

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440025

研究課題名(和文) 高等植物の根の形態形成を制御する新規転写制御機構の構造的研究

研究課題名(英文) Structural study of the novel transcription mechanism essential for root development of higher plants

研究代表者

平野 良憲 (Hirano, Yoshinori)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50452529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根の内部構造を決める2つのタンパク質SHRとSCRが、転写因子JKDと形成する三者複合体構造を決定した。SHRとSCRはヘテロ二量体を形成し、SHRの凹んだ溝にJKDがはまり込んでいた。このSHRに識別されるJKDの配列をSHR結合モチーフと命名した。JKDとよく似た転写因子は16種類あり、BIRDファミリーと呼ばれる。この中の13種がSHR結合モチーフをもち、SHR-SCR複合体と結合することがわかった。このことから、これらの相互作用を通してSHR-SCR複合体が複数の転写因子からなるネットワークを活性化することで、根の内部構造形成に必要な遺伝子を活性化する分子メカニズムが解明された。

研究成果の概要(英文)：Two GRAS proteins, SHR and SCR, cooperatively direct asymmetric cell division and the patterning of root cell types by transcriptional control in conjunction with BIRD/IDD transcription factors. The crystal structures of the SHR-SCR binary and JKD-SHR-SCR ternary complexes has been determined. Each GRAS domain comprises one / core subdomain with an -helical cap that mediates heterodimerization by forming an intermolecular helix bundle. The / core subdomain of SHR forms the BIRD binding groove, which specifically recognizes the zinc fingers of JKD. We identified a conserved SHR-binding motif in 13 BIRD/IDD transcription factors. Our results establish a structural basis for GRAS-GRAS and GRAS-BIRD interactions and provide valuable clues towards our understanding of these regulators, which are involved in plant-specific signalling networks.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 分子認識 転写因子 GRASファミリー IDDファミリー 転写制御 根のパターン形成 タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

動物や植物など多細胞生物では、細胞が分裂を繰り返すとともに、分裂した細胞が異なる運命をたどり、ある決まった構造を自ら生み出して特定の役割を担う器官や臓器が形成される。特に植物には細胞壁があるため細胞が移動できず、細胞分裂の異常は正常な形態形成の致命傷となりかねない。植物の根を拡大してみると、いくつかの組織から構成されており、各組織が目的にあった役割を担っている。根の中心部には中心柱があり、水や養分の通り道である維管束等がある。その外側には内皮、さらに外側は皮層や表皮が形成され、中心柱を守っている。このような放射状の基本的な内部構造パターンがどうしてできるかは植物学にとって根本的な問題であった。

先行研究から放射状の内部構造パターン形成を制御する遺伝子は幾つか見つけていた。それらの中で最も重要なのは、SHORT-ROOT (SHR) と SCARECROW (SCR) の 2 つのタンパク質であることがわかってきた。SHR と SCR は、植物特有の GRAS ファミリーと呼ばれるタンパク質であり、様々な解析から転写活性化因子であると推測されていた。中心柱で作られた SHR は外側の細胞層へ移動して、移動した先で SCR と出会って互いに相互作用し、さらには他の必要なタンパク質とも相互作用し、その部位の形成に必要な遺伝子を活性化して、中心柱を囲む内皮や皮層の細胞への分化を制御すると考えられていたが、どのようにして遺伝子の発現を活性化するのか、という基本的な分子機能(転写制御メカニズム)は不明だった。

近年、SCR、SHR と遺伝的に相関性のある転写因子が直接 SCR、SHR とタンパク質間相互作用することが報告された。N 末端側に保存された 4 つの Zn finger を有する BIRD/IDD ファミリータンパク質に属する MGP、JKD は、yeast two-hybrid 実験によって SHR、SCR と相互作用する。しかし、生体内での DNA 認識配列が不明であり、タンパク質複合体形成と転写制御機構の相関関係もよく分かっていない。

2. 研究の目的

GRAS ファミリータンパク質は既知の転写因子や、転写制御因子とのアミノ酸配列相同性がない現状を鑑みると、分子の構造的基盤解明は、新しい視点をもたらし、疑問解決の糸口あるいは新たな疑問、課題の抽出が可能となると期待される。そこで、本研究では GRAS ファミリータンパク質と IDD ファミリータンパク質の分子相互作用、遺伝的相関性に着目して、SCR、SHR の二者複合体の立体構造および IDD ファミリータンパク質 MGP、JKD との三者複合体の立体構造解析を通じて、GRAS ファミリータンパク質による転写制御機構および SCR、SHR による非対称分裂制御機構を原子レベルで明らかに

する。

3. 研究の方法

研究に必要な各種 GRAS ファミリータンパク質や BIRD/IDD ファミリータンパク質の大量発現系を確立した。発現したタンパク質試料について、その分解産物をマスペクトル等を用いて切断箇所を同定することで構造的に安定な領域を精製する系を確立した。精製した生物物理学的な性質を、ゲル濾過クロマトグラフィーや超遠心分析を用いて、分子の会合状態を調べた結果、SHR と SCR は安定なヘテロ二量体を形成することが明らかとなった。そこで SHR-SCR 複合体について結晶化スクリーニングを行った結果、結晶が得られた。得られた結晶を用いて大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行った結果、2.0 Å の X 線回折斑点を取得した。続いてセレノメチオニン置換タンパク質結晶を用いて X 線回折実験を行って得られたデータをもとに SAD 法によって位相決定を行って、立体構造を決定した。

次に *in vitro* において SHR-SCR 複合体と BIRD/IDD ファミリーの JKD、MGP の結合アッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて JKD、MGP の SHR-SCR 複合体との結合領域の絞り込みを行った。その結果、結合領域を数十残基程度までに絞り込むことに成功した。この結果に基づいて作成した種々のタンパク質コンストラクトについて、SHR-SCR との複合体として結晶化スクリーニングを行ったところ、結晶が得られたので、大型放射光施設 SPring-8 で X 線回折実験を行って、2.7 Å の X 線回折斑点を取得した。SHR-SCR 複合体の構造をモデルとして分子置換法によって立体構造を決定した。

等温滴定カロリーメトリー (ITC) を用いて SHR-SCR と BIRD/IDDs の結合親和性を定量的に解析するとともに、蛍光偏光解消法によって BIRD/IDDs の DNA 結合領域を同定するとともに、結合親和性を定量的に解析した。また、立体構造解析によって明らかになった情報を基に、種々の変異体を作製して、*in vitro* プルダウンアッセイやタバコの葉を用いた *in vivo* での相互作用解析によって、相互作用における寄与を解析した。

4. 研究成果

SHR と SCR のタンパク質を調製して相互作用解析を行った結果、これらが 1:1 で結合して、安定な複合体を形成することがわかった。そこで、この複合体を単離して結晶化を試みた結果、結晶を得ることが出来たため、この結晶を用いて放射光施設 SPring-8 で X 線回折データを取得し、X 線結晶構造解析を行って、SHR-SCR 複合体の三次元構造を決定することに成功した。SHR と SCR は互いに相補的な分子表面をもつ GRAS ドメインを介して、複合体を形成していた。驚いたことに、GRAS ドメインの構造は、メチル化酵素と類似した構造

をもっていることが判明した。しかし、触媒活性残基が保存されておらず、またメチル化反応に必須であるメチル基供与体と結合しないことが相互作用実験の結果から明らかとなり、メチル化酵素としては働いていないことがわかった。これは進化の過程で、既に存在していたタンパク質が流用されて、新しい役割を持つようになったと考えられ、SHR と SCR の場合は、遺伝子の活性化（転写制御）という新しい機能が付与されたと推測される。

また、SHR と SCR の相互作用は α -helical cap と命名した α ヘリックスが束になった領域が相互作用面となり、互いに相補的な分子表面を提示してしっかり張り付いて、双子のように対をなしていた。しかしながら、構造を精査すると、SHR と SCR には構造の異なる部位が相互作用面にあり、この差異が特異的な相互作用に寄与していることが明らかとなった。さらに、SCL3 と SCL5 という他の GRAS ファミリータンパク質について調べたところ、溶液中で SCL3 はホモ二量体、SCL5 では単量体であることが分かり、GRAS ファミリーは α -helical cap の特性によって会合状態の異なるサブタイプがあることが明らかとなってきた。

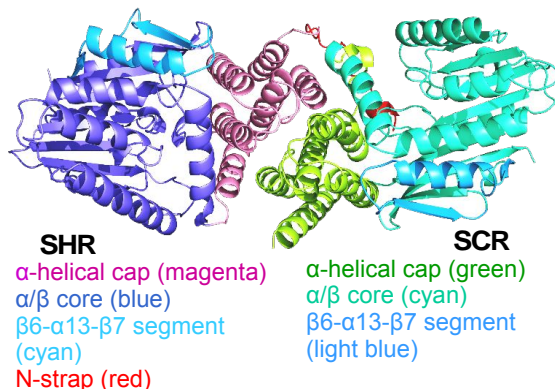


図 1. SHR-SCR 複合体の構造

SHR と SCR が遺伝子を活性化するためには、標的遺伝子を染色体の中から見つけ出し、塩基特異的に結合する必要がある。ところが、SHR-SCR の構造を調べても既知の DNA 結合モチーフや DNA と相互作用しそうな塩基性領域は見当たらない。実際、実験してみても、DNA との直接的な結合は観測されなかった。そのため、SHR、SCR は転写因子であるとは考えにくく、転写因子と相互作用することが遺伝子活性化の機能発現に重要であると予想された。このような状況の中で、BIRD/IDD ファミリーという転写因子群に属する JACKDAW (JKD) と MAGPIE (MGP) が、SHR-SCR 経路で働いているらしいことが分かってきた。そこで、転写因子 JKD、MGP と

SHR-SCR 複合体の相互作用解析を行ったところ、JKD、MGP の DNA 結合部位近辺と SHR-SCR 複合体が直接相互作用することを突き止めた。そこで SHR-SCR 複合体に JKD を結合させた三者複合体の結晶化を行い、この結晶を用いて X 線結晶解析を行って三者複合体の三次元構造の詳細を明らかにした。構造から SHR の分子表面には特徴的な溝があり、そこに JKD の一部がはまり込んで識別されていることがわかった。

より詳細に解析すると、JKD は DNA 結合モチーフであるジンクフィンガー (ZF) を 4 つ (ZF1、ZF2、ZF3、ZF4) もっているが、この中で、N 末端側の ZF1、ZF2、ZF3 の 3 つは DNA 塩基配列の読み取りに、C 末端側の ZF3 と ZF4 の 2 つは SHR と相互作用することが判明した。特に、ZF4 が SHR の凹んだ溝にはまり込んで、SHR に識別される。この ZF4 のアミノ酸配列を、「SHR 結合モチーフ」と命名した。JKD と相同性のある転写因子はシロイヌナズナでは 16 種類あり、総称して BIRD/IDD ファミリーと呼ばれているが、この中の 13 種が「SHR 結合モチーフ」をもっており、SHR-SCR 複合体と結合することがわかった。これら 13 の転写因子は、それぞれ別々の遺伝子を活性化すると考えられ、SHR-SCR 複合体が SHR 結合モチーフの識別を通して、複数の BIRD ファミリーの転写因子を利用することで、一群の遺伝子発現を活性化する「遺伝子ネットワーク起動スイッチ」として働くという分子メカニズムが解明された。

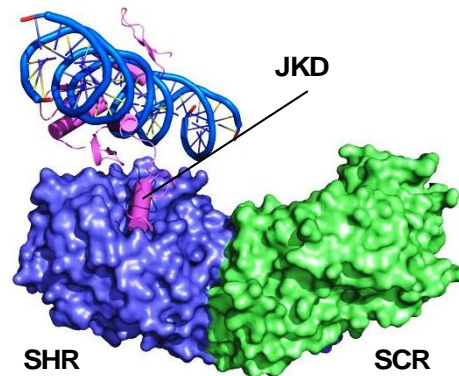


図 2. JKD-SHR-SCR 複合体の構造 (DNA はモデル)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

(1) Hirano Y, Nkagawa M, Suyama T, Murase K, Shirakawa M, Takayama S, Sun TP, Hakoshima T.

- Structure of the SHR–SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nature Plants*, **3**, 17010 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/nplants.2017.10
- (2) Maki K, Han SW, Hirano Y, Yonemura S, Hakoshima T, Adachi T.
Mechano-adaptive sensory mechanism of α -catenin under tension. *Scientific reports* **6**, 24878. (2016) 査読有
DOI: 10.1038/srep24878
- (3) Murase K, Hirano Y, Takayama S, Hakoshima T.
Efficient expression of SRK intracellular domain by a modeling-based protein engineering. *Protein Expression and Purification* pii: S1046-5928(15)30070-X. 査読有
DOI: 10.1016/j.pep.2015.09.020
- (4) Shibahara T, Hirano Y, Hakoshima T.
Structure of the free form of the N-terminal VH1 domain of monomeric α -catenin. *FEBS Letters* Vol 589, No. 15, pp1754-1760 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.053
- (5) Chamberlain PP, Lopez-Girona A, Miller K, Carmel G, Pagarigan B, Chie-Leon B, Rychak E, Corral LG, Ren YJ, Wang M, Riley M, Delker SL, Ito T, Ando H, Mori T, Hirano Y, Handa H, Hakoshima T, Daniel TO, Cathers BE.
Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nature Structural & Molecular Biology* Vol 21, No. 9, pp.803-809. (2014) 査読有
DOI: 10.1038/nsmb.2874
- (6) Nakagawa M, Kagiya M, Shibata N, Hirano Y, Hakoshima T Mechanism of high-affinity abscisic acid binding to PYL9/RCAR1. *Genes to Cells* **19**, 386-404. (2014) 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12140

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 柴原豪、平野良憲、箱嶋敏雄
“ α -catenin VH1 ドメインの遊離型単量体の結晶構造解析 ”
BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015 年 12 月 2 日 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- (2) 谷口雅俊、平野良憲、鈴木可奈子、箱嶋敏雄、森田 (寺尾) 美代
“ シロイヌナズナの DLLs-RLDs タンパク質間相互作用を介した重力シグナリング分子機構の解明 ”
第 56 回日本植物生理学会年会
2015 年 3 月 16 日 東京農業大学世田谷キャンパス (東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/hako/>

<http://bsw3.naist.jp/research/index.php?id=1463>

<http://www.naist.jp/pressrelease/2017/02/003660.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平野 良憲 (HIRANO YOSHINORI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：50452529