

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06969

研究課題名(和文) フロリゲンによる植物開花メカニズムの全貌解明と応用にむけた分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for flowering initiation by florigen

研究代表者

大木 出 (Ohki, Izuru)

京都大学・化学研究所・特定研究員

研究者番号：80418574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物において、花が咲く時期を決定しているのが開花ホルモンであるフロリゲンである。これまで我々はフロリゲンの受容体を発見し、核内で「フロリゲン活性化複合体」と呼ばれる開花促進複合体を形成することを明らかにしてきた (Taoka, Ohki, Tsuji et al. Nature 2011)。本研究では、さらに栄養成長期に開花の抑制を行っているアンチフロリゲンの解析を行い、受容体上で「フロリゲン抑制複合体」を形成する事を明らかにした。受容体上でのフロリゲンとアンチフロリゲンの拮抗的な結合、及び二つの複合体の量的バランスが開花促進・抑制の切り替えを行っているという新たな制御モデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：In higher plants, florigen is a mobile hormone that determines the flowering time, but its regulatory mechanism for floral induction remains unclear. In this study, we focused on anti-florigen, which suppresses floral induction antagonizing with florigen, to clarify the regulatory role in flowering. From the structural and biochemical analysis, anti-florigen was found to form a stable complex with florigen receptor on target receptor and inhibited a formation of florigen-receptor complex. The complex formation of florigen and anti-florigen against to the receptor is exchangeable, suggesting that the balance of the two complexes are important for floral induction.

研究分野：構造生物学

キーワード：立体構造解析 植物ホルモン 花成

## 1. 研究開始当初の背景

植物において、フロリゲンは開花に重要な役割を果たしている植物ホルモンであり、2007年に初めて同定された。フロリゲンの実体は *Hd3a/FT* 遺伝子がコードする 22 kD の小さな蛋白質性のホルモンであり、適切な日長条件下で葉で合成される。その後、維管束(水、栄養分等の通り道)を通り茎の先端(茎頂)の細胞へと運ばれ、花芽形成遺伝子の転写を促進し、花芽を形成させる。

我々は奈良先端大の島本らのグループと協力し、生化学的なアプローチを用いてフロリゲンの細胞内受容体を発見し、フロリゲンと受容体が茎頂細胞の核内で「フロリゲン活性化複合体」と呼ばれる転写複合体を形成することを明らかにし、その詳細な分子構造を解明した(Taoka, Ohki, Tsuji *et al.* Nature 2011、図1)。最近になって、このフロリゲン受容体が開花時だけでなく、花成が抑制されている成長期においても働き、開花抑制分子であるアンチフロリゲン (*RCN/TFL1*) と共に複合体を形成してフロリゲンによる開

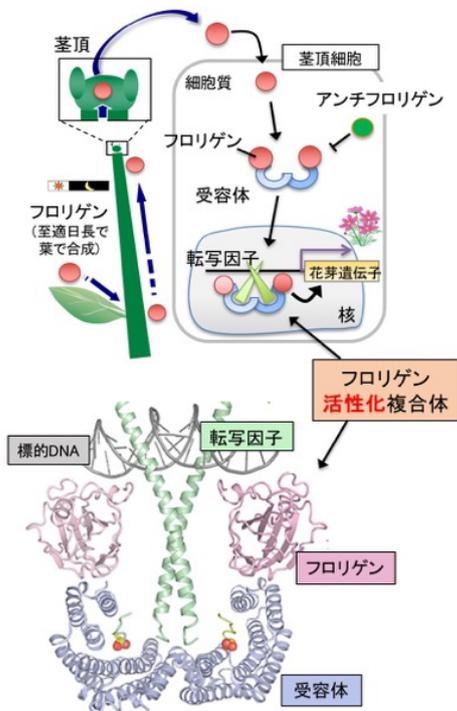


図1. フロリゲンが花成を引き起こす仕組み

(上) フロリゲンの葉から芽の先端(茎頂)への長距離移動と茎頂細胞内でのフロリゲン-受容体による花成促進の分子機構 (下) フロリゲン活性化複合体の立体構造

花を抑制していることが判明し、従来の開花制御機構の概念を新たに組み直す必要が出てきている(図2)。

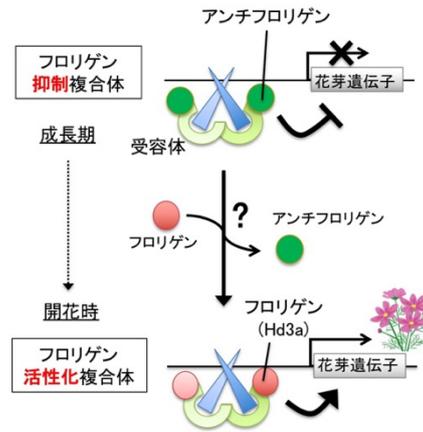


図2. アンチフロリゲンによる開花抑制

アンチフロリゲンはフロリゲンと高い相同性を持ち(一部のアミノ酸配列が異なる)、フロリゲンと類似のメカニズムにより抑制複合体を形成する

## 2. 研究の目的

これまでフロリゲンに細胞内受容体が存在することは知られておらず、フロリゲンの生物学はいまだ黎明期と言える。その分子機能、作用メカニズムなどが未解明のままである。

本研究は、この新規フロリゲン受容体を中心に、受容体がフロリゲンあるいはアンチフロリゲンと形成する2種類の機能複合体(フロリゲン活性化複合体とフロリゲン抑制複合体、図2)に注目して、構造生物学の技法を用いて分子機能を解明し、開花の促進・抑制の制御機構の全貌を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、イネのフロリゲン受容体とフロリゲン、アンチフロリゲンに注目し、立体構造、及び開花制御の分子機構の解明を行った。特に、アンチフロリゲン単独、及び受容体との複合体(フロリゲン抑制複合体)については未だ分子構造が未知なため、重点的に解析を進めた。

解析手法に関しては X 線結晶構造解析法、NMR 法及び生化学的手法を組み合わせ、多面的に解析を進めた。また、得られた構造情報を用いて、相互作用分子の探索も行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) アンチフロリゲンの機能解析

これまでの研究で、フロリゲンと受容体からなるフロリゲン活性化複合体の立体構造を決定し、開花「促進」の分子機構を明らかにしてきた (Taoka, Ohki, Tsuji *et al.*, Nature 2011)。しかし、栄養成長期には、アンチフロリゲン (RCN/TFL1) が受容体に直接働きかけ、開花を抑制している事が分かっている。そのため、花成の促進・抑制の切り替えのタイミングや植物の栄養・生殖成長期全体を通した開花制御機構を明らかにするには、アンチフロリゲンと受容体の詳細な解析も必要である事が分かってきた。

そこで、まず未だ構造未知のアンチフロリゲンによる抑制機構を調べるため、アンチフロリゲン単独での構造解析を行い、分子構造を決定した。得られたアンチフロリゲンの立体構造は、フロリゲンに非常に類似していたが、Segment B と呼ばれる長いループ領域、及び隣接するポケット構造において大きな違いが見られた。シロイヌナズナにおいて、フロリゲンの Segment B 全体やポケット構造に存在するアミノ酸をアンチフロリゲンと入れ替えると (Tyr→His)、開花能 (抑制と促進) が入れ替わる事から、この領域の構造の違いが開花制御に重要な役割を果たしている

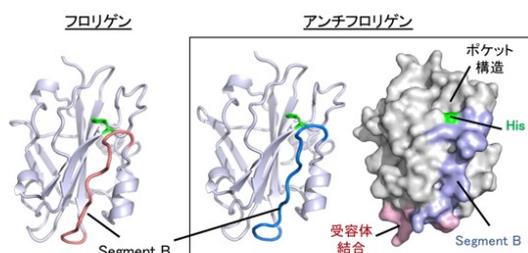


図3. アンチフロリゲンの構造

フロリゲン (左) とアンチフロリゲン (右) では Segment B 領域に構造の違いが見られる

ると考えられる (図3)。

この領域へは、フロリゲンとアンチフロリゲンで異なる外部制御因子が相互作用している可能性があり、特にフロリゲンにおいては領域に存在するアミノ酸が、植物種間で極めて高度に保存していることから、その相互作用因子の検索を行った。低分子ライブラリ (Hampton Silver Bullet) や植物培養細胞抽出液を用いた *in vitro* での相互作用解析より、フロリゲンのポケット構造に結合する分子を同定し、フロリゲンとの複合体構造を決定した。現在、同定した分子の生理活性機能の解析を進めている。

##### (2) フロリゲン抑制複合体の機能構造解析

アンチフロリゲンと受容体からなる「フロリゲン抑制複合体」の結晶構造解析を進め、立体構造の決定に成功した。

得られた立体構造から、アンチフロリゲンは受容体上のフロリゲン認識部位に結合していることが判明した。アンチフロリゲンとフロリゲンの間でアミノ酸配列が保存された領域が受容体との結合に用いられており、興味深いことに、両者の間でアミノ酸配列が大きく異なる領域 (Segment B や隣接ポケット構造) は、複合体上で外側に完全に露出し、受容体や転写因子、DNA との相互作用には関与していなかった。これは、この領域に異なる他因子 (co-activator や co-repressor) が構造の違いを認識して結合する事で、フロリゲンとアンチフロリゲンの機能差が生じている可能性を示唆している。

フロリゲンのこの領域に結合する低分子が現在、得られているため、その構造を基に結合する転写制御因子候補の検索も進めている。

##### (3) フロリゲンとアンチフロリゲンによる開花促進・抑制のスイッチング機構

既に得られているフロリゲンと受容体からなる「フロリゲン活性化複合体」と、今回

得られたフロリゲンと逆の機能を持つアンチフロリゲン、受容体からなる「フロリゲン抑制複合体」の二つの機能複合体の構造比較から、開花促進・抑制の切り替え機構を推測することが出来る。

得られた二つの複合体構造から、フロリゲンとアンチフロリゲンは受容体上の同一部位に結合しており、受容体上で競合的な結合が起こっている事が考えられた。そこで、*in vitro* で GST-pull down 法を用いた結合競合実験を行い、カラム上に固定したアンチフロリゲン-受容体複合体にフロリゲンを添加する事で、アンチフロリゲンが溶出し、フロリゲン-受容体複合体が形成されることが確認された。また、フロリゲンの茎頂細胞内標的遺伝子プロモーター配列 (API) を用いた EMSA アッセイから、フロリゲン同様、アンチフロリゲンも標的プロモーターDNA 上で複合体を形成でき、さらにフロリゲン添加によりプロモーターDNA 上でフロリゲン活性化複合体に変換される事が明らかになった。フロリゲンとアンチフロリゲンの受容体に対する結合定数 (KD) は同程度であり、結合状態の数値シミュレーションから、両者複合体の交換、存在比はシグモイダル曲線 (S 字) を示し、フロリゲン濃度の上昇に対して感度が高く、閾値のある交換システムとなっている事が

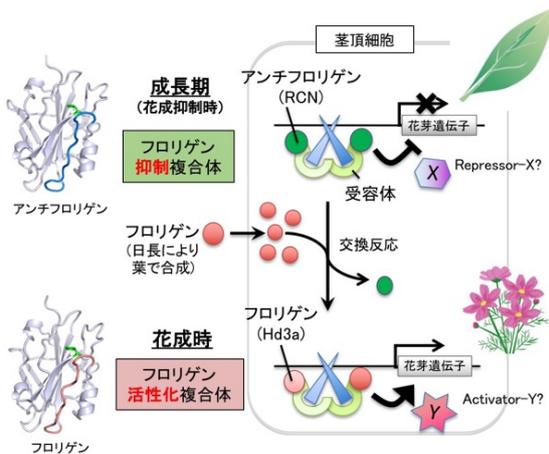


図4. 二つのフロリゲン複合体 (抑制/活性化) による開花制御機構

受容体上で花成リプレッサーがフロリゲンに置き換わる事で相転換、花成が引き起こされる。花成は抑制・活性化の2つの複合体のバランスにより制御される

示唆された。

以上の結果より、次のようなフロリゲンとアンチフロリゲンによる開花促進・抑制スイッチモデルを提唱した(図4)。開花の促進・抑制は、茎頂細胞の核内でのフロリゲン抑制複合体と活性化複合体の量的バランスで制御されており、受容体上のアンチフロリゲンが日長により葉で合成され運ばれてきたフロリゲンに置き換わる事で相転換、開花が引き起こされると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Fujita H, Tokunaga A, Shimizu S, Whiting A, Aguilar-Alonso F, Takagi K, Walinda E, Sasaki Y, Shimokawa T, Mizushima T, Ohki I, Ariyoshi M, Tochio H, Bernal F, Shirakawa M, Iwai K, Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization, Cell Rep 23(4), 1192-1204 (2018). 査読有
2. Kaneko-Suzuki M, Kurihara-Ishikawa R, Okushita-Terakawa C, Kojima C, Nagano-Fujiwara M, Ohki I, Tsuji H, Shimamoto K, Taoka KI, TFL1-Like Proteins in Rice Antagonize Rice FT-Like Protein in Inflorescence Development by Competition for Complex Formation with 14-3-3 and FD, Plant Cell Physiol 59, 458-468 (2018). 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. 大木出, 「溶液 NMR における超偏極技術の新たな展開と生体系への応用」、平成

29 年度日本分光学会 NMR 分光部会講習会、2017 年 10 月 6 日、京都テルサ（京都府京都市）

2. 大木出、藤咲貴大、池上貴久、白川昌宏、生体系の溶液 NMR における超偏極技術の新たな展開、第 56 回 NMR 討論会、2017 年 11 月 16 日、首都大東京（東京都八王子市）
3. 白川昌宏、五十嵐龍治、源城拓哉、外間進悟、藤咲貴大、寺田大紀、田辺竜太郎、大木出、吉成 洋祐、朽尾豪人、光検出磁気共鳴法による生細胞における 1 分子運動の計測、第 56 回 NMR 討論会、2017 年 11 月 14 日、首都大東京（東京都八王子市）
4. 大木出、尾野有菜、白川昌宏、植物のメチル化 DNA 結合タンパク質の構造解析、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
5. 大木出、白川昌宏、植物のメチル化 DNA 結合タンパク質の機能構造解析、第 58 回日本植物生理学会年会、2017 年 3 月 16 日、鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）
6. 尾野有菜、大木出、竹下至、白川昌宏、植物のメチル化 DNA 結合タンパク質の構造機能解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市西区）
7. 大木出、竹下至、白川昌宏、植物のメチル化 DNA 結合タンパク質の機能構造解析、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 9 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市博多区）
8. 竹下至、大木出、白川昌宏、植物のメチ

ル化 DNA 結合タンパク質の機能解析、日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

1. <http://bsw3.naist.jp/kojima/>
2. <http://researchmap.jp/read0154552/>
3. <http://mizuochilab.kuicr.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大木 出 (OHKI, Izuru)

京都大学・化学研究所

特定研究員

研究者番号：80418574

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 研究協力者

なし