

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02114

研究課題名(和文) 転写因子の協調的DNA認識を基盤とした brassinosteroid 応答遺伝子制御の実態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cooperative DNA recognition mechanism of transcription factors in brassinosteroid-responsive gene regulation

研究代表者

宮川 拓也 (Miyakawa, Takuya)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50596559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物ホルモンの brassinosteroid (BR) は植物の成長と発達に重要な役割を果たしている。そのシグナル伝達のマスター転写因子である BIL1/BZR1 は BR 応答性遺伝子の転写を抑制と活性化の双方に制御することが示唆されているが、その分子機構はまだ十分に理解されていない。本研究では、DNA 形状の読み取りによる塩基配列認識を介した BIL1/BZR1 単独のプロモーターへの結合は、BR 応答性遺伝子の転写を抑制する方向に制御することが示された。また、BIL1/BZR1 と相互作用する転写因子を探索し、それらが協調的に結合する標的塩基配列をゲノムワイドで解析するための拡張型 DAP-seq 法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において BIL1/BZR1 が単独で強く結合可能な塩基配列パターンが特徴づけられ、BR シグナル伝達に関連する新規遺伝子の発現調節の推定が可能になった。これにより、抑制型の BR 応答性遺伝子の発現を個別に調節し、BR による植物の成長促進・ストレス耐性効果を高めるプロモーターゲノム編集などへの応用が期待される。また、本研究で同定された転写因子との組み合わせに対して検討を重ねることにより、BR 応答性遺伝子の発現調節機構と、BR と他の植物ホルモンの協調的・拮抗的な生理作用が転写因子をハブとしたネットワークとして理解することにつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The phytohormone brassinosteroid (BR) plays an important role in plant growth and development. BIL1/BZR1, the master transcription factor for BR signaling, has been suggested to regulate transcription of BR-responsive genes in both repression and activation modes. However, the molecular mechanism is still poorly understood. In this study, we show that the binding of BIL1/BZR1 alone to the promoter, through nucleobase recognition by the DNA shape readout mechanism, regulates transcription of BR-responsive genes repressively. We also discovered multiple transcription factors that interact with BIL1/BZR1 and constructed an extended DAP-seq method to analyze their target sequences genome-wide on promoter regions.

研究分野：植物生化学・分子生理学

キーワード：植物 brassinosteroid 転写調節 転写因子間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

植物ホルモンのブラシノステロイド (BR) の合成やシグナル伝達経路を欠損させると、重度の矮性や暗所での脱黄化などの表現型が見られる。このように、BR は植物の成長と発達に重要な役割を果たし、細胞伸長、細胞分裂、光形態形成、木部分化、生殖などの多様な生理プロセスを制御している。また、植物の多岐にわたる成長過程を総じて促進的に調節する BR は、高温・低温や乾燥などのストレスに対する応答においても重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。BR は細胞膜に局在する膜貫通型受容体キナーゼ BRI1 に結合するとリン酸化カスケードを活性化し、最終的に脱リン酸化された bHLH 様転写因子 BIL1/ BZR1、およびそのホモログの BES1 が核内に蓄積する (図 1)。こうして、BR の生理作用に必要な遺伝子セットの発現が調節される。

BIL1/BZR1 および BES1 は、核において実に 5,000 を超える BR 応答性遺伝子の発現を制御することから、BR シグナル伝達のマスター転写因子と捉えられており、その N 末端側に共通した DNA 結合ドメインで標的遺伝子のプロモーター領域に結合する。これまでに研究グループは、BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと標的 DNA の複合体構造を解析し、BIL1/BZR1 が典型的な bHLH 転写因子とは異なる二量体化機構によって NN-BRRE-core 配列 (5'-NNCACG-3') を認識することを明らかにした (Nosaki, et al., Nat. Plants, 2018)。BIL1/BZR1 は BR 応答性遺伝子のプロモーターに結合し、それらの転写の抑制 (オフ) だけでなく活性化 (オン) にも機能することが示唆されている (図 1) が、この転写制御の方向性がどのような分子機構によって決められているのかについては、まだ十分に理解されていない。

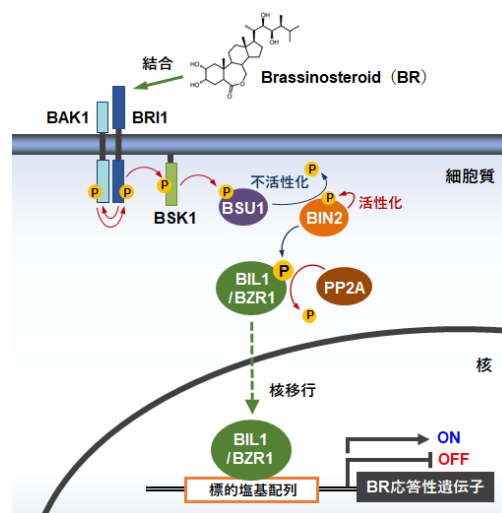


図 1 BR シグナル伝達における BIL1/BZR1 を介した遺伝子発現制御

## 2. 研究の目的

BR の生理作用に必要な遺伝子セットの発現調節を担う BIL1/BZR1 が、BR 応答性遺伝子のプロモーター上の標的塩基配列への結合を介して、抑制と活性化の双方向で転写を直接制御する仕組みの解明を目指し、本研究では「BIL1/BZR1 が認識する塩基配列パターンと転写制御方向の関係性」および「他の転写因子との相互作用を介した協調的な DNA 認識・転写制御機構」に着目して研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) BIL1/BZR1 が認識する塩基配列パターンと転写制御方向の関係性

単独の転写因子の標的塩基配列をゲノム DNA 上で探索するために DAP-seq 法が開発されている。独自に取得した BIL1/BZR1 の DNA マイクロアレイデータと統合し、BR 処理条件下で BIL1/BZR1 を介して発現レベルが有意に変動する遺伝子の発現パターンとプロモーター上の結合塩基配列パターンを解析した。さらに、ゲルシフトアッセイ (EMSA) とシロイヌナズナの葉肉細胞由来プロトプラストを用いた一過性発現レポーターアッセイにより、各塩基配列に対する BIL1/BZR1 の結合性への影響を定量評価し、その構造基盤を解析した。

### (2) 他の転写因子との相互作用を介した協調的な DNA 認識・転写制御機構

BIL1/BZR1 との相互作用が報告されている PIF4 は、BIL1/BZR1 と共通のプロモーター制御下にある遺伝子の発現を上昇させることが示唆されている。そこで、PIF4 に着目して BIL1/BZR1 と協調的に結合する標的塩基配列をゲノムワイドで解析するための拡張型 DAP-seq 法を検討した。また、酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法などにより、BIL1/BZR1 と相互作用する転写因子を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) BIL1/BZR1 が認識する塩基配列パターンと転写制御方向の関係性

シロイヌナズナの野生型 (WT) Col-0 植物と BR 処理した機能獲得型 *bill-1D/bzr1-1D* 変異体の DNA マイクロアレイデータの解析により、WT と比べて *bill-1D/bzr1-1D* 変異体では、4,015 遺伝子が発現上昇し、4,121 遺伝子が発現低下していることが示された。この DNA マイクロアレイデータと BIL1/BZR1 の DAP-seq データを統合した解析により、DAP-seq ピークは BIL1/BZR1

を介して発現が抑制される遺伝子のプロモーターに有意に濃縮されていることが明らかになった (図2)。これにより、BIL1/BZR1 単独のプロモーターへの結合は、BR 応答性遺伝子の転写を活性化するのではなく、転写を抑制する方向に制御することが示された (Nosaki et al., Nat. Plants, 2022)。

次に、発現が抑制される遺伝子のプロモーターに DAP-seq ピークが検出された配列を解析した結果、NN-BRRE-core 配列を含む 10 塩基の配列パターンが見出された。この配列パターンは、EMSA と一過性発現レポーターアッセイによって検証され、BIL1/BZR1 の結合能と転写抑制能がいずれも高い組み合わせが明らかになった。さらに、複合体構造に基づいた変異体解析により、BIL1/BZR1 は DNA の主鎖リン酸基との強固な相互作用ネットワークを形成するために

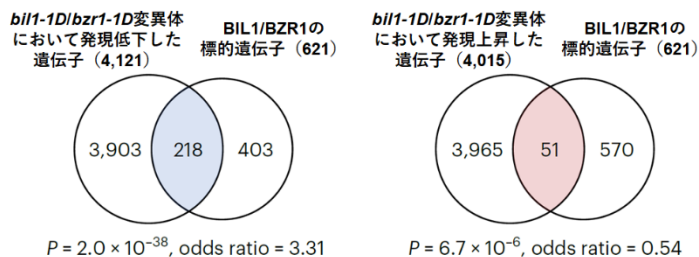


図2 BIL1/BZR1 が直接標的とする遺伝子の発現変化

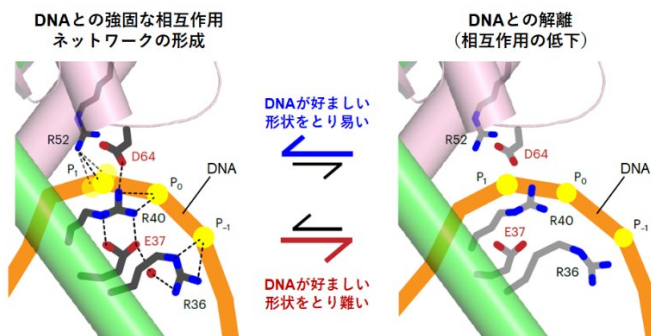


図3 BIL1/BZR1 の DNA 形状読み取り機構

DNA を歪ませ、この DNA 形状の読み取りによって塩基配列パターンを識別していることが結論づけられた (図3) (Nosaki et al., Nat. Plants, 2022)。

本研究において BIL1/BZR1 が単独で強く結合可能な塩基配列パターンが特徴づけられたことにより、BR シグナル伝達に関連する新規遺伝子の発現調節の推定が可能になった。実際に、葉緑体発達の調節に関わる *bpg4*、BR シグナル伝達の負の制御因子である BIN2 の抑制に関わる *bil8* のプロモーター領域に標的塩基配列が見出され、これらの遺伝子の転写が BIL1/BZR1 およびそのホモログの BES1 により抑制される分子機構が明らかになった (Chagan et al., Plant Physiol., 2024; Tachibara et al., Nat. Commun., 2024)。

以上の研究成果を踏まえると、BIL1/BZR1 による直接的な BR 応答性遺伝子の発現誘導においては、BIL1/BZR1 単独では結合能が比較的低い塩基配列パターンをもつ NN-BRRE-core 配列に対して、BIL1/BZR1 を効率的に誘引する仕組み、さらには BIL1/BZR1 と相互作用する転写抑制化因子 TPL との相互作用を解除する仕組みが必要であることが示唆される。

## (2) 他の転写因子との相互作用を介した協調的な DNA 認識・転写制御機構

BIL1/BZR1 が PIF4 と協調的に認識する塩基配列パターンを詳細に解析するため、2 種類の転写因子を用いた拡張型 DAP-seq 法を検討した。まず、BIL1/BZR1 と PIF4 のタンパク質調製条件を検討し、最終的に *in vitro* タンパク質合成系とアフィニティ精製の 2 種類の融合タグを組み合わせることで、それぞれ単独の合成と共合成による全長タンパク質の取得に成功した。この全長タンパク質と DNA 結合ドメインを用いた相互作用解析および DNA 結合解析により、両者が DNA 結合ドメインとは異なる領域で複合体を形成することが強く示唆された。次に、融合タグを利用して精製が可能な磁気ビーズを用いたプルダウンアッセイにより、BIL1/BZR1 と PIF4 のそれぞれ単独条件、および両者の共存条件で濃縮されるゲノム DNA 断片を調製し、次世代シーケンシング (NGS) により塩基配列情報が得られた。また、BIL1/BZR1 と核内で相互作用する新規因子を組み合わせた条件でも DAP-seq データを取得している。BIL1/BZR1 と PIF4 の標的塩基配列として特定の塩基配列の濃縮がこれまでに確認されている一方、RNA-seq による発現データと組み合わせた詳細な解析が進んでおり、BIL1/BZR1 と PIF4、さらには新規因子の共存条件に特有の塩基配列パターンの解明が期待される。

BIL1/BZR1 と相互作用する転写因子を Y2H 法により網羅的に解析した結果、シロイヌナズナにおいて複数の転写因子が BIL1/BZR1 と相互作用することが見出された。また、これらの転写因子は複数の転写因子ファミリーに分布しており、BIL1/BZR1 が幅広いタイプの転写因子と相互作用することが示唆された。この中には、種子発芽などの生理機能に関わる転写因子が含まれ、転写因子間の相互作用を介した BR と他のシグナル伝達のクロストークの理解につながる可能性がある。新たに同定された転写因子との組み合わせに対しても、本研究で検討した拡張型 DAP-seq 法を適用することで、BIL1/BZR1 を介した BR 応答性遺伝子の発現調節機構のさらなる解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishida H, Nosaki S, Suzuki T, Ito M, Miyakawa T, Nomoto M, Tada Y, Miura K, Tanokura M, Kawaguchi M, Suzuki T	4. 巻 33
2. 論文標題 Different DNA-binding specificities of NLP and NIN transcription factors underlie nitrate-induced control of root nodulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2340-2359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab103	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 Furuya T, Saito M, Uchimura H, Satake A, Nosaki S, Miyakawa T, Shimadzu S, Yamori W, Tanokura M, Fukuda H, Kondo Y	4. 巻 33
2. 論文標題 Gene co-expression network analysis identifies BEH3 as a stabilizer of secondary vascular development in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 2618-2636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koab151	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 Nosaki S, Mitsuda N, Sakamoto S, Kusubayashi K, Yamagami A, Xu Y, Bui TBC, Terada T, Miura K, Nakano T, Tanokura M, Miyakawa T	4. 巻 8
2. 論文標題 Brassinosteroid-induced gene repression requires specific and tight promoter binding of BIL1/BZR1 via DNA shape readout	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 1440-1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-022-01289-6	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 Kidokoro S, Konoura I, Soma F, Suzuki T, Miyakawa T, Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K	4. 巻 120
2. 論文標題 Clock-regulated coactivators selectively control gene expression in response to different temperature stress conditions in Arabidopsis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2216183120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2216183120	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 -

1. 著者名 Hashimoto T, Hashimoto K, Shindo H, Tsuboyama S, Miyakawa T, Tanokura M, Kuchitsu K	4. 巻 175
2. 論文標題 Enhanced Ca <sup>2+</sup> binding to EF hands through phosphorylation of conserved serine residues activates M <sub>p</sub> RBOHB and chitin triggered ROS production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 e14101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pp1.14101	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 -

1. 著者名 宮川拓也, 中野雄司	4. 巻 81
2. 論文標題 ブラシノステロイド応答遺伝子を発現制御する転写因子のDNA形状認識機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 318-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tachibana R, Abe S, Marugami M, Yamagami A, Akema R, Ohashi T, Nishida K, Nosaki S, Miyakawa T, Tanokura M, Kim JM, Seki M, Inaba T, Matsui M, Ifuku K, Kushiro T, Asami T, Nakano T	4. 巻 15
2. 論文標題 BPG4 regulates chloroplast development and homeostasis by suppressing GLK transcription factors and involving light and brassinosteroid signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44492-5	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 -

1. 著者名 Surina S, Yamagami A, Miyaji T, Chagan Z, Chung KM, Mitsuda N, Nishida K, Tachibana R, Zhu Z, Miyakawa T, Shinozaki K, Sakuta M, Asami T, Nakano T	4. 巻 N/A
2. 論文標題 BIL9 Promotes Both Plant Growth via BR Signaling and Drought Stress Resistance by Binding with the Transcription Factor HDG11	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant & Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcae009	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 Chagan Z, Nakata G, Suzuki S, Yamagami A, Tachibana R, Surina S, Fujioka S, Matsui M, Kushiro T, Miyakawa T, Asami T, Nakano T	4. 巻 N/A
2. 論文標題 BRZ-INSENSITIVE-LONG HYPOCOTYL8 inhibits kinase-mediated phosphorylation to regulate brassinosteroid signaling	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plphys/kiae191	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 宮川拓也, 中野雄司	4. 巻 62
2. 論文標題 植物特異的転写因子のDNA形状読み取りによる遺伝子発現制御	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 160-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮川拓也
2. 発表標題 ブラシノステロイド情報伝達の構造生物学と多階層アプローチへの展望
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーjing学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野崎翔平, 光田展隆, 坂本真吾, 山上あゆみ, 徐玉群, Bui Thi Bao Chau, 寺田透, 三浦謙治, 中野雄司, 田之倉優, 宮川拓也
2. 発表標題 ブラシノステロイド応答性の遺伝子抑制にはマスター転写因子のDNA形状認識が必須である
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川拓也
2. 発表標題 植物特異的転写因子のDNA形状認識による転写調節
3. 学会等名 第18回京大植物縦横無尽の会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 查干扎那, 山上あゆみ, 中田元基, 松井南, 久城哲夫, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイドシグナル伝達上の新規因子BIL8のBIN2キナーゼとの相互作用機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 查干扎那, 山上あゆみ, 中田元基, 松井南, 久城哲夫, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 新規タンパク質BIL8はGSK3-likeキナーゼBIN2を介してブラシノステロイドシグナルを調節する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shohei Nosaki, Nobutaka Mitsuda, Shingo Sakamoto, Takeshi Nakano, Masaru Tanokura, Takuya Miyakawa
2. 発表標題 Molecular and structural mechanism underlying the brassinosteroid-responsive transcriptional regulation by the master transcription factor BIL1/BZR1
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田快世, 中村佑介, 宮地朋子, 山上あゆみ, 野澤彰, 澤崎達也, 鈴木健裕, 堂前直, 宮川拓也, 松井南, 藤岡昭三, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 新規因子BIL7によるBRシグナル伝達促進機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大橋隆生, 立花諒, 山上あゆみ, 宮川拓也, 中野雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイドシグナル伝達因子BPG4とGLK転写因子による葉緑体制御機構の構造生物学的解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 明間莉乃, 立花諒, 山上あゆみ, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイド新規シグナル伝達因子BGHsによる脱黄化時の緑化制御機構の解明
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田快世, 中村佑介, 宮地朋子, 山上あゆみ, 鈴木健裕, 堂前直, 宮川拓也, 松井南, 藤岡昭三, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 新規ブラシノステロイドシグナル伝達因子BIL7による転写因子制御機構の解明
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年



1. 発表者名 西本彩乃, 山上あゆみ, 石川典子, 柏原正和, Ganbayar Namuunaa, Bardorj Bujin, 森晶樹, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイド新規シグナル伝達因子BIL7の高発現イネにおける生理機能の解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大橋隆生, 立花諒, 山上あゆみ, 宮川拓也, 中野雄司
2. 発表標題 ブラシノステロイドシグナル伝達因子BPG4とGLK転写因子による葉緑体制御機構の生化学解析
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 明間莉乃, 立花諒, 山上あゆみ, 田中亮一, 浅見忠男, 中野雄司
2. 発表標題 暗所誘導型新規遺伝子BGHsによる黄化芽生えにおける緑化順応制御機構の解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>植物の成長を促す植物ホルモンの遺伝子発現調節の新しい仕組み  <a href="https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-12-28">https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-12-28</a></p>
---

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
研究分担者	中野 雄司  (Nakano Takeshi)  (30281653)	京都大学・生命科学研究科・教授    (14301)	
研究分担者	光田 展隆  (Mitsuda Nobutaka)  (80450667)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長    (82626)	
研究分担者	野崎 翔平  (Nosaki Shohei)  (20850910)	筑波大学・生命環境系・助教    (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関