

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07448

研究課題名(和文) 根の形態形成を制御するGRAS/IDDファミリーによる転写制御機構の構造研究

研究課題名(英文) Structural study of the transcription mechanism by GRAS/IDD family essential for root development

研究代表者

平野 良憲(Hirano, Yoshinori)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：50452529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の根の形態形成に關与するGRASファミリーと転写因子IDDファミリーの相互作用に着目して、構造生物学的・生化学的手法を用いてより詳細な転写制御の分子機構の解析を行った。GRASファミリーのSCL3とIDDファミリー複合体のX線結晶構造解析を行った結果、既存のGRAS-IDD相互作用とは異なる新規の相互作用であることが明らかとなった。また、生化学的な解析から転写因子IDDファミリーとGRASタンパク質の組み合わせによって多数のタンパク質から構成される複合体が形成され、複雑な転写制御が行われている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の根の形態形成は成長過程と調和して転写制御をオン・オフにするため、複雑に制御されている。本研究では根の形態形成に重要な2つのファミリーGRAS、IDDファミリーについてその立体構造解析と分子相互作用解析の結果から、GRASファミリーとIDDファミリーの相互作用様式には多様性があることを示し、結合する組み合わせによって様々な転写制御複合体を形成し得ることを明らかにした。本成果は植物の複雑な転写制御機構の理解を深めると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have performed structural and biochemical analyses of the plant proteins, GRAS family and transcription factor IDD family, essential for the plant root development. The crystal structure of the SCL3-IDD protein complex revealed that SCL3 forms a homodimer and binds two BIRD/IDD transcription factors. The binding mode in SCL3-IDD complex is in sharp contrast to that found in a previous structure of the SHOOT-ROOT (SHR)-SCARECROW (SCR) heterodimer bound to BIRD/IDD transcription factors where N-terminal ZF motifs dock into the ZF-binding groove located at the alpha/beta core subdomain of SHR. We identified a conserved SDB motif in 12 out of 16 Arabidopsis BIRD/IDD-TF members. We also provide evidence that BIRD/IDD binds SHR/SCR and SCL3 simultaneously. These results expand and deepen our knowledge of the molecular mechanisms by which GRAS and BIRD/IDD members mediate cross-talk and networking of signaling pathways.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 転写制御 分子認識 GRASファミリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高等植物の非対称分裂研究は、根の分裂組織について研究が進んでいる。シロイヌナズナの根は 5 種類の始原細胞の反復した分裂によって、放射パターンと呼ばれるパターン形成を示して組織が同心円状に形成される。根のパターン形成異常を示す種々の変異体植物やトランスジェニック植物の解析によって、SCARECOW (SCR), SHORT ROOT (SHR) は皮層と内皮の 2 つの細胞層を形成する皮層/内皮始原細胞の非対称分裂や幹細胞性の維持、内皮細胞の運命決定など中心的な役割を果たしている。SHR、SCR とアミノ酸配列相同性の高い領域 (GRAS ドメイン) を持つタンパク質群が高等植物で保存され GRAS ファミリーという転写制御タンパク質群を形成している。しかし、GRAS ドメインは既知の DNA 結合モチーフを持たず、GRAS ファミリーによる転写制御機構はよく分かっていない。

近年、SCR、SHR と遺伝的に相関性のある転写因子 IDD ファミリーに属する IDD3、IDD10 は SHR、SCR と相互作用することが報告された。我々は研究開始までに GRAS ファミリー SHR、SCR と IDD ファミリーからなる複合体の構造解析を行い、GRAS ヘテロ二量体形成、IDD ファミリーの特異的な認識機構を原子レベルで明らかにして、転写制御のコファクターとして機能を明らかにしていた。

興味深いことにジベレリン依存的な根の形態形成に関与する GRAS ファミリー DELLA、SCL3 も IDD と相互作用することが報告された。しかし、SHR/SCR は IDD の Zinc Finger 領域と相互作用するのに対して、DELLA、SCL3 の GRAS ドメインは Zinc Finger 領域ではなく、C 末端側の領域で相互作用する。このことから、DELLA、SCL3 による IDD タンパク質の認識・制御機構は SHR によるものとは異なることが強く示唆された。また、SHR/SCR の下流および DELLA タンパク質下流で活性化される遺伝子が異なることから、GRAS ファミリーは IDD の標的を変換する機能を担っている可能性が考えられた。SHR/SCR 経路、ジベレリンシグナルはいずれも根端分裂組織において、内皮細胞の分化に関与することが報告されているが、そのクロストークについては、ほとんどよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では SCL3、DELLA タンパク質による IDD ファミリー認識機構と、IDD ファミリーを介した SHR/SCR 経路とのクロストーク機構の分子レベルでの解明を目指した。具体的には SCL3 または DELLA タンパク質と IDD ファミリーの単体および複合体立体構造解析を行って原子レベルで転写制御の分子機構を明らかにする。これに加えて生化学的・物理的手法を用いて IDD に対する SHR/SCR、SCL3 や DELLA タンパク質の相互関係 (競合関係か協調関係か) や IDD の DNA 結合に対する GRAS ファミリー結合の影響を明らかにする。以上の研究によって、GRAS ファミリーと IDD ファミリーによる転写制御機構解明、ひいては根の形態形成制御機構の一端を明らかにすることとした。

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、SCL3 は安定なホモ二量体を形成することが明らかとなった。SCL3 ホモ二量体の結晶化スクリーニングを行った結果、結晶が得られたため、大型放射光施設 SPring-8 での X 線回折

実験を行ったが分解能が低く、種々の改善を試みたが十分な分解能の回折データを得ることはできなかった。

次に *in vitro* において SCL3 と BIRD/IDD ファミリーの結合アッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて SCL3 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、BIRD/IDD ファミリーの結合領域フラグメントと SCL3 複合体の結晶化スクリーニングを行った結果、複数の結晶が得られた。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、IDD タンパク質の種類によってそれぞれ分解能は異なるものの 2.5-3.3 Å 程度の分解能の X 線回折斑点を取得した。以前に決定した SHR/SCR 複合体中の SCR 分子を鋳型とした分子置換法によって位相決定を行って、立体構造を決定した。

等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて SCL3 と BIRD/IDDs の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によって、相互作用における寄与を解析した。

4. 研究成果

SCL3 タンパク質を調製して生物物理学的な解析を行ったところ、溶液中で安定なホモ二量体として存在していることが明らかとなった。一方 BIRD/IDD ファミリーの C 末端には 2 つの保存された領域 MSATALLQKAA 配列と TR/LDFLG 配列が SCL3, DELLA との相互作用に関与することが先行研究から示唆されていた。今回、我々は *in vitro* プルダウンアッセイによってその結合領域の絞り込みを行い、MSATALLQKAA 配列が SCL3 との相互作用に重要であり、TR/LDFLG 配列は必要ないことが明らかとなった。よって MSATALLQKAA 配列を含む BIRD/IDD タンパク質と SCL3 の結合をゲルろ過クロマトグラフィーで解析したところ、結合はするものの部分的に解離してしまうことから、ゲルろ過による複合体調製は適さないことが判明した。また、ITC により定量的に相互作用解析を行った結果、解離定数 K_D は数 μM ~ 十数 μM 程度であった (図 1)。別々に精製したタンパク質を混合して結晶化スクリーニングを行った結果、結晶を得た。この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。長さの異なる 2 つの BIRD/IDD タンパク質と SCL3 複合体の X 線回折データを取得して、2.4 Å, 3.2 Å 分解能で立体構造を決定することに成功した。

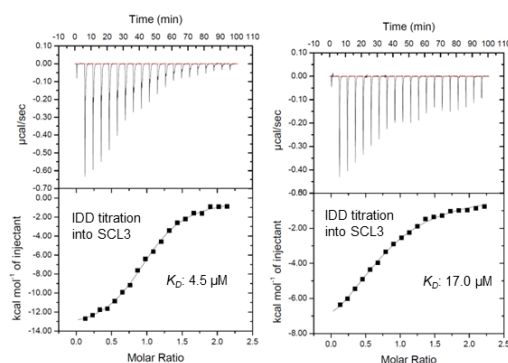


図 1. ITC による SCL3 と IDD タンパク質の相互作用解析

SCL3 の GRAS ドメインは α -helical cap と α/β core と呼ばれる 2 つのサブドメインから構成され、以前に決定した SHR, SCR の GRAS ドメインとよく似た全体構造をしていた。SCL3 は α -helical cap の対称的な相互作用面によってホモ二量体を形成していた。先行研究で決定されたホモ二量体を形成するイネ GRAS ファミリータンパク質 SCL7 では α/β core どうしの相互作用によって二量体が形成されていたが、今回決定した SCL3-IDD 複合体では SCL7 のホモ二量体とは全く相互作用領域や配向が異なっていた。SCL7 は二量体形成に伴って生じる溝に DNA が結合することが示唆されていたが、SCL3 では二量体系によって生じる溝は狭く、負電荷を帯びた領域が存在することから DNA との結合には適さないことが分かった。SCL3 の二量体の配向は SHR-SCR 複合体に見られる配向に似ているが、SHR-SCR 複合体では非対称なのに対して、SCL3 では一方のプロトマーに対してもう一方のプロトマーの配向が約 40° 回転することによって対称

な相互作用面を形成していた。SCL3 では 1 本の α ヘリックス (αA ヘリックス) が GRAS ドメインから突き出た格好となり、このヘリックスがもう一方のプロトマーと相互作用することで対称な相互作用面を形成しており、この構造の違いが GRAS ファミリーの特異的なホモ二量体・ヘテロ二量体形成に重要であることが明らかとなった。

BIRD/IDD の SCL3 結合領域は α ヘリックス構造をとり、SCL3 の α -helical cap と呼ばれるヘリックスバンドル構造と相互作用していた。SHR では α/β core で BIRD/IDD と相互作用していたため、SCL3 では SHR とは BIRD/IDD の認識配列も結合領域も異なるため、新規な様式で BIRD/IDD と相互作用していることが明らかとなった。その相互作用については変異体を作成して複合体形成に与える影響も調べた。以上の結果から、BIRD/IDD は SCL3、SHR-SCR という 2 つの GRAS ファミリータンパク質二量体と異なる領域を用いて相互作用することから、同時に 2 つの GRAS 二量体と結合する可能性があることが示唆された (図 2)。実際に *in vitro* の相互作用実験では同時に相

互作用することからこの多量体形成が植物体内での複雑な転写制御の一端を担う可能性が示唆された。

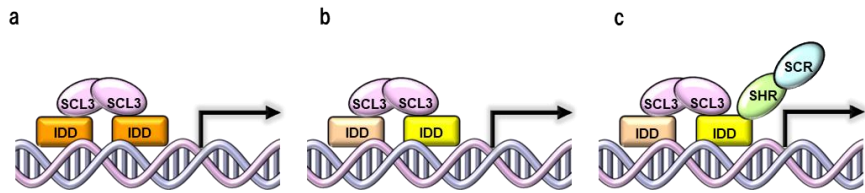


図 2. GRAS-IDD タンパク質によるマルチサブユニット転写制御複合体の形成
細胞内では以下のような複数の状態が存在しうると推測される。a. SCL3 二量体は 2 つの IDD と結合する。b. SCL3 二量体は 2 種の異なる IDD と結合する。c. b にさらに SHR-SCR 複合体が結合してマルチサブユニット転写制御複合体が形成される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furutani Masahiko, Hirano Yoshinori, Nishimura Takeshi, Nakamura Moritaka, Taniguchi Masatoshi, Suzuki Kanako, Oshida Ryuichiro, Kondo Chiemi, Sun Song, Kato Kagayaki, Fukao Yoichiro, Hakoshima Toshio, Morita Miyo Terao	4. 巻 11
2. 論文標題 Polar recruitment of RLD by LAZY1-like protein during gravity signaling in root branch angle control	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13729-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirano Yoshinori, Gao Yong-Guang, Stephenson Daniel J, Vu Ngoc T, Malinina Lucy, Simanshu Dhirendra K, Chalfant Charles E, Patel Dinshaw J, Brown Rhoderick E	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis of phosphatidylcholine recognition by the C2-domain of cytosolic phospholipase A2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e44760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.44760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Seto Y, Yasui R, Kameoka H, Tamiru M, Cao M, Terauchi R, Sakurada A, Hirano R, Kisugi T, Hanada A, Umehara M, Seo E, Akiyama Ki, Burke J, Takeda-Kamiya N, Li W, Hirano Y, Hakoshima T, Mashiguchi K, Noel JP, Kyojuka J, Yamaguchi S	4. 巻 10
2. 論文標題 Strigolactone perception and deactivation by a hydrolase receptor DWARF14	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-08124-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hirano Yoshinori, Amano Yu, Yonemura Shigenobu, Hakoshima Toshio	4. 巻 23
2. 論文標題 The force-sensing device region of α -catenin is an intrinsically disordered segment in the absence of intramolecular stabilization of the autoinhibitory form	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 370 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12578	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maki Koichiro, Han Sung-Woong, Hirano Yoshinori, Yonemura Shigenobu, Hakoshima Toshio, Adachi Taiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched -catenin by AFM	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20115-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西村岳志, 古谷将彦, 平野良憲, 谷口雅俊, 深尾陽一郎, 箱嶋敏雄, 森田(寺尾)美代
2. 発表標題 RLD1 は LZY3と相互作用することで細胞膜に局在しオーキシン輸送の制御を介して側根の伸長方向を 決定する
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷将彦, 西村岳志, 押田龍一郎, 谷口雅俊, 平野良憲, 箱嶋敏雄, 森田(寺尾)美代
2. 発表標題 重力シグナリングに関わるLZY 及びRLD の機能解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyo Terao Morita, Masahiko Furutani, Takeshi Nishimura, Chiemi Kondo, Moritaka Nakamura, Masatoshi Taniguchi, Yoshinori Hirano, Toshio Hakoshima
2. 発表標題 LZY3-RLD interaction plays a crucial role in gravity signaling in Arabidopsis gravitropism
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----