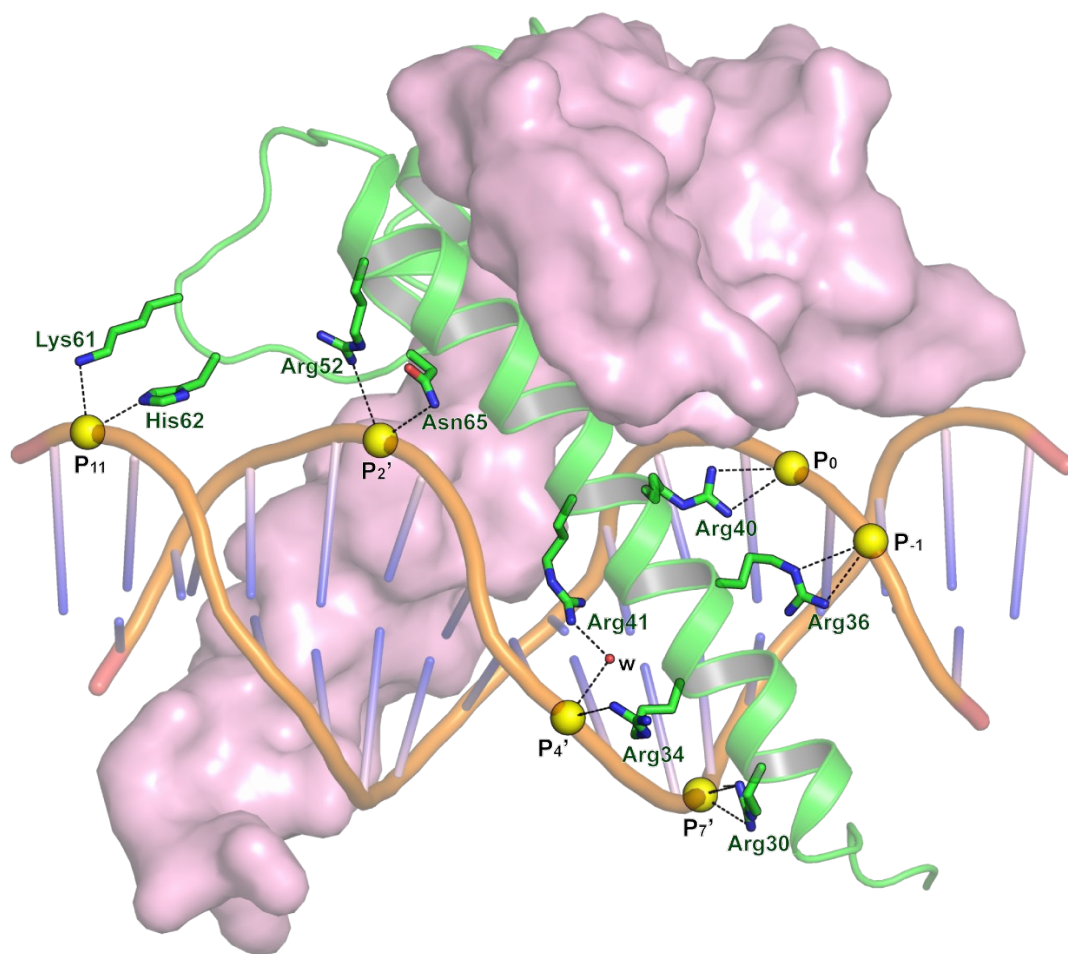


図 4-6 BIL1/BZR1 による DNA のリン酸基認識

BIL1/BZR1 のプロトマー上の残基と DNA 主鎖のリン酸基との相互作用様式。DNA 上の黄色の丸はリン酸基を、W は水分子を表す。水素結合は黒破線で示した。また、BIL1/BZR1 のもう片方のプロトマーは分子表面モデルで表示されている。

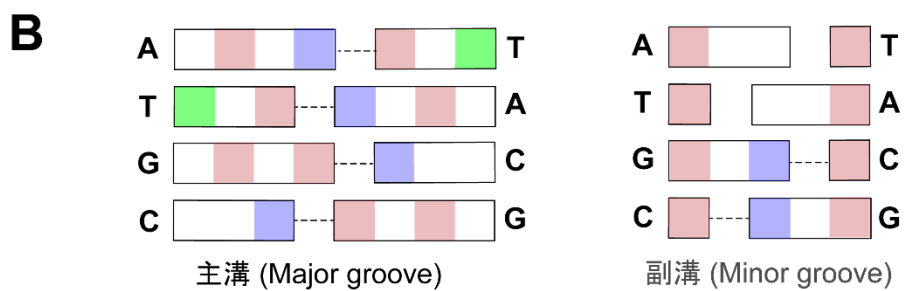
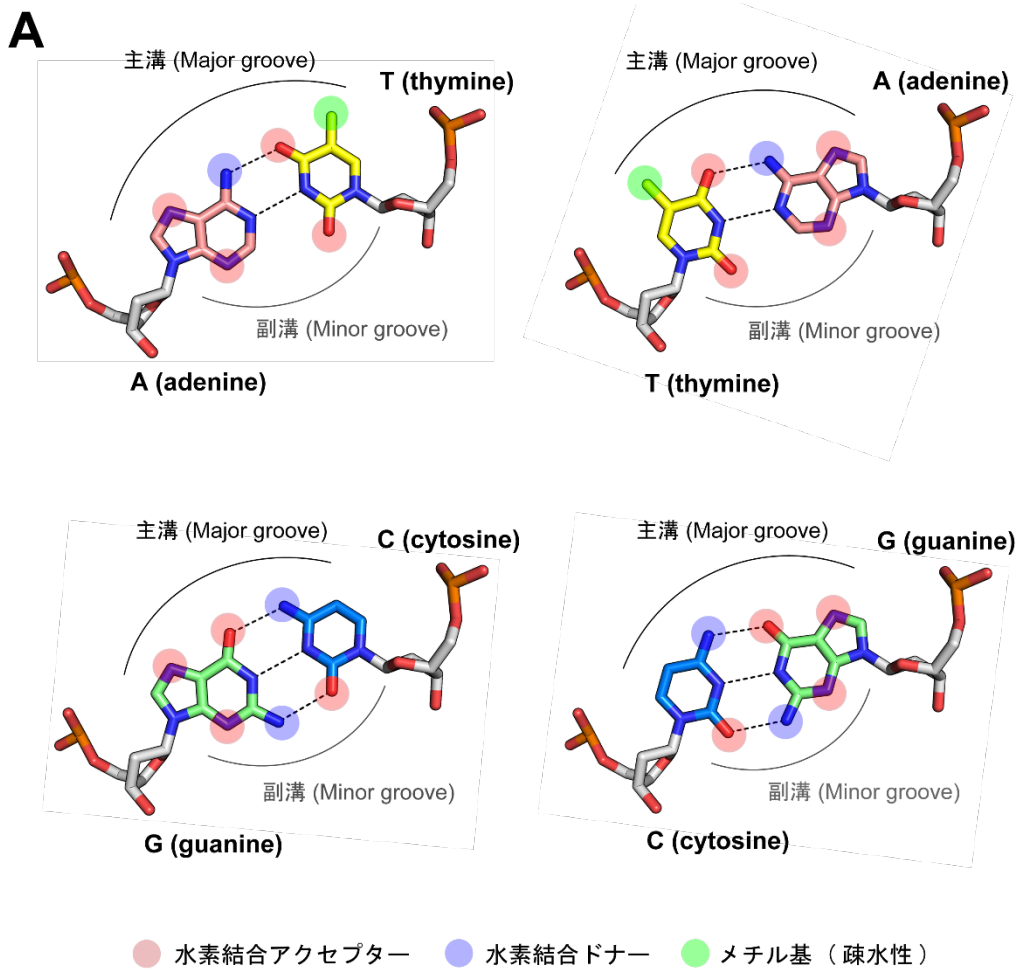


図 4-7 DNA 塩基が特異的に認識されるための化学的性質パターン

- (A) DNA の各塩基対の立体構造および化学的性質が図示されている。
 (B) DNA 塩基が特異的に認識されるための化学的性質パターンの模式図 (Harteis *et al.* 2014 に基づき作成した).

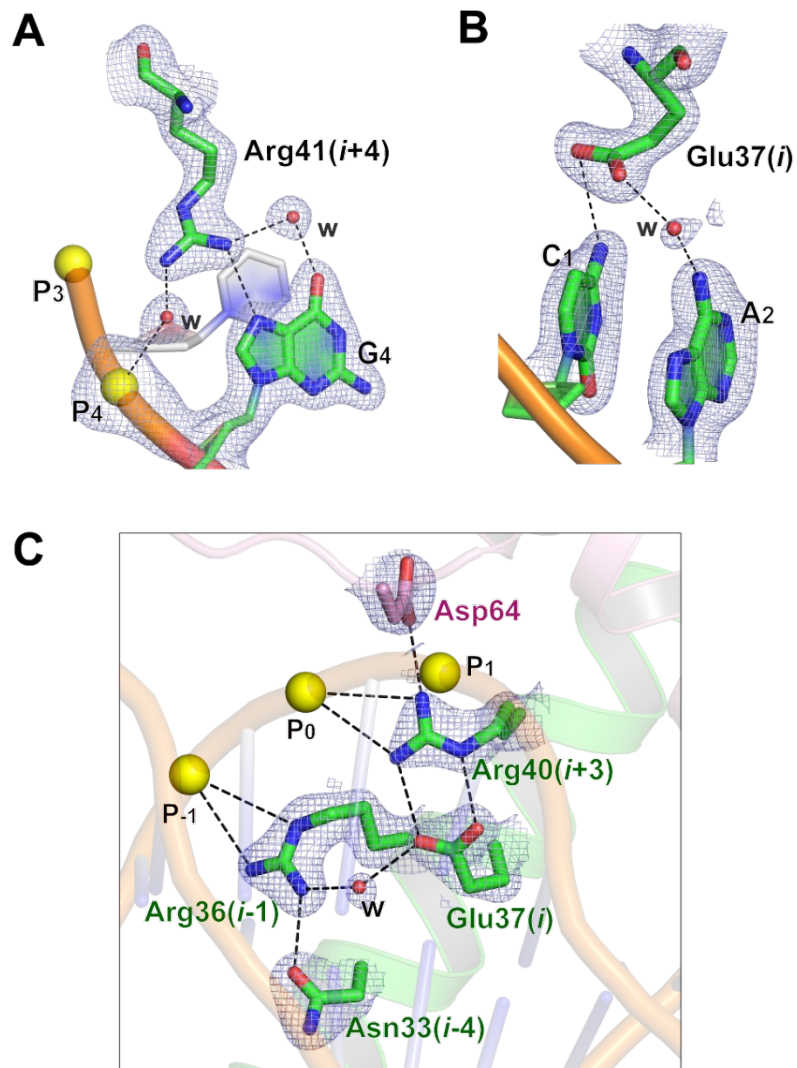


図 4-8 BIL1/BZR1 : DNA 複合体において鍵となる相互作用様式

BIL1/BZR1 の Arg 41($i+4$) 残基による G₄ 塩基の認識様式 (A), Glu37(i) 残基による C₁A₂ 残基の認識様式 (B), Glu(i) と Arg($i+3$) のペアを介した DNA 主鎖との相互作用ネットワーク様式 (C) が示されている。水素結合および塩橋は黒の点線で示した。黄色の球は DNA 主鎖上のリン酸基を、W は水分子を表す。また、 $2Fo-Fc$ マップ (1.5σ レベル) で電子密度マップが示されている。

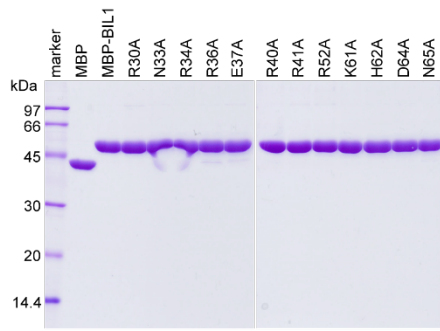
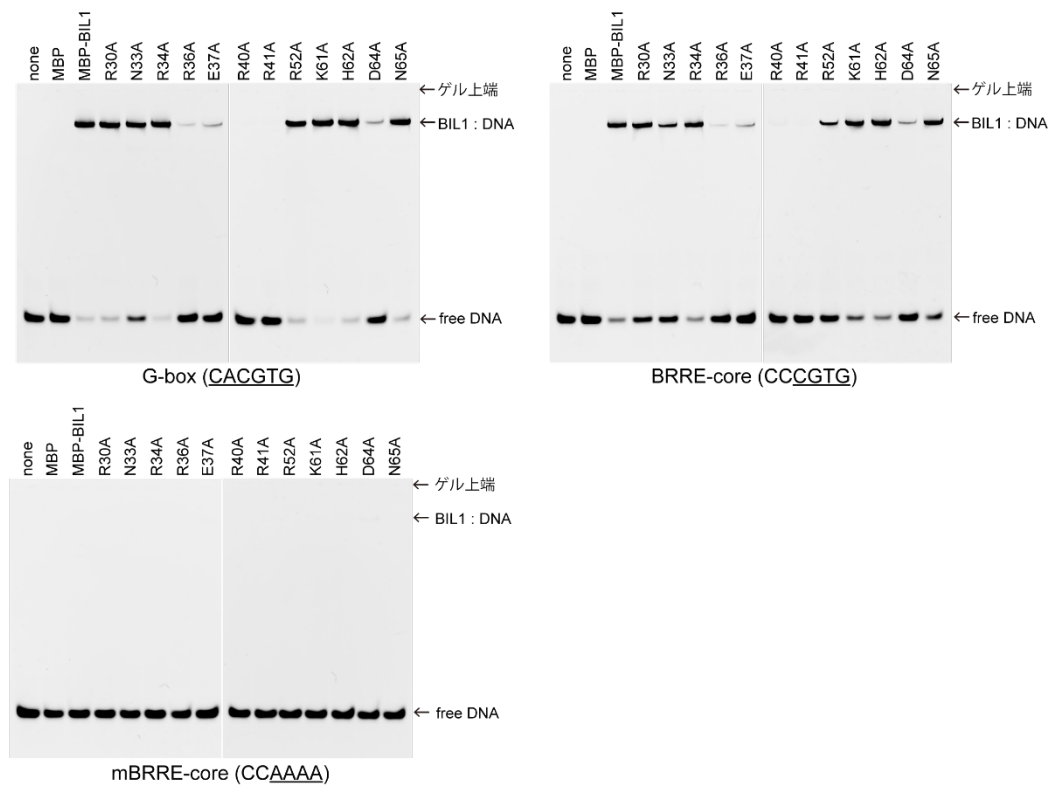
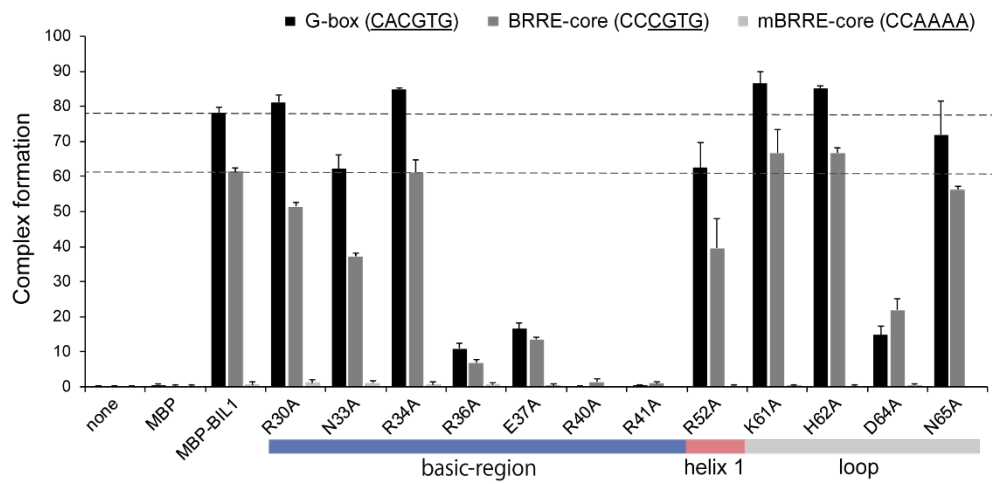
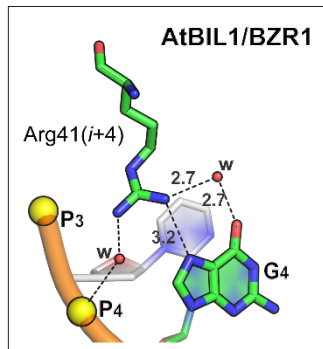
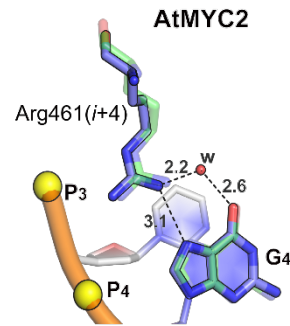
A**B****C**

図 4-9 BIL1/BZR1 の点変異体を用いた DNA 結合力の評価

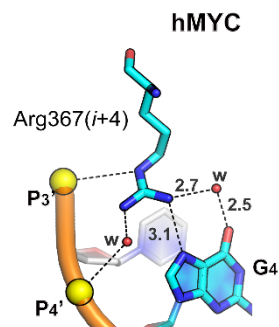
- (A) 精製した MBP 融合 BIL1/BZR1 の各変異体の SDS-PAGE 解析結果.
- (B) G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), NN-BRRE 配列 (5'-CCCGTG-3'), または mBRRE 配列 (5'-CCAAAA-3') を含む標識 DNA と各タンパク質の EMSA 解析結果. それぞれの実験は 3 回ずつ行った.
- (C) B の結果に基づいて, タンパク質と複合体を形成した標識 DNA の割合の平均値が棒グラフで図示されている. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.



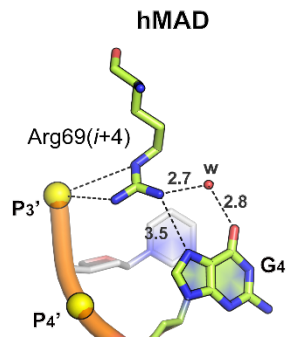
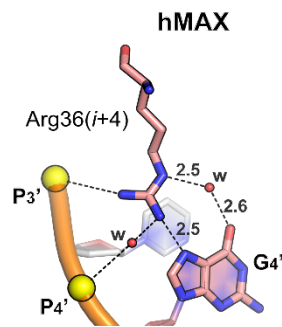
AtBIL1/BZR1 (PDB: 5ZD4, 2.2 Å)



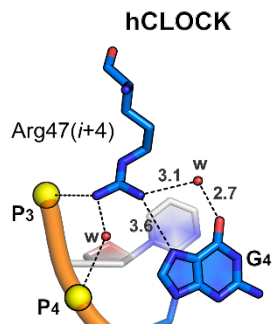
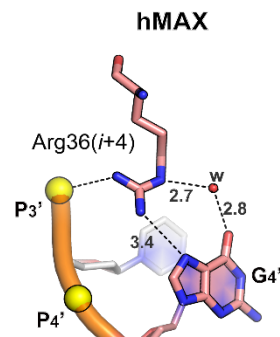
AtMYC2 (PDB: 5GNJ, 2.7 Å)



hMYC-hMAX (PDB: 1NKP, 1.8 Å)



hMAD-hMAX (PDB: 1NLW, 2.0 Å)



hCLOCK-hBMAL1 (PDB: 4H10, 2.4 Å)

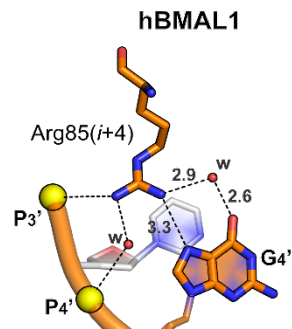


図 4-10 Arg(*i*+4) 残基による G₄塩基の認識様式比較

BZR 転写因子 BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の結晶構造において、Arg(*i*+4) 残基が G₄ 塩基を特異的に認識する様式が示されている。黄色の球は DNA 主鎖上のリン酸基を、W は水分子を表す。水素結合は黒の点線で示し、その距離 (Å) を図示した。また各結晶構造の分解能を示した。

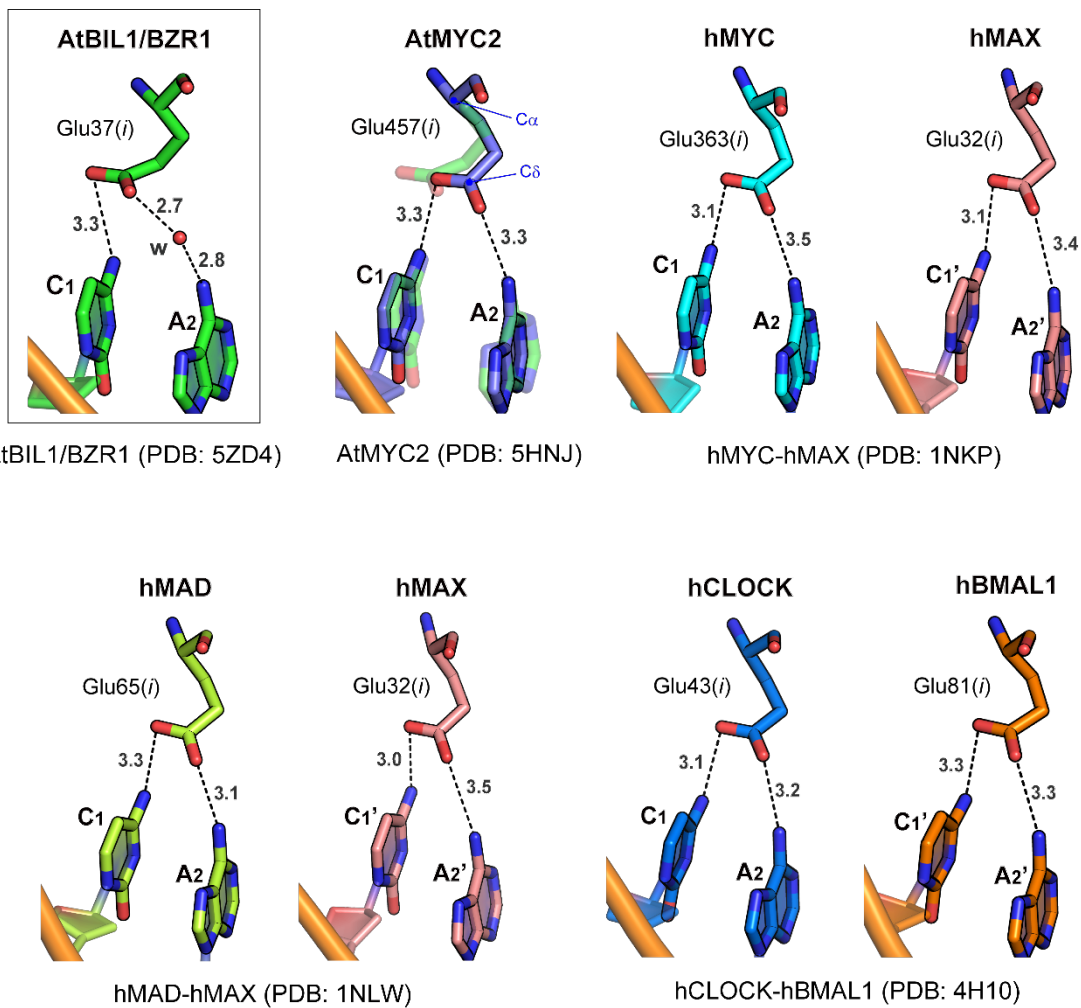
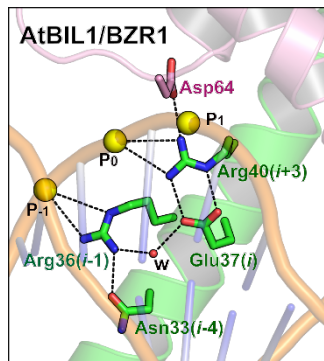
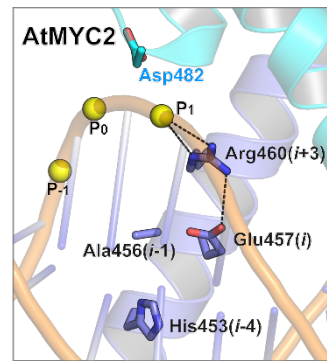


図 4-11 $\text{Glu}(i)$ 残基による C_1A_2 塩基の認識様式比較

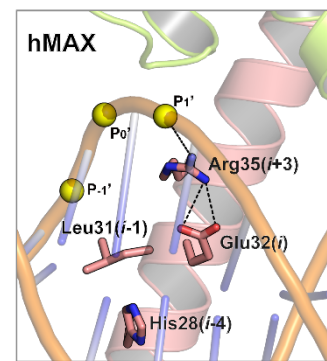
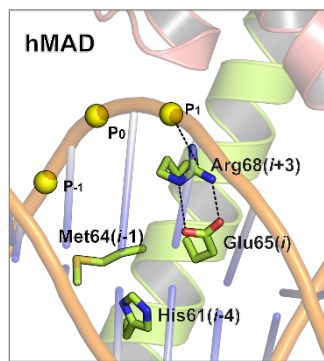
BZR 転写因子 BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の結晶構造において、 $\text{Glu}(i)$ 残基が C_1A_2 塩基を特異的に認識する様式を示されている。W は水分子を表す。水素結合は黒の点線で示し、その距離 (Å) を図示した。



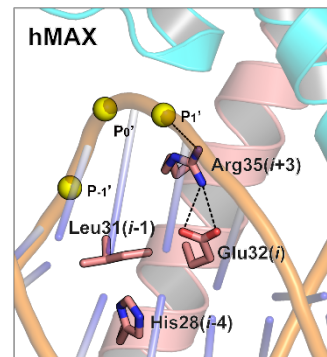
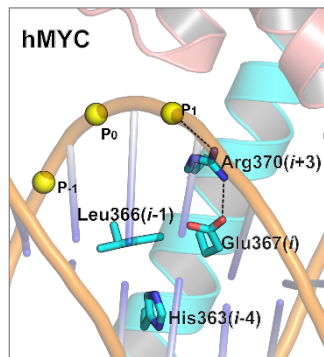
AtBIL1/BZR1 (PDB: 5ZD4)



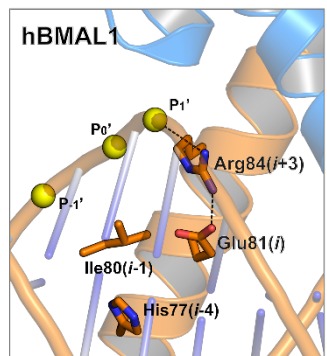
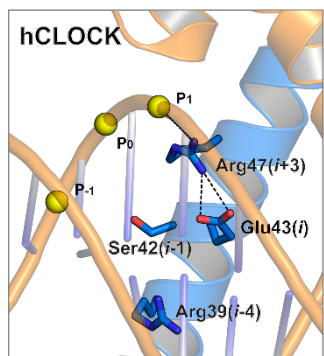
AtMYC2 (PDB: 5HNJ)



hMAD-hMAX (PDB: 1NLW)



hMYC-hMAX (PDB: 1NKP)



hCLOCK-hBMAL1 (PDB: 4H10)

図 4-12 DNA 主鎖との相互作用ネットワーク形成様式の比較

BZR 転写因子 BIL1/BZR1 および典型的 bHLH 転写因子の結晶構造において、Glu(*i*) および Arg(*i*+3) のペアを介した DNA 主鎖との相互作用ネットワークの形成様式が示されている。黄色の球は DNA 主鎖上のリン酸基を、W は水分子を表す。水素結合および塩橋は黒の点線で示し、その距離 (Å) を図示した。

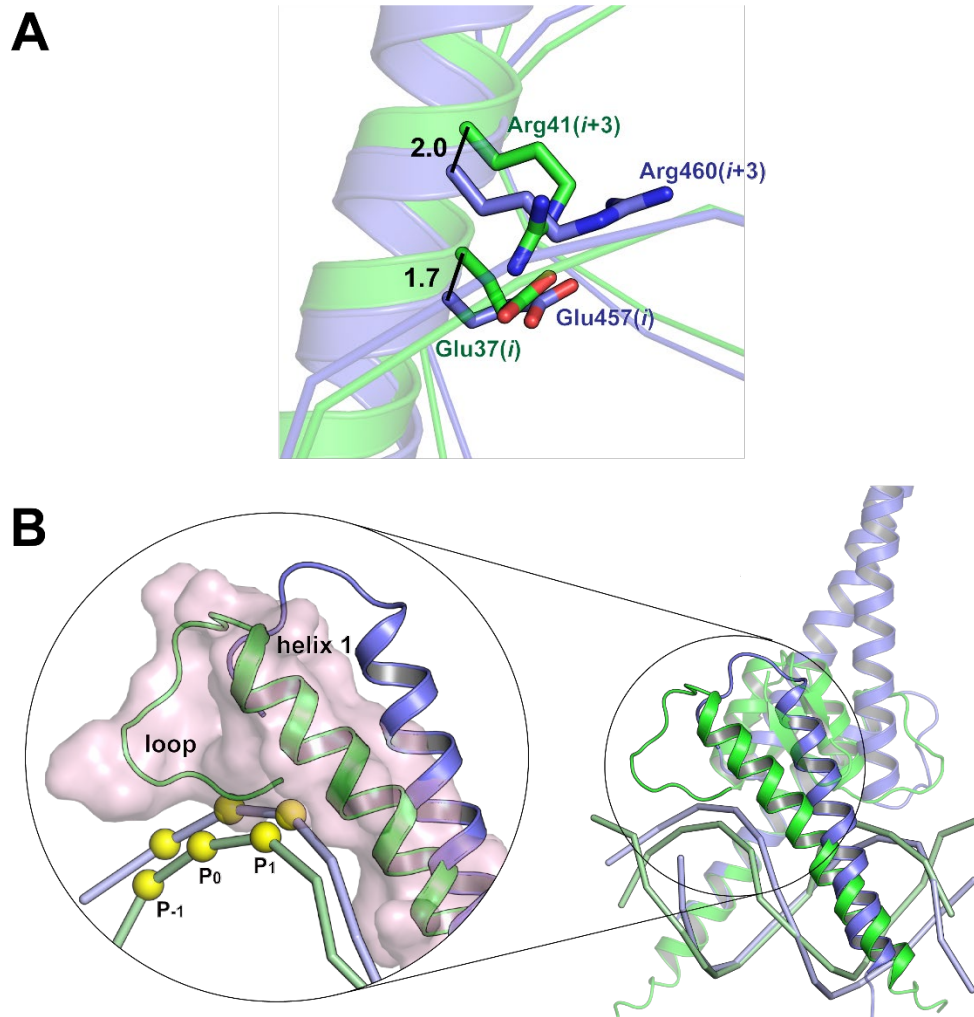


図 4-13 BIL1/BZR1 または bHLH 転写因子と DNA との位置関係

- (A) BIL1/BZR1 (BZR 転写因子) 結合型 DNA と MYC2 (bHLH 転写因子) 結合型 DNA で構造アライメントを行った際の、BIL1/BZR1 および MYC2 の DNA 認識ヘリックス上の Glu(*i*) 残基同士または Arg(*i*+3) 残基同士の相対位置関係。DNA の主鎖はリボンモデルで示した。また、BIL1/BZR:DNA 複合体は緑色で、MYC2:DNA 複合体は青色で示した。
- (B) BIL1/BZR1 および MYC2 の片方の DNA 認識ヘリックスで構造アライメントを行った際の、隣接鎖上のヘリックス 1 およびループ、そして認識する DNA の主鎖の相対位置関係。黄色の球は DNA 主鎖上のリン酸基を表す。また、BIL1/BZR1 のヘリックス 1 およびループは分子表面モデルで示した。

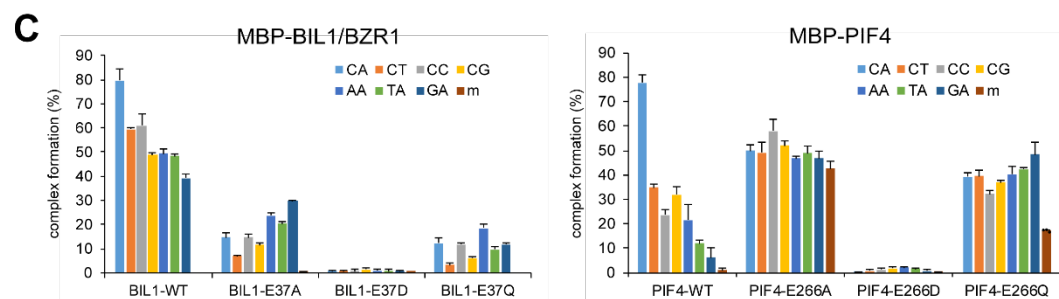
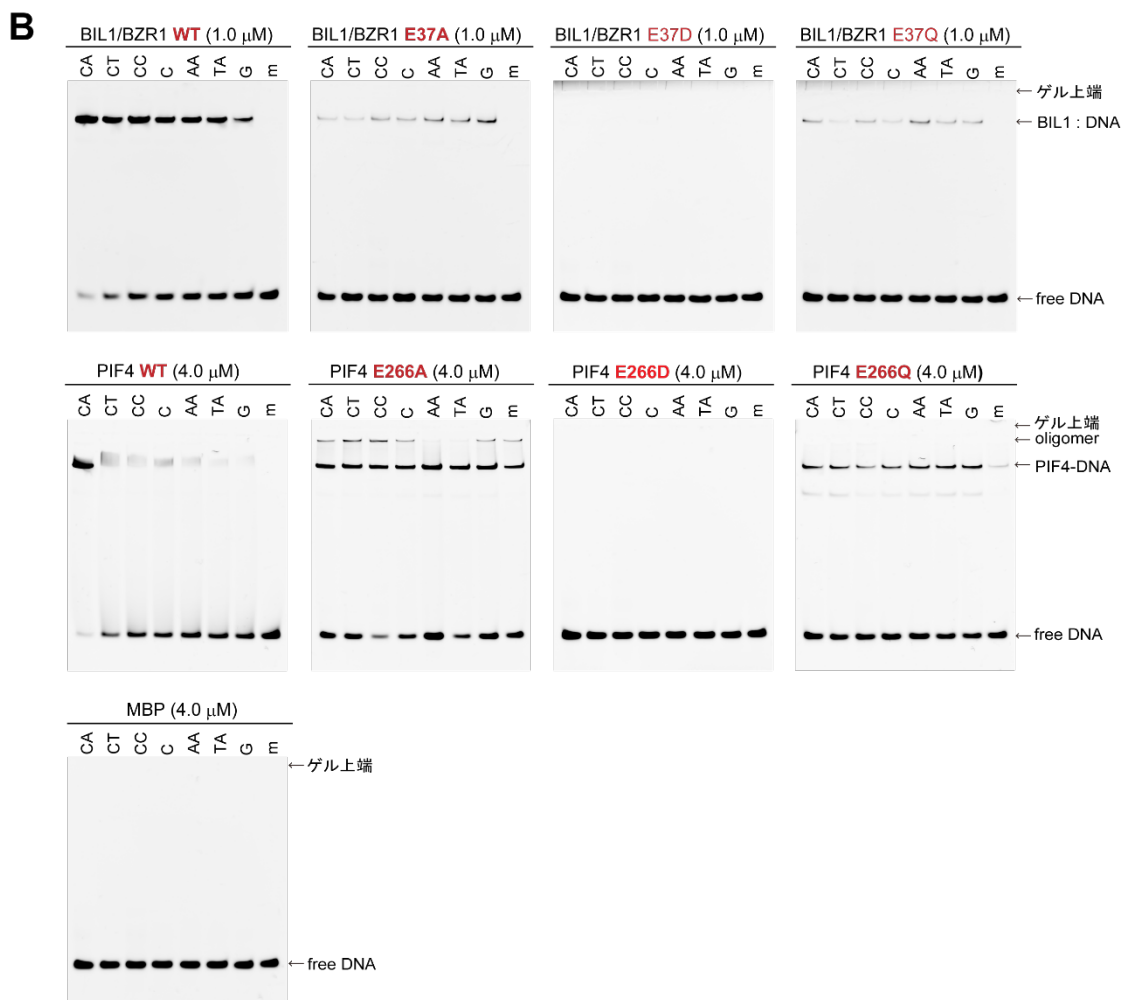
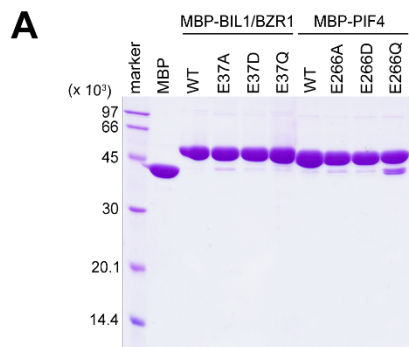


図 4-14 BIL1/BZR1 および PIF4 の Glu(i) 変異体の DNA 結合特異性

- (A) 精製した MBP 融合 BIL1/BZR (21–104) および PIF4 (253–419) の各変異体の SDS-PAGE 解析結果.
- (B) MBP 融合 BIL1/BZR1 および PIF4 の G-box 配列 (5'-CACGTG-3'), 6 種類の NN-BRRE コア配列 (5'-NNCGTG-3'), または mBRRE コア配列 (5'-CCAAAA-3') に対する EMSA 解析. BIL1/BZR1 は標識 DNA (終濃度 0.25 μ M) の 4 倍のモル濃度の 1.0 μ M で, PIF4 および MBP は標識 DNA の 16 倍のモル濃度の 4.0 μ M で解析を行った. それぞれの実験は各 3 回ずつ試行された. なお WT の結果は, 図 2-5 のものと同一である.
- (C) B の結果に基づいて, タンパク質と複合体を形成した標識 DNA の割合の平均値が棒グラフで図示されている. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.

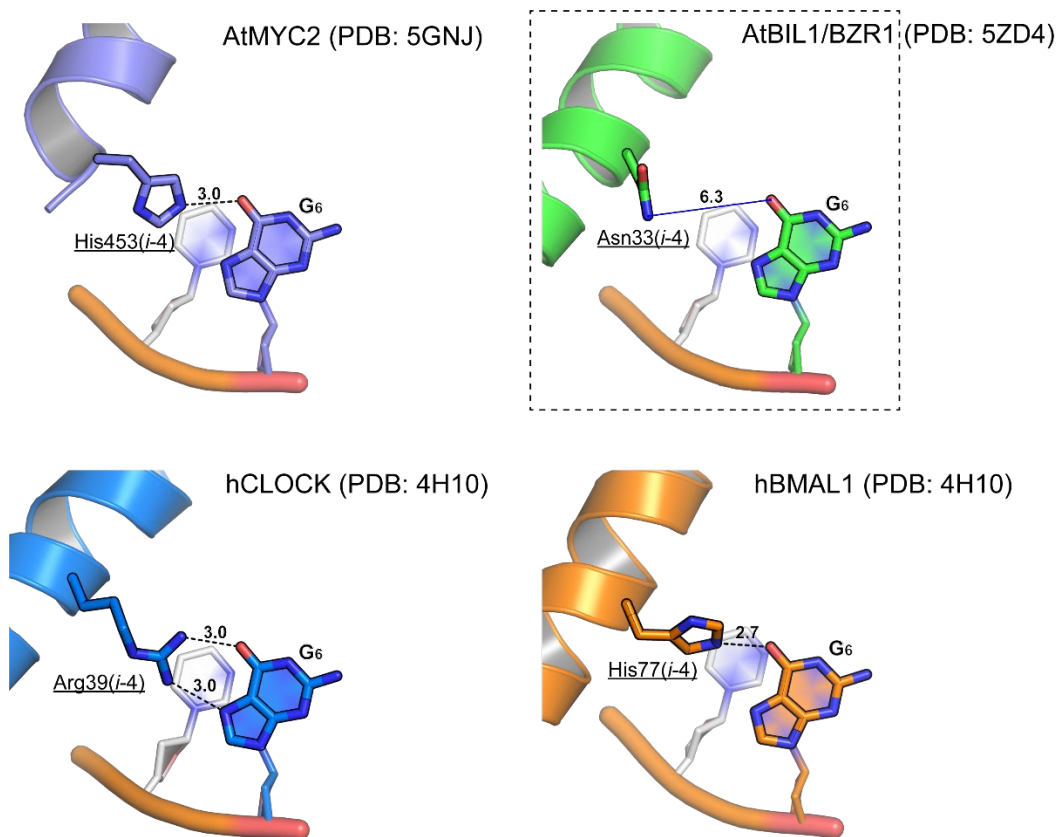


図 4-15 典型的 bHLH 転写因子による G₆ 塩基認識

典型的な bHLH 転写因子であるシロイヌナズナ由来 MYC2, ヒト由来 hCLOCK, およびヒト由来 BMAL1 の His / Arg(*i*-4) 残基による G₆ 塩基の認識様式が示されている. 水素結合および塩橋は黒の点線で示し, その距離 (Å) を図示した. また, 比較として BZR1 転写因子 BIL1/BZR1 の Asn(*i*-4) 残基と G₆ 塩基の相対位置を示した. Asn(*i*-4) 残基のアミノ基と G₄ 塩基のカルボニル基との間の距離 (Å) を図示した.

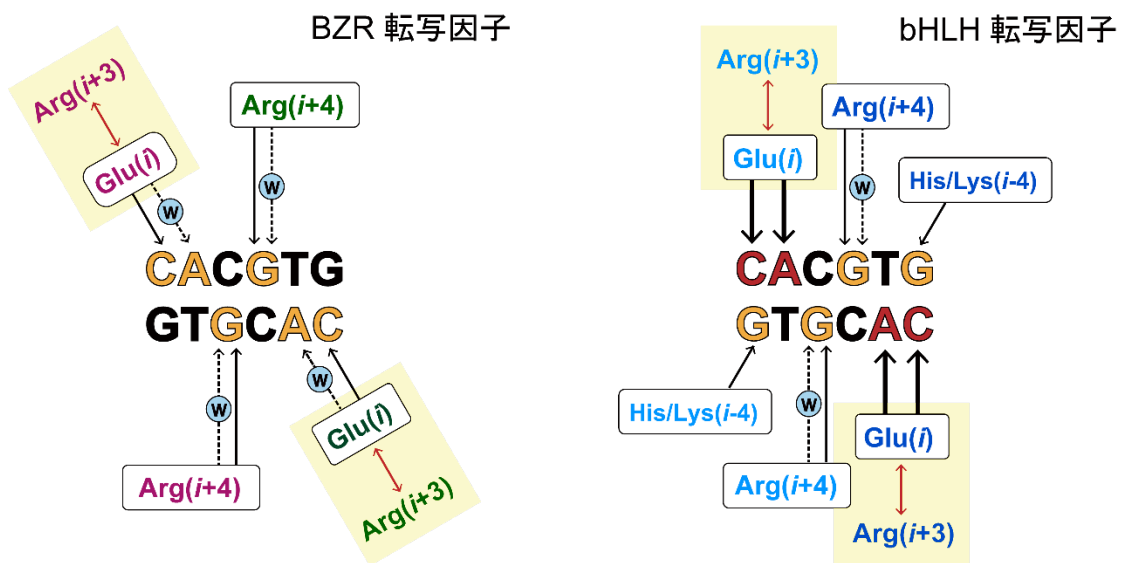
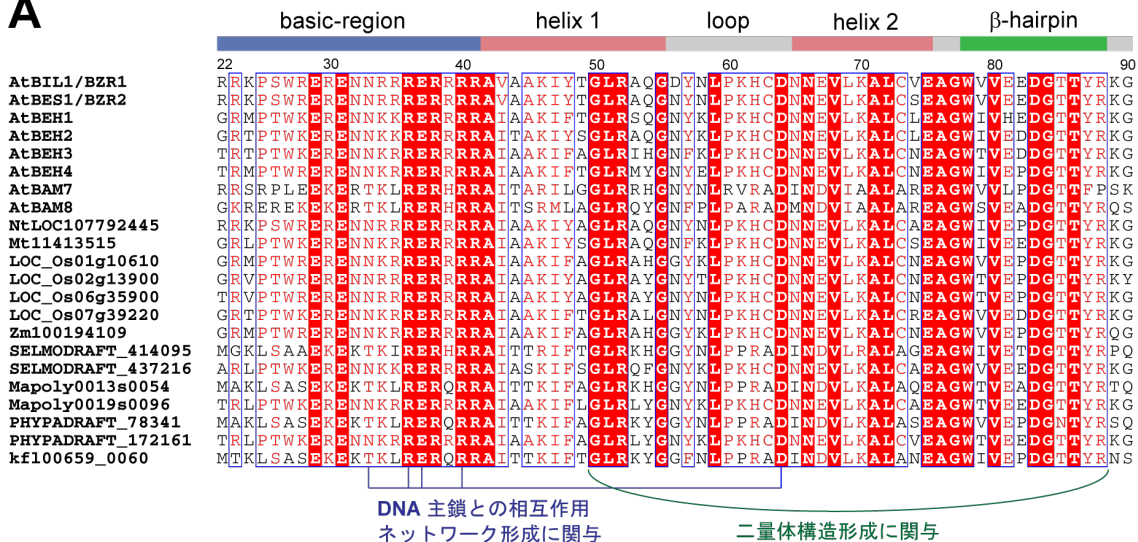


図 4-16 BZR 転写因子と典型的 bHLH 転写因子の G-box 配列認識様式

BZR 転写因子および典型的 bHLH 転写因子の G-box 配列 (5'-CACGTG-3') 認識様式の模式図が示されている。黒の実線は直接的な水素結合を、黒の点線は水 (W) を介した水素結合を示す。

A



B

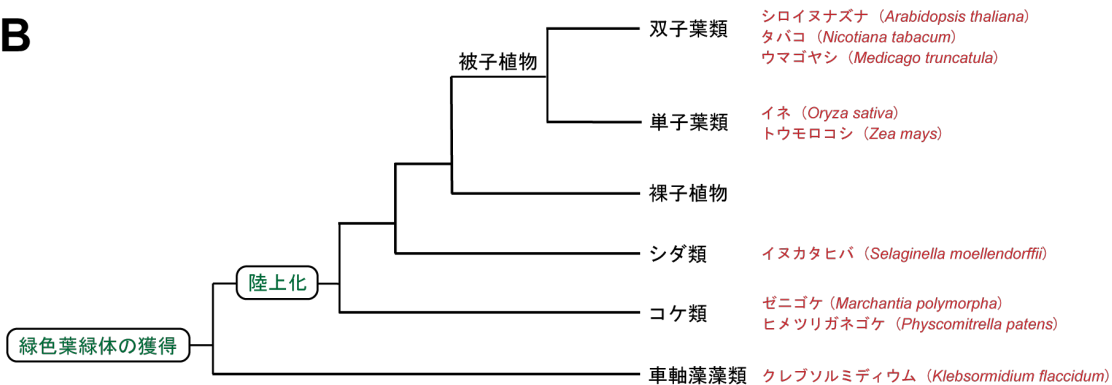


図 4-17 様々な植物種における BZR 転写因子型 DNA 結合ドメイン

- (A) 様々な植物種に存在する BZR 転写因子型 DNA 結合ドメインのアミノ酸アライメントが示されている。アライメントに用いたのは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 AtBIL1/BZR1, AtBES1/BZR2, AtBEH1-4, AtBAM7, 8, タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来 NtLOC107792445, ウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) 由来 Mt11413515, イネ (*Oryza sativa*) 由来 LOC_Os01g10610, 02g13900, 06g35900, 07g39220, トウモロコシ (*Zea mays*) 由来 Zm100194109, イヌカタヒバ (*Selaginella moellendorffii*) 由来 SELMODRAFT_414095, 437216, ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) 由来 Mapoly0013s0054, 0019s0096, ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 由来 HYPADRAFT_78341, 172161, 車軸藻クレブソルミディウム (*Klebsormidium flaccidum*) 由来 kfl00659_0060 である。各タンパク質のアミノ酸配列は UniProt および PlantTFDB データベース (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) (Guo *et al.* 2008) より抽出した。
- (B) A の植物種を含めた植物の進化系統樹 (Qiu *et al.* 2006 に基づき作成した)。

第 5 章

BIL1/BZR1 のコア配列周辺の塩基配列 に対する DNA 結合特異性

※ 本章の内容は、学術雑誌論文として
出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

第 6 章

総合討論

6-1 本研究の概要

BR は主に植物の成長や形作りなどを促す植物ホルモンである。BR の生理作用には、植物細胞における 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。しかしながら、BZR 転写因子が有する 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試みた。

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 bHLH 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。EMSA と 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 C₁A₂ 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ーと 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 つのコア塩基配列モチーフに対して二分子で認識することも明らかになった。

BZR 転写因子の DNA 結合特異性の構造機能相関を理解するために、シロイヌナズナにおける BZR 転写因子 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと標的 DNA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。水分子を可視化できるような高分解能の X 線回折データを取得するために、BIL1/BZR1 に結晶化促進タグとして MBP を融合させたキメラタンパク質を付加した。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、最高分解能 2.17 Å の BIL1/BZR1 (MBP 融合) および標的 DNA との複合体の立体構造の解明に至った。これは高等植物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。

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、 α 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。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 β 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°も広げていることが見出された。

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 ファミリー転写因子と同様に 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 G₄ (C₃ 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 C₁A₂ (T₅G₆ 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。さらに詳細な比較解析の結果、BIL1/BZR1 の Glu(*i*) は bHLH ファミリー転写因子と同様に Arg(*i*+3) 及び 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。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 C₁A₂ 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。

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。Glu37(*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、Glu37(*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₋₁ および P₀ をそれぞれ直接的に認識する。これらのリン酸基の位置は塩基配列依存的に変化しうるため、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。

6-2 BZR 転写因子のパラログ間の比較

同一生物種において転写因子パラログが複数存在する場合、それらは異なる DNA 結合特異性をもつ場合がある。例えば典型的な bHLH 転写因子においては、G-box 配列を認識するための Glu(*i*), Arg(*i*+3), Arg(*i*+4) モチーフが異なる残基に置き換わることで、G-box 配列以外のコア塩基配列モチーフを認識する非典型タイプも存在する (Buck & Atchley 2003, Dolan 2010, Carretero-Paulet *et al.* 2010, Feller *et al.* 2011)。さらにヘテロ二量体を形成できるパートナーとの組み合わせ次第では標的塩基配列の多様性がさら

に高まる。また、共通のコア塩基配列モチーフを認識するにもかかわらず、ループ構造の違い等によって周辺塩基配列への特異性を各々もつことが報告されている (Gordân *et al.* 2013, Zou *et al.* 2015, Ezer *et al.* 2017)。このようなパラログ間で見られる特徴は bZIP 転写因子でも報告されている (Jakoby *et al.* 2002, Heim *et al.* 2003, Zou *et al.* 2015, Ezer *et al.* 2017)。植物ホルモン・オーキシン情報伝達のマスター転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) においては、DNA 結合ドメイン中の DNA 認識サブドメインや二量体形成サブドメインに係わる残基が高度に保存されるも、パラログ間でサブドメインを繋ぐリンカーの柔軟性が異なることで DNA 結合特異性にも違いが生じることが明らかになっている (Guilfoyle & Hagen 2007, Boer *et al.* 2014)。傷害ストレス応答で鍵となる植物ホルモン・ジャスモン酸の情報伝達は bHLH 転写因子 MYC サブファミリーを介して引き起こされる (Lorenzo *et al.* 2004)。シロイヌナズナにおけるジャスモン酸のマスター転写因子 MYC2 は他のパラログとは異なり DNA 結合ドメインを介してホモ四量体を形成することで、標的遺伝子プロモーターとの DNA 結合親和力を高め、かつプロモーター領域のルーピングを促し、ジャスモン酸応答遺伝子の転写活性を高めることが明らかになっている (Dombrecht *et al.* 2007, Lian *et al.* 2017)。

シロイヌナズナにおいては BR 情報伝達のマスター転写因子として BIL1/BZR1 と BES1 の 2 種類の BZR 転写因子がよく知られる。これら 2 つの転写因子間では約 88% という高いアミノ酸配列相同性があり、BR 情報受容能、DNA 結合能、転写調節能を含めた多くの点で重複した機能を示す (Hothorn *et al.* 2011, She *et al.* 2011)。Arabidopsis eFP Browser 2.0 (http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html) (Schmid *et al.* 2005, Nakabayashi *et al.* 2005) より抽出した様々な器官や生長時期における遺伝子発現パターンを比較しても、両者には大きな違いは見出されなかった (図 6-1)。しかしながら、BIL1/BZR1 または BES1 に同一の変異が導入された機能獲得型変異株 *bill-1D/bzr1-1D* と *bes1-1D* では明らかに異なる形質を示すことが分かっており、両者

には相互作用する因子に何かしら相違点があるのではないかと考えられている (Yin *et al.* 2002, She *et al.* 2011). 本研究で着目した DNA 結合ドメインにおいて, BIL1/BZR1 と BES1 間で異なるアミノ酸残基は Asp56^{BIL1/BZR1} / Asn55^{BES1} と Val74^{BIL1/BZR1} / Ser73^{BES1} のみである. 本研究で解き明かした結晶構造より, これらの 2 残基はいずれも二量体分子の表面に位置していることがわかった. DNA 結合ドメインの分子表面の違いによって異なる因子と相互作用している可能性はあるが, まずはこれらの 2 つの残基を BIL1/BZR1 と BES1 の間で置き換えた組み換え植物の形質を調べる実験が必要だと考えられる. 一方で, BIL1/BZR1 と BES1 との間では二量体形成界面に位置する残基や DNA との相互作用に係わる残基はいずれも完全に保存されていたため (図 6-2, 6-3), 他の因子とのヘテロ二量体形成能や DNA 結合特異性には違いがないと予想される. また二量体形成に係わる残基が共通しているということは, BIL1/BZR1 と BES1 は DNA 結合ドメインを介してヘテロ二量体を形成できることを意味しているが, その生理学的意義は不明である. またシロイヌナズナにおいては, BIL1/BZR1 と BES1 のパラログとして BES1/BZR1 HOMOLOG (BEH) 1-4 の 4 種類が存在する. BEH1-4 においても DNA 結合ドメイン, BR 情報を受容する領域, そして転写調節に係わる領域が高度に保存される (図 1-4). そのため, BEH1-4 は BIL1/BZR1 および BES1 と重複した機能をもつ転写因子であると考えられている (Wang *et al.* 2005, Yin *et al.* 2005). 一方で, BEH1-4 の遺伝子発現パターンは BIL1/BZR1 および BES1 との間に違いが見られ, また BEH1-4 の発現パターンもそれぞれ異なっていた (図 6-1). DNA 結合ドメインに着目すると二量体形成に係わる Tyr48^{BIL1/BZR1} が BEH1, 3, 4 では Phe に, Tyr57^{BIL1/BZR1} が BEH3 では Phe に置き換わっていることがわかった (図 6-2). bHLH 転写因子や bZIP 転写因子のようにパラログ間で二量体形成能に違いがある可能性が考えられる. DNA との相互作用に係わる残基については, 完全に保存されていたため (EMSA 解析で DNA 結合親和性に係わらないと示唆された Arg34 を除く), BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4

間で DNA 結合特異性はほぼ変わらないと予想される (図 6-3).

BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4 以外の BZR 型 DNA 結合ドメインをもつタンパク質として β -amylase-like protein (BAM) 7, 8 が存在する. BMA7, 8 は BZR 転写因子型 DNA 結合ドメインとグリコシダーゼ様ドメインから構成され, デンプン分解の過程に係わる転写因子である (Reinhold *et al.* 2011, Soyk *et al.* 2014). シロイヌナズナ由来の BAM7, 8 の BZR 型 DNA 結合ドメインは BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4 とアミノ酸配列相同性が約 50%であるが, 主鎖骨格形成に係わるアミノ酸残基, また DNA 主鎖との相互作用ネットワークに係わる残基の多くは BIL1/BZR1 と共通していた (図 4-17). これは, DAP-seq 解析や先行研究における EMSA を用いた *in vitro* 解析より示唆された, BAM7, 8 が BIL1/BZR1 や BES1 と類似の DNA 結合特異性を有するという知見と一致している (Reinhold *et al.* 2011, O'Malley *et al.* 2016, Plant Cistrome Database). 二量体形成に係わる残基に着目すると, Tyr48^{BIL1/BZR1} が BAM7, 8 では Leu に, Tyr57^{BIL1/BZR1} が BAM8 では Phe に, また Leu69^{BIL1/BZR1} が BAM7, 8 では Ile に置き換わっていることがわかった (図 6-2). 糖代謝情報と BR 情報が交わることを防ぐために, BAM7, 8 と BR 情報伝達の BZR 転写因子との間でヘテロ二量体を形成できない可能性は考えられるが, いずれにせよ BZR 型 DNA 結合ドメインをもつパラログ間でヘテロ二量体形成能を網羅的に調べる必要がある. DNA との相互作用に係わる残基に着目すると, BAM7, 8 においては DNA 主鎖を認識する Arg30^{BIL1/BZR1}, Arg34^{BIL1/BZR1}, Lys61^{BIL1/BZR1}, His62^{BIL1/BZR1}, Asn65^{BIL1/BZR1} が別の残基に置き換わっていた (図 6-3A). また DNA との相互作用ネットワーク形成に係わる Asn33^{BIL1/BZR1} が Thr に置き換わっていた. 以上のように DNA との相互作用に係わる残基がいくつも置き換わっていることにより, BR 情報伝達の BZR 転写因子とは異なる DNA 結合親和性, または DNA のコンフォメーション認識の特異性に違いが生じ, BAM7, 8 を介した糖代謝応答と BZR 転写因子を介した BR 応答を異なるものに行っている可能性が考察される.

6-3 他の転写因子ファミリーとの DNA 結合特異性の違い

植物において G-box 配列 (5'-CACGTG-3') は光などの環境応答に係わる遺伝子プロモーター上に多く見出されており, bHLH 転写因子, bZIP 転写因子, そして BZR 転写因子に直接認識される (Jakoby *et al.* 2002, Tokedo-Ortiz *et al.* 2003, Ezer *et al.* 2017). 同一の遺伝子プロモーターが異なる転写因子によって認識されることにより, 複雑な転写制御機構が生まれる. 例えば, bZIP 転写因子 HYPOCOTYL 5 (HY5) は, 典型的 bHLH 転写因子である PIF サブファミリーの G-box 配列認識を競合的に阻害し, 生体内において PIF の強力なアゴニスト活性を示す (Toledo-Ortiz *et al.* 2014). 環境応答シグナルによって HY5 と PIF の量比が変わることで PIF の標的プロモーターへの結合量が制御され, 外界の情報を統合した転写応答へと変換される (Toledo-Ortiz *et al.* 2014). 本研究の解析結果からも, BZR 転写因子は G-box 配列認識において bHLH 転写因子または bZIP 転写因子と競合的關係にあると考えられるが, その生理学的意義はいまだわかっていない.

bHLH 転写因子, bZIP 転写因子, および BZR 転写因子はいずれも G-box 結合タンパク質であるが, それぞれ異なる塩基配列認識特異性をもつ. bHLH 転写因子は E-box 配列 (5'-CAnnTG-3') を, bZIP 転写因子は ACGT 配列 (5'-nACGTn-3') を厳密に認識することが知られている. また本研究における生化学的解析と構造生物学的解析から, BZR 転写因子は G-box 配列中の塩基をいずれも緩く認識することが示唆された. このような違いから, bHLH 転写因子と bZIP 転写因子は遺伝子プロモーター上のコア塩基配列モチーフ依存的に競合的關係から逃れることが可能である (図 6-4). また, BZR 転写因子においては bHLH 転写因子や bZIP 転写因子が認識しづらい NN-BRRE コア配列 (5'-nnCGTG-3') を認識可能である (図 6-4). また, bHLH 転写因子, bZIP 転

写因子および BZR 転写因子が各々のコア塩基配列外の周辺配列に対する特異性をもつことで、より選択的に標的遺伝子プロモーターを認識することができ、細胞内において不必要な情報伝達の混線を防いでいる可能性が考えられる。BZR 転写因子 BIL1/BZR1 や BES1 が標的とする遺伝子プロモーター上には BRRE 配列 (5'-nnCGTG^C/_TG-3') が多く見られ、5-3-4 では BZR 転写因子が結合するのに適した DNA のコンフォメーションを供する可能性を考察したが、他のファミリーの転写因子が結合するのを防ぐため、または未知の BZR 転写因子アンタゴニストが強く結合するために必要な塩基配列モチーフである可能性も考えられる。

6-4 BZR 転写因子と他の転写因子ファミリーの相互作用

BR 情報伝達のマスター転写因子である BZR 転写因子 BIL1/BZR1 および BES1 は、PIF4 や BIM1 等の bHLH 転写因子と相互作用して協同的に伸長促進遺伝子等を活性化することが報告されている (Yin *et al.* 2005, Oh *et al.* 2014)。BZR 転写因子と bHLH 転写因子のアミノ酸配列には類似性が認められており、両者は DNA 結合ドメインを介してヘテロ二量体を形成し、G-box 配列または E-box 配列を強く認識できるようになるのではないかと考えられていた。しかしながら、本研究で明らかになった BZR 転写因子型 DNA 結合ドメインの二量体形成様式は bHLH 転写因子とは明らかに異なっていた。この知見と一致するように、筆者が行った *in vitro* 実験では、BZR 転写因子 (BIL1/BZR1, BES1) と bHLH 転写因子 (PIF4, BIM1) の DNA 結合ドメイン間の直接的な相互作用、および標的 DNA 断片に対する協同的認識作用は確認できていない (データ未記載)。しかし、植物細胞においては翻訳後修飾等の過程があるため、BZR 転写因子と bHLH 転写因子の DNA 結合ドメイン間のヘテロ二量体を形成しないとは断定できない。実際に、活性酸素情報が BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメイン中の Cys63 を直接

酸化修飾することで、酸化修飾された BIL1/BZR1 は PIF4 全長との結合力が増大し、BIL1/BZR1 と PIF4 の協同的遺伝子制御が引き起こされることが最近報告された (Tian *et al.* 2018). BIL1/BZR1 の Cys63 の側鎖はヘリックス 1 と 2 を繋ぐループ上に存在している. この Cys 残基が酸化修飾されることでループ構造および二量体構造に変化が生じ、BIL1/BZR1 の BZR 型 DNA 結合ドメインが PIF4 の bHLH 型 DNA 結合ドメインとヘテロ二量体を形成できるようになる可能性はある.

異なる転写因子同士による協同的遺伝子活性化の分子機構は、ヘテロ二量体形成による DNA 結合親和力の増加以外にもいくつも報告されている (図 6-5). 例えば、転写因子同士が領域を問わず分子表面で相互作用できる場合、それぞれの転写因子が認識する塩基配列モチーフが適した相対位置に存在すれば強固な相互作用ネットワークを形成し、みかけの DNA 結合親和力を増大させることもできる (一方が標的 DNA と解離したとしても、もう片方と繋がっているため再び標的 DNA と接触しやすくなる) (図 6-5B) (Spitz & Furlong 2012). 転写因子同士は直接相互作用しないが、片方の転写因子が DNA に結合することで周辺の DNA (数十 bp 程度) の構造変化を引き起こし、他方の転写因子が結合しやすい DNA のコンフォメーションを供するという協同的認識機構も存在する (図 6-5C) (Falvo *et al.* 1995, Spitz & Furlong 2012, Jolma *et al.* 2015). また、数百 bp 以上離れた塩基配列モチーフをそれぞれ認識する 2 つの転写因子同士が相互作用できる場合、プロモーター DNA のルーピングを引き起こすことができる. プロモーター DNA のルーピングにより基本転写装置のリクルートが促されて遺伝子の転写活性が促進される (図 6-5D) (Matthews 1992, Schleif 1992).

BZR 転写因子と bHLH 転写因子によって協同的に活性化される遺伝子 (*IAA19* や *SAUR-AC* 等) のプロモーター上には、BZR 転写因子と bHLH 転写因子の認識モチーフである G-box 配列や E-box 配列が離れた位置に複数存在している. DNA 結合ドメイン以外の領域で相互作用し、上述したように DNA のルーピングが引き起こされる可

能性はある。実際に、BIL1/BZR1の転写調節領域上にあるEARモチーフを欠失させると、コリプレッサー-TPLを介した転写抑制能が消失するだけではなく、PIF4との共同的な転写活性化能も失われるため、転写装置のリクルートとの関連性は極めて高い。BIL1/BZR1とPIF4による協同的な転写活性化には、さらにオーキシン情報伝達のマスター転写因子ARF6が関与していることも明らかになっている(Oh *et al.* 2014)。酵母ツーハイブリッド(yeast two-hybrid; Y2H)法を用いた相互作用解析により、BIL1/BZR1とARF6はDNA結合ドメイン以外の領域で相互作用することも見出されている(Oh *et al.* 2014)。またジベレリン情報伝達抑制因子であるDELLAタンパク質は、BIL1/BZR1、ARF6、PIF4のいずれとも相互作用し、BIL1/BZR1:ARF6:PIF4複合体形成を物理的に阻害することにより伸長促進遺伝子の転写を抑制する(de Lucas *et al.* 2008, Feng *et al.* 2008, Bai *et al.* 2012, Li *et al.* 2102, Gallego-Bartolomé *et al.* 2012, Oh *et al.* 2014)。先行研究におけるY2H法による相互作用解析ではDELLAはBIL1/BZR1のDNA結合ドメイン以外の領域に結合することが示されており(Li *et al.* 2102, Gallego-Bartolomé *et al.* 2012)、また筆者が行った*in vitro*プルダウンアッセイにおいても同様の結果が得られている(野崎 2016)。以上の知見より、協同的な遺伝子活性化の分子機構を明らかにするためには、DNA結合ドメインのみではなく全長の転写因子を用いて解析する必要がある。さらに本研究で用いたような約30 bpの短いDNA断片ではなく、数千bpの遺伝子プロモーターDNAを丸ごと用いることも重要であると考えられる、

乾燥ストレス応答性のNo apical meristem, *Arabidopsis* transcription activation factor and cup-shaped cotyledon (NAC) 転写因子 RESPONSIVE TO DESICCATION 26 (RD26) はDNA結合ドメイン同士を介してBES1に結合し、BES1の転写調節を阻害することが見出されている(Ye *et al.* 2017)。この際、RD26とBES1は標的コア配列を含む短いDNA断片に対し、協同的に結合親和力が増強される。NAC転写因子とBZR転写因子という全く異なるDNA結合ドメインをもつ転写因子によるDNAの協同的認識がどの

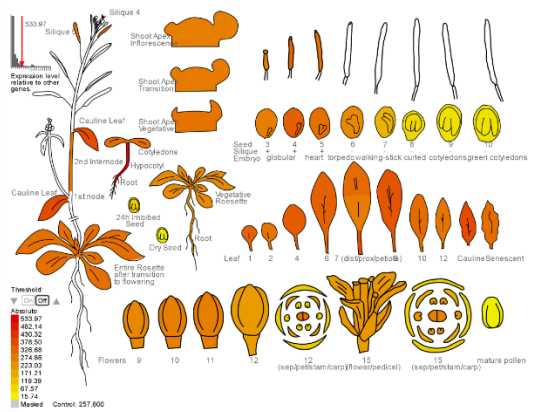
ような仕組みで引き起こされるかは非常に興味深い。

6-5 今後の課題と展望

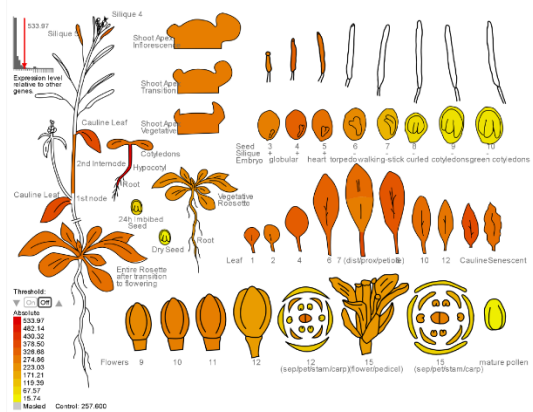
本研究では、BIL1/BZR1 が標的 DNA を認識する立体構造を解き明かし、BZR 転写因子の DNA 結合特異性の構造基盤を明らかにすることができた。コア塩基配列の緩い認識機構だけではなく DNA のコンフォメーション認識による周辺配列認識特異性の分子機構にも着目したことにより、BZR 転写因子が典型的 bHLH 転写因子とは異なる DNA 結合特異性をもつ理由を明確に示すことができた。しかしながら、BZR 転写因子がどのような塩基配列、すなわち DNA のコンフォメーションを好んで認識しているのかは未だ不明である。網羅的な DNA との相互作用解析結果に加え、分子動力学法シミュレーションを用いて BZR 転写因子と DNA の複合体の局所的な柔軟性を調べることで、その詳細が明らかになると期待できる。BZR 転写因子の塩基配列に対する嗜好性を予測することが可能になれば、ゲノム編集が容易になった現在、標的遺伝子のプロモーターDNA 配列を人工改変することで有用形質を示す植物の創出にも繋がることを期待される。

また、BZR 転写因子は遺伝子プロモーターおよび他の転写因子依存的に、転写調節を正または負に切り換えることができる興味深いタンパク質である。負の転写調節機構は転写コリプレッサーTPL との結合で説明することができるが、bHLH 転写因子等との協同的な転写調節機構は未だ詳細がわかっていない。DNA 結合ドメインのみではなく全長のタンパク質、そして遺伝子プロモーターDNA を丸ごと用いた相互作用解析を行うこと、また転写因子間の相互作用領域を *in vitro* の系で詳細に明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

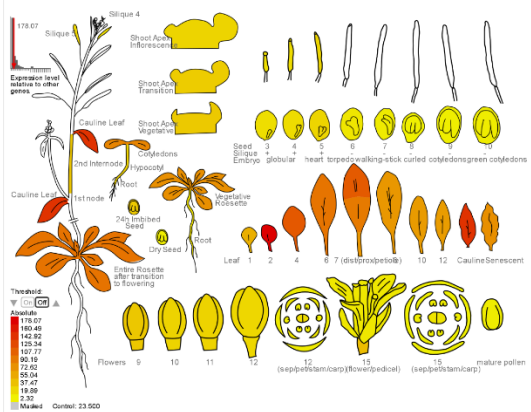
BIL1/BZR1 (At1g75080)



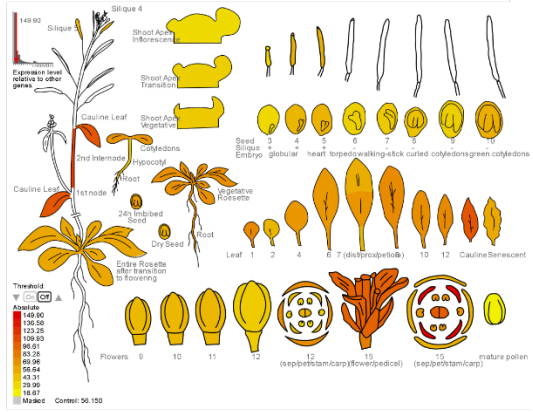
BES1 (At1g19350)



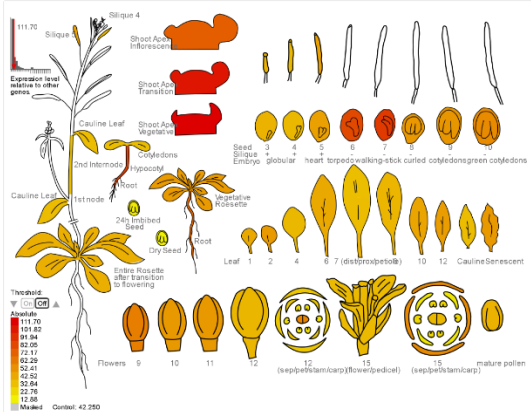
BEH1 (At3g50750)



BEH2 (At4g36780)



BEH3 (At4g18890)



BEH4 (At1g78700)

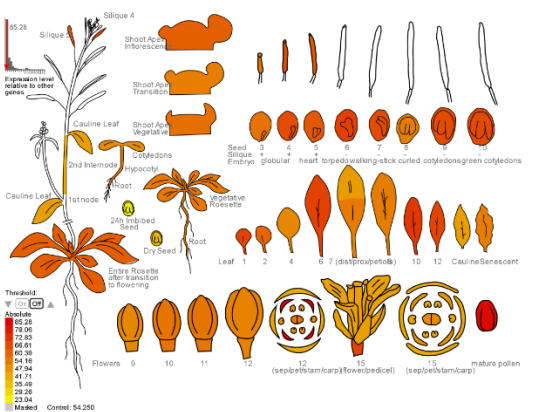


図 6-1 シロイヌナズナにおける BZR 転写因子の遺伝子発現パターン

Arabidopsis eFP Browser 2.0 より抽出したシロイヌナズナにおける 6 種類の BZR 転写因子 (BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4) の遺伝子発現パターンが様々な器官や生長時期ごとに示されている。暖色であるほど遺伝子発現量が多いことを示す。

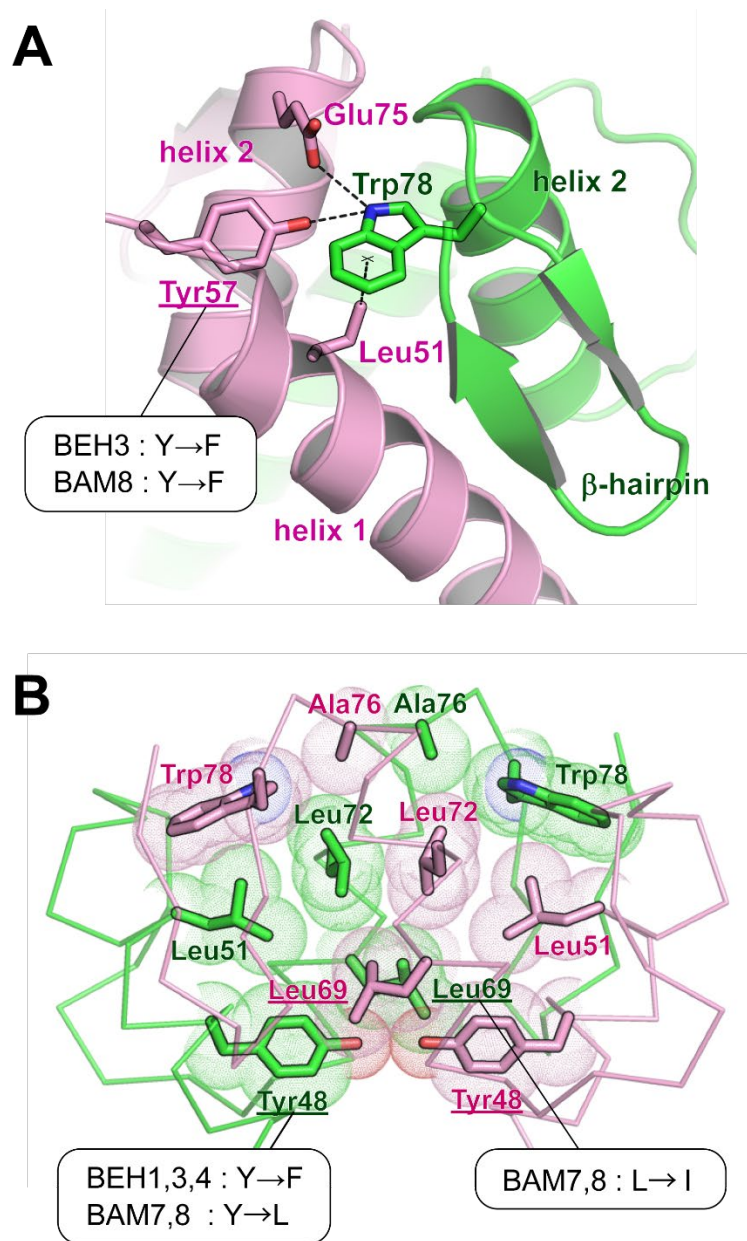


図 6-2 BZR 転写因子パラログにおける二量体形成に係わる残基

シロイヌナズナの BZR 型 DNA 結合ドメインをもつ転写因子 (BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4, BAM7, 8) 間における二量体形成に係わる残基の違いが, BIL1/BZR1 の結晶構造上にマッピングされている. Trp78^{BIL1/BZR1} を介した二量体形成に係わる相互作用様式 (A) と, 疎水性コア構造形成様式 (B) を示した.

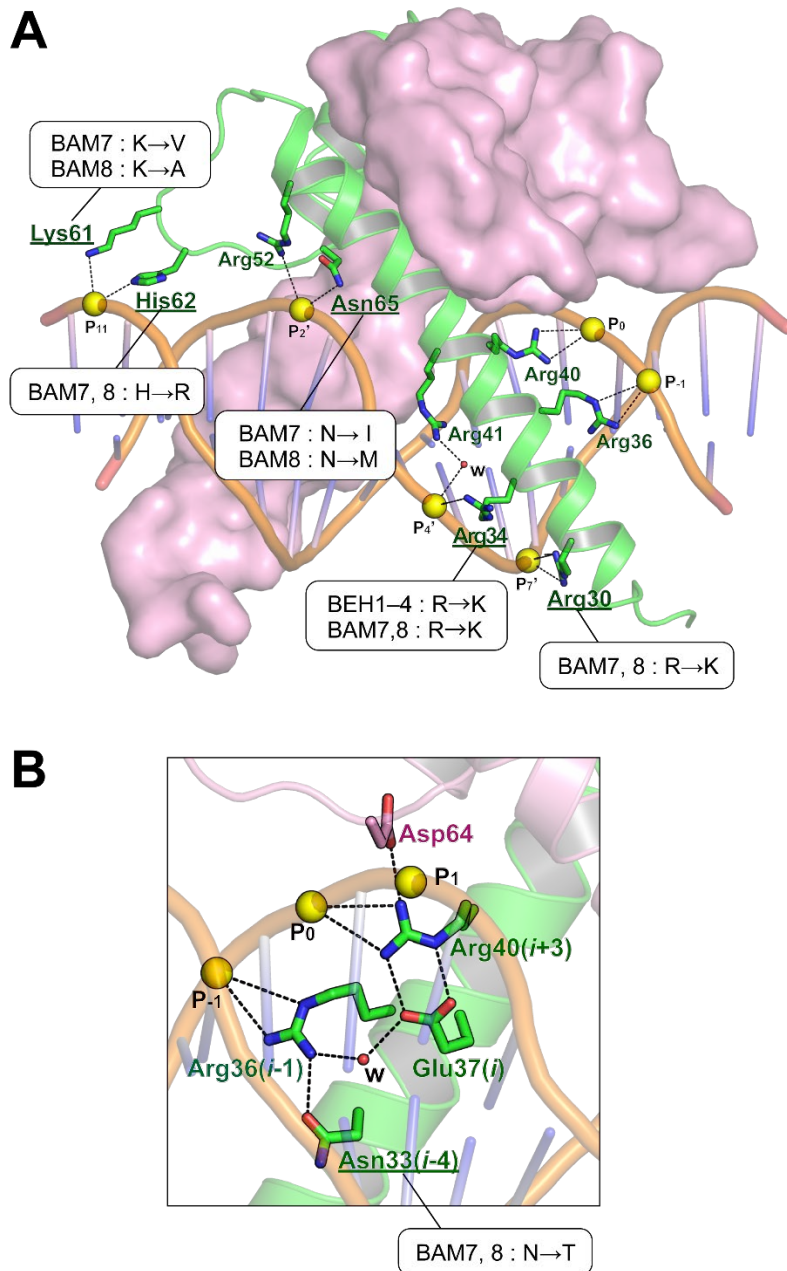


図 6-3 BZR 転写因子パラログにおける DNA 認識に係わる残基

シロイヌナズナの BZR 型 DNA 結合ドメインをもつ転写因子 (BIL1/BZR1, BES1, BEH1-4, BAM7, 8) 間における DNA 認識に係わる残基の違いが, BIL1/BZR1 の結晶構造上にマッピングされている. Trp78^{BIL1/BZR1} を介した二量体形成に係わる相互作用様式 (A) と, 疎水性コア構造の形成様式 (B) を示した.

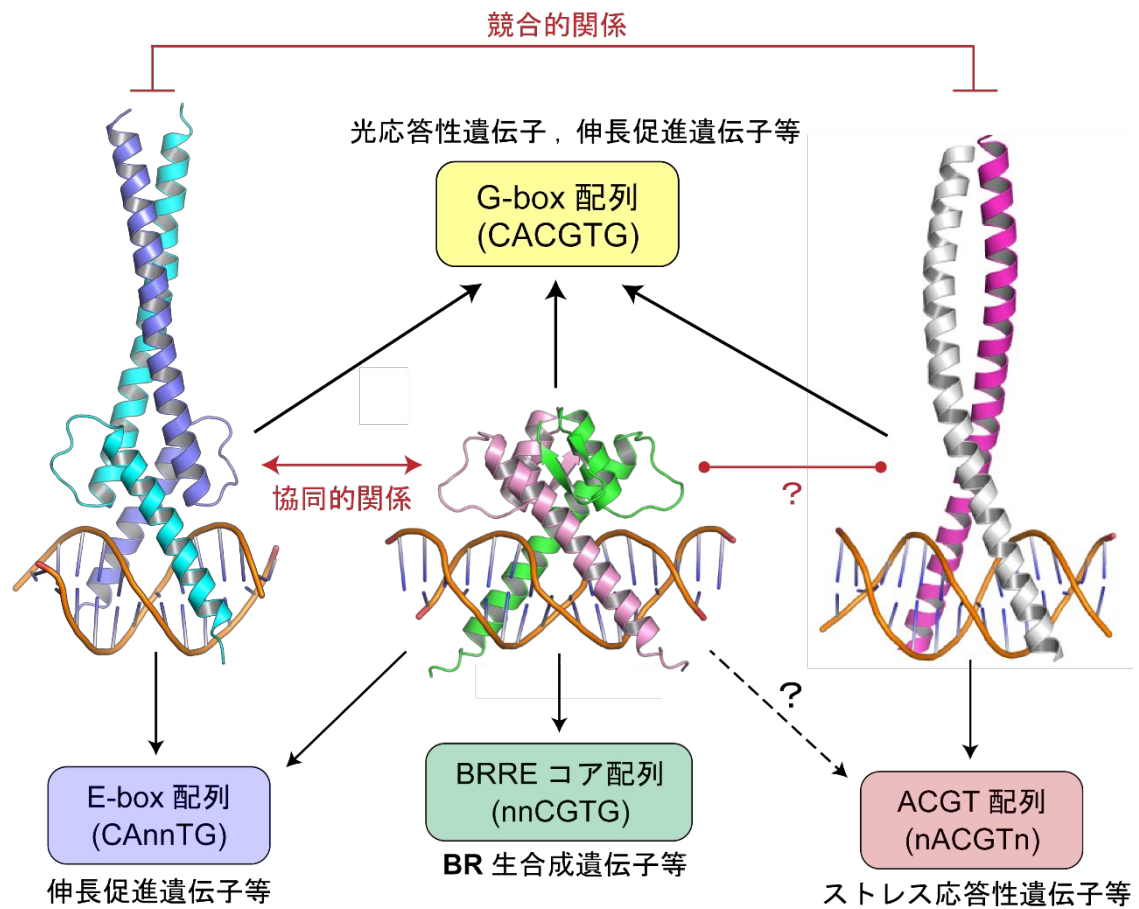


図 6-4 植物において G-box 配列を認識する転写因子の塩基配列特異性

植物において bHLH 転写因子， bZIP 転写因子および BZR 転写因子が特異的に認識可能な塩基配列モチーフが示されている。また， それぞれの転写因子間の生理学的な関係性を赤字で示した。

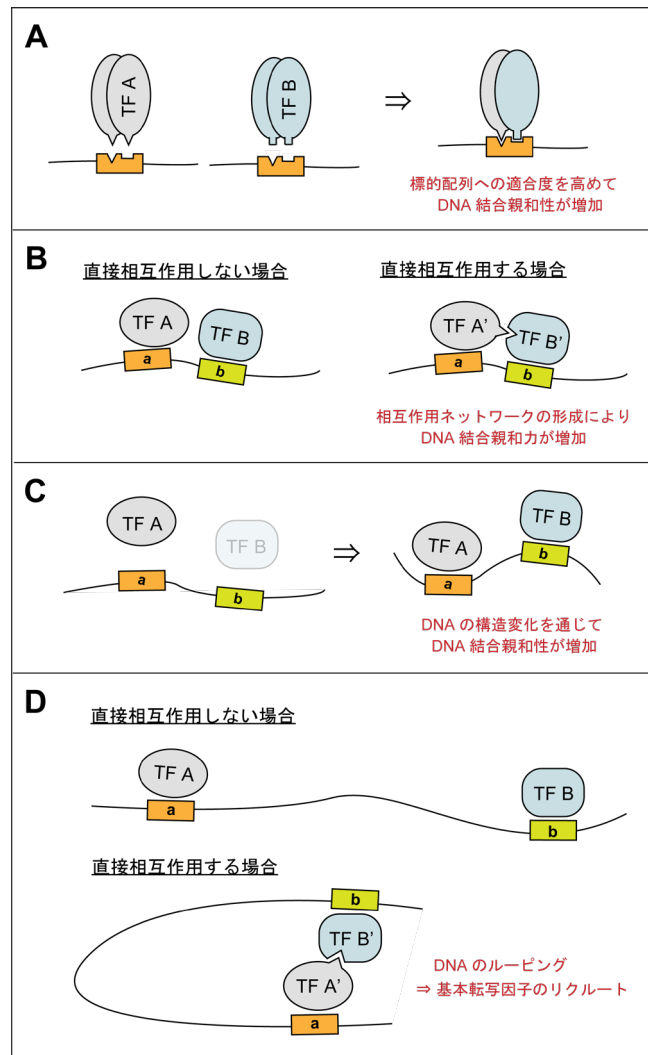


図 6-5 異なる転写因子同士による協同的な DNA 認識機構の例

- (A) ヘテロ二量体を形成することで、特定の塩基配列への特異性が増加する。
- (B) 転写因子同士が領域を問わず分子表面で相互作用できる場合、それぞれの転写因子が認識する塩基配列モチーフが適した相対位置に存在すれば強固な相互作用ネットワークを形成し、みかけの DNA 結合親和性が増加する。
- (C) 転写因子同士は直接相互作用しないが、片方の転写因子が DNA に結合することで周辺の DNA (数十 bp 程度) の構造変化を引き起こし、他方の転写因子が結合しやすい DNA のコンフォメーションを供する。
- (D) 数百 bp 以上離れた塩基配列モチーフをそれぞれ認識する転写因子が相互作用できる場合、プロモーター DNA のルーピングを引き起こされ、基本転写装置のリクルートが促される。

引用文献

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J. & Grosse-Kunstleve, R. W.** (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. & Terwilliger, T. C.** (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1948–1954.
- Asami, T, Nakano, T, Nakashita, H, Sekimata, K, Shimada, Y & Yoshida S.** (2003). The influence of chemical genetics on plant science: Shedding light on functions and mechanism of action of brassinosteroids using biosynthesis inhibitors.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N. & Foolad, M. R.** (2010). The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **29**, 162–190.
- Bai, M. Y., Shang, J. X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T. P. & Wang, Z. Y.** (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **8**, 810–817.
- Bai, M. Y., Zhang, L. Y., Gampala, S. S., Zhu, S. W., Song, W. Y., Chong, K & Wang, Z. Y.** (2007). Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 13839–13844.
- Blanchet, C., Pasi, M., Zakrzewska, K. & Lavery, R.** (2011). CURVES+ web server for analyzing and visualizing the helical, backbone and groove parameters of nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* **39**, W68–W73.
- Buck, M. J. & Atchley, W. R.** (2003). Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. *J. Mol. Evol.* **56**, 742–775.
- Bukowska, M. A. & Grutter, M. G.** (2013). New concepts and aids to facilitate crystallization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 409–416.
- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. F. & Robertson, D. L.** (2010). Genome-wide classification and evolutionary

- analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol.* **153**, 1398–1412.
- Castillon, A., Shen, H. & Huq, E.** (2007). Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci.* **12**, 514–521.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W. & Davies, B.** (2007). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **158**, 423–438.
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A. & Linse, S.** (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2050–2055.
- Cowtan, K.** (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **62**, 1002–1011.
- de Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E. & Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**, 480–484.
- Depuydt, S. & Hardtke, C. S.** (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* **21**, R365–R373.
- Derewenda, Z. S.** (2010). Application of protein engineering to enhance crystallizability and improve crystal properties. *Acta crystallogr. Sect. D Biolo. crystallogr.* **66**, 604–615.
- Derewenda, Z. S.** (2011). It's all in the crystals. *Acta crystallogr. Sect. D Biolo. crystallogr.* **67**, 243–248.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., Manners, J. M. & Kazan, K.** (2017). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2225–2245.
- Emsley, P. & Cowtan, K.** (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
- Evans, P. R. & Murshudov, G. N.** (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214.
- Ezer, D., Shepherd, S. J. K., Brestovitsky, A., Dickinson, P., Cortijo, S., Charoensawan, V., Box, M. S., Biswas, S., Jaeger, K. E. & Wigge, P.A.** (2017) The G-box transcriptional regulatory code in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **5**, 628–640.

- Falvo, J. V., Thanos, D. & Maniatis, T.** (1995). Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN β gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y). *Cell* **83**, 1101–1111.
- Feller, A., MacHemer, K., Braun, E. L. & Grotewold, E.** (2011). Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* **66**, 94–116.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L. M. & Deng, X. W.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475–479.
- Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G. & Burley, S. K.** (1994). Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *EMBO J.* **13**, 180–189.
- Ferré-D'Amaré, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B. & Burley, S. K.** (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* **363**, 38–45.
- Friedrichsen, D. M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J. N., Alonso, J., Ecker, J. R., Furuya, M. & Chory, J.** (2002). Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**, 1445–1456.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., Alabadí, D. & Blázquez, M. A.** (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **14**, 13446–13451.
- Gampala, S. S., Kim, T. W., He, J. X., Tang, W. Q., Deng, Z. P., Bai, M. Y., Guan, S. H., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J. M., Chen, H. J., Shibagaki, N., Ferl, R. J., Ehrhardt, D., Chong, K., Burlingame, A. L. & Wang, Z. Y.** (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **13**, 177–189.
- Goldschmidt, L., Cooper, D. R., Derewenda, Z. S. & Eisenberg, D.** (2007). Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci.* **16**, 1569–1576.

- Gordân, R., Shen, N., Dror, I., Zhou, T., Horton, J., Rohs, R. & Bulyk, M. L.** (2013). Genomic regions flanking E-box binding sites influence DNA binding specificity of bHLH transcription factors through DNA shape. *Cell Rep.* **3**, 1093–1104.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metz, F.** (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308.
- Gudesblat, G. E. & Russinova, E.** (2011). Plants grow on brassinosteroids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 530–537.
- Guo, A. Y., Chen, X., Gao, G., Zhang, H., Zhu, Q. H., Liu, X. C., Zhong, Y. F., Gu, X., He, K. & Luo, J.** (2008). PlantTFDB: A comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D966–D996.
- Grove, M. D., Spenger, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., Steffens, G. L., Flippen-Aderson, J. L. & Cook, J. C.** (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216–217.
- Harteis, S. & Schneider, S.** (2014). Making the bend: DNA tertiary structure and protein-DNA interactions. *Int. J. Biochem.* **15**, 12335–12363.
- He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S., Gendron, N., Sun, C. Q. & Wang, Z. Y.** (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* **307**, 1634–1638.
- He, J. X., Gendron, J. M., Yang, Y., Li, J. & Wang, Z. Y.** (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10185–10190.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. & Bailey, P. C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735–747.
- Hellman, L. M. & Fried, M. G.** (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protocols* **2**, 1849–1861.
- Hothorn, M., Belkadir, Y., Dreux, M., Dabi, T., Noel, J. P., Wilson, I. A. & Chory, J.** (2011). Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* **474**, 467–471.
- Huq, E. & Quail, P. H.** (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**, 2441–2450.

- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T. & Parcy, F.** (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **7**, 106–111.
- Jin, T., Chuenchor, W., Jiang, J., Cheng, J., Li, Y., Fang, K., Huang, M., Smith, P. & Xiao, T. S.** (2017). Design of an expression system to enhance MBP-mediated crystallization. *Sci. Rep.* **7**, 40991.
- Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K. R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., Enge, M., Kivioja, T., Morgunova, E. & Taipale, J.** (2015). DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature* **527**, 384–388.
- Jones, S.** (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol.* **5**, 226.
- Joshi, R., Passner, J. M., Rohs, R., Jain, R., Sosinsky, A., Crickmore, M. A., Jacob, V., Aggarwal, A. K., Honig, B. & Mann, R.S.** (2007) Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure. *Cell* **131**, 530–543.
- Kabsch, W.** (2010). XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
- Kim, T. W., Guan, S., Burlingame, A. L. & Wang, Z. Y.** (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol. Cell* **43**, 561–571.
- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., Sun, Y., Burlingame, A. L., & Wang, Z. Y.** (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1254–1260.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A. C., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., & Chory, J.** (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**, 167–171.
- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, G.C. & Franklin KA.** (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* **19**, 408–413.
- Krishna, P.** (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* **22**, 289–297.
- Kumar, S. V., Lucyshyn, D., Jaeger, K. E., Alos, E.; Alvey, E.; Harberd, N. P & Wigge, P. A.,** (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature* **484**, 242–245.

- Leivar, P.; Monte, E.; Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E. & Quail, P. H. (2008).** Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr. Biol.* **18**, 1815–1823.
- Li, J. & Chory, J. (1997).** A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929–938.
- Li, J. & Chory, J. (1999).** Brassinosteroid actions in plants. *J. Exp. Bot.*, **50**, 275–282.
- Li, J. & Nam, K. H. (2002).** Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3 / SHAGGY-like kinase. *Science* **295**, 1299–1301.
- Li, J., Wen, J. Q., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F.E. & Walker, J.C. (2002).** BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110** 213–222.
- Li, Q. F., Wang, C., Jiang, L., Li, S., Sun, S. S. & He, J. X. (2012).** An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signalling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Sci. Signal* **5**, ra72.
- Lian, T. F., Xu, Y. P., Li, L.F., Su, X. D. (2017).** Crystal structure of tetrameric *Arabidopsis* MYC2 reveals the mechanism of enhanced interaction with DNA. *Cell Rep.* **19**, 1334–1342.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J. & Solano, R. (2004).** JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1938–1950.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C. & Fankhauser, C. (2008).** Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* **53**, 312–323.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2003).** Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* **50**, 437–450.
- Matthews, B. W. (1968).** Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McCoy, A. J. et al. (2007).** Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.

- Miyaji, T., Yamagami, A., Kume, N., Sakuta, M., Osada, H., Asami, T., Arimoto, Y. & Nakano, T.** (2014). Brassinosteroid-related transcription factor BIL1/BZR1 increases plant resistance to insect feeding. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 960–968.
- Nair, S. K. & Burley, S. K.** X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. (2003). *Cell* **112**, 193–205.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. & Nambara, E.** (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant. J.* **41**, 697–709.
- Nam, K. H. & Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203–212.
- Nemhauser, J. L., Hong, F. & Chory, J.** (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**, 467–475.
- Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L. & Maloof, J. N.** (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**, 358–361.
- Matthews, K. S.** (1992). DNA looping. *Microbiol. Rev.* **56**, 123–136.
- Moon, A. F., Mueller, G. A., Zhong, X. & Pedersen, L. C.** (2010). A synergistic approach to protein crystallization: combination of a fixed-arm carrier with surface entropy reduction. *Protein Sci.* **19**, 901–913.
- Oh, E., Zhu, J. Y., Bai, M. Y., Arenhart, R. A., Sun, Y. & Wang, Z. Y.** (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Elife* **3**, e03031.
- Oh, E., Zhu, J. Y., Ryu, H., Hwang, I. & Wang, Z. Y.** (2014). TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nat. Commun.* **5**, 4140.
- Oh, E., Zhu, J. Y., Ryu, H. & Wang, Z. Y.** (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* **14**, 802–809.
- O'Malley, R. C., Huang, S. C., Song, L., Lewsey, M. G., Bartlett, A., Nery, J. R., Galli, M., Gallavotti, A. & Ecker, J. R.** (2016). Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell* **165**, 1280–1292.

- Park P. J.** (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 669–680.
- Pires, N. & Dolan, L.** (2010). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signal. Behav.* **5**, 911–912.
- Pogenberg, V., Ogmundsdóttir, M. H., Bergsteinsdóttir, K., Schepsky, A., Phung, B., Deineko, V., Milewski, M., Steingrímsson, E. & Wilmanns, M.** (2012). Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes Dev.* **26**, 2647–2658.
- Qiu, Y. L., Li, B., Wang, Z. D., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., Estabrook, G. F., Hendry, T. A., Taylor, D. W., Testa, C. M., Ambros, M., Crandall-Stotler, B., Duff R. J., Stech, M., Frey, W., Quandt, D., & Davis, C. D.** (2006). The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 15511–15516.
- Reinhold, H., Soyk, S., Simková, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., Vaughan, C. K., Monroe, J. D. & Zeeman, S. C.** (2011). β -amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *Plant Cell* **23**, 1391–1403.
- Rohs, R., Jin, X., West, S. M., Joshi, R., Honig, B. & Mann, R. S.** (2012). Origins of specificity in protein-DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 233–269.
- Rohs, R., West, S. M., Sosinsky, A., Liu, P., Mann, R. S. & Honig, B.** (2009). The role of DNA shape in protein-DNA recognition. *Nature* **461**, 1248–1253.
- Ryu, H, Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S. & Hwang, I.** (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **19**, 2749–2762.
- Santiago, J., Henzler, C. & Hothorn, M.** (2013). Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science* **341**, 889–892.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. & Estelle, M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 301–307.
- Schleif, R.** (1992). DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 199–223

- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D. & Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development.. *Nat. Genet.* **37**, 501–506.
- She, J., Han, Z., Kim, T. W., Wang, J., Cheng, W., Chang, J., Shi, S., Wang, J., Yang, M., Wang, Z. Y. & Chai, J.** (2011). Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **474**, 472–476.
- Shimada, S., Komatsu, T., Yamagami, A., Nakazawa, M., Matsui, M., Kawaide, H., Natsume, M.; Osada, H., Asami, T. & Nakano, T.** (2015). Formation and dissociation of the BSS1 protein complex regulates plant development via brassinosteroid signaling. *Plant Cell* **27**, 375–390.
- Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., Oshima, Y. & Hakoshima, T.** (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *EMBO J.* **16**, 4689–4697.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* **115**, 327–334.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G.** (2011). Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.
- Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., McGrath, W. J., Listwan, P. & Kobe, B.** (2003). Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* **12**, 1313–1322.
- Soyk, S., Simková, K., Zürcher, E., Luginbühl, L., Brand, L. H., Vaughan, C. K., Wanke, D. & Zeeman, S. C.** (2014). The enzyme-like domain of *Arabidopsis* nuclear β -amylase is critical for DNA sequence recognition and transcriptional activation. *Plant Cell* **26**, 1746–1763.
- Spitz, F. & Furlong, E.E.** (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 613–626.
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., He, J. X., Bai, M. Y., Zhu, S., Oh, E., Patil, S., Kim, T. W., Ji, H., Wong, W. H., Rhee, S. Y. & Wang, Z. Y.** (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **19**, 765–777.

- Tang, W., Kim, T. W., Oses-Prieto, J. A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A. L. & Wang, Z. Y.** (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* **321**, 557–560.
- Tang, W. Q.; Yuan, M., Wang, R. J., Yang, Y. H., Wang, C.M., Oses-Prieto, J. A., Kim, T. W., Zhou, H. W., Deng, Z. P., Gampala, S. S., Gendron, J. M., Jonassen, EM., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A. L., Sun, Y. & Wang, Z. Y.** (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 124–131.
- Tian, Y., Fan, M, Qin, Z., Lv, H., Wang, M., Zhang, Z., Zhou, W., Zhao, N., Li, X., Han, C., Ding, Z., Wang, W., Wang, Z. Y. & Bai, M. Y.** (2018). Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor. *Nat. Commun.* **9**, 1063.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. & Quail, P. H.** (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749–1770.
- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K. P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., Rodríguez-Concepción, M. & Halliday, K. J.** (2014). The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS Genet.* **10**, e1004416.
- Vert, G. & Chory, J.** (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* **441** 96–100.
- Wang, X. L. & Chory, J.** (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**, 1118–1122.
- Wang, Z. Y., Bai, M. Y., Oh, E. & Zhu, J. Y.** (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 701–724.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. & Chory, J.** (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380–383.
- Wang, Z. Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J.** (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* **2**, 505–513.

- Wang, Z., Wu, Y., Li, L. & Su, X. D.** (2013). Intermolecular recognition revealed by the complex structure of human CLOCK-BMAL1 basic helix-loop-helix domains with E-box DNA. *Cell Res.* **23**, 213–224.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson, K. S.** (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- Yakovchuk, P., Protozanova, E., Frank-Kamenetskii, M. D.** (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* **34**, 564–574.
- Ye, H., Liu, S., Tang, B., Chen, J., Xie, Z., Nolan, T. M., Jiang, H., Guo, H., Lin, H. Y., Li, L., Wang, Y., Tong, H., Zhang, M., Chu, C., Li, Z., Aluru, M., Aluru, S., Schnable, P. S. & Yin, Y.** (2017). RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. *Nat. Commun.* **8**, 14573.
- Ye, Q., Zhu, W., Li, L., Zhang, S., Yin, Y., Ma, H., & Wang, X.** (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 6100–6105.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J.** (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* **120**, 249–259.
- Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J. M., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J.** (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181–191.
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., Rodermel, S. & Yin, Y.** (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **65**, 634–646.
- Zhao, B. & Li, J.** (2012). Regulation of brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *J. Integr. Plant. Biol.*, **54**, 746–759.

- Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R. J., Decker, A. D., Tax, F. E. & Li, J.** (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol.* **130**, 1221–1229.
- Zhou, T., Shen, N., Yang, L., Abe, N., Horton, J., Mann, R. S., Bussemaker, H. J., Gordân, R., & Rohs., R.** (2015). Quantitative modeling of transcription factor binding specificities using DNA shape. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 4654–4659.
- 野崎 翔平 (2016). 修士論文 ブラシノステロイド情報伝達因子の制御機構解析.
- 鈴木 佑真 (2017). 修士論文 ブラシノステロイド情報伝達因子 BIL1/BZR1 の DNA 認識機構の解析

謝辞

本研究を行う機会を与えてくださり、また研究を快く行える環境と数多くのご指導、ご鞭撻を賜りました宮川拓也特任准教授および田之倉優特任教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、独立行政法人理化学研究所環境資源科学研究センター (CSRS) の中野雄司専任研究員には数多くの有益な助言を頂きました。心より御礼申し上げます。

植物ホルモン研究に関する様々な知識をご教授くださった東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物制御化学研究室の浅見忠男教授に心より御礼申し上げます。

徐玉群特任助教には、実験手法や論文執筆をはじめ数多くのご指導をいただきました。心より御礼申し上げます。

宮園健一特任准教授、平林佳博士 (特別研究員 PD)、学習院大学理学部生命科学科の中村顕助教、および東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生物構造学研究室の永田宏次准教授には、豊富な経験に基づく有益なアドバイスを多数いただきました。心より御礼申し上げます。

日々の研究生活を支えていただき、多くの助言と激励をいただきました養生訓科学寄附講座の皆様には感謝いたします。

最後になりましたが、これまで私の博士課程進学および学位取得を温かく見守り応援してくださった両親に深く感謝いたします。