

植物ホルモン・ブラシノステロイドによる
遺伝子発現調節機構に関する生化学的解析

重田 友明

2014

**Biochemical analysis of the mechanism for regulation
of brassinosteroid-responsive gene expression in
Arabidopsis cultured cells**

Tomoaki Shigeta

2014

目次

略語一覧	6
第 1 章 総合緒言	
1-1 節 総合緒言	9
1-2 節 図表	13
第 2 章 核画分に存在するブラシノステロイド (BR) 応答性タンパク質 の網羅的解析	
2-1 節 緒言	18
2-2 節 材料及び方法	20
2-2-1 項 植物材料及び培養条件	20
2-2-2 項 植物ホルモン及び生合成阻害剤の処理	20
2-2-3 項 細胞の形態学的解析	21
2-2-4 項 核の分画及びタンパク質の抽出	21
2-2-5 項 タンパク質の前処理及び二次元電気泳動	22
2-2-6 項 ゲル染色によるタンパク質の検出及びゲル画像の解析	23
2-2-7 項 タンパク質の同定	24
2-3 節 結果及び考察	27
2-3-1 項 ブラシノライド (BL) 及びブラシナゾール (Brz) 処理が シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 の成長に与える効果	27
2-3-2 項 BL 及び Brz 処理が核画分に存在するタンパク質の 総量に与える影響	29
2-3-3 項 核画分に存在する BR 応答性タンパク質の存在量変化	29

2-3-4 項	質量分析法による BR 応答性タンパク質の同定	31
2-3-5 項	BL 処理に対する BR 応答性核タンパク質の初期応答	35
2-4 節	図表	39
第 3 章 BR 依存的に形成される Heat shock protein 90 (HSP90) 複合体		
の特性解析		
3-1 節	緒言	52
3-2 節	材料及び方法	55
3-2-1 項	植物材料及び培養条件	55
3-2-2 項	植物ホルモン及び各種阻害剤の処理	55
3-2-3 項	プラスミドの構築	55
3-2-4 項	シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 の形質転換	57
3-2-5 項	<i>In vitro</i> タンパク質合成及び脱リン酸化	58
3-2-6 項	細胞の分画及びタンパク質の抽出	58
3-2-7 項	イムノブロット	59
3-2-8 項	タンパク質の精製	60
3-2-9 項	<i>In vitro</i> 共免疫沈降	62
3-2-10 項	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析	62
3-2-11 項	AlphaScreen	63
3-2-12 項	リアルタイム PCR	63
3-3 節	結果及び考察	65
3-3-1 項	シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 における HSP90 複合体の 細胞内分布及び分子特性	65

3-3-2 項	HSP90 を含む高分子複合体の BR 依存的な質的量的変化	66
3-3-3 項	抗 HSP90 抗体を用いた免疫沈降画分に存在する HSP90.3 の同定.....	67
3-3-4 項	BES1 と HSP90 の BR 依存的な分子間相互作用	68
3-3-5 項	<i>In vitro</i> における BES1 と HSP90.3 の ATP 依存的な分子間相互作用...	70
3-3-6 項	BR 生合成遺伝子のフィードバック制御における BES1/HSP90 複合体の関与	72
3-4 節	図表	75
第 4 章	総合考察	86
第 5 章	要旨	90
第 6 章	Summary	92
謝辞	94
参考文献	96

略語一覽

ABA	Abscisic acid
BAS1	PhyB activation-tagged suppressor 1
BES1	Brassinosteroid insensitive 1-EMS-suppressor 1
BIM1	BES1-interacting Myc-like protein 1
BIN2	Brassinosteroid insensitive 2
BL	Brassinolide
BN/SDS-PAGE	Two-dimensional blue native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
BR	Brassinosteroid
BR11	Brassinosteroid insensitive 1
Brz	Brassinazole
BSA	Bovine serum albumin
BZR1	Brassinazole resistant 1
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus 35S promoter
CBB	Coomassie brilliant blue
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase
CPD	Constitutive photomorphogenesis and dwarfism
DHFR	Dihydrofolate reductase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol

DWF4	Dwarf 4
ELF6	Early flowering 6
GDA	Geldanamycin
HATs	Histone acetyltransferases
HAT1	Homeodomain leucine zipper protein 1
HDACs	Histone deacetylases
HD2B	Histone deacetylase 2B
HF-BES1	6×His-FLAG-BES1
HSP90	Heat shock protein 90
IAA	Iodoacetamide
IEF	Isoelectric focusing
IWS1	Interact with spt6 1
JPL	Jouanneau and Péaud-Lenoél
KDM4B	K demethylase 4B
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MYBL2	Myeloblastosis family transcription factor-like 2
MYB30	Myeloblastosis family transcription factor 30
NAP1	Nucleosome assembly protein 1
NSV	Normalized spot volume
OA	Okadaic acid
PP2A	Protein phosphatase 2A
REF6	Relative of early flowering 6

RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAM syn.2	S-adenosylmethionine synthetase 2
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TAP	Tandem affinity purification
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
UBQ10	Polyubiquitin 10
VIP3	Vernalization independence 3
2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

第 1 章 総合緒言

1-1 節 総合緒言

大地で固着生活を営む植物は、様々な環境変化に順応するための巧妙な内的制御系を備えている。その一例として、植物ホルモン（植物生長調節物質）を伝達物質とした環境応答機構が挙げられる。すなわち、環境変化に遭遇した植物は、体内に保持されている（内生の）植物ホルモンの存在量を変化させることやそれに対する感受性を調節することで、新しい環境に適応した形態や新規の代謝応答を構築する。また、環境応答とは別に、植物ホルモンは遺伝的にプログラムされた発生や分化においても重要な役割を果たしている。したがって、植物ホルモンの生理機能や作用機序、特に情報伝達経路を解明することは、植物の発生や分化、外的刺激に対する応答の根幹をなす分子機構の理解に不可欠である（Durbak et al., 2012; Vanstraelen and Benková, 2012）。

ブラシノステロイド（BR）は、ステロイド骨格を持ち、非常に低濃度（ナノモル水準）で細胞分裂の活性化や細胞伸長の促進、維管束系の分化、花成や老化の移行、光形態形成の促進など多彩な生理現象を調節している植物ホルモンである（Clouse and Sasse, 1998）。近年では、BR は植物の光合成や呼吸、蒸散で重要な役割を果たす気孔の形成を制御することも報告されている（Gudesblat et al., 2012; Kim et al., 2012; Khan et al., 2013）。最も生理活性が強い BR として、1979 年にセイヨウアブラナの花粉からブラシノライド（BL）が単離され、その化学構造が明らかにされた（Figure 1; Grove et al., 1979）。現在では、数多くの類縁化合物が被子植物や裸子植物、シダ植物、コケ植物などから幅広く発見されている。

興味深いことに、BR はウイルス、細菌、カビなどの生物的ストレスや高温・低

温、乾燥、塩などの非生物的ストレスに対する抵抗性を植物に付与すること、加えて、不良環境下において種々の作物に生育改善効果や増収効果をもたらすことが報告されている (Khripach et al., 2000; Krishna, 2003; 岡本ら、2007; Divi and Krishna, 2009)。例えば、高温、乾燥、病原菌などの環境ストレス下に植物をおくと、無処理区に比べて BR 処理区の植物では生育が顕著に改善されていた (Nakashita et al., 2003; Kagale et al., 2007)。しかしながら、BR の安定性や活性持続性が低いこと、適切な投与時期や部位が特定されていないこともあり、実際に BR 投与によって明確な効果が観察されないことも多い (Kamuro and Takatsuto, 1999)。

上述のような背景の下、近年、BR の生合成や情報伝達に関与する遺伝子の人為的な制御による作物の増産を目指した研究も広く展開されている。例えば、トウモロコシ、イネ、シロイヌナズナに由来する BR 合成酵素・ステロール C22 位水酸化酵素の遺伝子を導入したイネは野生型に比べて分げつ数が増し、さらに種子の数や重量も増加することが報告されている (Wu et al., 2008)。さらに、シロイヌナズナに由来する BR 関連転写因子 Brassinazole resistant 1 (BZR1)の優性突然変異遺伝子 *bzr1-1D* を過剰発現させたトマトは野生型に比べ、果実のカロテノイド量が増加することが観察されている (Liu et al., 2014)。また、実際に優良品種として広く栽培されているオオムギの渦系統 (*uzu* 変異体) の原因遺伝子は、BR の受容体遺伝子 *Hordeum vulgare Brassinosteroid insensitive 1 (BR1)* の点突然変異体であることが解明されている (Chono et al., 2003)。加えて、半矮性かつ耐雪性の品種であるソラマメの倫玲 (*rinrei* 変異体) の形質がシロイヌナズナの BR 生合成遺伝子 *Dwarf1* のオーソログ遺伝子 *BR deficit dwarf 1* の欠損変異に起因することも報告されている (Fukuta et al., 2004)。上述の研究報告は、BR の作用機序に関わる細胞内因子の働きを分子レベルで解明することが、BR の特性を作物育種に有効に

活用する上で大変重要であることを示唆する。

これまで、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やイネ (*Oryza sativa*) を用いた分子遺伝学的手法によって BR 情報伝達に関与する様々な因子が同定され、これに関するモデルも提唱されている (Figure 2; Kim and Wang, 2010; Clouse, 2011; Ye et al., 2011; Guo et al., 2013; Zhu et al., 2013)。簡単に説明すると、BR が細胞膜上に局在する BRI1 に感知される (Li and Chory, 1997; Wang et al., 2001; Kinoshita et al., 2005) と、その情報は様々なタンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応を経て、最終的に転写因子である BRI1-EMS-suppressor 1 (BES1) 及び BZR1 に伝達される (Wang et al., 2002; Yin et al., 2002)。BR が十分量存在しているとき、BES1/BZR1 転写因子をリン酸化する酵素 Brassinosteroid insensitive 2 (BIN2) が不活化され (Kim et al., 2009)、同時に Protein phosphatase 2A (PP2A) が BES1 及び BZR1 を脱リン酸化する (Tang et al., 2011)。このようにして両転写因子は活性化されるとともに核に蓄積し (Ryu et al., 2007; 2010)、それぞれ 250 種及び 953 種にもおよぶ標的遺伝子の発現を制御する (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011)。一方、BR が枯渇しているとき、BIN2 が BES1 及び BZR1 をリン酸化し、それらの機能を不活化する (He et al., 2002)。

上述のように、BR 情報伝達経路の大筋は解明されてきたが、BES1 及び BZR1 を始めとする核に局在するタンパク質がどのようにして数多くの BR 応答性遺伝子の発現を制御しているのか?、どのような生化学的な仕組みが存在するのか? という点は未だ不明な点が多い。環境ストレスに対する応答やアブシシン酸 (ABA) の情報伝達の下流では、ヒストンタンパク質のメチル化やアセチル化により転写領域のクロマチン構造が弛緩することで、遺伝子の発現が活性化することが明らかにされている (Chinnusamy et al., 2008; Kim et al., 2010)。しかし、BR による転写制御とクロマチンリモデリングの関

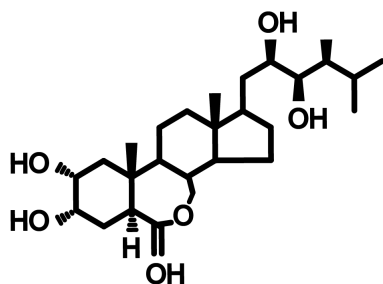
係性を示す結果は報告されていない。近年、BES1 は標的遺伝子の制御を行う際に、種々のタンパク質と複合体を形成することが分かってきた (Table 1)。これらのことより、BR の制御下にある核タンパク質や BES1 が複合体を形成するパートナー・タンパク質を同定し、それらの特性を生化学的に明らかにすることは、BR 情報伝達と標的遺伝子の発現制御の両機構の全容解明にとって重要な課題であると考えられる。

上記の生化学的解析を行うためには、均質な材料を一定量以上、しかも安定的に入手する必要がある。そこで、本研究ではシロイヌナズナの生態型 Columbia の芽生えから誘導された懸濁培養細胞 T87 株を用いた。(Axelos et al., 1992)。当該研究室で行われた従前の研究から、シロイヌナズナ芽生えの各器官は BR に対して異なる応答を示すことが分かっている (Tanaka et al., 2003)。例えば、シロイヌナズナの下胚軸や子葉の成長は BL 処理によって促進されるが、根の成長は阻害される。このことは BR に対する感受性や応答がそれぞれの器官や組織で異なっていることを示唆する。一方、T87 細胞は、比較的均質な細胞種から構成され、増殖速度も早いので、大量の材料を安定的に入手することが可能である。加えて、それは ABA やサイトカイニンの作用機構に関する生化学的な研究に使用された実績もあるので (Yoshida et al., 2002; Yamada et al., 2004; Li et al., 2012)、BR 情報伝達機構の生化学的解明を目指す本研究に適していると考えられる。

著者は、BR 情報伝達に依存した遺伝子発現機構の一端を明らかにするため T87 細胞を用いた生化学的解析を行った。本論文では、これらの実験より得られた新知見を報告する。なお、本論文の内容は大きく 2 つの章から構成されている；内生の BR 濃度に応じて質的量的な変化を示す核タンパク質の検索と同定 (第 2 章) と BES1 と複合体を形成するタンパク質の解析 (第 3 章) である。

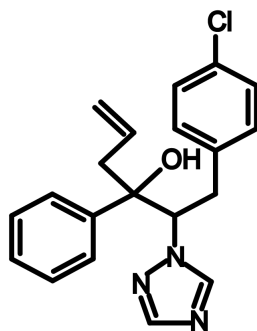
1-2 節 図表

Brassinolide (BL)



(22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-
24-methyl-B-homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-one
C₂₈H₄₈O₆

Brassinazole 2001 (Brz)

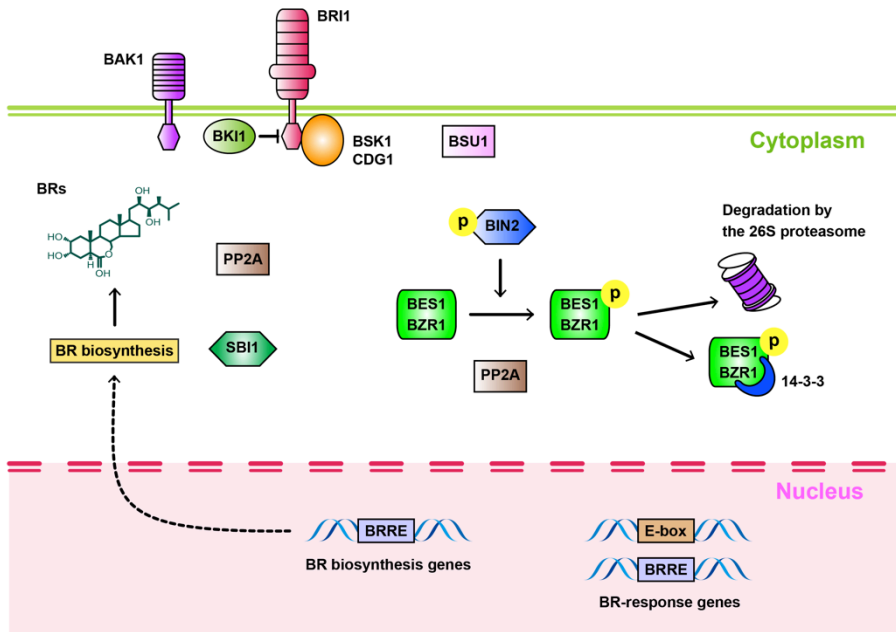


3-Phenyl-2-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)-1-(
4-chlorophenyl)-5-hexene-3-ol
C₂₀H₂₀ClN₃O

Figure 1. Structure of brassinolide and brassinazole

Brassinolide (BL) is the most bioactive BR, which is synthesized from campesterol in *Arabidopsis*. Brassinazole 2001 (Brz), a specific BR biosynthesis inhibitor is a triazole derivative that inhibits a C-22 hydroxylase, DWARF4 activity.

A



B

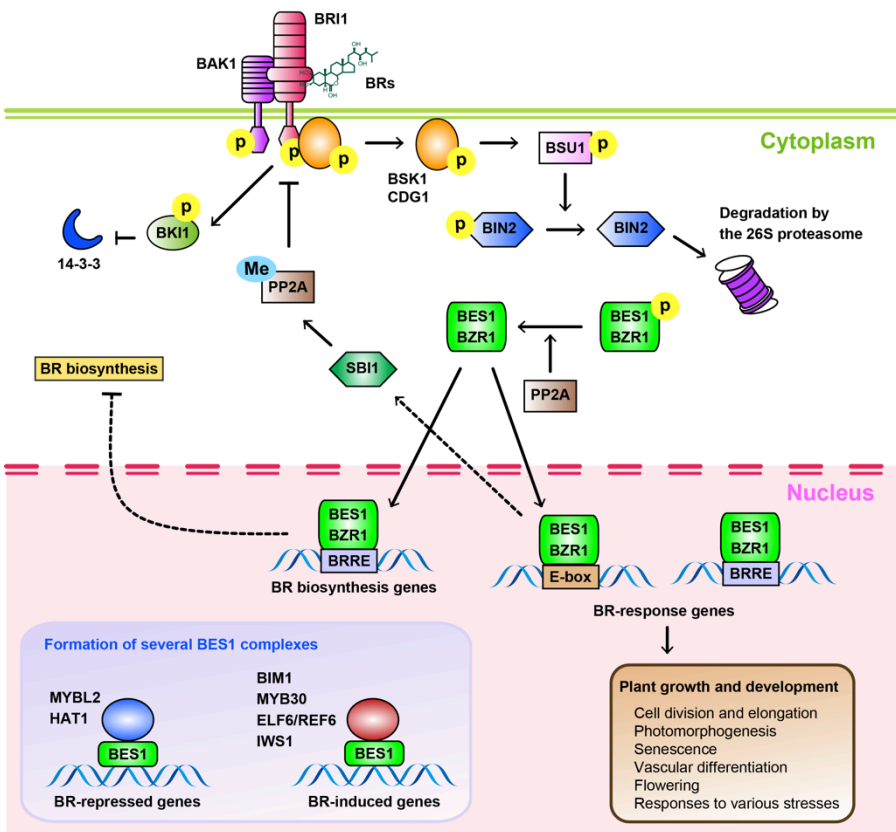


Figure 2. A model of BR signaling in *Arabidopsis*

(A) When BRs are not perceived by BRI1, BKI1 interacts with the C-terminus of BRI1 and inhibits kinase activity of BRI1. At the same time, the phosphorylated form of BIN2 phosphorylates BES1 and BZR1, leading to their degradation by the 26S proteasome and/or cytoplasmic retention by their interaction with 14-3-3. As a result, they cannot accumulate in the nucleus and bind to DNA. **(B)** When BRs bind to BRI1, activated BRI1 associates with co-receptor BAK1 in addition to its phosphorylation and dissociation of BKI1. Released BKI1 binds to 14-3-3 and inhibits its function. Further activated BRI1 by sequential transphosphorylation of BRI1 with BAK1 phosphorylates BSK1 and CDG1 kinases that interact with BSU1 phosphatase. BIN2 inactivated by BSU1 leads to 26S proteasome degradation. Concomitantly, PP2A phosphatase activates the phosphorylated form of BES1 and BZR1, resulting in increase of their accumulation in the nucleus. Subsequently, BES1 and BZR1 bind to E-box and BRRE motifs of promoter regions of BR-regulated genes to regulate their expression. For example, BES1 and BZR1 down-regulate BR biosynthesis genes. In addition, BES1 forms a protein complex with several partners to regulate genes for various BR responses. To terminate BR signaling, PP2A interacts with and then dephosphorylates activated BRI1, which is facilitated by its methylation by SBI1 produced in a BR-dependent manner. Abbreviations used in this figure are shown as follows: BRI1, BR insensitive 1; BKI1, BRI1 kinase inhibitor 1; BIN2, BR insensitive 2; BES1, BRI1-EMS-suppressor 1; BZR1, brassinazole resistant 1; BAK1, BRI1-associated receptor kinase 1; BSK1, BR signaling kinase 1; CDG1, constitutive differential growth 1; BSU1, BRI1 suppressor 1; PP2A, protein phosphatase 2A; BRRE, BR response element; SBI1, suppressor of BRI1; MYBL2, myeloblastosis family transcription factor-like 2; HAT1, homeodomain leucine zipper protein 1; BIM1, BES1-interacting Myc-like protein 1; MYB30, myeloblastosis family transcription factor 30; ELF6, early flowering 6; REF6, relative of early flowering 6; IWS1, interact with spt6 1; P, phosphorylation; Me, methylation.

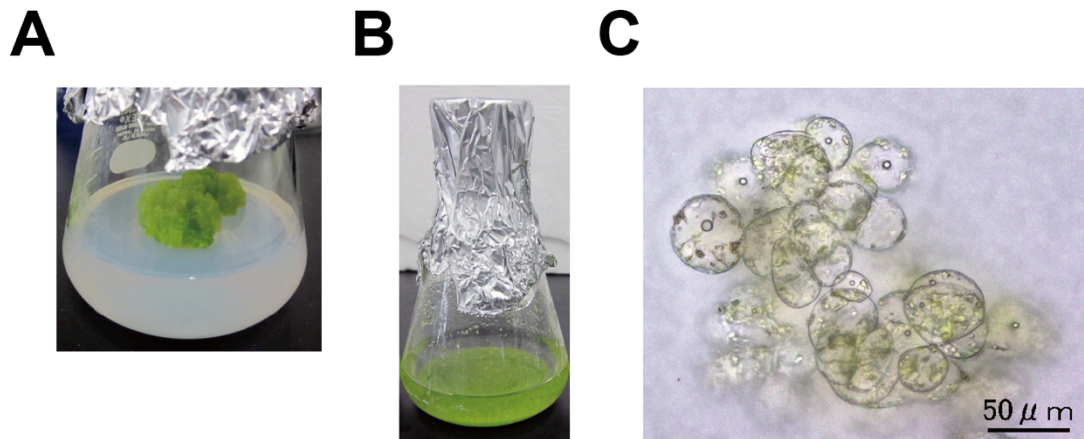


Figure 3. Photographs of *Arabidopsis* cultured cells

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. (ecotype Colombia) T87 suspension-cultured cells were maintained in JPL (Jouanneau and Péaud-Lenoël) medium with agar (**A**) or without agar (**B**). Cells were grown at 22 °C with orbital agitation (120 rpm) under a 16/8 h light dark regime. Every 14 days, 0.6 ml aliquots of cell suspension in (**B**) were transferred to 30 ml of fresh medium and incubated successively under the same conditions. (**C**) Microscopic observation of the cells.

Table 1. BES1-interacting proteins

Protein	Function	Experimental strategy	Reference
BIM1		Yeast two hybrid	Yin et al., 2005
MYB30	Transcriptional regulation	Microarray and ChIP	Li et al., 2009
MYBL2		ChIP-chip	Ye et al., 2012
HAT1		ChIP-chip	Zhang et al., 2014
ELF6	Histone demethylation	Yeast one hybrid	Yu et al., 2008
REF6			
IWS1	Transcriptional elongation	Screening for suppressors of <i>bes1-D</i>	Li et al., 2010
14-3-3	Cytoplasmic retention	Yeast two hybrid	Gampala et al., 2007

Abbreviation of each protein is shown as follows: BIM1, BES1-interacting Myc-like protein 1; MYB30, myeloblastosis family transcription factor 30; MYBL2, myeloblastosis family transcription factor-like 2; HAT1, homeodomain leucine zipper protein 1; ELF6, early flowering 6; REF6, relative of early flowering 6; IWS1, interact with spt6 1.

第 2 章 核画分に存在するブラシノステロイド応答性タンパク質の網羅的解析

2-1 節 緒言

本研究は、第 1 章で述べたように、T87 細胞を BR 情報伝達の生化学的解析に利用することを計画したが、内生 BR 量の変化が T87 細胞の生理的パラメーターに影響を与えることを調べた報告は認められない。そこで、本章では最初に、活性型 BR である BL や BR 生合成酵素の阻害剤であるブラシナゾール (Brz) を T87 細胞の培養液中に直接投与することによって、BL や Brz が T87 細胞の形態に与える影響を確認した。

Brz は、自身のトリアゾール基を介して、BR の側鎖の 22 位水酸化を触媒する Cytochrome P450 monooxygenases である DWARF4 (DWF4) に直接結合し、その活性を阻害する化合物である (Figure 2; Asami et al., 2000; 2001; Sekimata et al., 2001)。浅見らの報告によると、Brz (5 μ M) を処理したニチニチソウの培養細胞において、新鮮重 1 g あたりの BL 量が 0.25 ng から検出限界以下に減少していた (Asami et al., 2001)。さらに、Brz を投与し育てられたシロイヌナズナの芽生えは矮化し、暗緑色で曲がった葉を持つ典型的な BR 欠損変異体と同様な表現型を示した (Asami et al., 2000; Tanaka et al., 2003; 2005)。これらの知見は、Brz によって植物細胞内の BR 量が枯渇した結果、BR が作用せずに異常な形態を示していることを推測させる。Brz を用いる利点として、BR 欠損変異体とは全く異なり、植物細胞内の BR 量を低下させる時期を任意に設定できることが挙げられる。もう 1 つの利点として、Brz による BR 量の枯渇の初期に生じる遺伝子発現やタンパク質量の変化を処理直後から経時的に調べることが可能である。一方、BR 欠損変異体の場合では恒常的に BR が枯渇しているので、2 次的影響を考慮する必

要がある。

本章では、BR 応答性遺伝子の発現制御に関わると予想される因子の挙動を明らかにすることを最大の目的とした。そのために、BL 処理や Brz 処理によって内生の BR 濃度が変化した T87 細胞から細胞核を調製した。そして、そこに存在するタンパク質を 2 次元電気泳動法 (2D-PAGE) によって網羅的に解析した。2D-PAGE は、様々な刺激に応答して質的量的変化を示すタンパク質の網羅的な検出に有効な分析方法である。しかしながら、2D-PAGE は様々な存在量を示すタンパク質を 1 枚のゲル中で検出するため、存在量がわずかなタンパク質は解析が困難になるという短所を持つ。シロイヌナズナから得られた全タンパク質の 2D-PAGE 分析では、既知の BR 情報伝達因子の検出には成功していない (Deng et al., 2007)。一方で、Tang et al. (2008) は、シロイヌナズナの膜画分に存在するタンパク質を限定的に解析することによって、BR 情報伝達に関わる Brassinosteroid signaling kinase 1 を発見した。この研究報告より、核に存在するタンパク質に限定して、それらの挙動や特性を明らかにすることは、BR 情報伝達に関わる新規な因子の発見を可能にすることが予想される。

上述のような背景の下、本研究では、BL や Brz の処理による内生 BR 量の変化が T87 細胞の成長に及ぼす影響に加え、核画分中のタンパク質の存在量に与える影響を調べた。さらに、その中で特に顕著に変化するタンパク質の同定も試みた。本章では、BR 応答性核タンパク質の解析結果に基づいて、BR による遺伝子発現制御機構におけるそれらの役割について議論する。

2-2 節 材料及び方法

2-2-1 項 植物材料及び培養条件

シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 株は、理化学研究所バイオリソースセンターより分与して頂いた (Figure 3)。この細胞は Jouanneau and Péaud-Lenoél (JPL) (Jouanneau and Péaud-Lenoél, 1967) 培地で培養した。液体培養した T87 細胞の継代培養方法は以下に示す通りである。2 週間培養した細胞懸濁液 0.6 mL をクリーンベンチ内で新鮮な JPL 培地 30 mL を含む 100 ml 容三角フラスコに移した。その後、22 °C、16 時間明所、8 時間暗所のもと 120 rpm で巡回培養した。

2-2-2 項 植物ホルモン及び生合成阻害剤の処理

ブラシノライド (BL) は、Brassino Co. (Toyama, Japan) より購入した。ブラシナゾール 2001 (Brz) は、東京大学大学院農学生命科学研究科の浅見忠男教授及び理化学研究所名誉研究員の吉田茂男博士に分与して頂いた (Sekimata et al., 2001)。BL と Brz はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、それぞれ 0.1 mM と 5 mM のストック溶液を調製した。その後、それらは -80°C で冷凍保存した。JPL 培地 30 mL に 0.1 mM BL や 5 mM Brz を 30 µL 加え、終濃度 0.1 µM 及び 5 µM とした。その後、BL や Brz を含む JPL 培地に、2 週間培養した T87 細胞の懸濁液を 2 mL 加え、22 °C、16 時間明所、8 時間暗所のもと 120 rpm で巡回培養した (0、2、4、8 日間)。2-3-5 項の実験では、継代培養後 2 日目の細胞懸濁液に BL を添加し、更に 0、6、12 時間の培養を行った。

2-2-3 項 細胞の形態学的解析

細胞の乾燥重の計測は、以下の手順で行った。細胞懸濁液 10 mL を遠心管に移し、遠心分離を行った (1000×g、5 分)。その後、上清の培地を完全に取り除き、遠心管内の細胞を脱イオン水で 3 回洗浄した。洗浄後の細胞は、-20 °C で凍結させ、更に一晩の凍結乾燥を行った。最後に、電子天秤で重量を測定し、あらかじめ測定しておいた遠心管の重量を差し引くことで乾燥重とした。

細胞の長径の計測は、以下のように行った。細胞懸濁液 1 mL を遠心分離 (1000×g、5 分) し、培地上清を除去した。残渣の細胞を Olympus IX70 倒立型顕微鏡 (OLYMPUS Co., Tokyo, Japan) で観察し、デジタルカメラで無作為に撮影した。1 試料につき、100 個の細胞の長径を定規で計測し、平均値を算出した。

細胞の形態観察には、低真空型の走査電子顕微鏡である Miniscope TM-1000 (Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan) を使用した。観察の試料として、BL や Brz を処理し、4 日間培養した細胞の懸濁液から培地を除いた残渣をカーボンシートの上に広げたものを用いた。観察における顕微鏡の倍率は 200 倍と 3000 倍を採用した。

2-2-4 項 核の分画及びタンパク質の抽出

T87 細胞における核の分画及びタンパク質の抽出は、CellLytic Plant Nuclei (PN) Isolation/Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を使用し、操作手順は付属のマニュアルに従った。核の収量低下を防ぎ、多くの核タンパク質を抽出するため、核はショ糖重層液による半精製によって調製した。また、単離した核画分中のタンパク質は、

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) を用いて定量した。

2-2-5 項 タンパク質の前処理及び二次元電気泳動

CellLytic PN kit で抽出したタンパク質にはバッファー由来の高濃度の塩が含まれているため、Tang et al. (2008) に従って、これの脱塩濃縮を行った。まず、100 μg のタンパク質を含む試料溶液に対して、100 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノールを 5 倍量添加し、混和した。その後、氷上にて 2 時間静置し、タンパク質を沈殿させた。最高速度で遠心分離し (4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間)、上清を取り除いた残渣に 1 mL の氷冷メタノールを静かに添加し、軽く上下に攪拌した。そして、氷上にて 30 分間静置させた。最高速度で遠心分離し (4 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分間)、上清を取り除いた後の沈殿物を風乾させた。最後に、IPG buffer, pH 3-10 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) を終濃度 0.5 % になるように DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) と混合した溶液 200 μL に沈殿物を完全に溶解させて、二次元電気泳動法のための試料とした。

2D-PAGE の一次元目である等電点電気泳動 (IEF) は、ストリップゲルとして Immobiline DryStrip pH 3-10 NL, 11 cm (GE Healthcare) を使用し、泳動装置として Ettan IPGphor IEF system (GE Healthcare) を用いた。操作の概略は以下の通りである。100 μg のタンパク質を含む試料溶液 200 μL をストリップホルダーの中心に滴下した。その後、ストリップホルダー中の試料溶液を染み込ませるようにストリップゲルを静かに置いた。泳動中におけるゲルの乾燥を防ぐために、ゲルの上に 200 μL の Plus One DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) を添加し、ゲル全体を覆った。最後に、IPGphor に蓋をしたストリップホルダーを置き、22 $^{\circ}\text{C}$ にてゲルを 14 時間膨潤させた。電圧を 300V、600V、

1000V、5000V、8000V で各 3 時間、8000V で 4 時間に設定し、タンパク質の分離を行った。泳動後のストリップゲルをストリップホルダーから取り出し、丁寧にシリコンオイルを拭き取った。さらに、二次元目のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) の前処理として、ストリップゲル中のタンパク質の還元アルキル化を行った。ストリップゲルを終濃度 50mM のジチオスレイトール (DTT) を添加した NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies Co., Carlsbad, CA) を含む 15 mL 容遠心管の中に浸し、30 分間振とうした。そして、ゲルを終濃度 125 mM のヨードアセトアミド (IAA) を添加した NuPAGE LDS sample buffer に移し、更に 30 分間振とうした。還元アルキル化処理後のストリップゲルの両端を計 5cm 切り落とし、6 cm のストリップゲル (pH 4-7) とした。これを NuPAGE Novex 12 % Bis-Tris gel, 1.0 mm, 2D well (Life Technologies) のウェルに挿入した。その上から、泳動バッファーである 1×NuPAGE MOPS SDS running buffer (Life Technologies) に溶解させた 1 %アガロース溶液を流し込むことで、ゲルを封入した。最後に、ゲルを XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System (Life Technologies) に固定し、泳動バッファーを満たした後、泳動を行った (30 mA 定電流)。

2-2-6 項 ゲル染色によるタンパク質の検出及びゲル画像の解析

全タンパク質を検出するために、2D-PAGE 後のゲルは SYPRO Ruby protein gel stain (Life Technologies) による蛍光染色に供試した。染色操作は付属のマニュアルに準じた。染色後のゲルは、FLA-5000 (Fujifilm Co., Tokyo, Japan) で読み取り、画像データとして取得した。ゲル画像の解析に関して、PDQuest version 7.4 ソフトウェア (Bio-Rad)

を使用した。解析操作はマニュアルに従ったので、以下に簡単な解析の流れを示す。まず、ゲル画像をソフトウェアに取り込み、ノイズの除去や染色のバックグラウンドの補正を行った。続いて、それぞれ取得したゲル画像でスポットを自動検出し、異なるゲル画像間でのタンパク質スポットをマッチングさせた。その後、ゲル間の染色差を補正するために、画像のノーマライゼーション処理 (Total quantity in valid spots) を行った。最後に、異なるゲル間における同一スポットの蛍光量をタンパク質の存在量、すなわち Normalized spot volume (NSV) として表すことで、比較解析を行った。

2-2-7 項 タンパク質の同定

本研究では、Shevchenko et al. (2006) の手法に改変を加え、質量分析計によるタンパク質同定のための試料を調製した。以下に、その詳細を示す。まず、2D-PAGE ゲルから標的のタンパク質スポットを切り出した。蛍光染色したゲルは、Safe Imager 2.0 Blue Light Transilluminator (Life Technologies) によって可視化した。切り出したゲル片に、100 μ L の脱染色液 (50 %アセトニトリル、100 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、室温で 15 分間振とうし、溶液を除いた。この操作を計 2 回行った。100 μ L の 100 %アセトニトリルを加え、5 分間振とうし、ゲルを脱水した。その後、真空デシケーターにてゲル片を 20 分間乾燥させた。乾燥させたゲル片に、終濃度 20 μ g/mL の Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega, Madison, WI) を含む酵素溶液 (10 %アセトニトリル、40 mM 重炭酸アンモニウム) を 10 μ L 加え、120 分間氷上で静置した。ゲル片が膨潤した後に残った酵素溶液を除去し、トリプシンを含まない溶液 (10 %アセトニトリル、40 mM 重炭酸アンモニウム) を 20 μ L 加えた後、37 $^{\circ}$ C で一晩酵素反応させた。トリプシン

ン消化液を回収し、残渣にペプチド抽出液（50 %アセトニトリル、5 %ギ酸）を 50 μ L 加え、室温で 20 分間振とうした。溶液を回収後、抽出操作をもう一度繰り返した。回収した溶液は、減圧遠心エバポレーターでアセトニトリル、ギ酸、重炭酸アンモニウムを揮発させた後、-20 $^{\circ}$ C で一晩凍結させた。最後に、凍結乾燥機にて試料を乾燥させ、冷凍保存した。試料のペプチドは、質量分析計による測定の直前に 10 μ L の 0.1 %ギ酸溶液によく再溶解させた。

ゲル内におけるトリプシン消化で得られたペプチドは、液体クロマトグラフィ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) による測定に用いた。まず、5 μ L の試料をナノ LC である Dina-M HPLC (KYA Technologies Co., Tokyo, Japan) に導入した。LC のカラムには、ペプチドの脱塩濃縮を行う HiQ sil C18W-3 トラップカラム (サイズ : 0.5 mm i.d. \times 1 mm) と分離を行う HiQ sil C18W-3 キャピラリーカラム (サイズ : 0.15 mm i.d. \times 50 mm) を使用した。LC の溶媒として、A 溶媒に 0.1 %ギ酸溶液、B 溶媒に 70 %アセトニトリルを含む 0.1 %ギ酸溶液を用いた。グラジエント分離の条件は以下に示す通りである。流速 200 nL/min の条件下で、溶媒割合 A : 98、B : 2 から送液を開始し、40 分後に A : 0、B : 100、50 分後に A : 98、B : 2 となるような計 60 分間のプログラムを設定した。ナノ LC とオンラインで接続した質量分析計には、Q-STAR XL hybrid quadrupole time-of-flight instrument (AB SCIEX, Toronto, Canada) を使用した。機器の使用法はマニュアルに従ったため、以下に本研究における測定条件を示す。ナノ LC による分離がスタートして 10 分後に、Information Dependent Acquisition (IDA) による MS 及び MS/MS 測定を 50 分間行い、陽イオンを検出した。LC で分離した試料は Electrospray ionization 法 (電圧 1800V) でイオン化させた。そして、1 つ目の四重極型 MS で質量電荷比 (m/z) 400-1800 の範囲内に存在する 2-5 価の親イオンを 1 秒間取得した。続いて、コリジョン

セルにおける親イオンの開裂によって生じたフラグメントイオンを 2 つ目の飛行時間型 MS で $m/z = 50-2000$ の範囲において 2 秒間取得した。この測定では、異なる親イオン由来のフラグメントイオンを取得するために、2 秒間の測定を 3 回繰り返した。また、LC-MS/MS の質量校正は、ヨード酢酸でシステイン残基のアルキル化を行った BSA のトリプシン消化物を用いた。すなわち、 $m/z = 582.3$ の親イオンを開裂させた際に生じる 2 種のフラグメントイオン ($m/z = 86.0964$ 及び $m/z = 951.4782$) をスタンダードとした。

最後に、得られた測定データは ProteinPilot version 2.0 ソフトウェア (AB SCIEX) による解析に供試した。解析条件として、以下の項目を設定した。サンプルタイプを identification、システイン残基の還元アルキル化を iodoacetamide、消化に用いた酵素を trypsin、測定機器を QSTAR ESI、生物種を *Arabidopsis thaliana* とした。加えて、ゲル由来の試料である Gel-based ID を設定し、177 種の生物学的修飾に加え、アミノ酸置換も検索対象にした。検索したデータベースとして、NCBI Inr を用い、徹底的な検索である Through ID を行って、同定したタンパク質の閾値 (Unused ProtScore) を 1.3 (95%) 以上に設定した。同定したタンパク質の細胞内局在や機能は、The Arabidopsis Information Resource (<http://arabidopsis.org/index.jsp>) 及び The UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org>) データベースのアノテーションを用いて調査した。

2-3 節 結果及び考察

2-3-1 項 BL 及び Brz 処理がシロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 の成長に与える効果

現在までに、シロイヌナズナの植物体において、BL や Brz の処理によって引き起こされる生理的な変化を観察した多くの研究が行われてきた。例えば、シロイヌナズナの芽生えにおいて、0.1 μM の BL 処理および 5 μM の Brz 処理は、種々の BR 生合成遺伝子の発現を変化させる (Tanaka et al., 2005)。T87 細胞も植物体と同様に内生 BR 量の変化に伴った生理的な変化を示すかどうかを明らかにするために、0.1 μM の BL や 5 μM の Brz の処理が T87 細胞の成長に与える影響を調べた。

まず、BL 及び Brz を処理した細胞の乾燥重及び細胞の長径の経時的な測定結果を Figure 4 に示した。細胞の乾燥重は、全ての処理区（無処理、BL、BL+Brz、Brz）において、培養 0 日目から 4 日目にかけて直線的に増加した (Figure 4A)。培養 4 日目の細胞の乾燥重は、無処理区 ($12.5 \pm 1.7 \text{ mg}$) に比べて、BL 処理区で約 30 % 増加し、Brz 処理区で約 18 % 減少していた。このことは、内生の BR 濃度の上昇による細胞成長の促進が乾燥重の増加を引き起こしていることを示唆する。加えて、乾燥重の変化は BL 処理 2 日目の細胞でさえも観察されたので、投与した BL が細胞に対して処理後 2 日以内に作用していることも考えられる。培養 4 日目における細胞の長径も、乾燥重と同様に、無処理区 ($46.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$) より BL 処理区で約 11 % 増加し、Brz 処理区で約 6 % 減少していた (Figure 4B)。

次に、細胞の長径で顕著な差が認められた培養 4 日目の細胞を走査型電子顕微鏡で観察した結果、無処理区の細胞と比べて、BL 処理区の細胞は肥大していた (Figure 5A、

Figure 5B)。ところが、Brz 処理区の細胞は、電子顕微鏡による低真空条件下の観察によって、明らかに縮んでつぶれていた (Figure 5C)。これらの結果より、BL 処理は細胞の肥大を促進しているが、Brz 処理は細胞壁の構造を弱くしていることが予想される。このことは、過去に報告されたシロイヌナズナの植物体における研究結果と一致していた。例えば、連続光で生育させたシロイヌナズナの植物体において、BL は細胞分裂よりも細胞肥大を介した細胞伸長を促進する (Tanaka et al., 2003)。一方、Brz はシロイヌナズナの下胚軸の細胞長を無処理に比べて 50%減少させる (Tanaka et al., 2003)。また、BR は細胞壁合成、細胞壁の修飾、細胞壁構成タンパク質の合成に関わるような多くの細胞壁関連遺伝子の発現を誘導することも明らかとなっている (Goda et al., 2002; 2004)。以上の研究報告を踏まえて、本実験結果により、T87 細胞はシロイヌナズナの芽生えと同様に BL や Brz の処理に応答した細胞成長を示すことを確認できた。BL による T87 細胞の肥大には、恐らく、細胞壁の合成や構築を促進するような酵素の遺伝子の発現上昇が関与していることが考えられるため、今後の解析で明らかにしていく必要がある。

ここまで述べてきたように、BL と Brz の処理における細胞の長径の違いは各処理を開始してから 4 日後の細胞で最も顕著であったが、処理後 8 日目の細胞では各処理区間において大きな差が観察されなかった (Figure 4B)。シロイヌナズナの実生において、BL 処理 (0.1 μ M) は自身の代謝遺伝子 *PhyB activation-tagged suppressor 1 (BAS1)* の発現を処理後 1 時間で急速に上昇させることが知られている (Tanaka et al., 2005)。このことから、細胞内における BL の急速な代謝により、培地に添加した BL の大部分が減少していることが予想される。そのため、培養 8 日目の細胞では BL による成長促進効果があまり認められなかったのかもしれない。

以上の実験結果をまとめると、BL 処理や Brz 処理は、T87 細胞の成長を促進また

は阻害していることが明らかとなった。したがって、T87細胞はBRが誘発する細胞成長の分子機構を解明するための有用な実験材料であると考えられる。BLやBrzによる細胞の形態変化は処理4日目で最も顕著だったので、培地に添加したBLやBrzは処理後2日以内に生理的効果を発揮していることが推測された。そこで、次にBLもしくはBrzを含む培地で2日間培養したT87細胞の核に存在するタンパク質の特性解析を試みた。

2-3-2 項 BL 及び Brz 処理が核画分に存在するタンパク質の総量に与える影響

2D-PAGE 解析に用いる核タンパク質の量を十分に確保するために、BL や Brz を 2 日間処理した T87 細胞から細胞核を精製し、タンパク質を抽出した。細胞の新鮮重 3 g あたりのタンパク質の収量は、無処理区 ($49.7 \pm 2.8 \mu\text{g}$) に比べて、BL 処理区で約 33 % 減少していた。一方、Brz 処理区で約 11 % 増加していた。BL 処理でタンパク質の収量が低下した理由の 1 つとして、以下の推測が考えられる。2-3-2 項で述べたように、BL 処理によって細胞が肥大したことで、等量の細胞重量における細胞数が減少し、結果として核の収量が低下したのかもしれない。よって、このことは今後の研究によって証明していかなければならない。

2-3-3 項 核画分に存在する BR 応答性タンパク質の存在量変化

続いて、BR に制御される核タンパク質を網羅的に検出するために、核画分の抽出タンパク質を用いて、2D-PAGE によるタンパク質プロファイルの比較・解析を行っ

た。2D-PAGE 後のゲルを SYPRO ruby によって染色し、PDQuest ソフトウェアによる画像解析を行った。その結果、pH 4-7 の範囲と分子量 10-100 kDa の範囲において、550 種以上のタンパク質スポットが含まれていることが分かった (Figure 6)。そこで、2D-PAGE 解析によって得られた多くのスポットの中から生理的に意義のある BR 応答性タンパク質の候補を見出すために、ゲル上のそれぞれのスポットの normalized spot volume (NSV) と内生の BR 濃度について相関分析を行った。NSV とは、2-2-6 項で述べたように、ゲル間の染色後差を補正した後のそれぞれのスポットの蛍光強度である。本研究では、これをタンパク質の存在量とした。また、BR 濃度に関しては、従前の研究報告をもとに、Brz 処理区の細胞は非常に低濃度の BR 量、無処理区の細胞は通常濃度の BR 量、BL 処理区の細胞は高濃度の BR 量であることが考えられる。タンパク質スポットの番号は、図表間で共通になるように使用した。

検出された 551 種のタンパク質スポットのうち、16 種は NSV と BR 濃度の間に正の相関があることを見いだした。Figure 7A に示した 8 種のタンパク質スポットは、BL 存在下で NSV が最も大きく、もしくは Brz 存在下で NSV が最も小さくなっていた。両処理区間で大きな差が観察されたスポット 1、3、6 について、Brz に対する BL の NSV は、それぞれ 10 倍以上、5 倍以上、約 4 倍であった。Figure 7A に示していない、残りの 8 種の NSV は Table 3 に示した。これらは BL 処理区のみを検出され、他の処理区では検出されなかった。以上の 16 種のスポットとは反対に、55 種のタンパク質スポットは、NSV と BR 濃度の間に負の相関があることが分かった。そのうち、15 種のタンパク質スポットの NSV を Figure 7B に示した。これらの NSV は、Brz 存在下で最も大きく、もしくは BL 存在下で最も小さくなっていた。BL 処理区に対する Brz 処理区の NSV を比較した結果、スポット 20 と 23 で 6 倍以上、スポット 11、14、18 で約 4 倍となり、

両処理区間の NSV の比に大きな差が認められた。また、55 種のスポットのうち、残りの 40 種は Brz 処理区のみを検出され、他の処理区では検出限界以下の存在量であった。これらは、内生 BR の枯渇により、顕著に存在量が増加するのかもしれない。これら 40 種の中で、3-3-4 項で行った質量分析によってタンパク質の同定が成功した 8 種の NSV を Table 5 に示した。残りの 32 種は存在量のごくわずかなため、質量分析に必要な十分量の消化ペプチドを得ることができなかった。

ここまでの実験結果をまとめると、タンパク質の分離能が非常に高い 2D-PAGE と幅広い直線範囲で定量性を示す蛍光タンパク質染色法の SYPRO ruby 染色を組み合わせた網羅的な核画分タンパク質の解析によって、内生の BR 濃度の変化に応じて量的な増減を示す 71 種のタンパク質を高感度に検出できた。このような研究方法は、内生 BR 量に応答したタンパク質の初期変化を解析することができるので、従前の分子遺伝学的手法を主軸とした BR 作用機作に関する研究に新たな知見をもたらす可能性が予想される。

2-3-4 項 質量分析法による BR 応答性タンパク質の同定

前項で見いだされた BR 応答性タンパク質の細胞内局在性や機能を明らかにするために、LC-MS/MS 分析によるタンパク質の同定を試みた。LC-MS/MS で得られた測定結果は、ProteinPilot ソフトウェアで解析し、その結果を Table 2, Table 3, Table 4, Table 5, Table 6 に示した。同定したタンパク質の局在性は、関連論文 (Bae et al., 2003; Calikowski et al., 2003; Brown et al., 2005; Pendle et al., 2005; Casasoli et al., 2007; Jones et al., 2009) 及びデータベースのアノテーションを用いて調査した。Table 2 と Table 3 は、NSV と BR

量に正の相関が見られた 16 種のタンパク質の解析結果をまとめたものである。これらのタンパク質は、核局在型 (5 種)、他のオルガネラ局在型 (8 種)、局在不明 (2 種) であった。残り 1 種のタンパク質は、恐らくトリプシン消化後のペプチドの生成量が少なかったことにより、同定に至らなかった。核局在が知られているタンパク質として、スポット 1 と 5 において Nucleosome assembly protein 1;2 (NAP1;2)、スポット 3 において S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM syn.2)、スポット 27 において Histone deacetylase 2B (HD2B) が同定された。興味深いことに、これらのタンパク質はクロマチンリモデリングと呼ばれる、クロマチンの構造変化を介して遺伝子の発現量を調節する分子機構に関与することが報告されている (Wagner et al., 2003; Zhou et al., 2004; Park et al., 2006; Katoh et al., 2011)。

S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM syn.2) は、メチオニンと ATP を基質として S-アデノシルメチオニンの生合成を触媒するタンパク質である。しかしながら、これまで核内における SAM syn.2 の機能はほとんど理解されていなかった。近年、マウスのがん細胞において、SAM syn.2 は転写因子 MafK 及びメチル基転移酵素と複合体を形成することが報告された (Katoh et al., 2011)。そのことにより、ヒストン H3 のメチル化が誘発され、MafK による標的遺伝子の転写の抑制が起こるという仕組みが示されている。特に、重要な点として、どのようなメカニズムを介して DNA やそれを取り巻くヒストンの修飾部位が特定されているのかということであり、これは長年の謎であった。転写因子、SAM syn.2、ヒストンメチル化酵素によるタンパク質複合体の形成が修飾部位を決定、もしくは誘導しているとすれば非常に興味深い。

Histone deacetylases (HDACs/HDs) はヒストンの N 末端のリジン残基からアセチル基を除去する酵素である。その結果、ヒストンへの DNA の巻き付きが強くなり、転

写関連因子がクロマチンに結合できなくなる (Hollender et al., 2008)。このように、脱アセチル化によって、転写が抑制されたヘテロクロマチンが形成される。一方、アセチル化はユークロマチンの形成を促進し、転写を活性化する。以上のように、ヒストンの脱アセチル化やアセチル化は転写調節の中心的な役割を担っている (Lee et al., 2007)。さらに、Wu et al. (2003) は、シロイヌナズナの HD2s に種々の転写因子の DNA 結合ドメインを融合したタンパク質を一過的に発現させ、レポーター遺伝子 *GUS* の応答を調べた。その結果、転写因子単独に比べ、HD2s との融合タンパク質のほうが *GUS* 活性を減少させることが明らかにされた。この研究報告より、HD2s は転写因子との複合体形成を介して、遺伝子発現の抑制に関与していることが示唆される。その上、HDACs は環境ストレス応答や ABA、ジャスモン酸、エチレンの応答において重要な役割を担っているが (Sridha et al., 2006; Zhou et al., 2005)、これらと BR 応答の関係は明らかにされていない。今後、HD2B を介したヒストンの脱アセチル化と BR 応答の関係を明らかにしていくことは、解決すべき重要な研究課題であると考えられる。

様々な生物間で保存されている NAP1 は、ATP 依存的なクロマチンリモデリング因子と協調的に、ヌクレオソームの構築や解体におけるヒストンのシャペロンとして働いている (Park et al., 2006; Liu et al., 2009a)。さらに、これは転写開始や転写伸長に関わるタンパク質と複合体を形成することも知られている (Zlatanova et al., 2007)。シロイヌナズナにおいて、NAP1 は ABA の情報伝達における正の制御因子として報告されており、ストレス応答とクロマチンリモデリングにおける新規の関連性も提唱されている (Liu et al., 2009b)。これらのことより、BR 応答性遺伝子の発現調節にも、NAP1 のタンパク質複合体を介したクロマチンリモデリングが関与している可能性が推測される。この仮説を証明するために、内生 BR 量に応答した NAP1 複合体の挙動やその構成因子

を今後明らかにしていくことが必要である。

Table 4 と Table 5 は、タンパク質の存在量と BR 量に負の相関が見られた 55 種のタンパク質のうち、LC-MS/MS で同定に成功した 20 種のタンパク質を示したものである。これらのタンパク質は、核局在が 6 種、他のオルガネラ局在が 12 種、局在不明が 2 種であった。スポット 35 において、スポット 1 と 5 に存在した NAP1;2 のアイソフォームである NAP1;1 が同定された。また、Table 6 では、内生の BR 量に応答した存在量の変化を示さなかったタンパク質スポットの中で、核局在が知られている 9 種のタンパク質も示した。

ここで、2D-PAGE 後のゲルにおいて、等電点は異なるがほぼ同じ分子量である 2 つの NAP1;2 のスポット（スポット 1 と 5）を示した (Figure 8A)。2D-PAGE の 2 次元目における 2 つのスポットの移動距離の差より、これらの分子量の差は約 1.4 kDa であることが予想された。無処理区に対する Brz 処理区の相対的な NSV は、スポット 1 において 0.41、スポット 5 において 0.43 であった (Figure 8B)。しかしながら、BL 処理区はスポット 1 において 4.84、スポット 5 において 1.27 であった (Figure 8B)。この結果は、スポット 1 の NAP1;2 は、スポット 5 よりも BL に対する応答がより顕著であることを示唆する。加えて、スポット 1 に対するスポット 5 の NSV の比は、Brz 処理区と無処理区でそれぞれ 5.3、5.1 であったのに対し、BL 処理区では 1.4 であったことから (Figure 8B)、2 種の NAP1;2 の存在量比の変化は内生 BR 量と関連していることも考えられる。現在のところ、BR 量に応答した 2 種の NAP1;2 の存在量の変化及び分子量の差を説明できる実験結果を得られていないが、1 つの可能性として、NAP1;2 が BR 量に応答した翻訳後修飾を受けていることが予想される。例えば、シロイヌナズナの葉における細胞増殖期に NAP1;1 がファルネシル化され、核に局在することが報告されて

いる (Galichet and Gruissem, 2006)。加えて、*in vivo* 及び *in vitro* において、NAP1;2 は Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) が付加される (Budhiraja et al., 2009)。さらに、HeLa 細胞において、NAP1 及び NAP2 の C 末端はそれぞれ 9 個から 10 個のグルタミン酸が付加されるポリグルタミン酸化による修飾を受けることも知られている (Regnard et al., 2000)。今後の研究において、内生 BR 量に応答した NAP1;2 の翻訳後修飾の種類を特定することは、BR に依存したクロマチンリモデリングにおける NAP1 の役割を理解するために重要な課題である。

2-3-5 項 BL 処理に対する BR 応答性核タンパク質の初期応答

2-3-4 項で同定した BR 応答性の核タンパク質が BL 処理の初期にも応答を示すかどうかを明らかにするために、0、6、12 時間の BL 処理による核タンパク質の経時的な量的変動を 2D-PAGE によって調べた。Figure 9 は、処理 0 時間の無処理区に対する BL 処理区の NSV を 1 とし、処理 6 時間と 12 時間における 8 種の核タンパク質の存在量比を示している。スポット 1 (NAP1;2)、3 (SAM syn.2)、15 (60S ribosomal protein L14) は BL の処理時間と共に存在量が上昇していた。一方、スポット 5 (NAP1;2)、35 (NAP1;1)、42 (Band 7 family protein)、47 (Vernalization independence 3; VIP3) は一過的な BL 処理に応じて存在量が減少していた。VIP3 は、2 日間の BL 処理では存在量に変化が観察されなかった核タンパク質である (Table 6)。これは、花成を負に制御していることが既に知られている (Zhang et al., 2003)。また、VIP3 突然変異体において、ヒストン H3 のリジン残基がメチル化される量は一定だが、その修飾を受けるヒストン H3 のクロマチン内での分布が変化していることが明らかとなっている (Oh et al., 2008)。以上の研究

報告より、BR 情報伝達における VIP3 の役割を今後明らかにすることは、BR に関連したヒストンのメチル化の分子機構を理解する上で重要な知見となるであろう。

ここで、2-3-3 項及び 2-3-4 項において、内生 BR 量の増加に伴って存在量が増加することが明らかとなった 2 種の NAP1;2 (スポット 1 と 5) の BL に対する初期応答に注目した。スポット 1 の存在量は 12 時間の BL 処理によって約 3 倍に増加したが、スポット 5 は約 0.5 倍になっていた (Figure 9)。このことから、一過的な内生 BR 量の上昇に対して、スポット 1 とスポット 5 は相反する応答を示しているように思われる。しかし、スポット 1 と 5 の存在量の総和は、0 時間の BL 処理に比べて、12 時間で 1.4 倍に増加していた。これらの結果より、スポット 5 の NAP1;2 の一過的な存在量の減少には、タンパク質分解、翻訳後修飾、核-細胞質間の移行など様々な要因が関与する可能性が考えられる。今後、このことを解明するために、内生 BR 量に応答した NAP1;2 の挙動を詳細に解析する必要がある。また、スポット 5 の NAP1;2 は、2 日間の BL 処理に対する応答と 12 時間の BL 処理に対する応答が異なっていた (Figure 7A, Figure 9)。しかしながら、今のところ、これらの細胞の生理的状态が同一であるかどうかは分からないので、2 つの実験結果を単純に比較することは適切ではないと思われる。例えば、2 日間の BL 処理は、12 時間の BL 処理よりも、タンパク質の生合成の促進やその組成の変化などの二次的影響を細胞に及ぼしているかもしれない。

現在までに、DNA マイクロアレイの結果とプロテオミクスの結果を比較すると、様々な生物種で mRNA 量とタンパク質量の変化が必ずしも連動しないことが報告されている (Anderson and Seilhamer, 1997; Ideker et al., 2001; Griffin et al., 2002; Huber et al., 2004; Tian et al., 2004)。そこで、BL 処理の初期に応答した核タンパク質に関して、10 nM の BL を 3 時間処理したシロイヌナズナ芽生えにおける mRNA 量を AtGenExpress デー

データベースで調べた (Table 7, Goda et al., 2008)。その結果、各遺伝子の発現量は無処理と比較して、BL で大きな変化が認められなかった。このことは、本研究で同定した核タンパク質とそれをコードしている遺伝子の BL に対する応答性は異なる可能性を示唆している。すなわち、生化学的手法によって得られた本研究の成果は、従来の分子遺伝学的手法による BR 情報伝達の研究では発見・入手できないものであり、BR 作用機構の解明に関する研究の両輪と成りうるものであることが予想される。上記の予想を裏付けるために、同定した核タンパク質と遺伝子の BR に対する挙動を T87 細胞で調べなければならない。

ここで、本章を総括する。これまでの分子遺伝学的研究において、BR 情報伝達は、BL が BRI1 によって受容された後、様々なタンパク質のリン酸化及び脱リン酸化反応を経て、核へシグナルが伝達されるという仕組みであることが明らかとなっていた。しかしながら、この過程では、様々な細胞内小器官で数多くのタンパク質が複雑かつ相互に関与していることが予想された。そのため、本研究では、細胞核に存在するタンパク質に限定した網羅的な解析による新規な BR 関連核タンパク質の同定を目指した。その結果、内生 BR 量に応答して存在量に変化する核タンパク質を 11 種同定することに成功した (Table 2, Table 3, Table 4, Table 5, Table 6)。これらのタンパク質のうち、NAP1s、SAM syn.2、HD2B、VIP3 はクロマチンを構成するヒストンの制御に関わることが知られていた。そのため、BR による遺伝子の発現制御にはヒストンの機能調節を介したクロマチンの構造変換が関与している可能性が考えられた。また、NAP1;2 は BR 量の変化に応答した翻訳後修飾を受けていることも予想された。これらの実験結果は、生化学的解析を中心とした本研究の特色ある成果である。ここで、以上の実験結果及び既知の知見をもとに、クロマチンリモデリングを介した BR の遺伝子発現調節機構に関するモ

デルを予想した (Figure 10)。まず、BR 情報伝達によって活性化した BES1 及び BZR1 のような BR 関連転写因子の一部は標的遺伝子のシス配列に結合し、BR 応答性遺伝子の発現を制御する (He et al., 2005; Yin et al., 2005)。同時に、NAP1s や ATP 依存的クロマチンリモデリング因子がクロマチン構造を弛緩させる。このことは、BR 応答性遺伝子のプロモーター領域に転写因子が接近しやすくなることにつながる。このとき、転写因子がクロマチン上の適切な DNA 部位に、SAM syn.2 のような DNA やヒストンのメチル化・脱メチル化に関わる因子や HD2B のようなヒストンのアセチル化・脱アセチル化に関わる因子を呼び込むことでタンパク質複合体を形成する。これらのことにより、従来知られていた遺伝子発現制御機構に加えて、クロマチン上の局所的な DNA やヒストンの修飾を介した BR 応答性遺伝子の発現制御も行われていることが推測される。ここで、BES1 の相互作用因子として、Early flowering 6 (ELF6) やその相同タンパク質である Relative of early flowering 6 (REF6) が同定されている (Yu et al., 2008)。面白いことに、これら 2 種のタンパク質はヒストン H3 のリジン残基を脱メチル化する酵素として知られている。さらに、これらは BR 応答性の細胞伸長に関わる TOUCH4 遺伝子のプロモーター領域において BES1 と複合体を形成することで、遺伝子の発現制御を担っている (Yu et al., 2008)。そこで、BR による遺伝子の発現制御機構に関わる新たな因子を同定するための更なる方策として、BES1 を中心としたタンパク質複合体の解析が考えられた。そこで、次章で、BES1 の新規な相互作用因子の同定及びその因子の BR 情報伝達における役割の解明を目指した。

2-4 節 図表

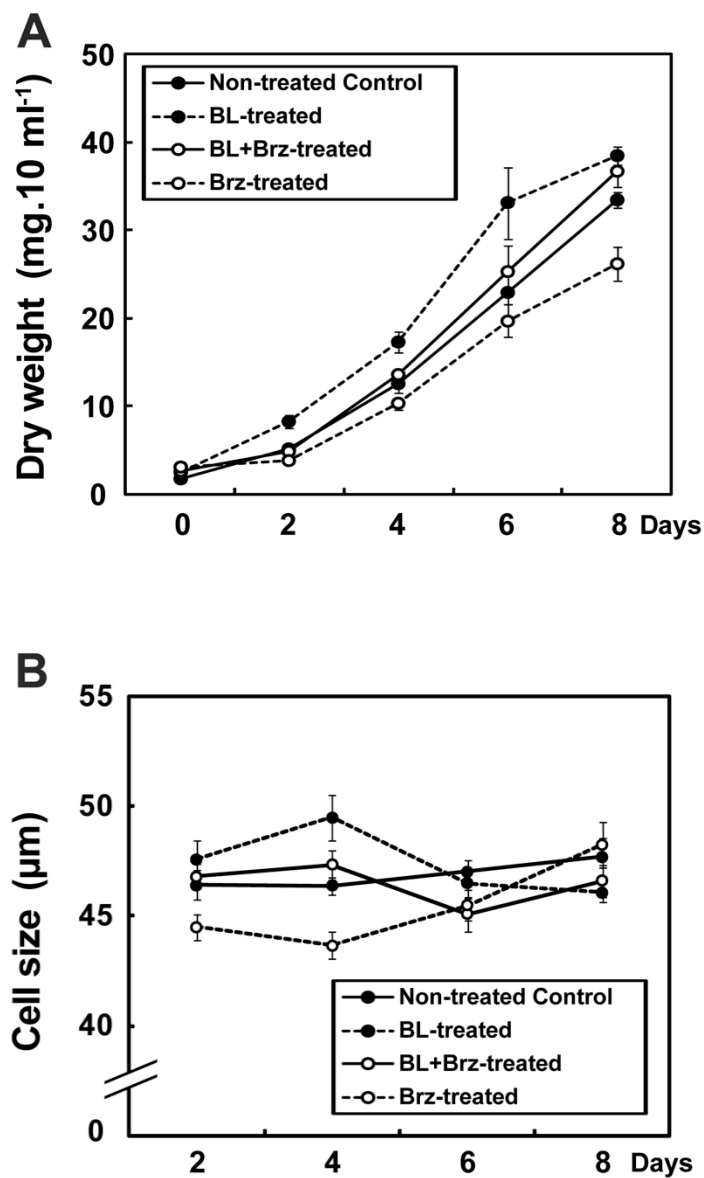


Figure 4. Fluctuations in physiological parameters of *Arabidopsis* cultured cells treated with BL and/or Brz over an 8-day culture period

(A) Dry weight of cells, and (B) cell size. *Arabidopsis* cultured cells were grown at 22 °C for 14 days, then aliquots were transferred to fresh medium with or without BL (0.1 µM) or Brz (5 µM). Values are expressed as mean ± SE of three experiments.

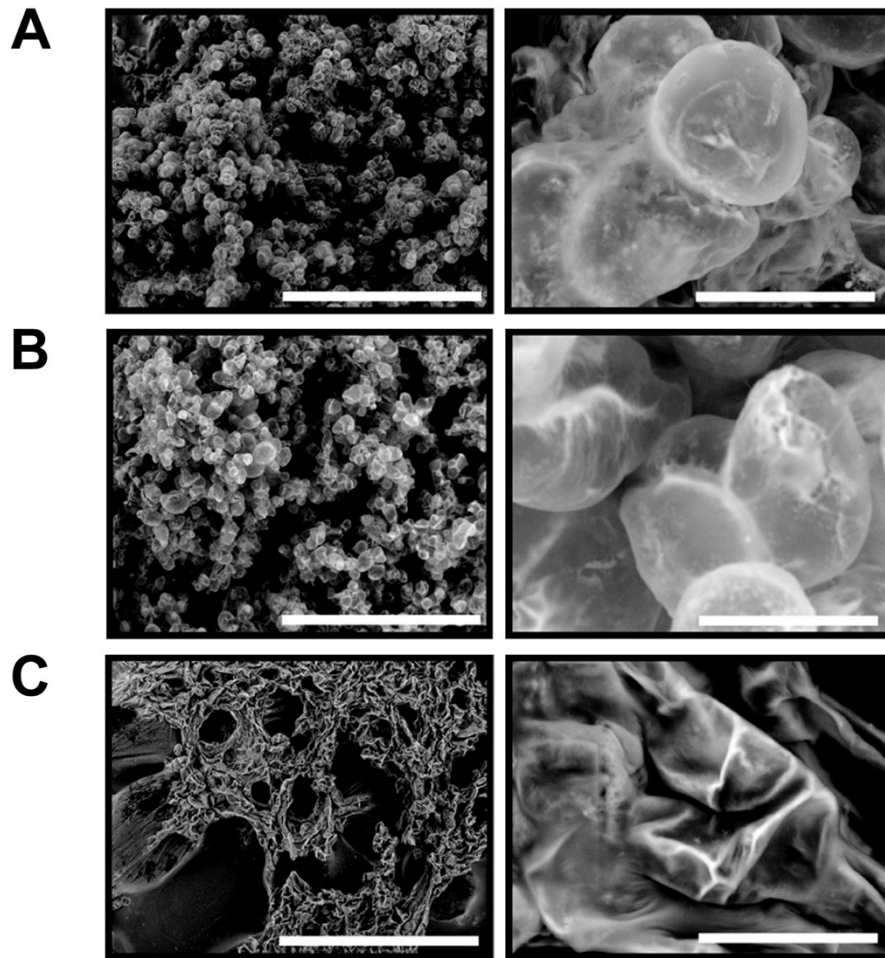


Figure 5. Morphological observation of *Arabidopsis* cultured cells after 4-day treatment with BL or Brz using electron microscopy
(A) Non-treated control cells, **(B)** BL (0.1 μM)-treated cells, and **(C)** Brz (5 μM)-treated cells. Scale bars represent 500 μm (left panels) and 30 μm (right panels).

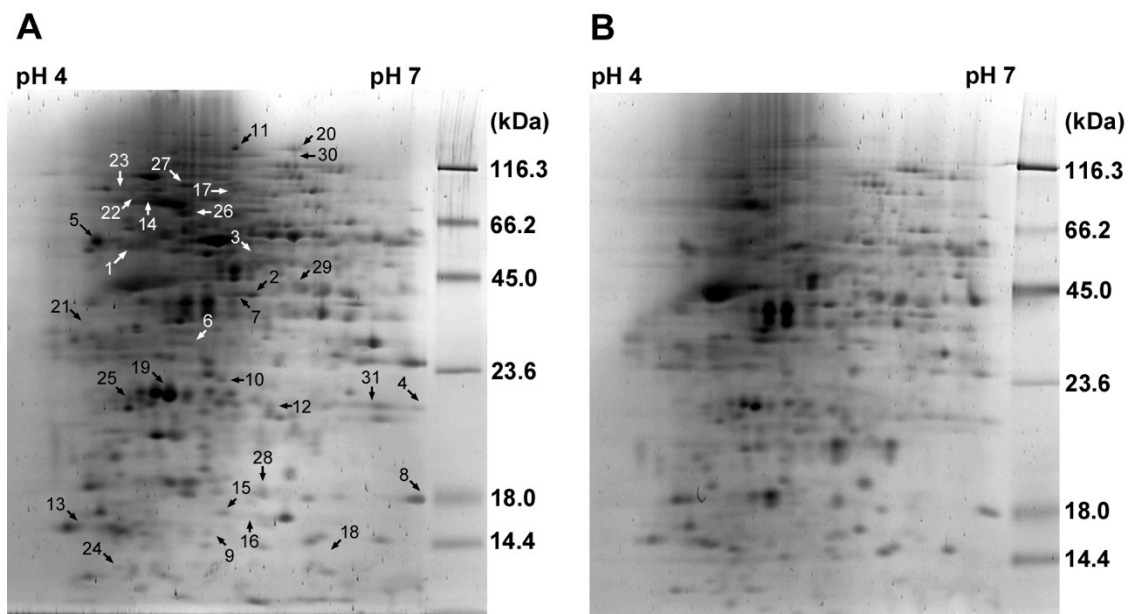


Figure 6. Representative profiles of 2D-PAGE analysis of proteins in a nuclear-enriched fraction from cells treated with BL (0.1 μ M) for 2 days

(A) BL-treated cells, and (B) non-treated control cells. Each arrow indicates a detected protein spot in the gel. All proteins were stained with SYPRO Ruby dye and gel images are representative of 2D-PAGE gels from each treatment condition. Each protein sample (approximately 100 μ g) was separated in the first dimension using IEF and in the second dimension by SDS-PAGE. An immobilized non-linear pH gradient from 4 to 7 was formed by using Immobiline gel strips.

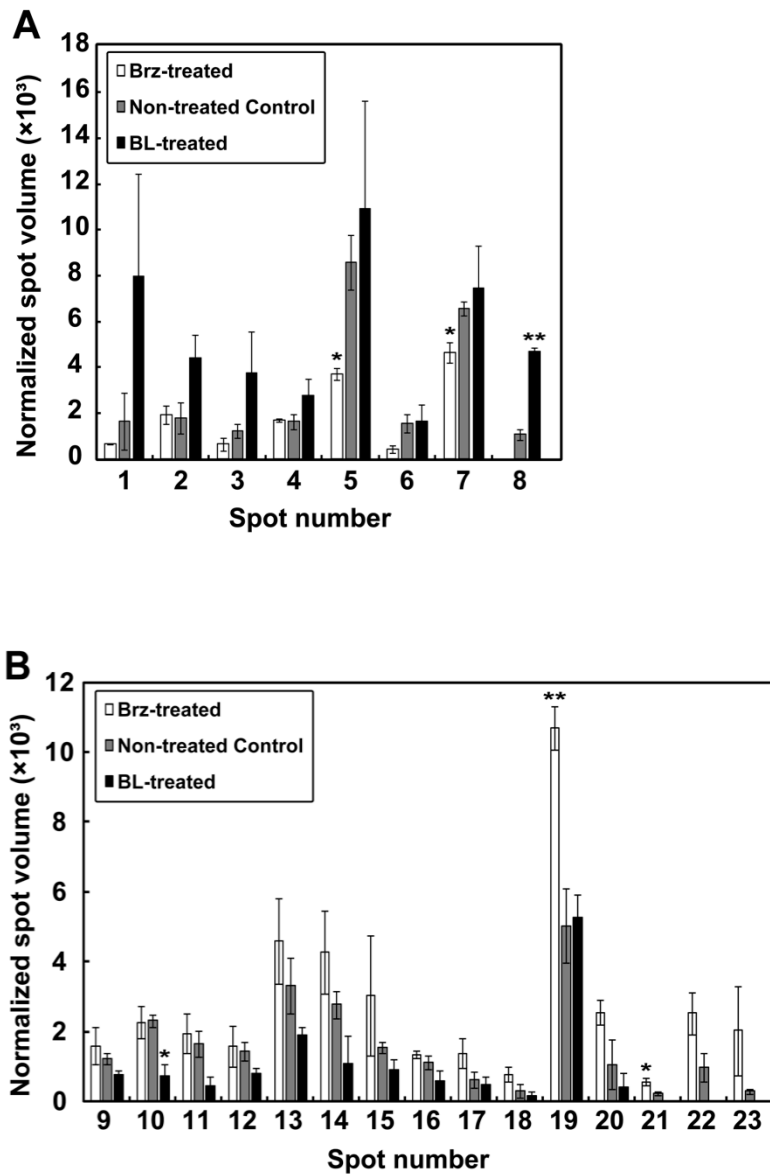


Figure 7. Detection of protein spots showing a correlation between normalized spot volume (NSV) and cellular BR levels

(A) Positively correlated proteins, and (B) negatively correlated proteins. Each value is expressed as mean \pm SE of three experiments. Asterisks indicate statistically significant differences compared with the non-treated control (**P < 0.01, *P < 0.05).

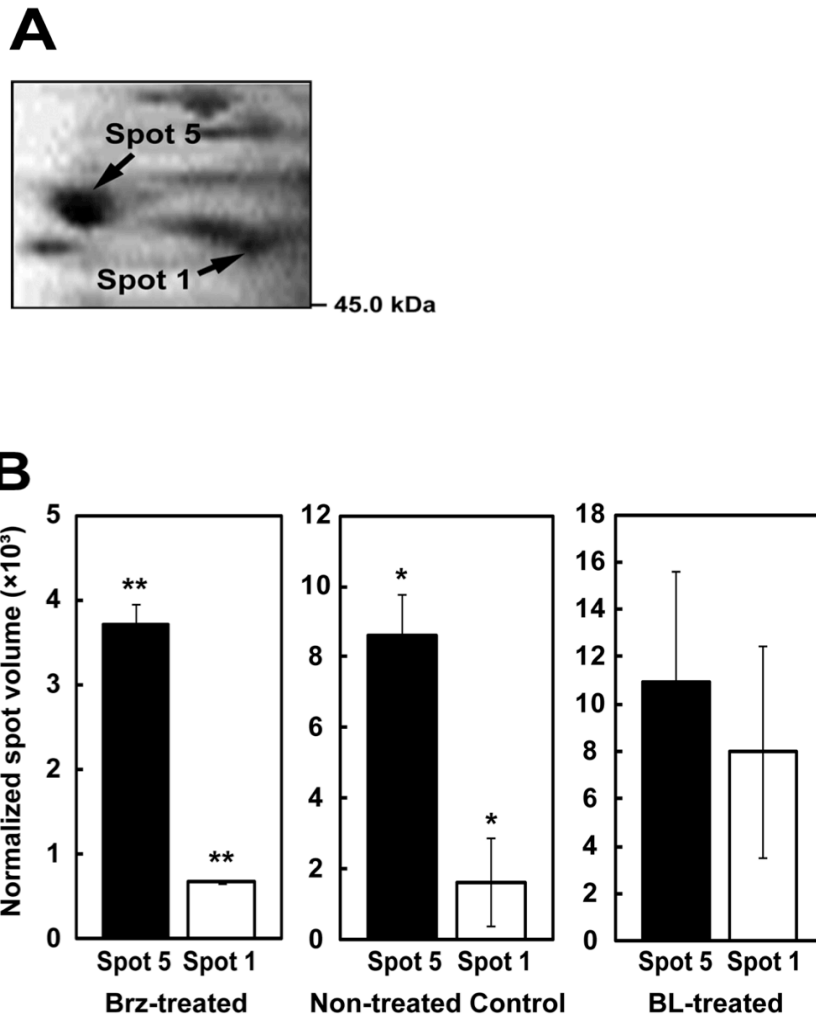


Figure 8. Difference in the ratio of protein spot 5 to spot 1 in the 2D-PAGE gels from treated and non-treated cells

(A) Representative protein gel showing spot 5 and spot 1, which were both identified as the same protein, NAP1;2. (B) Normalized spot volume (NSV) of spots 5 and 1 under different cellular BR levels. Each value is expressed as mean \pm SE of three experiments. Asterisks indicate significant differences (**P < 0.01, *P < 0.05).

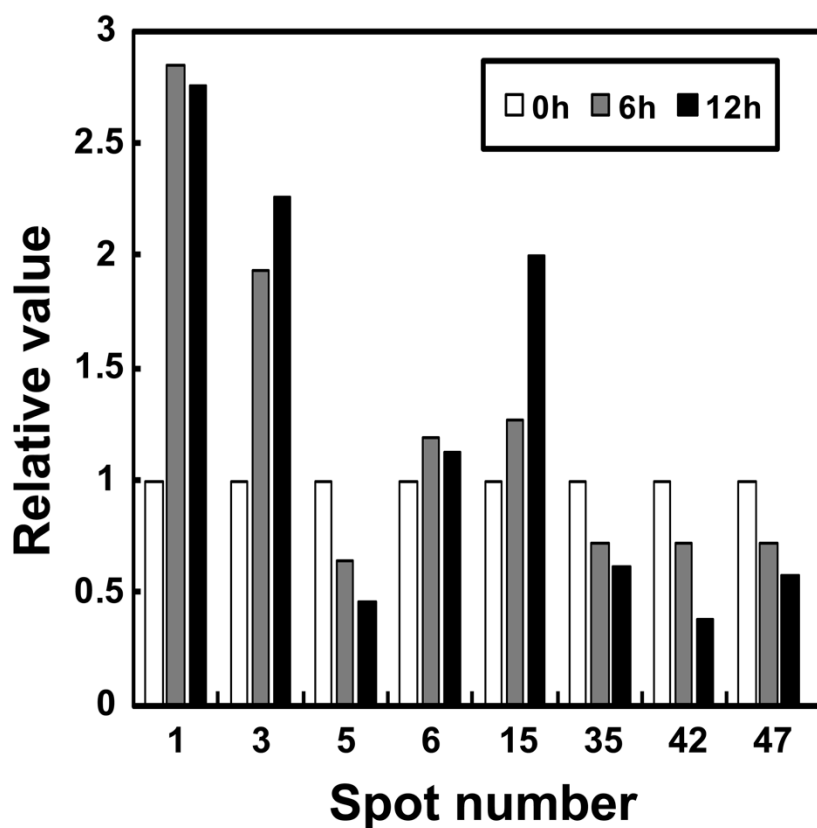


Figure 9. Fluctuations in protein abundance for identified nuclear target proteins in an early phase of BL (0.1 μ M) treatment

For BL-treated cells, the abundance fluctuations of eight proteins were investigated, from 0 to 12 h after onset of treatment. Each value is shown as a relative ratio of normalized spot volume (NSV) in BL-treated cells to non-treated control cells.

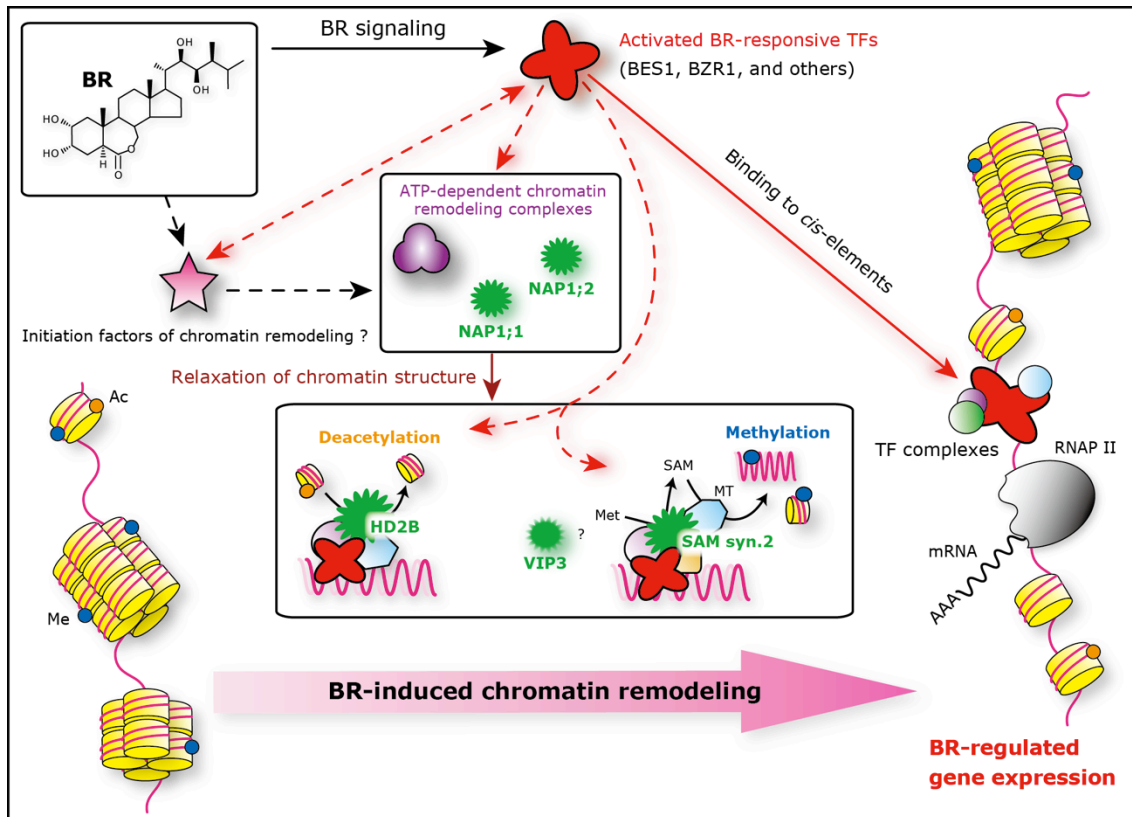


Figure 10. Multifunctional and fluid roles of transcription factors in regard to BR-induced gene expression

Summary of BR signaling factors potentially involved chromatin remodeling is schematized here; other transcription factors and other proteins in this scheme have not yet been discovered. Spatial and time-dependent changes in these protein complexes also have not been established. The interconnections of these various factors are not currently known. Solid lines indicate direct interactions and dotted lines indicate unknown interactions. Positive interactions are noted by an arrow. Green stars indicate our identified nuclear proteins. BR: brassinosteroid; TF: transcription factor; NAP1: nucleosome assembly protein 1; SAM syn.2: S-adenosylmethionine synthetase 2; HD2B: histone deacetylase 2B; VIP3: vernalization independence 3; Ac: acetyl group; Me: methyl group; MT: methyltransferase; Met: methionine; SAM: S-adenosyl-mehionine; RNAP II: RNA polymerase II.

Table 2. Identification and cellular localization of proteins positively correlated with cellular BR levels

Spot no. ^a	Gene locus	Protein name	Localization ^b	Accession no. ^c	Theoretical Mr.pI ^d	PM ^e	SC ^f	UPS ^g
1	At2g19480	Nucleosome assembly protein1;2	Nucleus	gi 15224782	43.5/4.3	19	48.0	17.4
2	At3g62600	DnaJ heat shock family protein	Endoplasmic reticulum lumen	gi 15228802	39.2/5.9	9	40.5	3.7
3	At4g01850	S-adenosylmethionine synthetase 2	Nucleolus	gi 15234354	43.2/5.7	13	46.8	16.4
4	At5g63510	Gamma carbonic anhydrase like 1	Mitochondrion	gi 15242792	27.6/9.0	17	84.9	18.6
5	At2g19480	Nucleosome assembly protein 1;2	Nucleus	gi 145329176	42.9/4.3	24	52.0	21.3
6	At2g18020	Embryo defective 2296	Nucleolus	gi 15227954	27.8/4.3	6	28.3	4.0
7	At2g47470	Protein disulfide isomerase-like 2-1	Cell wall	gi 15226610	39.5/5.8	31	71.2	15.5
8	At3g08030	Unknown protein	Cell wall	gi 18398135	39.0/7.2	5	27.9	1.7

^aSpot numbers refer to protein spots labeled in Figure 6A and Figure 7A.

^bLocalization of identified proteins according to published literature (Bae et al., 2003; Calikowski et al., 2003; Brown et al., 2005; Pendle et al., 2005; Casasoli et al., 2007; Jones et al., 2009) and database annotations (TAIR and UniProtKB).

^cAccession number in the NCBI database.

^dTheoretical molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) calculated using the ExPASy website.

Table 3. Identification and cellular localization of proteins detected only in BL-treated cells

Spot no. ^a	Gene locus	Protein name	NSV \pm SE ^b	Localization ^c	Accession no. ^d	Theoretical Mr.pI ^e	PM ^f	SC ^g	UPS ^h
24		Not identified	177.7 \pm 105.5						
25		Ribosomal protein L9, putative	634.0 \pm 289.8	unknown	gi 21554945	22.0/9.5	18	68.6	7.32
26	At1g78900	Vacuolar ATP synthase subunit A	1042.6 \pm 369.0	Vacuolar membrane	gi 15219234	68.8/5.1	18	32.3	11.0
27	At5g22650	Histone deacetylase 2B	579.9 \pm 252.8	Nucleolus	gi 30688577	32.3/4.7	7	24.2	4.0
28	At1g22780	Pointed first leaves	725.7 \pm 312.0	Cell wall	gi 15219950	17.5/10.5	15	86.2	4.0
29	At4g35630	Phosphoserine aminotransferase	1015.6 \pm 440.1	Chloroplast	gi 15237069	47.3/8.3	25	57.4	14.4
30	AtMg01190	ATP synthase subunit alpha	436.1 \pm 356.0	Mitochondrion	gi 14916970	55.0/6.2	33	59	23.8
31		Ribosomal protein L9, putative	316.6 \pm 23.2	unknown	gi 21554945	22.0/9.5	6	43.3	2.9

^aSpot numbers refer to protein spots labeled in Figure 6A.

^bNormalized spot volume (NSV) \pm standard errors (SE, n = 3).

^cLocalization of the identified proteins according to published literature (Bae et al., 2003; Calikowski et al., 2003; Brown et al., 2005; Pendle et al., 2005; Casasoli et al., 2007; Jones et al., 2009) and database annotations (TAIR and UniProtKB).

Table 4. Identification and cellular localization of proteins negatively correlated with cellular BR levels

Spot no. ^a	Gene locus	Protein name	Localization ^b	Accession no. ^c	Theoretical Mr.pI ^d	PM ^e	SC ^f	UPS ^g
9	At4g27230	Histone H2A	Nucleus	gi 15237024	13.8/10.1	4	40.5	2.0
10		Putative ATP synthase	unknown	gi 21592716	27.6/6.8	27	73.8	20.0
11	At2g03510	Band 7 family protein	Nucleolus	gi 18395564	40.6/5.7	30	70.5	22.9
12	At5g23520	Unknown protein	Cytoplasm	gi 15237781	49.1/6.5	2	3.7	2.0
13	At2g27720	60S acidic ribosomal protein P2	Nucleus	gi 15226231	11.4/4.6	2	17.4	1.4
14	At4g39690	Unknown protein	Mitochondrion	gi 18420505	70.5/5.1	16	33.4	8.2
15	At4g27090	60S ribosomal protein L14	Nucleolus	gi 15236981	15.5/10.0	5	43.3	3.4
16		Not identified						
17	At5g50920	Heat shock protein 93-V (CLPC 1)	Chloroplast	gi 18423214	103.4/6.4	11	14.9	8.4
18		Not identified						
19	At1g66580	60S ribosomal protein L10	Cytoplasm	gi 18408550	24.9/10.6	3	23.1	1.4
20	At2g27170	Structural maintenance of chromosomes 3	Nucleus	gi 41584495	139.3/6.1	18	16.8	8.5
21		Not identified						
22	At5g28540	Luminal binding protein (BiP) 1	Endoplasmic reticulum lumen	gi 15241844	73.6/5.1	21	30.2	9.1
23	At2g38040	Carboxyltransferase alpha	Chloroplast	gi 62319750	85.2/5.6	22	33.6	12.6

^aSpot numbers refer to protein spots labeled in Figure 6A and Figure 7B.

^bLocalization of identified proteins according to published literature (Bae et al., 2003; Calikowski et al., 2003; Brown et al., 2005; Pendle et al., 2005; Casasoli et al., 2007; Jones et al., 2009) and database annotations (TAIR and UniProtKB).

^cAccession number in the NCBI database.

^dTheoretical molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) calculated using the ExPASy website.

^ePM, number of matched peptides.

^fSC, percentage of sequence coverage.

^gUPS, Unused ProtScore from ProteinPilot 2.0 software.

Table 5. Identification and cellular localization of proteins detected only in Brz-treated cells

Spot no. ^a	Gene locus	Protein name	NSV \pm SE ^b	Localization ^c	Accession no. ^d	Theoretical Mr.pI ^e	PM ^f	SC ^g	UPS ^h
32	At5g23310	Iron superoxide dismutase 3	774.5 \pm 217.1	Chloroplast	gi 3273757	30.3/8.6	1	6.5	2.0
33	At5g63400	Adenylate kinase 1	1371.8 \pm 631.0	Mitochondrion	gi 15242753	26.9/6.9	19	75.2	17.4
34	At2g26140	FtsH protease 4	747.1 \pm 160.6	Mitochondrion	gi 18401040	77.2/8.7	46	71.7	21.8
35	At4g26110	Nucleosome assembly protein 1;1	3135.0 \pm 366.1	Nucleus	gi 15236115	43.0/4.4	17	51.6	10.9
36	At5g13850	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 3	3035.9 \pm 854.0	Cytoplasm	gi 71151986	22.0/4.4	5	29.9	5.5
37		2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit-like protein	1738.6 \pm 268.3	unknown	gi 7076784	114.1/6.7	90	79.9	72.5
38		Putative 60S acidic ribosomal protein P0	1633.7 \pm 739.6	Cytoplasm	gi 21554645	34.1/4.9	12	54.1	6.0
39	At5g26830	Threonyl-tRNA synthetase	1565.7 \pm 898.2	Chloroplast	gi 3617770	80.9/6.5	24	37.0	19.0

^aSpot numbers.

^bNormalized spot volume (NSV) \pm standard errors (SE, n = 3).

^cLocalization of the identified proteins according to published literature (Bae et al., 2003; Calikowski et al., 2003; Brown et al., 2005; Pendle et al., 2005; Casasoli et al., 2007; Jones et al., 2009) and database annotations (TAIR and UniProtKB).

^dAccession number in the NCBI database.

^eTheoretical molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) calculated using the ExPASy website.

^fPM, number of matched peptides.

^gSC, percentage of sequence coverage.

^hUPS, Unused ProtScore from ProteinPilot 2.0 software.

Table 6. Identification of nuclear-localized proteins showing no response to cellular BR levels

Spot no. ^a	Gene locus	Protein name	Accession no. ^b	Theoretical Mr.pI ^c	PM ^d	SC ^e	UPS ^f
40	At1g56110	Arabidopsis homolog of nucleolar protein 56	gi 15223458	58.6/8.8	13	27.6	2.6
41	At3g09200	60S acidic ribosomal protein P0	gi 15232603	34.1/5.0	35	85.0	30.6
42	At2g03510	Band 7 family protein	gi 18395564	40.6/5.7	33	65.4	16.7
43	At2g03510	Band 7 family protein	gi 29028866	36.5/5.8	7	30.7	2.7
44	At1g09760	U2 small nuclear ribonucleoprotein A	gi 15218274	28.0/5.8	6	29.7	8.6
45	At3g57290	Eukaryotic translation initiation factor 3E	gi 18410687	51.7/5.6	10	33.6	5.7
46	At2g03511	Band 7 family protein	gi 18395564	40.6/5.7	16	67.7	4.2
47	At4g29830	Vernalization independence 3	gi 15233721	34.2/5.8	15	67.6	11.1
48	At2g46280	TGF-beta receptor interacting protein 1	gi 15225954	36.4/6.5	10	33.5	6.6

^aSpot numbers.

^bAccession number in the NCBI database.

^cTheoretical molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) calculated using the ExPASy website.

^dPM, number of matched peptides.

^eSC, percentage of sequence coverage.

^fUPS, Unused ProtScore from ProteinPilot 2.0 software.

Table 7. The mRNA responses to BL treatment of the genes encoding nuclear proteins, which were identified based on BR-dependent changes in protein abundance in this study

Spot No.	AGI code	Protein	Signal						Signal ratio of BL/Mock
			Mock (3 h)			10 nM BL (3 h)			
			1	2	Ave.	1	2	Ave.	
1 and 5	AT2G19480	Nucleosome assembly protein 1;2	3261.6	2898.6	3080.1	3864.8	3630.5	3747.7	1.2
3	AT4G01850	S-adenosylmethionine synthetase 2	13169.6	11304.8	12237.2	13819.7	12311	13065.4	1.1
6	AT2G18020	Embryo defective 2296	26156	27741	26948.5	22937	24865.5	2391.3	0.89
15	AT4G27090	60S ribosomal protein L14	17595.8	15909.2	16752.5	17180.7	14510	15845.35	0.95
35	AT4G26110	Nucleosome assembly protein 1;1	1827.5	1281.5	1554.5	2127.1	1335.6	1731.35	1.1
42	AT2G03510	Band 7 family protein	2387	1780.6	2083.8	1987.2	1980.6	1983.9	0.95
47	AT4G29830	Vernalization independence 3	1149.2	892.5	1020.85	996.2	952.4	974.3	0.95

Transcriptome data were downloaded from a table named as “basic hormone treatment of seedling” in AtGenExpress JAPAN database

(<http://atpbsmd.yokohama-cu.ac.jp/AtGenExpressJPN/AtGenExpress.html>). Then the data values for the target genes were chosen and used to prepare Table 7.

第3章 BR 依存的に形成される Heat shock protein 90 複合体の特性解析

3-1 節 緒言

現在、BR 情報伝達で重要な地位を占める BES1 転写因子は種々のタンパク質と複合体を形成することで、様々な BR 応答を制御していると考えられている。すなわち、BES1 は転写調節の際には BIM1、MYB30、MYBL2、HAT1 と結合して、転写伸長においては IWS1 と複合体を形成して、ヒストンタンパク質の脱メチル化に関しては ELF6、REF6 と結合して、核-細胞質間移行に際しては 14-3-3 と分子間相互作用を示す (Table 1; Yin et al., 2005; Yu et al., 2008; Li et al., 2009, 2010; Ryu et al., 2010; Ye et al., 2012; Zhang et al., 2014)。以上のことから、BES1 が数多くの標的遺伝子の発現を制御するために形成する複合体の個々の構成因子を同定することは、BR による遺伝子発現制御機構を解明する上で重要な知見になると予想される。

そこで、本研究では BES1 の相互作用因子の候補タンパク質の 1 つとして、Heat shock protein 90 (HSP90) に着目した。HSP90 は、真核生物において高度に保存された分子シャペロンとして様々な役割を果たしている。重要なこととして、動物や菌類において、HSP90 は転写因子を始め、ステロイド受容体、キナーゼ、シャペロンのようなクライアントと呼ばれる多数のタンパク質と分子間相互作用を形成することが知られている (Taipale et al., 2010)。このことは、クライアントの機能や安定性の制御に寄与している。また、HSP90 とクライアントのヘテロ複合体の形成は HSP90 の ATPase 活性に強く依存している (Basso et al., 2002)。このため、その ATPase の特異的阻害剤であるゲルダナマイシン (GDA) は、HSP90 とクライアントの複合体の形成を妨げ、クライ

アントの不安定化を引き起こすことが報告されている (Obermann et al., 1998; Fang et al., 2009)。

シロイヌナズナにおいて、HSP90 は 7 種のファミリーが存在しており、それぞれ細胞内の局在性が異なることが既に明らかにされている (Krishna and Gloor, 2001)。すなわち、HSP90.1、HSP90.2、HSP90.3、HSP90.4 の 4 種は細胞質と核への局在性を示す。一方、HSP90.5 は葉緑体、HSP90.6 はミトコンドリア、HSP90.7 は小胞体に局在する。そして、植物の成長や発達においても、動物と同様に、HSP90 の機能は必須であることも明らかにされてきた。例えば、薬理的もしくは遺伝学的に HSP90 の機能を抑制すると、シロイヌナズナは様々な形態異常を引き起こすことが観察されている (Sangster et al., 2007)。ABA の作用機構においても HSP90 の重要性が報告されている。Clément et al. (2011) は、HSP90.2 が気孔の閉鎖に加え、ABA 応答における転写調節に関与することを明らかにした。興味深いことに、非生物学的ストレスや病原菌に対する植物の様々な防御応答において、HSP90 を介したタンパク質複合体の形成が重要な役割を担っていることも知られている (Kadota and Shirasu, 2012)。これらの知見は、HSP90 とクライアントの複合体形成が植物の生活環を通して生じる様々な生理現象で重要な役割を果たしていることを示唆する。

これまで、いくつかの研究グループによって、BR の作用機構における HSP90 の関与が指摘されてきた。例えば、HSP90.1 と相互作用する TWISTED DWARF1 をコードしている遺伝子 (*twisted dwarf1*) の T-DNA 挿入変異体は、BR 非感受性変異体と同様な表現型を示すことが明らかにされている (Kamphausen et al., 2002; Pérez-Pérez et al., 2004)。また、*brassinazole-insensitive-long hypocotyl 2* (*BIL2*) 遺伝子は、HSP90 と同じ分子シャペロンであり、BR 情報伝達の下流で機能するミトコンドリア局在型の新規

DnaJ/HSP40 ファミリータンパク質をコードしていることが報告されている (Bekh-Ochir et al., 2013)。以上の研究報告より、HSP90 やそのタンパク質複合体に焦点を当てた研究は、BR 情報伝達に関する理解を更に深めることができると考えられる。

以上のような背景より、本章では、HSP90 が BR の情報伝達に関与する分子レベルの証拠を生化学的に示すことを目的とした。まず、内生の BR 濃度の変化に対する HSP90 複合体の質的量的変化を調べた。次に、HSP90 のクライアント候補として、BES1 に焦点を当てた。すなわち、BES1 と HSP90 の細胞内での直接的な相互作用の検証を試みた。最後に、BR 応答性遺伝子の発現制御における BES1/HSP90 複合体の必要性を検討した。

3-2 節 材料及び方法

3-2-1 項 植物材料及び培養条件

植物材料として、シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 株を用いた。培養条件は、第 2 章の材料及び方法 (2-2-1 項) に準じた。

3-2-2 項 植物ホルモン及び各種阻害剤の処理

BL と Brz のストック溶液は、2-2-2 項に準じて調製した。また、プロテインホスファターゼ 2A の特異的阻害剤であるオカダ酸アンモニウム塩 (OA; Merck, Darmstadt, Germany)、並びに HSP90 の ATPase 活性の特異的阻害剤であるゲルダナマイシン (GDA; Focus Biomolecules, Plymouth Meeting, PA) のストック溶液の濃度は、それぞれ 1 mM 及び 5 mM とした。これらの試薬は、100 % DMSO に溶解し、-20 °C で冷凍保存した。また、継代後培養 7 日目で、初期の対数増殖期に相当する T87 細胞の細胞懸濁液中に、これらのストック溶液を直接添加した。

3-2-3 項 プラスミドの構築

本研究で使用したオリゴヌクレオチドの全配列は Table 8 に示した。以下に、BES1 過剰発現細胞の作出に使用したプラスミドの構築方法を示す。BES1 の完全長 cDNA は 7 日齢のシロイヌナズナ実生から抽出した全 RNA を用いた Reverse transcription

polymerase chain reaction (RT-PCR) によって増幅した (Tanaka et al., 2005)。RT-PCR に用いたフォワード及びリバースプライマーにはそれぞれ、制限酵素 *ClaI* 及び *NotI* による切断部位を付加した。増幅した cDNA は pUC118 プラスミドの *SmaI* 切断部位に挿入し、その後塩基配列の解読を行うことで、クローニングした *BES1* の塩基配列にエラーがないことを確認した。次に、Zanetti et al. (2005) に従い、6×His-FLAG タグをコードしている 2 組のオリゴヌクレオチドを設計した。それぞれのオリゴヌクレオチドは超純水に溶解し、95 °C で 3 分間加熱後、室温で冷却することで、アニーリングさせた。1 mM ATP の存在下で、アニーリング産物に T4 ポリヌクレオチドキナーゼを処理し、5'-OH 末端をリン酸化した。2 組の 2 本鎖断片は pBluescript SK (+) プラスミド (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) の *SmaI/ClaI* 切断部位に挿入した後、塩基配列を解読することで、合成した 6×His-FLAG タグの配列が正しいことを確認した。*NcoI/ClaI* 断片を含む 6×His-FLAG 及び *ClaI/NotI* 断片を含む 1.1 kb の *BES1* cDNA をそれぞれのプラスミドから切り出し、pUC18 プラスミドの *NcoI/NotI* 切断部位に同時に導入した。この pUC18 プラスミドには、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター (*CaMV 35S*)、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) の改良型遺伝子、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* の *nopaline synthase* 遺伝子由来のターミネーター (*Nos-T*) を含んでいるが (Chiu et al., 1996)、本研究では GFP 遺伝子と 6×His-FLAG-*BES1* (*HF-BES1*) 遺伝子を入れ替えることで *CaMV 35S::HF-BES1::Nos-T* 融合遺伝子を作製した。なお、*CaMV 35S::GFP::Nos-T* 融合遺伝子を含む本来の pUC18 プラスミドは、静岡県立大学の丹羽康夫博士に分与して頂いた。更に、この融合遺伝子は、シーケンス解析によって、配列の間違いないことを確認した。最後に、*CaMV 35S::HF-BES1::Nos-T* 融合遺伝子を含むプラスミドは *EcoRI* によって直線化し、バイナリーベクターである

pCAMBIA1300 の *EcoRI* 切断部位に挿入した後に、アグロバクテリウムによる T87 細胞の形質転換に使用した。

コムギ胚芽無細胞系によるタンパク質合成に使用した転写鋳型は、以下のように作製した。*CaMV 35S::HF-BES1::Nos-T* 融合遺伝子を含む pUC18 プラスミドを鋳型にして、PrimeSTAR Max DNA polymerase (TakaRa Bio, Shiga, Japan) 存在下で *HF-BES1* の cDNA 領域を PCR によって増幅した。そして、その PCR 産物を InFusion HD cloning kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) によって、pEU-E01-MCS プラスミド (CellFree Sciences Co., Yokohama, Japan) の *EcoRV* 切断部位に挿入した。最後にシーケンス解析によって、*6HF-BES1* やその近傍配列の塩基配列が正しいことを確認した。また、HSP90.3 の転写鋳型は、Nemoto et al. (2011) に従い、転写用の RNA プロモーターを 2 つのプライマーで分断した PCR 法 (Split-primer PCR 法) によって構築した。

3-2-4 項 シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 株の形質転換

CaMV 35S::HF-BES1::Nos-T 融合遺伝子を含む pCAMBIA1300 プラスミドは、エレクトロポレーション法によって、*Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif 株に導入した。T87 細胞の形質転換は、Ogawa et al. (2008) の方法に準じた。形質転換後の細胞は 10 µg/mL のハイグロマイシン及び 200 µg/mL のクラフォランを含む JPL 寒天培地で選抜し、5 µg/mL のハイグロマイシン及び 200 µg/mL のクラフォランを含む JPL 液体培地で維持した。継代培養の条件は、野生型の T87 細胞と同様に、第 2 章の材料及び方法 (2-2-1 項) に準じた。

3-2-5 項 *In vitro* タンパク質合成及び脱リン酸化

HF-BES1 タンパク質と HSP90.3 タンパク質、及び大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素の N 末端側に FLAG タグを付加した融合タンパク質 (FLAG-DHFR) を合成するために、Nemoto et al. (2011) に従って、*in vitro* 転写及びコムギ胚芽無細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳を行った。また、合成した HF-BES1 を脱リン酸化するために、HF-BES1 の粗合成液に Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP; TaKaRa Bio) を処理した。酵素反応条件は、付属のマニュアルに従った。酵素反応液に等量の 2×SDS サンプルバッファ [125 mM トリス塩酸 (pH 6.8)、2 % (w/v) SDS、10 % (v/v) グリセロール、5 % (v/v) 2-メルカプトエタノール、0.005 % (w/v) ブロモフェノールブルー] を加えることで、反応を停止した。

3-2-6 項 細胞の分画及びタンパク質の抽出

ネイティブなタンパク質は、以下に示すように調製した。全ネイティブタンパク質 (Total native protein, T) は、Protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) 及び PhosSTOP (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を添加した CelLytic P Cell Lysis Reagent (P9599, Sigma-Aldrich) によって得た。サイトゾルのタンパク質 (Cytosolic protein, C)、膜画分のタンパク質 (Membrane protein, M)、核画分のタンパク質 (Nuclear protein, N) の抽出には、CelLytic PN kit を用いた。サイトゾルのタンパク質は、可溶化した細胞を遠心分離 (1260×g) した後に生じる上清として回収した。膜画分のタンパク質は、細胞膜と核を含む沈殿物に終濃度 0.3 % の Triton X-100 を処理することで得た。残渣の核画

分は、Benzonase nuclease (Merck) を氷上で 1 時間処理された。その後、終濃度 1 % の Triton X-100、500 mM の 6-アミノカプロン酸、protease inhibitor cocktail を添加した 1×NativePAGE sample buffer (Life Technologies Co.) で核を再懸濁し、30 分間氷上で静置した。遠心分離 (12000×g) した後に得られた上清を核画分のタンパク質として調製した。タンパク質の定量方法は、第 2 章の材料及び方法 (2-2-4 項) と同様である。

3-2-7 項 イムノブロット

SDS-PAGE を行った後の 10 % のポリアクリルアミドゲルは、転写バッファー [25 mM トリス、192 mM グリシン、10 % (v/v) メタノール] で平衡化した。そして、メタノールと超純水で予め親水処理を行っていた Immobilon-P メンブレン (Millipore, Bedford, MA) にセミドライ方式で転写した。転写後のメンブレンは、終濃度 5 % (w/v) のスキムミルク (Megmilk snow brand Co., Tokyo, Japan) を溶解させた TBS-T [20 mM トリス、137 mM 塩化ナトリウム、0.1 % (v/v) Tween 20、pH 7.6] に浸漬し、室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。TBS-T で洗浄したメンブレンは、HF-BES1 を検出するために、1 % (w/v) BSA を含む TBS-T で 5000 倍希釈した anti-FLAG rabbit polyclonal antibody (F7425、Sigma-Aldrich) を処理した。もしくは、HSP90 を検出するために、TBS-T で 1000 倍希釈した anti-HSP90 rabbit polyclonal antibody (sc-33755、SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を処理した。一次抗体溶液に浸漬したメンブレンは、4 °C で一晩反応させた。洗浄したメンブレンは、更に、TBS-T で 3000 倍希釈した Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody-conjugated horseradish peroxidase (Abcam, Cambridge, MA) と室温で 1 時間反応させた。最後に、Amersham ECL prime western blotting detection

reagent (GE Healthcare) と反応させたメンブレンは、LAS-1000 (Fujifilm. Co.) による化学発光検出に供試した。

また、Blue native (BN) -PAGE 及び two-dimensional BN/SDS-PAGE は、NativePAGE Novex Bis-Tris Gel system kit (Life Technologies Co.) の方法に従った。1次元目の BN-PAGE には NativePAGE Novex 4-16 % Bis-Tris gel、2次元目の SDS-PAGE には 10 % のポリアクリルアミドゲルを用いた。ゲルの平衡化に関して、還元処理は 65 °C に加温して行った。

3-2-8 項 タンパク質の精製

質量分析の試料は、以下のように調製した。BL 処理した細胞から抽出した全ネイティブタンパク質を 4 °C 下で Sephacryl S-200 High Resolution ゲルろ過クロマトグラフィー (GE Healthcare) に供試した。ゲル担体は、平衡化バッファー [50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、10 % (v/v) グリセロール、1 % (v/v) Triton X-100] で前処理した。ボイドボリューム相当の溶出液は、Bio-Rad Protein Assay で定量後、平衡化バッファーで終濃度 1 mg/mL に希釈した。1 mL のタンパク質溶液に 50 µL の Dynabeads Protein G magnetic beads (Life Technologies) を加え、4 °C で 30 分間転倒混和した。上清を回収し、2 µg の Normal rabbit IgG (sc-2027, SantaCruz) もしくは抗 HSP90 抗体を加え、4 °C で一晩転倒混和した。50 µL の Dynabeads Protein G を加え、4 °C で 1 時間転倒混和し、抗体-抗原複合体を回収した。残渣のビーズは 200 µL のバッファー [50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、10 % (v/v) グリセロール、0.1 % (v/v) Triton X-100] で 3 回洗浄した。最後に、20 µL の 2×SDS サンプルバッファーをビーズ

に加え、95 °C、3 分間加温した後、上清を免疫沈降物として調製した。

HF-BES1 のタンデムアフィニティー精製 (TAP) に関して、以下の手順で行った。全ての操作は氷上、あるいは 4 °Cで行った。まず、His タグを用いた精製を行った。1 mL の全ネイティブタンパク質に終濃度 5 mM のイミダゾールを添加した。200 μ L の COSMOGEL His-Accept 懸濁液 (Nacalai Tesque) をマニュアルに準じて洗浄し、100 μ L の His 洗浄溶液 [50 mM リン酸ナトリウムバッファー、300 mM 塩化ナトリウム、5 mM イミダゾール、0.1 % (v/v) Triton X-100、pH 8.0] で予め平衡化した。試料溶液を平衡化した His-Accept 懸濁液に添加し、2 時間転倒混和した。遠心分離 (1500 \times g、5 分) した後、上清を除去し、1 mL の His 洗浄溶液で残渣を洗浄した (計 3 回)。洗浄後の沈殿物に 500 μ L の His 溶出液 [50 mM リン酸ナトリウムバッファー、300 mM 塩化ナトリウム、125 mM イミダゾール、0.1 % (v/v) Triton X-100、pH 8.0] を加え 5 分間の転倒混和を行い、遠心分離後の上清を溶出液として回収した (計 2 回)。次に、FLAG タグを用いた精製を行った。40 μ L の Mouse IgG-Agarose 懸濁液 (A0919、Sigma-Aldrich) 及び ANTI-FLAG M2 Affinity Gel 懸濁液 (A2220、Sigma-Aldrich) をそれぞれ 500 μ L の TBS-T [50 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、0.1 % (v/v) Triton X-100、pH 7.5] で洗浄した (計 2 回)。1 mL の His 溶出液を洗浄後の Mouse IgG-Agarose に添加した後、1 時間転倒混和し、遠心分離 (5000 \times g、30 秒) 後の上清をプレクリア画分として調製した。1 mL のプレクリア画分を洗浄した ANTI-FLAG M2 Affinity Gel に加え、更に 4 時間転倒混和した。遠心分離後の残渣は、1 mL の TBS-T で 4 回洗浄した。終濃度 150 ng/ μ L の FLAG ペプチド (F3290、Sigma-Aldrich) 水溶液 [10 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5] を残渣に 100 μ L 加え、30 分間転倒混和し、遠心分離後の TAP 画分として調製した (計 2 回)。最後に、溶出液は 10 μ L の StrataClean Resin (Agilent Technologies)

で濃縮し、等量の 2×SDS サンプルバッファーと混合し、95 °C で 5 分間加熱処理した。

3-2-9 項 *In vitro* 共免疫沈降

コムギ胚芽無細胞系にて合成した 20 μL の HSP90.3 及び HF-BES1 の粗合成液を 160 μL の結合バッファー [20 mM トリス塩酸 (pH 7.5)、150 mM 塩化ナトリウム、0.1 % (v/v) Triton X-100] と混合し、1 時間静置した。更に、結合バッファーで予め平衡化した ANTI-FLAG M2 Affinity Gel もしくは Mouse IgG-Agarose の懸濁液 40 μL と混合し、4 °C で 1 時間転倒混和した。1 mL の結合バッファーで 4 回洗浄した後、残渣に 20 μL の 2×SDS サンプルバッファーを加え、95 °C で 5 分間加熱処理し、上清を回収した。

また、GDA の処理は次のように行った。まず、20 μL の HSP90.3 の合成液と 160 μL の結合バッファーを混合した。次に、その混合液に終濃度 50 μM の GDA を加え、1 時間前処理した。最後に、20 μL の HF-BES1 の合成液を加え、先に述べた共免疫沈降を行った。

3-2-10 項 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析

10 %ポリアクリルアミドゲルによる SDS-PAGE によって分離したタンパク質を Silver Stain MS kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で検出した。90 kDa の分子量を示す位置に存在するバンドを切り出し、第 2 章の材料及び方法 (2-2-7 項) と同様にゲル内消化に供試した。得られた消化物は、第 2 章の材料及び方法 (2-2-7 項) に従って、LC-MS/MS 解析によるタンパク質の同定を行った。タンパク質候補の探索に

用いたデータベースは、Uniprot を使用した。

3-2-11 項 AlphaScreen

In vitro で合成したタンパク質を用いた Alpha Screen 法は、Nemoto et al. (2011) 及び Takahashi et al. (2012) の方法に準じた。以下に、簡潔な解析の流れを示す。ビオチン化した HSP90.3 及び 5 倍希釈した HF-BES1 もしくは FLAG-DHFR を反応バッファー [100 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、0.01 % (v/v) Tween 20、1 mg/mL BSA] に加え、25 °C で 1 時間 384 穴の Optiplat (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) 上に反応させた。この反応溶液に検出バッファー [100 mM トリス塩酸 (pH 8.0)、0.01 % (v/v) Tween 20、1 mg/mL BSA、1 ng/mL anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich)、Protein A-conjugated acceptor beads (PerkinElmer)、Streptavidin-coated donor beads (PerkinElmer)] を添加し、更に 25 °C で 1 時間静置した。タンパク質の分子間相互作用は、EnSpire alpha マイクロプレートリーダー (PerkinElmer) にて解析した。

3-2-12 項 リアルタイム PCR

BES1 過剰発現細胞から RNeasy plant mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて全 RNA を調製した。その後、得られた全 RNA を鋳型にして、ReverTra Ace qPCR RT master mix with gDNA remover (Toyobo, Osaka, Japan) で cDNA を合成した。最後に、超純水で 10 倍希釈した cDNA、10 µM のプライマーセット (Table 8)、SYBR premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) を混合し、Thermal Cycler Dice real-time system TP800 (TaKaRa Bio)

による定量的 PCR を行った。 *Constitutive photomorphogenesis and dwarfism* (CPD) 及び *Dwarf 4* (DWF4) の相対的発現量は、それぞれの発現量を *Polyubiquitin 10* (UBQ10) の発現量でノーマリゼーションした後に、 $\Delta \Delta Ct$ 法によって算出した。

3-3 節 結果及び考察

3-3-1 項 シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 における HSP90 複合体の細胞内分布 及び分子特性

T87 細胞における HSP90 複合体の挙動を明らかにするために、免疫学的手法によって HSP90 複合体の細胞内分布と動的状態を調べた。HSP90 の検出には、SantaCruz 社から販売されている抗 HSP90 (at-115) 抗体を使用した。この抗体のエピトープ配列は、HSP90 の C 末端側に位置する M585-D699 である。その配列は、HSP90.3 と完全に同一であり、HSP90.2 とは 97 %、HSP90.4 とは 93 %、HSP90.1 とは 84 %、HSP90.5 及び HSP90.6 とは 33 %、HSP90.7 とは 42 %の相同性が認められた。このことから、この抗体によって検出される HSP90 は実験条件によっては、HSP90.3、HSP90.2、HSP90.4、HSP90.1 の少なくとも 4 種の HSP90 ファミリーが混在する可能性が考えられる。

まず、この抗体を用いて、T87 細胞における HSP90s の細胞内分布と存在量を解析した。第 3 章の材料及び方法 (3-2-6 項) に示した手順で、4 種のタンパク質画分を得た。すなわち、全ネイティブタンパク質 (T)、サイトゾルタンパク質 (C)、膜タンパク質 (M)、核タンパク質 (N) である。得られた画分を用いてイムノブロット分析を行った結果、全てのタンパク質画分でおおよそ 90 kDa を示す移動度の位置に単一のバンドが検出された (Figure 11A)。この結果は、この抗体によって検出されたバンドが HSP90 ファミリーのタンパク質であることを示している。

次に、T 画分、C 画分、N 画分における HSP90 複合体の分子分布を BN/SDS-PAGE と抗体検出によって調べた。その結果、まず、1 次元目のネイティブな状態において、

おおよそ 146 kDa から 1,000 kDa の分子量範囲で多数のタンパク質のスポットが存在していることが分かった (Figure 11B)。このことは、T87 細胞において、様々な構成因子を持つと予想される HSP90 複合体が複数存在していることを示唆する。そして、全ての画分に共通して、最も存在量が多いスポットが 146 kDa 付近に観察された。HSP90 はネイティブな条件下において 2 量体の構造を示すことから、このスポットは二量体様の構造をとっている HSP90 であると推定される (Wayne and Bolon, 2007)。加えて、T 画分は 720 kDa より高分子側にも HSP90 複合体が存在していることが明らかとなった (Figure 11B, top panel)。一方、C 画分と N 画分において、上記のスポットは弱く検出されていた。480 kDa 以下の分子量を持つ HSP90 複合体に関しては、3 種の画分で同程度のシグナルが観察された (Figure 11B, middle and lower panels)。以上の結果より、HSP90 は細胞内画分に応じて、2 量体様のサイズを示す複合体や 480 kDa 以上のサイズを示す高分子複合体を形成していることが示唆された。

3-3-2 項 HSP90 を含む高分子複合体の BR 依存的な質的量的変化

本論文の第 2 章において、T87 細胞は内生 BR 量の変化に応答した生理的变化を示すことを明らかにした。さらに、T 画分において、480 kDa 以上の分子サイズを示す HSP90 複合体が存在していることも分かった (Figure 11B)。そこで、BN/SDS-PAGE と免疫検出を用いて、BL や Brz 処理が T 画分に存在する HSP90 複合体の分子分布に与える効果を調べた。その結果、BL 処理によって 1,048 kDa と 720 kDa 付近に HSP90 を含む高分子複合体のスポットが顕著に認められた (Figure 12)。一方、480 kDa 以下の複合体のプロファイルは、BL や Brz 処理に応答した変化をほとんど示さなかった。これら

の結果より、HSP90 を含む高分子複合体は、内生 BR 量の増加に応じて質的量的な変化を示すことが考えられる。しかし、HSP90 の総量は BL や Brz によって、ほとんど変化しなかった (Figure 13)。このことより、クライアントの数、種類、組み合わせによる HSP90 複合体の質的变化が HSP90 を含む高分子複合体の BR 依存的な分子特性の変化に寄与することが示唆された。ただし、BL によって高分子側で検出された HSP90 複合体の形成には、どの HSP90 ファミリーが関与しているのかどうかを今後の研究によって明らかにしていく必要がある。

3-3-3 項 抗 HSP90 抗体を用いた免疫沈降画分に存在する HSP90.3 の同定

3-3-1 項で述べたように、本研究で使用した抗 HSP90 (at-115) 抗体はシロイヌナズナの複数の HSP90 ファミリーを検出している可能性が考えられた。そこで、この抗体と優先的に結合している HSP90 ファミリーの同定を試みた。まず、BL を処理した T87 細胞から T 画分のタンパク質を調製した。それをセファクリル S200 ゲルろ過クロマトグラフィーに供試し、ボイドボリュームに相当する溶出液を回収した。次に、抗 HSP90 抗体による免疫沈降で、その溶出液から HSP90 複合体を精製した。最後に、その精製画分に含まれる HSP90 を LC-MS/MS によって同定した。その結果、抗 HSP90 抗体で免疫沈降されたタンパク質画分には、HSP90.3 が主に含まれていることが明らかとなった (Table 9)。すなわち、HSP90.3 に対応する 2 本のペプチドが同定された (Figure 14)。1 本目のペプチドである EVSHEWDLVNK (質量の理論値 1,354.6517、測定誤差 25 ppm、対応する HSP90 のアミノ酸配列 E253–K263) は HSP90.2 と HSP90.3 に存在しており、一方、2 本目のペプチドである DTSGEALGR (質量の理論値 904.4251、測定誤

差 38 ppm、対応する HSP90 のアミノ酸配列 D162-R170) は HSP90.3 のみに存在していた。これらのことは、BL 処理した T87 細胞の T 画分において、HSP90.3 が抗 HSP90 抗体と優先的に結合していることを示唆する。しかしながら、LC-MS/MS 分析に供試したタンパク質サンプルには 480 kDa 以下の分子量を持つ HSP90 を含む複合体も混在していると考えられる。そのため、BL に誘導される HSP90 高分子複合体の形成と HSP90.3 の関係性は今後の研究で詳細に検討する必要がある。

3-3-4 項 BES1 と HSP90 の BR 依存的な分子間相互作用

Sangster and Queitsch (2005) の総説において、HSP90 シャペロン複合体の活性は BR 情報伝達にとって必要であることが指摘されている。加えて、3-3-2 項における実験結果より、HSP90 を含む高分子複合体は BR 量に応じた特性変化を示すことが明らかとなった。従って、BR 情報伝達に関わるタンパク質を HSP90 のクライアントとして同定することは、BR 情報伝達の詳細な仕組みを理解する上で非常に重要であると思われる。BR 情報伝達で機能する転写因子 BES1 は自身の標的遺伝子を制御するために種々のタンパク質と複合体を形成することが明らかにされてきた (Yin et al., 2005; Yu et al., 2008; Li et al. 2009, 2010; Ye et al., 2012; Zhang et al., 2014)。加えて、動物において、HSP90 は多くの転写因子と相互作用し、それらの機能を調節していることも証明されている (Taipale et al. 2012)。これらの理由より、HSP90 のクライアント候補として BES1 に着目し、HSP90 が BES1 と複合体を形成しているかどうかを検証した。

BES1 タンパク質の精製を容易にするために、N 末端側に 6 個のヒスチジン (His) タグと FLAG タグを融合させた BES1 タンパク質 (HF-BES1) を過剰発現させた T87 形

質転換細胞を作出した。シロイヌナズナのネイティブな BES1 は BL 処理に応答した脱リン酸化を受けて活性化することが知られている (Yin et al., 2002; Vert and Chory, 2006)。そのため、最初に HF-BES1 タンパク質が内生 BR 量の増加に依存した脱リン酸化を受けているのかどうかを検討した。BES1 のリン酸化・脱リン酸化状態は、電気泳動における BES1 のバンドの挙動の変化で判断されている (Yin et al., 2002)。すなわち、リン酸化した BES1 のバンドに比べ、BL 処理によって脱リン酸化された BES1 のバンドはゲル上の移動距離が長くなることから、本実験においても、このことを指標として HF-BES1 のリン酸化状態を追跡した。

その結果、BL を処理した形質転換細胞における HF-BES1 は、他の処理を行った細胞に比べ、SDS-PAGE における移動距離が長くなった (Figure 15A、Figure 15B, top panel)。BL の存在下では、BES1 は低リン酸化状態となり、BL の非存在下では高リン酸化状態となることが報告されている (Yan et al., 2009; Ryu et al., 2010)。さらに、protein phosphatase 2A の阻害剤であるオカダ酸は BL に誘導される HF-BES1 バンドの移動を阻害した (Figure 15A)。これらのことは、BES1 過剰発現細胞中の HF-BES1 はネイティブな BES1 と同様に BL に応答して脱リン酸化され、低リン酸化状態となっていることを示唆する。

次に、内生の HSP90 が HF-BES1 とタンデムアフィニティー精製 (TAP) によって共精製されるかどうかにより、両者の結合を検証した。抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロット分析は、BL 処理の有無に関わらず、HF-BES1 タンパク質を BES1 過剰発現細胞から特異的に精製し、濃縮できたことを示した (Figure 15B, third panel)。一方、HSP90 は BL の有無に関わらず共精製された。しかしながら、HSP90 のシグナルは BL 無処理区に比べて、BL 処理区でより強く検出された (Figure 15B, forth panel)。これらの結果

より、HSP90 は BL 非存在下に比べ、BL 存在下で優先的に BES1 と分子間相互作用を示すことが明らかとなった。

3-3-5 項 *In vitro* における HSP90.3 と BES1 の ATP 依存的な分子間相互作用

HSP90.3 を含む HSP90 は、BL 処理した細胞において、HF-BES1 と強く相互作用することが示された (Figure 15)。次に、*in vitro* においても HF-BES1 と HSP90.3 が複合体を形成するのかどうかを検討した。コムギ胚芽無細胞抽出物による *in vitro* タンパク質合成系で得られた HSP90.3 と HF-BES1 の粗合成液を混合し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。抗 HSP90 (at-115) 抗体を用いたイムノブロット分析によって、免疫沈降物中に存在する HSP90.3 のシグナルが認められた (Figure 16A)。一方、マウス IgG による免疫沈降で得られたサンプルでは、HSP90.3 が検出されなかった (Figure 16A)。これらの結果は、銀染色による検出によっても、同様に得ることができた (Figure 17)。更に、AlphaScreen を用いて、*in vitro* における HF-BES1 と HSP90.3 の相互作用を定量的に調べた (Figure 16B)。その結果、ビオチン化した HSP90.3 とネガティブコントロールの FLAG-DHFR の組み合わせと比較して、ビオチン化した HSP90.3 と HF-BES1 の組み合わせにおいて 5 倍以上の化学発光シグナルが観察された (Figure 16C)。これらの結果は、*in vitro* においても HSP90.3 と BES1 が複合体を形成することを強く支持するものであった。

In vivo 共精製実験の結果より、低リン酸化状態の BES1 は HSP90 と優先的にヘテロな複合体を形成することが示唆された (Figure 15)。従って、*in vitro* で合成した HF-BES1 が高リン酸化型もしくは低リン酸化型のどちらで存在しているのかどうかを

調べた。コムギ胚芽無細胞系で合成した HF-BES1 の粗合成液に Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) を処理し、その後イムノブロット分析を行った。その結果、CIAP 無処理区と比較して、CIAP 処理は HF-BES1 のシグナルを減少させた (Figure 16D)。この結果より、*in vitro* で合成した HF-BES1 が主に高リン酸化型として存在していることが分かった。従って、*in vitro* において高リン酸化型の HF-BES1 と HSP90.3 が複合体を形成することが予想された。一方で、*in vivo* における共精製実験では、HSP90 は恐らく、低リン酸化状態の HF-BES1 と優先的に結合していた (Figure 15)。*In vivo* と *in vitro* における HSP90 と HF-BES1 の分子間相互作用のメカニズムは異なっているのかもしれない。現在のところ、これらの現象の違いを適切に説明できる実験結果は得られていないが、いくつかの仮説が考えられる。

Lachowiec et al. (2013) は、*in vivo* における共免疫沈降実験の結果から、BES1 は自身のリン酸化状態と非依存的に HSP90 と相互作用できることを主張している。一方、本研究によって、BL を処理した BES1 過剰発現細胞において多くの HSP90 が HF-BES1 と共精製されることも明らかとなった (Figure 15B)。これらのことは、HSP90 と BES1 の複合体形成には低リン酸化状態の BES1 に優先性があるけれども、高リン酸化状態の BES1 にも HSP90 と複合体を形成する可能性があることを示唆する。あるいは別な可能性として、2 種類の異なるタンパク質合成システム、つまり不均一なコムギ胚芽無細胞タンパク質翻訳系もしくは均一な T87 細胞における細胞内タンパク質翻訳系によって合成された HF-BES1 のリン酸化部位やリン酸化の程度が異なっていることも考えられる。つまり、*in vitro* で合成された HF-BES1 は、BL を投与した BES1 過剰発現細胞の HF-BES1 のリン酸化状態を反映していないのかもしれない。以上のことから、HSP90 と分子間相互作用を示す BES1 のリン酸化部位を特定することは今後の重要な研究課題

であると考えられる。

HSP90 とクライアントの相互作用において、HSP90 の ATPase 活性は重要な働きを担っている。その特異的阻害剤である GDA は、クライアントに対する HSP90 の結合能を抑制することが知られている (Obermann et al., 1998; Basso et al., 2002; Fang et al., 2009)。以上の理由で、*in vitro* における BES1/HSP90.3 の複合体形成に対する GDA の影響を調べた。まず、HSP90.3 の粗合成液に、GDA を直接添加した。それから、HF-BES1 の粗合成液を混合し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。抗 HSP90 抗体によるイムノブロット分析の結果、Mock 処理に比べて、GDA 処理は HF-BES1 と共精製された HSP90.3 の存在量を大きく減少させることが明らかとなった (Figure 16E)。このことは、HSP90.3 の ATPase 活性が、*in vitro* における BES1 と HSP90.3 の複合体形成において、必須であることを示唆する。

3-3-6 項 BR 生合成遺伝子のフィードバック制御における BES1/HSP90 複合体の関与

本研究は、BES1 と HSP90 が *in vivo* において BR 依存的な様式で、そして *in vitro* において ATPase 依存的な様式で複合体を形成することを明らかにしてきた (Figure 15、Figure 16)。そこで、BES1 と HSP90 の分子間相互作用はどのようにして BR 情報伝達に関与しているのか？、という新たな疑問が生じた。これを明らかにするために、内生 BR 量の増加によって発現が負に制御される 2 種の BR 生合成遺伝子 *CPD* と *DWF4* (Tanaka et al., 2005) に GDA が与える影響をリアルタイム PCR で検討した。

その結果、BES1 過剰発現細胞における両遺伝子の転写量は GDA 非存在下において BL によって経時的に大幅な減少を示した (Figure 18)。それとは反対に、GDA 存在

下においては BL に誘導される両遺伝子の転写量の減少が強く阻害されることが分かった。これら両遺伝子は、BES1 とそのホモログ転写因子である BZR1 の標的遺伝子であることが知られている (He et al., 2005; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011; Ye et al., 2012)。先の *in vitro* 結合実験において、HF-BES1/HSP90.3 複合体の存在量が GDA によって明らかに減少していた (Figure 16E)。加えて、シロイヌナズナの植物体において、GDA に対する BZR1 の感受性は BES1 のそれより低いことが明らかにされている (Lachowiec et al., 2013)。すなわち、BZR1 は HSP90 のクライアントではないということが報告されている (Lachowiec et al., 2013)。以上のことから、GDA によって BES1/HSP90 複合体の形成が阻害されることによって、CPD と DWF4 の正常なフィードバック制御が抑制されていることが推測される。しかしながら、BES1 と BZR1 はアミノ酸レベルで非常に高い相同性 (87% の同一性、96% の類似性) を示すことも事実である (Yin et al., 2002; Wang et al., 2002)。従って、本研究の実験結果だけでは、GDA が BZR1 と HSP90 の複合体形成にも影響を与えている可能性を否定できない。そこで、BR 情報伝達における BES1/HSP90 複合体の役割をより明確にするために、今後の解析によって BZR1 が HSP90 と複合体を形成するかどうかを検証することは重要な研究課題の 1 つである。

最後に、本章を総括する。本研究により、BR 情報伝達における HSP90 シャペロンの重要性を示す 3 つの知見を得ることができた。1 つ目に、HSP90 を含む高分子複合体は内生 BR 量の増加に応答して形成されることが分かった。2 つ目に、HF-BES1 は *in vitro* において、恐らく *in vivo* でも同様に、HSP90 の ATPase 活性依存的に HSP90.3 とヘテロ複合体を形成することが明らかとなった。3 つ目に、HSP90 の特異的阻害剤である GDA は、BL に誘発される 2 種の BR 生合成遺伝子、CPD と DWF4 のフィードバック阻害を抑制した。従って、この過程における BES1/HSP90 複合体の関与が示唆された。

本研究で得られた結果は、BR 情報伝達における BES1/HSP90 複合体の分子機能をより詳細に解明するための出発点となり得る重要な知見であることが考えられる。今後の研究において、BES1/HSP90 複合体も含め、HSP90 を含む高分子複合体を形成する他の構成因子を同定することは非常に重要である。そのことにより、近い将来、BR 情報伝達を介した内生 BR 量のフィードバック制御に加えて、これらの複合体を介した BR の遺伝子発現調節に関するメカニズムも明らかになると期待している。

3-4 節 図表

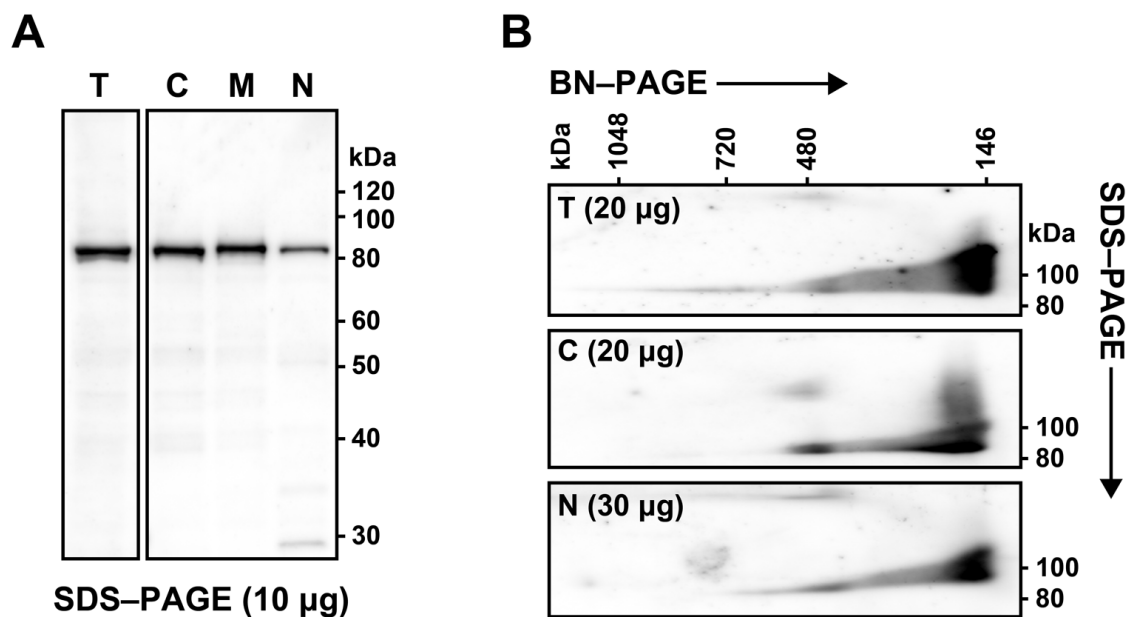


Figure 11. Cellular distribution and molecular profiles of HSP90-containing complexes
Native proteins differentially extracted from 7-day-cultured cells were subjected to **(A)** SDS-PAGE or **(B)** BN/SDS-PAGE linked immunodetection with the anti-HSP90 (at-115) antibody. Abbreviations in the figures: T, total native proteins; C, cytosolic proteins; M, membrane proteins; N, nuclear proteins. See the Materials and Methods for cell fractionation details.

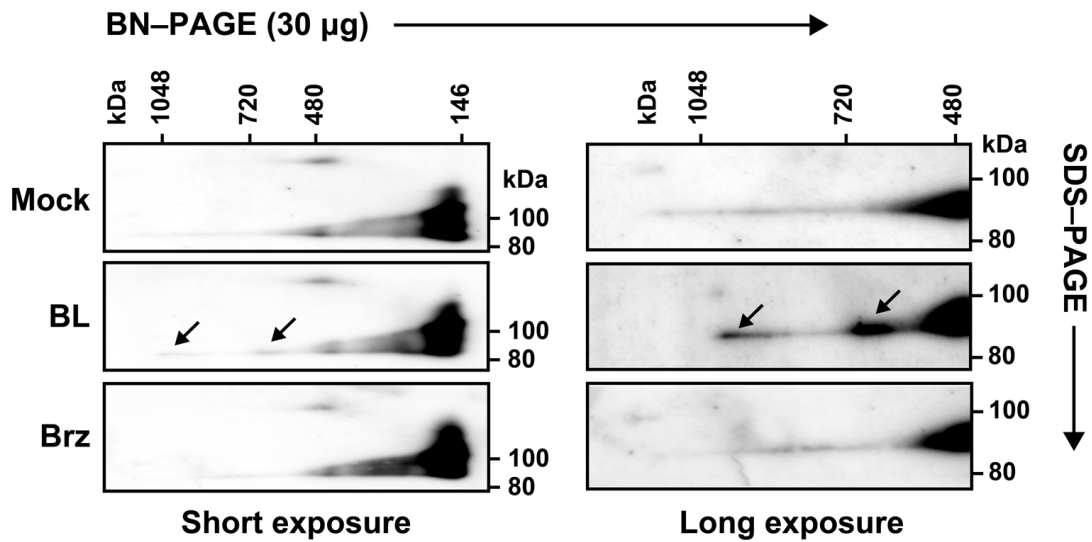


Figure 12. Alteration in the molecular profiles of HSP90-containing complexes in response to BR level

Total native proteins (the same as the protein fraction “T” in Figure 11) extracted from 7-day-cultured cells treated with either 1 μ M BL or 5 μ M Brz for 24 h were subjected to BN/SDS-PAGE linked immunodetection with the anti-HSP90 (at-115) antibody. Photographs show chemiluminescence images in different exposure times: short (left panels) and long (right panels). Arrows point to HSP90-containing macromolecular complexes specifically detected in BL-treated cells.

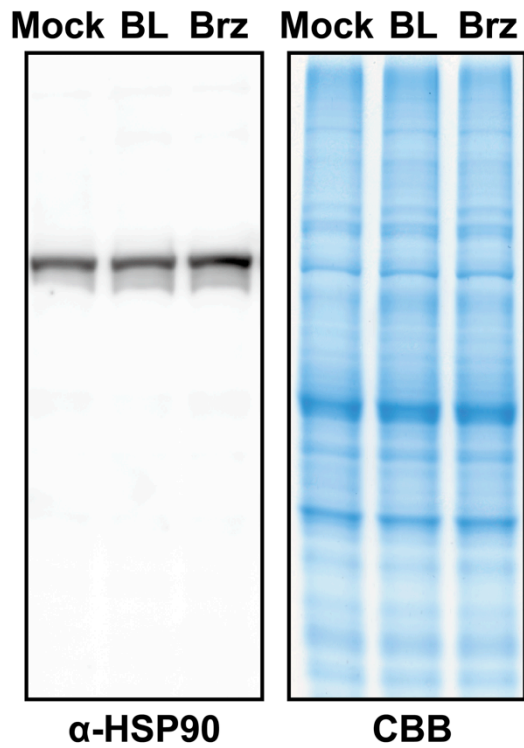


Figure 13. Effect of BR level on HSP90 protein abundance

Total native proteins extracted from 7-day-cultured cells treated with 1 μ M BL and 5 μ M Brz for 24 h were subjected to SDS-PAGE linked immunodetection with the anti-HSP90 (at-115) antibody. Left: chemiluminescence images. Right: coomassie brilliant blue (CBB)-stained images. Note that both BL and Brz treatments barely affected the amount of HSP90 proteins

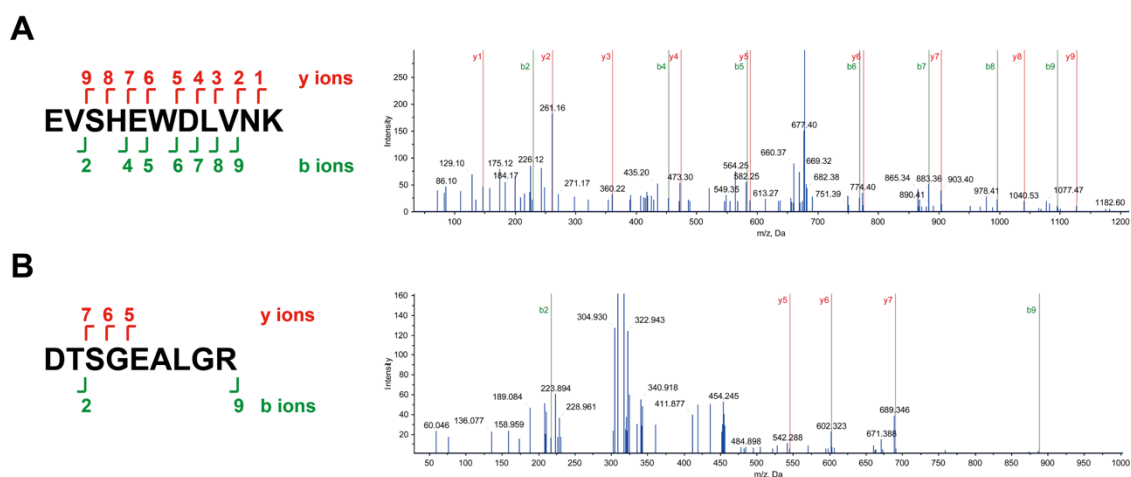


Figure 14. Preferential binding of the anti-HSP90 antibody to HSP90.3

Immunoprecipitation with the anti-HSP90 (at-115) antibody was carried out to purify HSP90 proteins in total native proteins (the protein fraction “T” in Figure 11) extracted from BL-treated cells. A silver-stained band with the MW of 90 kDa in a gel of SDS-PAGE was excised and subjected to an in-gel digestion assay with trypsin and then to an LC-MS/MS analysis. Two tandem mass spectra are shown in (A) and (B); the first spectrum was obtained from a doubly charged ion with monoisotopic $m/z = 1354.6857$ and corresponded to the sequence EVSHEWDLVNK, and the second one was obtained from a doubly charged ion with monoisotopic $m/z = 904.3911$ and corresponded to the sequence DTSGEALGR.

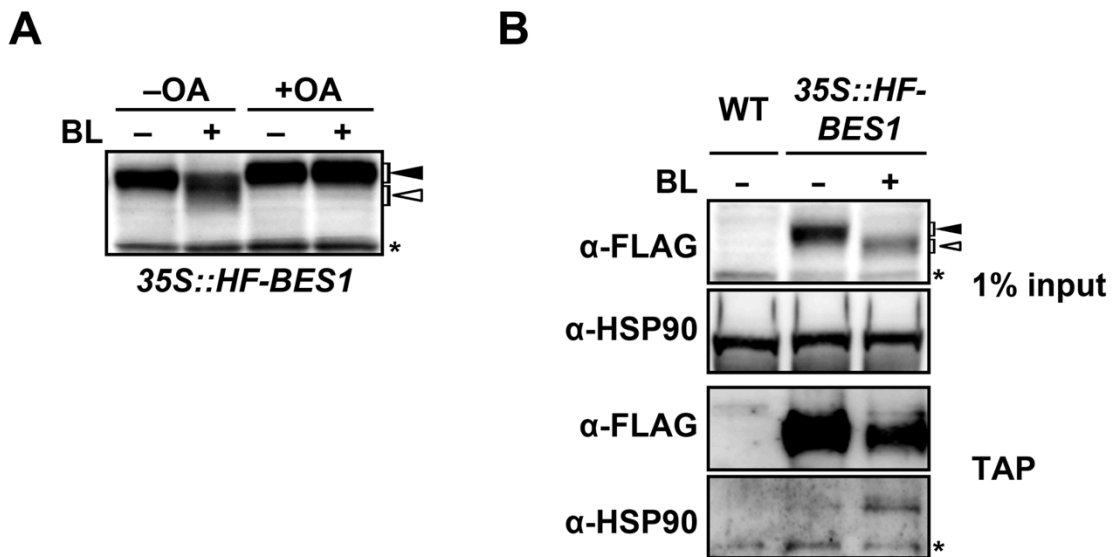


Figure 15. Interaction of HSP90 with BES1 *in vivo*

(A) To examine the phosphorylation status of HF-BES1 proteins, we carried out immunoblotting with an anti-FLAG antibody using total denatured proteins extracted from 7-day-cultured transgenic cells harboring *CaMV 35S::HF-BES1* genes, which were treated sequentially with or without 1 μ M okadaic acids (OA) for 1 h and with or without 1 μ M BL for 6 h. (B) TAP was used to purify HF-BES1 proteins in the total native proteins (the protein fraction “T” in Figure 11) prepared from the BL-treated or BL-non-treated transgenic cells. The purified proteins were then subjected to immunoblotting analyses with the anti-FLAG and anti-HSP90 (at-115) antibodies, respectively. A non-transgenic parental cell line (WT) was used as a control. The brackets with the closed arrowhead and open arrowhead show the hyperphosphorylated and hypophosphorylated HF-BES1, respectively. An asterisk indicates a non-specific band.

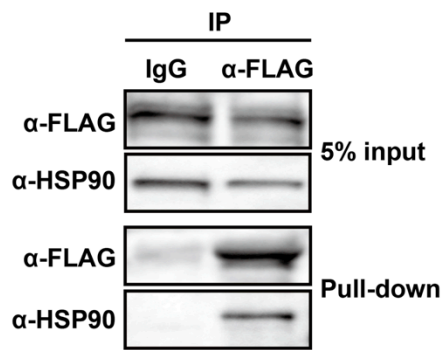
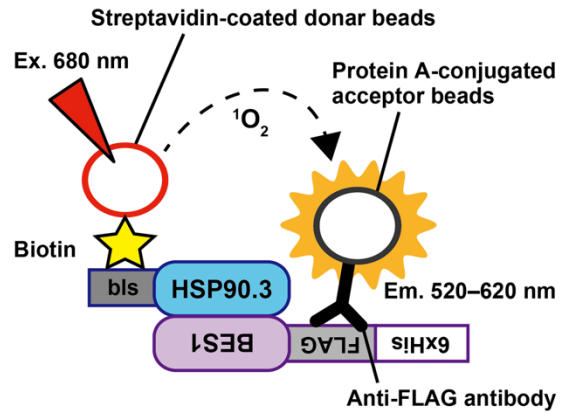
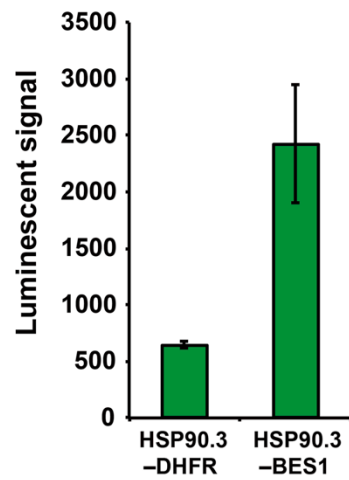
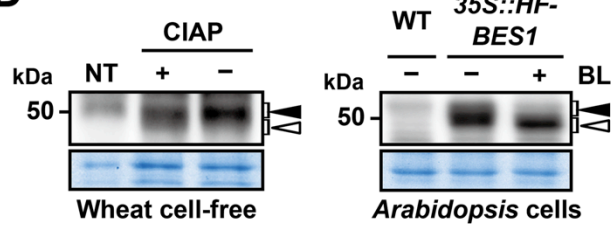
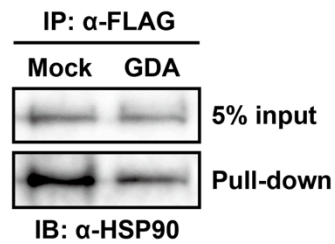
A**B****C****D****E**

Figure 16. Interaction of HSP90.3 with BES1 *in vitro*

(A) *In vitro*-synthesized proteins of HSP90.3 and HF-BES1, separately expressed in a wheat germ cell-free system, were mixed and incubated for 1 h and then subjected to an immunoprecipitation using the anti-FLAG antibody. Immunoblotting using the anti-HSP90 (at-115) antibody was performed to detect HSP90.3 in the precipitates. Mouse IgG was used as a control antibody. **(B)** A schematic diagram of the AlphaScreen assay for the detection of HSP90.3 binding to BES1. The interaction between biotinylated HSP90.3 and HF-BES1 bridges the streptavidin-coated donor beads and the anti-FLAG antibody-conjugated acceptor beads. Upon excitation at 680 nm, singlet oxygen molecules are produced from the donor beads, which react with the acceptor beads, resulting in light emission with the wavelength between 520 and 620 nm. **(C)** Binding strength between HSP90.3 and BES1 was quantitatively estimated by measuring the luminescence. *In vitro*-synthesized FLAG-DHFR was used as a negative control. Luminescence values are plotted as average values with the standard error of three measurements. Student's t-test ($P < 0.05$) was performed to test the significance of differences in luminescence signal strength between HSP90.3 with BES1 and HSP90.3 with DHFR. **(D)** The immunoblot analyses using the anti-FLAG antibody were carried out on the *in vitro*-synthesized HF-BES1 proteins incubated with or without CIAP (left panel), and the total native protein fractions extracted from the WT and the transgenic cells overproducing HF-BES1 (right panel). BL treatment was performed as explained in Figure 15. NT, non-treated control. The brackets with the closed arrowhead and open arrowhead show the hyperphosphorylated and hypophosphorylated HF-BES1, respectively. Coomassie brilliant blue-stained gel was used as a loading control. **(E)** To test the involvement of ATPase activity in the HSP90.3/BES1 interaction, HSP90.3 was first incubated with or without 50 μ M GDA for 1 h, then with HF-BES1 for 1 h. Immunoprecipitation and immunodetection were performed as described in **(A)**.

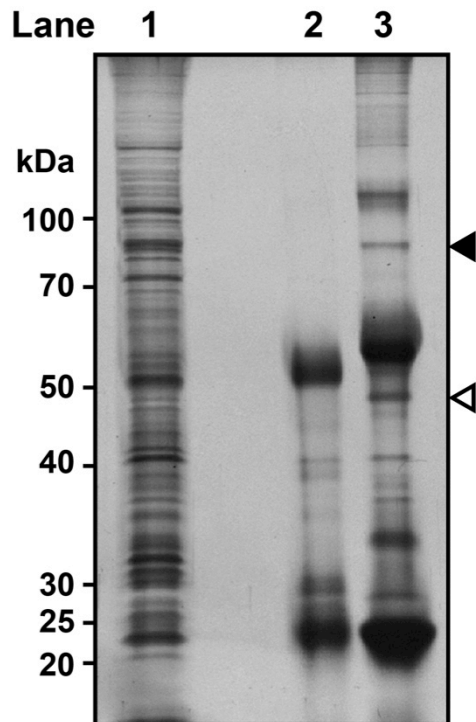


Figure 17. Silver staining protein patterns in the immunoprecipitates by anti-FLAG antibody. The immunoprecipitates used in Figure 16A were subjected to 10 % SDS-PAGE analysis and then silver staining. Lane 1, 2, and 3 indicate the input fraction, the product precipitated by Mouse IgG, and the product precipitated by anti-FLAG antibody, respectively. A closed triangle indicates the HSP90.3 band. An open triangle indicates the HF-BES1 band.

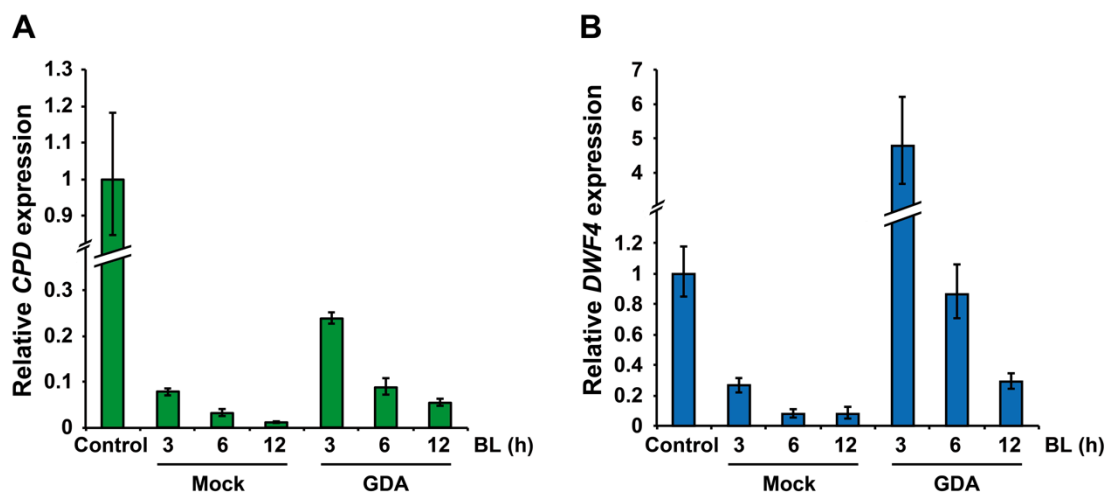


Figure 18. Geldanamycin-triggered suppression of negative feedback regulation in BR biosynthetic genes

Seven-day-cultured transgenic cells overproducing HF-BES1 were pre-treated with mock or 10 μ M GDA for 30 min, then incubated with 1 μ M BL for 3, 6, and 12 h. The real-time PCR was performed to determine the transcript levels of (A) *CPD* and (B) *DWF4*. The mRNA levels are shown as a relative value of expression to that of a control experiment incubated for 12.5 h total in the absence of GDA and BL (fold change = 1). *UBQ10* was used for the normalization of each mRNA level. Error bars indicate standard deviations (n=3).

Table 8. Oligonucleotides used

Name	Locus	Sequence (5' to 3')	Purpose
<i>BESI</i>	At1g19350	CC <u>ATCGAT</u> GAAAAGATTCTTCTATAATCCAGCG GGGCGGCCGCCATAACAGGTTTCATGTACTTC	Cloning
5' half of HF tag		<u>CCCATGGGACATCACCATCATCACCACGGTGGAG</u> <i>aate</i> ACCTCCACCGTGGTATGATGGTATG <u>TCCCATGGG</u>	Dual tag synthesis
3' half of HF tag		GTgattataaggatgatgataagGGAGGTGGTGGAGGAGGTGGAATTGATGGAAAGAT <u>CGATCTTCCATCAATCCACCTCTCCACCACCTCC</u> <i>ettateateatecttat</i>	Dual tag synthesis
<i>HF-BESI</i>		CTACATCACCAAGATATCATGGGACATCACCATCATCA TCGAGAACTAGT <u>GATATCTCA</u> ACTATGAGCTTTACCAT	Cloning
<i>HSP90.3</i>	At5g56010	CCACCCACCACCACCAATGGCGGACGCAGAAACCTTTG	1st split-primer PCR
AODA2306		AGCGTCAGACCCCGTAGAAA	1st split-primer PCR
SPU		GCGTAGCATTAGGTGACACT	2nd split-primer PCR
deSP6E02bls-S1		GGTGACACTATAGAACTCACCTATCTCTCTACACAAAAC-ATTTCCCTACATACAACCTTTCAACTTCCTATTA TGGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAGATCGAGTGGCACGAACTCCACCACCACCAATG	2nd split-primer PCR
AODA2303		GTCAGACCCCGTAGAAAAGA	2nd split-primer PCR
<i>CPD</i>	At5g05690	AGCAACTCGGTAACGACAGG CTGTCAGTGGCGGTGAAGG	Real-time PCR
<i>DWF4</i>	At3g50660	AAACAACGGAGCGTCATCCT GCTAGCTCTGAACCAGCACA	Real-time PCR
<i>UBQ10</i>	At4g05320	GGTGGTTTGTGTTTGGGGC AGTCGAGTCACTTTGCAGGC	Real-time PCR

Restriction sites are underlined, 6×His tag sequences are in uppercase italics, and FLAG tag sequences are in lowercase italics.

Table 9. LC-MS/MS analysis of immunoprecipitated HSP90 proteins

Protein name	Locus	UniProt	UPS ^a	PM ^b	SC ^c
Heat shock protein 90.3	At5g56010	P51818	20.43	19	25.8

^aUnused ProtScore (UPS) from ProteinPilot software. UPS greater than 2.0 indicates a confidence level of 99 %

^bNumber of matched peptides

^cPercentage of sequence coverage

第4章 総合考察

本研究は、シロイヌナズナ懸濁培養細胞 T87 株を用いた生化学的解析により BR 情報伝達を介した遺伝子発現調節機構の解明を目指したものである。この研究を通じて、著者は、以下に示すような2つの新知見を得ることに成功した。第一に、BR に応答して存在量が増減する核タンパク質で、クロマチンリモデリングに関わると考えられるものを5種同定した。これらのうち、NAP1;2、SAM syn.2 と HD2B の3種は BR 量の上昇に伴って存在量が増加した。残りの2種のうち NAP1;1 の存在量は BR 合成阻害剤・Brz 処理で増加した。一方、VIP3 の存在量は BL 処理の初期に一過的に減少した。第二に、内生 BR 量の増加に伴って分子シャペロン HSP90 と BES1 転写因子の複合体形成が促進されることを明らかにした。さらに、BES1/HSP90 複合体が BR 生合成遺伝子 (CPD と DWF4) の BR 情報伝達依存的な負のフィードバック発現、すなわち内生 BR 量の恒常性維持に関わることを見いだした。

まず、一番目の知見に関して考察する。本研究では、クロマチンの構造変換を介した遺伝子の発現制御に関わるタンパク質のうち、ヒストンのメチル化に関わる SAM syn.2 と VIP3 の存在量が BR 依存的に増減することを見つけた。この結果は、BR による遺伝子発現調節にヒストンのメチル化が関与する可能性を強く示唆する。最近、BES1 の結合タンパク質としてヒストン脱メチル化酵素である ELF6 と REF6 が同定された (Yu et al., 2008; Lu et al., 2011)。また、ヒストン H3 のリジン残基の脱メチル化ができなくなった *elf6* 突然変異体及び *ref6* 突然変異体では、BR の応答性遺伝子の発現が抑制されることが報告されている (Yu et al., 2008)。これらの研究報告から類推すると、本研究で見つかった SAM syn.2 や VIP3 も BR 応答性遺伝子を負に制御している可能性が

考えられる。今後、これら 2 つのタンパク質が果たす役割を明らかにすることは、BR 情報伝達、及び BR 依存的な遺伝子発現制御の機構解明にとって非常に重要である。本研究では、上記のヒストンのメチル化関連タンパク質とは別に脱アセチル化に関わる核タンパク質・HD2B を同定した。Wu et al. (2003) は、HD2s が様々な転写因子と結合する可能性を指摘している。BES1 やそのパラログである BZR1 は BR 情報伝達の重要な転写因子であるので、HD2B が BES1 や BZR1 と結合するかどうか？ また、そうであるならば、それらの結合が BR 依存的かどうか？といった疑問に答えることは、BR 情報伝達におけるヒストンの脱アセチル化の意味を明らかにする上で、鍵となると予想される。

次に、二番目の知見について考察する。本研究により、BES1/HSP90 複合体が BR 情報伝達を介した BR 生合成遺伝子 (*CPD* 及び *DWF4*) の発現調節に重要であることを初めて示された。また、複合体形成には HSP90 自身が有する ATPase 活性が必須であることも分かった。*CPD*、*DWF4* 両遺伝子の BR 情報伝達に依存したフィードバック発現は、内生 BR 量の恒常性維持において重要な役割を担うことが報告されている (Tanaka et al., 2005)。このことを考慮すると、BES1 と HSP90 の分子間相互作用は内生 BR 量の恒常性維持を担う分子機構の一部であると推定される。最近になり、BES1 が BR 生合成遺伝子を含む 250 種の遺伝子を標的にすることが報告された (Yu et al., 2011)。したがって、HSP90 の ATPase 活性が BES1 の標的遺伝子の発現に与える影響を網羅的に調べることは、内生 BR 量の恒常性維持のみならず、BR 存在下で BES1 が司る生理学応答における BES1/HSP90 複合体の役割の解明に繋がると思われる。

BES1/HSP90 複合体が果たす生化学的機能としては、いくつかの仮説が考えられる。例えば、HSP90 は BIN2 によるリン酸化から BES1 を保護し、BES1 を安定化して

いる可能性である。ヒトにおいて、HSP90 は Akt キナーゼと複合体を形成することで、その機能を安定化していることが知られている (Basso et al., 2002)。Akt キナーゼは、がんの進行やインスリンの代謝などで重要な調節的役割を果たす酵素である。Akt キナーゼと HSP90 の複合体形成が阻害されると、Akt はユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受けることが報告されている (Basso et al., 2002)。以上の知見を踏まえて、次の仮説を立てた。BES1/HSP90 複合体の形成が阻害されると、BES1 が BIN2 によるリン酸化を受け不安定化する。その結果、BES1 を介した CPD 及び DWF4 のフィードバック発現に異常が生じたのかもしれない。また、上記とは別に次のような仮説も考えられる。従前の研究により、BES1 は、リン酸化による制御に加えて、核-細胞質間移動と DNA 結合能の制御を受けることが報告されている (Vert and Chory, 2006; Ryu et al., 2010)。HSP90 はこれらの過程にも関わっているのかもしれない。今後、以上の可能性を検証していくことは、BR 情報伝達における HSP90/BES1 複合体の機能の詳細な解明に繋がると考えられる。

HSP90 が BES1 以外の BR 情報伝達因子と分子間相互作用を形成する可能性を検討することも今後の研究課題の 1 つである。特に、BES1 と非常に高い相同性を持つ BZR1 が HSP90 と複合体を形成するかどうかを明らかにすることは重要と思われる。また、最近になり BES1 及び BZR1 の機能を負に制御するリン酸化酵素である BIN2 が HSP90 と複合体を形成することが報告された (Samakovli et al., 2014)。これらの結果は、HSP90 が複数の BR 情報伝達因子と複合体を形成することを示唆する。将来、HSP90 と結合する BR 情報伝達因子の全容が分かり、各複合体の役割が解き明かされることが期待される。

Ipenberg et al. (2013) は、ヒトのガン細胞において HSP90 が K demethylase 4B

(KDM4B) と結合することで後者の安定性を高めることを報告した。KDM4B は、ヒストン H3 の 9 番目と 36 番目のリジン残基の脱メチル化酵素で、転写制御に関わっている。この研究報告は、HSP90 がクロマチンリモデリングに関わることを示唆する。したがって、本研究で同定したヒストンの修飾を介したクロマチンリモデリングに関わる BR 応答性タンパク質と HSP90 との結合を調べることは大変興味深い。

以上のように、著者はシロイヌナズナ T87 培養細胞を用いた生化学的解析により、BR による遺伝子発現制御機構に関わる核タンパク質を見いだすことに成功した。今後、本研究を更に発展させ、遠い将来ではあるが得られた知見を農業へ応用するために、次のような研究計画を提案する。一番目に、本研究で確立した実験系を改善し、BR による遺伝子発現制御に関わる因子を更に多く同定することである。二番目に、T87 細胞で同定に成功したタンパク質因子がシロイヌナズナ植物体で果たす役割を明らかにすることである。三番目に、栽培植物への研究展開の前段階として、得られた遺伝子を実用植物へ形質転換し、それらの表現型を調べることである。また、RNA 干渉や過剰発現などの手法を用いて、オーソログ遺伝子の発現を混乱させることでそれらの生理機能を推定し、また、農業利用の可能性を模索する。残念ながら、日本では商業的な遺伝子組み換え作物の栽培が事実上制限されている。そこで、四番目として形質転換に代わる方法により、これら遺伝子に変異を有する作物を作出することである。つまり、突然変異を誘発した作物の集団から上記の遺伝子に変異を有する個体を逆遺伝学的に特定して行く。これを実行するための手法としては、Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) 法が考えられる (Wang et al., 2012)。以上のような研究を遂行することで、本研究で得られた知見を将来、収量増加や環境ストレス耐性を向上させた作物の育種に利用することを期待している。

第 5 章 要旨

植物ホルモン・ブラシノステロイドによる遺伝子発現調節機構に関する生化学的解析

植物ホルモン・ブラシノステロイド (BR) は植物の発生・成長過程の様々な場面で影響を与えることが知られている。また、BR は花成、枝の分岐数、植物の背丈、バイオマスや種子の収量、生物学的及び非生物学的ストレスに対する抵抗性など、農業上重要な植物の性質にも大きな影響を与えることが報告されている。ここ 20 年間に行われたシロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究は、BR 情報伝達に関する理解を大幅に進展させてきた。簡潔に説明すると、細胞表面にある BR11 受容体と BR の結合を契機に細胞質及び核内で連続したタンパク質のリン酸化・脱リン酸化反応が起こり、最終的に BR の情報は互いに高い相同性を持つ 2 種の転写因子 BES1 と BZR1 に受け渡される。さらに、活性化された両タンパク質が数千もの遺伝子の発現を誘導もしくは抑制することで、先に述べたような BR による多彩な生理現象が導かれる。上述のように BR 情報伝達の概要は解明されてきたが、BR 依存的な遺伝子の発現制御の詳細、例えば、この過程の中で核タンパク質が果たす役割など未解明な部分も多い。

本研究では、BR 情報伝達の分子機構の全体像を生化学レベルで解明することを最終目的として、まず、薬理学的手法により内生 BR 量を変化させたシロイヌナズナ T87 培養細胞における核タンパク質の動態を二次元電気泳動法により解析した。その結果、計 551 種のタンパク質スポットを検出することに成功した。これらの中で 16 種のタンパク質は BR 量の上昇に応じて存在量が増加すること、また、55 種は存在量が減少することが明らかになった。続いて、LC-MS/MS 解析を行い、BR により存在量が増減

するタンパク質 35 種を同定した。同定したタンパク質のうち 11 種は、予想通り、核局在が報告されたタンパク質であった。また、この中には NAP1;2、SAM syn.2、HD2B、NAP1;1 が存在した。これら 4 種のタンパク質はクロマチンリモデリングに関与することが知られているので、BR 情報伝達とその後起こる遺伝子発現制御にとってクロマチン構造の変化が重要であると考えられる。加えて、上記の結果は、細胞分画による核単離と二次元電気泳動法の組み合わせが、BR 依存的な核タンパク質の挙動を網羅的に追跡するのに適した方法であることを示している。

次に、T87 培養細胞から精製した BES1 を含むタンパク質複合体の特性解析を行い、パートナー・タンパク質として分子シャペロンの HSP90 を初めて同定した。また、内生 BR 量を増加させると、BES1 と HSP90 の分子間相互作用だけではなく、480 kDa 以上の分子量を示す HSP90 複合体の形成が促進されることが分かった。さらに、HSP90 の ATPase 活性の阻害剤・ゲルダナマイシンを処理すると、BES1 と HSP90 の結合が阻害されること、及び BR 生合成遺伝子である *CPD* と *DWF4* の BR 依存的な発現抑制が損なわれることが明らかとなった。これらの結果から、BES1 と HSP90 の分子間相互作用が BR 情報伝達と、これを介した内生 BR 量の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが推測された。

以上のように本研究は、クロマチンリモデリングと BES1 転写因子に対する HSP90 のシャペロン活性が BR 情報伝達とそれに引き続く遺伝子発現制御の分子機構の一端を担っていることを初めて明らかにした。

第 6 章 Summary

Biochemical analysis of the mechanism for regulation of brassinosteroid-responsive gene expression in *Arabidopsis* cultured cells

Brassinosteroids (BRs) are unique polyhydroxylated steroidal hormones that affect a wide range of plant growth and development at an extremely low concentration. They also control several important agronomic traits, such as flowering time, number of branches, plant architecture, biomass production and seed yield, and tolerance to biotic and abiotic stresses. Over the past decades, molecular genetic studies using *Arabidopsis* plants have made a great progress in our understanding of BR signal transduction pathway. Briefly, upon the binding of BR to a cell-surface receptor BRI1, its signaling cascade progresses with a series of phosphorylation-dephosphorylation reactions in both cytoplasmic and nuclear spaces and finally activates two closely related transcription factors, BES1 and BZR1 that together regulate thousands of BR responsive genes, thus leading to the numerous physiological processes mentioned above. However, other aspects of BR signaling-mediated gene expression, such as the involvement of other nuclear proteins and if so, their functions in it are largely unknown.

Therefore, for elucidation of the whole mechanisms underlying BR signaling, biochemical characterization was firstly performed to reveal the nature of nuclear proteins in *Arabidopsis* cultured cells grown under different BR levels. As a results, it was observed that sixteen spots increased in their abundance in response to high BR contents among 551 protein spots detected on the 2D-PAGE gels, while fifty-five of spots decreased. The result indicates

that 2D-PAGE combined with pre-fractionation of nuclei is an effective approach for investigating the BR-induced changes in nuclear protein abundance. Then, LC-MS/MS analysis was carried out to characterize proteins derived from the 71 spots fluctuated BR-dependently in their amounts, and identification of 35 proteins was succeeded, among which 11 proteins were reportedly nuclear-localized. Among them, three proteins (NAP1;2, SAM syn.2, and HD2B) were recognized to be BR-induced while two proteins (NAP1;1 and VIP3) were BR-repressed. All five proteins have been reported to be involved in chromatin remodeling. Thus, this finding strongly suggests that changes in chromatin structure are crucial for BR signaling-mediated gene expression.

Next, affinity-purification procedure was employed to characterize a protein complex containing BES1 and successfully identified a molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90) as a novel partner. High BR levels promoted not only BES1 interaction with HSP90, but also the formation of HSP90-containing macromolecular complexes with more than 480 kDa of molecular weight. Geldanamycin, a specific inhibitor of HSP90's ATPase activity caused prevention of BES1 binding to HSP90 and also disturbance of BR-dependent expression of two BR biosynthesis genes, *CPD* and *DWF4*. These observations suggest that BES1/HSP90 interaction plays a crucial role in BR signaling-mediated feedback control of endogenous BR contents through regulation of the corresponding genes.

Taken together, the current biochemical study firstly demonstrates the involvement of both the chromatin remodeling process and the chaperone activity of HSP90 targeted BES1 in BR signaling-mediated gene regulation.

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の執筆にあたり、実験の場を提供して下さると共に、数々のご助言、ご指導を直接賜りました鹿児島大学大学院連合農学研究科の杉元康志教授、鹿児島大学の松尾友明名誉教授、鹿児島大学農学部の岡本繁久准教授に心から感謝致します。また、研究を進めるにあたり、佐賀大学農学部の穴井豊昭教授から数多くのご助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。ご多忙の中、本論文の審査をして頂いた佐賀大学農学部の鈴木章弘教授、鹿児島大学農学部の岩井久教授に深く感謝致します。

共同研究者として、東京大学大学院農学生命科学研究科の浅見忠男教授、理化学研究所名誉研究員の吉田茂男博士にはブラシナゾールの分与並びに様々なご助言を賜りました。京都府立大学大学院生命科学研究科の中村考志教授には、共同研究者として、数々のご指導、ご助言を賜りました。また、FLA-5000の使用に関して、鹿児島大学共同獣医学部の叶内宏明准教授にご指導を頂きました。また、質量分析装置の使用に関して、同大学農学部の安部淳一教授にご指導を賜りました。同大学農学部の吉田理一郎助教には、形質転換細胞の作製及び遺伝子の発現解析に関するご指導に加えて、日々の研究活動における様々なご助言や励ましのお言葉も頂きました。細胞の形質転換で使用したプラスミドは、静岡大学の食品栄養環境科学研究所の丹羽康夫助教に分与して頂きました。最後に、小麦胚芽無細胞系によるタンパク質合成及びAlphaScreenに関して、愛媛大学プロテオサイエンスセンターの根本圭一郎博士にご指導並びに数多くのご助言を賜りました。ここに、深謝の意を表します。

そして、森孝文さん、牟田口由紀さんには、T87細胞を用いた本研究の先駆けとなる実験を担当していただきました。また、安田大祐さん、深草翔太さんには主に二次元電気泳動による実験で多大なるご尽力を頂きました。さらに、形質転換細胞の作製では、財前裕一さんに甚大なるご協力を頂きました。Washington State Universityの田仲究博士、(株)デンソー基礎研究所の吉満勇也博士には、研究活動や日常生活に関する多くのアドバイスを賜りました。ここに、感謝の意を表します。本研究や学生生活に関して、様々な形で協力や励ましを頂いた青果保蔵学及び遺伝子制御学研究室、植物分子生物学研究室、先端バイオテクノロジー研究室の皆さんに厚くお礼を申し上げます。

最後に、本論文の完成に至るまでに様々な面で支えて頂いた両親、弟、恋人、友人を含め、全ての方々に心より感謝致します。

参考文献

- [1] Anderson L, Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18:533-537
- [2] Asami T, Min YK, Nagata N, Yamagishi K, Takatsuto S, Fujioka S, Murofushi N, Yamaguchi I, Yoshida S (2000) Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* 123:93-100
- [3] Asami T, Mizutani M, Fujioka S, Goda H, Min YK, Shimada Y, Nakano T, Takatsuto S, Matsuyama T, Nagata N, Sakata K, Yoshida S (2001) Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in *Planta*. *J Biol Chem* 276:25687-25691
- [4] Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) A protocol for transient gene-expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem* 30:123-128
- [5] Bae M, Cho E, Choi E, Park O (2003) Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J* 36:652-663
- [6] Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N (2002) Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277:39858-39866
- [7] Bekh-Ochir D, Shimada S, Yamagami A, Kanda S, Ogawa K, Nakazawa M, Matsui M, Sakuta M, Osada H, Asami T, Nakano T (2013) A novel mitochondrial DnaJ/Hsp40 family protein BIL2 promotes plant growth and resistance against environmental stress in brassinosteroid signaling. *Planta* 237:1509-1525
- [8] Brown J, Shaw P, Shaw P, Marshall D (2005) *Arabidopsis* nucleolar protein database (AtNoPDB). *Nucleic Acids Res* 33:D633-636
- [9] Budhiraja R, Hermkes R, Müller S, Schmidt J, Colby T, Panigrahi K, Coupland G, Bachmair A (2009) Substrates related to chromatin and to RNA-dependent processes are

- modified by Arabidopsis SUMO isoforms that differ in a conserved residue with influence on desumoylation. *Plant Physiol* 149:1529-1540
- [10] Calikowski T, Meulia T, Meier I (2003) A proteomic study of the arabidopsis nuclear matrix. *J Cell Biochem* 90:361-378
- [11] Casasoli M, Meliciani I, Cervone F, De Lorenzo G, Mattei B (2007) Oligogalacturonide-induced changes in the nuclear proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mass Spectrom* 268:277-283
- [12] Chinnusamy, V, Gong, Z, Zhu, JK (2008) Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol* 50:1187-1195
- [13] Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6:325-330
- [14] Chono M, Honda I, Zeniya H, Yoneyama K, Saisho D, Takeda K, Takatsuto S, Hoshino T, Watanabe Y (2003) A semidwarf phenotype of barley uzu results from a nucleotide substitution in the gene encoding a putative brassinosteroid receptor. *Plant Physiol* 133:1209-1219
- [15] Clément M, Leonhardt N, Droillard MJ, Reiter I, Montillet JL, Genty B, Laurière C, Nussaume L, Noël LD (2011) The cytosolic/nuclear HSC70 and HSP90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid-dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 156:1481-1492
- [16] Clouse SD (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23:1219-1230
- [17] Clouse SD, Sasse J (1998) Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:427-451
- [18] Deng Z, Zhang X, Tang W, Osés-Prieto JA, Suzuki N, Gendron JM, Chen H, Guan S, Chalkley RJ, Peterman TK, Burlingame AL, Wang ZY (2007) A proteomics study of brassinosteroid response in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* 6:2058-2071
- [19] Divi UK, Krishna P (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* 26:131-136

- [20] Durbak, A, Yao, H, McSteen, P (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 15:92-96
- [21] Fang S, Fu J, Yuan X, Han C, Shi L, Xin Y, Luo L, Yin Z (2009) Heat shock protein 90 regulates the stability of MEKK3 in HEK293 cells. *Cell Immunol* 259:49-55
- [22] Fukuta N, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Fukuta Y, Nakayama M (2004) 'Rinrei', a brassinosteroid-deficient dwarf mutant of faba bean (*Vicia faba* L.). *Physiol Plant* 121:506-512
- [23] Galichet A, Gruissem W (2006) Developmentally controlled farnesylation modulates AtNAP1;1 function in cell proliferation and cell expansion during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol* 142:1412-1426
- [24] Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, Chen H, Shibagaki N, Ferl RJ, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 13:177-189
- [25] Goda H, Sasaki E, Akiyama K, Maruyama-Nakashita A, Nakabayashi K, Li WQ, Ogawa M, Yamauchi Y, Preston J, Aoki K, Kiba T, Takatsuto S, Fujioka S, Asami T, Nakano T, Kato H, Mizuno T, Sakakibara H, Yamaguchi S, Nambara E, Kamiya Y, Takahashi H, Hirai MY, Sakurai T, Shinozaki K, Saito K, Yoshida S, Shimada Y (2008) The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* 55:526-542
- [26] Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S (2004) Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 134:1555-1573
- [27] Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 130:1319-1334
- [28] Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R (2002) Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-333

- [29] Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281:216-217
- [30] Gudesblat GE, Schneider-Pizoñ J, Betti C, Mayerhofer J, Vanhoutte I, van Dongen W, Boeren S, Zhiponova M, de Vries S, Jonak C, Russinova E (2012) SPEECHLESS integrates brassinosteroid and stomata signalling pathways. *Nat Cell Biol* 14:548-554
- [31] Guo H, Li L, Aluru M, Aluru S, Yin Y (2013) Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 16:545-553
- [32] He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005) BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307:1634-1638
- [33] He JX, Gendron JM, Yang YL, Li JM, Wang ZY (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10185-10190
- [34] Hollender C, Liu Z (2008) Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *J Integr Plant Biol* 50:875-885
- [35] Huber M, Bahr I, Kratzschmar JR, Becker A, Muller EC, Donner P, Pohlenz HD, Schneider MR, Sommer A (2004) Comparison of proteomic and genomic analyses of the human breast cancer cell line T47D and the antiestrogen-resistant derivative T47D-r. *Mol Cell Proteomics* 3:43-55
- [36] Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292:929-934
- [37] Ipenberg, I, Guttmann-Raviv, N, Khoury, HP, Kupershmit, I, Ayoub, N (2013) Heat shock protein 90 (Hsp90) selectively regulates the stability of KDM4B/JMJD2B histone demethylase. *J Biol Chem* 288:14681-14687
- [38] Jones A, MacLean D, Studholme D, Serna-Sanz A, Andreasson E, Rathjen J, Peck S (2009) Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*. *J*

- [39] Jouanneau J-P, Péaud-Lenoël C (1967) Croissance et synthèse des protéines de suspensions cellulaires de Tabac sensibles à la kinétine. *Physiol Plant* 20:834-850
- [40] Kadota Y, Shirasu K (2012) The HSP90 complex of plants. *Biochim Biophys Acta* 1823:689-697
- [41] Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225:353-364
- [42] Kamphausen T, Fanghänel J, Neumann D, Schulz B, Rahfeld JU (2002) Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90. *Plant J* 32:263-276
- [43] Kamuro Y, Takatsuto S (1999) Practical application of brassinosteroids in agricultural fields. In A Sakurai, T Yokota, SD Clouse, eds, *Brassinosteroids: steroidal plant hormones*. Springer-Verlag, Tokyo, 223–241
- [44] Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, Kera Y, Noda T, Igarashi K (2011) Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell* 41:554-566
- [45] Khan M, Rozhon W, Bigeard J, Pflieger D, Husar S, Pitzschke A, Teige M, Jonak C, Hirt H, Poppenberger B (2013) Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 288:7519-7527
- [46] Khripach V, Zhabinskii V, de Groot A (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Anna Bot* 86:441-447
- [47] Kim, JM, To, TK, Nishioka, T, Seki, M (2010) Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant Cell Environ* 33:604-611
- [48] Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang JX, Burlingame AL, Wang ZY (2009) Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 11:1254-1260

- [49] Kim TW, Michniewicz M, Bergmann DC, Wang ZY (2012) Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* 482:419-422
- [50] Kim TW, Wang ZY (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61:681-704
- [51] Kinoshita T, Cano-Delgado A, 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
- [52] Krishna P (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J Plant Growth Regul* 22:289-297
- [53] Krishna P, Gloor G (2001) The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6:238-246
- [54] Lachowicz J, Lemus T, Thomas JH, Murphy PJ, Nemhauser JL, Queitsch C (2013) The protein chaperone HSP90 can facilitate the divergence of gene duplicates. *Genetics* 193:1269-1277
- [55] Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:284-295
- [56] Li B, Takahashi D, Kawamura Y, Uemura M (2012) Comparison of plasma membrane proteomic changes of *Arabidopsis* suspension-cultured cells (T87 Line) after cold and ABA treatment in association with freezing tolerance development. *Plant Cell Physiol* 53:543-554
- [57] Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90:929-938
- [58] Li L, Ye H, Guo H, Yin Y (2010) *Arabidopsis* IWS1 interacts with transcription factor BES1 and is involved in plant steroid hormone brassinosteroid regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3918-3923
- [59] Li L, Yu X, Thompson A, Guo M, Yoshida S, Asami T, Chory J, Yin Y (2009) *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* 58:275-286

- [60] Liu L, Jia C, Zhang M, Chen D, Chen S, Guo R, Guo D, Wang Q (2014) Ectopic expression of a BZR1-1D transcription factor in brassinosteroid signaling enhances carotenoid accumulation and fruit quality attributes in tomato. *Plant Biotechnol J* 12:105-115
- [61] Liu Z, Zhu Y, Gao J, Yu F, Dong A, Shen WH (2009a) Molecular and reverse genetic characterization of *NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN1 (NAP1)* genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 59:27-38
- [62] Liu ZQ, Gao J, Dong AW, Shen WH (2009b) A truncated *Arabidopsis* NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the *Atnap1;3-2* mutant. *Mol Plant* 2:688-699
- [63] Lu F, Cui X, Zhang S, Jenuwein T, Cao X (2011) *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat Genet* 43:715-719
- [64] Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33:887-898
- [65] Nemoto K, Seto T, Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T (2011) Autophosphorylation profiling of *Arabidopsis* protein kinases using the cell-free system. *Phytochemistry* 72:1136-1144
- [66] Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 143:901-910
- [67] Ogawa Y, Dansako T, Yano K, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Noji M, Saito K, Shibata D (2008) Efficient and high-throughput vector construction and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells for functional genomics. *Plant Cell Physiol* 49:242-250
- [68] Oh S, Park S, van Nocker S (2008) Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 4:e1000077
- [69] Park YJ, Luger K (2006) Structure and function of nucleosome assembly proteins.

Biochem Cell Biol 84:549-558

- [70] Pendle A, Clark G, Boon R, Lewandowska D, Lam Y, Andersen J, Mann M, Lamond A, Brown J, Shaw P (2005) Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Mol Biol Cell* 16:260-269
- [71] Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL (2004) The ULTRACURVATA2 gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* 134:101-117
- [72] Regnard C, Desbruyeres E, Huet JC, Beauvallet C, Pernollet JC, Edde B (2000) Polyglutamylation of nucleosome assembly proteins. *J Biol Chem* 275:15969-15976
- [73] Ryu H, Cho H, Kim K, Hwang I (2010) Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 29:283-290
- [74] 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
- [75] Samakovli D, Margaritopoulou T, Prassinos C, Milioni D, Hatzopoulos P (2014) Brassinosteroid nuclear signaling recruits HSP90 activity. *New Phytol* In press
- [76] Sangster TA, Bahrami A, Wilczek A, Watanabe E, Schellenberg K, McLellan C, Kelley A, Kong SW, Queitsch C, Lindquist S (2007) Phenotypic diversity and altered environmental plasticity in *Arabidopsis thaliana* with reduced Hsp90 levels. *PLoS One* 2:e648
- [77] Sangster TA, Queitsch C (2005) The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr Opin Plant Biol* 8:86-92
- [78] Sekimata K, Kimura T, Kaneko I, Nakano T, Yoneyama K, Takeuchi Y, Yoshida S, Asami T (2001) A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on *Arabidopsis*, cress, tobacco, and rice. *Planta* 213:716-721
- [79] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-2860
- [80] Sridha S, Wu K (2006) Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid

- responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 46:124-133
- [81] Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K, Zhu JY, He JX, Bai MY, Zhu S, Oh E, Patil S, Kim TW, Ji H, Wong WH, Rhee SY, Wang ZY (2010) Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 19:765-777
- [82] Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:515-528
- [83] Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, Lindquist S (2012) Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition. *Cell* 150:987-1001
- [84] Takahashi H, Takahashi C, Moreland NJ, Chang YT, Sawasaki T, Ryo A, Vasudevan SG, Suzuki Y, Yamamoto N (2012) Establishment of a robust dengue virus NS3-NS5 binding assay for identification of protein-protein interaction inhibitors. *Antiviral Res* 96:305-314
- [85] Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S (2005) Brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis* is ensured by feedback expressions of multiple genes involved in its metabolism. *Plant Physiol* 138:1117-1125
- [86] Tanaka K, Nakamura Y, Asami T, Yoshida S, Matsuo T, Okamoto S (2003) Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J Plant Growth Regul* 22:259-271
- [87] Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Osés-Prieto JA, Kim TW, Zhou HW, Deng Z, Gampala SS, Gendron JM, Jonassen EM, Lillo C, DeLong A, Burlingame AL, Sun Y, Wang ZY (2011) PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* 13:124-131
- [88] Tang WQ, Deng ZP, Osés-Prieto JA, Suzuki N, Zhu SW, Zhang X, Burlingame AL, Wang ZY (2008) Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol Cell Proteomics* 7:728-738
- [89] Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H,

- Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3:960-969
- [90] Vanstraelen, M, Benková, E (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:463-487
- [91] Vert G, Chory J (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441:96-100
- [92] Wagner D (2003) Chromatin regulation of plant development. *Curr Opin Plant Biol* 6:20-28
- [93] Wang, TL, Uauy, C, Robson, F, Till, B (2012) TILLING in extremis. *Plant Biotechnol J* 10:761-772
- [94] Wang ZY, 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
- [95] Wang ZY, 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
- [96] Wayne N, Bolon DN (2007) Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. *J Biol Chem* 282:35386-35395
- [97] Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, Wang J, Wan J, Zhai H, Takatsuto S, Matsumoto S, Fujioka S, Feldmann KA, Pennell RI (2008) Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell* 20:2130-2145
- [98] Wu K, Tian L, Zhou C, Brown D, Miki B (2003) Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 histone deacetylases. *Plant J* 34:241-247
- [99] Yamada H, Koizumi N, Nakamichi N, Kiba T, Yamashino T, Mizuno T (2004) Rapid response of *Arabidopsis* T87 cultured cells to cytokinin through His-to-Asp phosphorelay signal transduction. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1966-1976
- [100] Yan Z, Zhao J, Peng P, Chihara RK, Li J (2009) BIN2 functions redundantly with other *Arabidopsis* GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*

150:710-721

- [101] Ye H, Li L, Guo H, Yin Y (2012) MYBL2 is a substrate of GSK3-like kinase BIN2 and acts as a corepressor of BES1 in brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 109:20142-20147
- [102] Ye H, Li L, Yin Y (2011) Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. J Integr Plant Biol 53:455-468
- [103] 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
- [104] Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, 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
- [105] Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol 43:1473-1483
- [106] Yu X, Li L, Guo M, Chory J, Yin Y (2008) Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 105:7618-7623
- [107] 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
- [108] Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J (2005) Immunopurification of polyribosomal complexes of *Arabidopsis* for global analysis of gene expression. Plant Physiol 138:624-635
- [109] Zhang D, Ye H, Guo H, Johnson A, Zhang M, Lin H, Yin Y (2014) Transcription factor HAT1 is phosphorylated by BIN2 kinase and mediates brassinosteroid repressed gene expression in *Arabidopsis*. Plant J 77:59-70
- [110] Zhang H, Ransom C, Ludwig P, van Nocker S (2003) Genetic analysis of early flowering

- mutants in *Arabidopsis* defines a class of pleiotropic developmental regulator required for expression of the flowering-time switch flowering locus C. *Genetics* 164:347-358
- [111] Zhou C, Labbe H, Sridha S, Wang L, Tian L, Latoszek-Green M, Yang Z, Brown D, Miki B, Wu K (2004) Expression and function of HD2-type histone deacetylases in *Arabidopsis* development. *Plant J* 38:715-724
- [112] Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K (2005) HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1196-1204
- [113] Zhu JY, Sae-Seaw J, Wang ZY (2013) Brassinosteroid signalling. *Development* 140:1615-1620
- [114] Zlatanova, J, Seebart, C, Tomschik, M (2007) Nap1: taking a closer look at a juggler protein of extraordinary skills. *FASEB J* 21:1294-1310
- [115] 岡本繁久、田仲究、中村考志、松尾友明 (2007) ブラシノステロイド研究の進歩と農業利用への期待. *農業及び園芸* 82 巻 6 号 641-652 頁