

令和元年6月10日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18505

研究課題名（和文）溶液NMRを用いたフロリゲン複合体の立体構造解析

研究課題名（英文）Structural study of the Florigen Activation Complex using solution NMR

研究代表者

古板 恭子（FURUITA, Kyoko）

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：30727665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：花成ホルモンであるフロリゲンは受容体14-3-3及び転写因子FDとともにフロリゲン活性化複合体（FAC）を形成し、花芽形成遺伝子を発現させることで花成を誘導する。本研究では、フロリゲン機能の理解を深めるため、溶液NMR法を用い、FACの立体構造研究に取り組んだ。その結果、FAC構成因子のうち、フロリゲンの立体構造を決定した。また、高分子量タンパク質に適した主鎖信号帰属法を開発し、溶液NMR法で解析するには高分子量となる分子量5.5万の14-3-3の主鎖信号の帰属を達成した。また、FAC-DNA4者複合体についてX線小核散乱実験を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した高分子量タンパク質の解析法は、特別な装置や高価な試薬を必要とせず、他のタンパク質にも広く適用可能である。また、本研究で得られたフロリゲンの立体構造や14-3-3の信号帰属結果は、FACをターゲットとした薬剤のスクリーニングやデザインに役立つと考えられ、人為的に花成を誘導したり抑制したりする薬剤の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：Florigen, or a flowering hormone, triggers flowering by activating flower initiation genes through the formation of the “Florigen Activation Complex (FAC)”, which is composed of two florigen, two 14-3-3 proteins and two transcription factors. In this study, we performed structural studies of FAC using mainly solution NMR. First, we determined the solution NMR structure of the florigen. Then we developed a method to assign backbone NMR signals of high-molecular-weight proteins, and performed backbone chemical shift assignments of the 55 kDa 14-3-3 protein. Additionally, we performed small angle X-ray scattering experiments of FAC-DNA complex.

研究分野：構造生物学

キーワード：溶液NMR 立体構造 フロリゲン タンパク質 複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは花成を誘導する植物ホルモンとして同定されたタンパク質である。フロリゲンは受容体 14-3-3 及び転写因子 FD とフロリゲン活性化複合体 (FAC) を形成し、花芽形成遺伝子の発現を誘導する。近年、フロリゲンは花成誘導にとどまらず、さまざまな光周性の反応に関わっていることが示唆されている。例えば、ジャガイモの塊茎形成、ポプラの短日条件における成長の停止と休眠芽の形成、トマトやトウモロコシにおける形態形成などである。こうした機能多様性は、FAC における FD が別の転写因子と置き換わり、FAC 様複合体が形成され、別の遺伝子発現が制御されるためと考えられている。フロリゲン、14-3-3 及び FD の 14-3-3 結合モチーフを含む 9 残基のペプチドからなる複合体の結晶構造は過去に報告した (文献 1)。しかし、この構造からは、フロリゲンと FD との位置関係や、FAC と DNA との相互作用様式などは明らかではない。DNA まで含んだ完全な FAC の立体構造が明らかになれば、FAC 様複合体を形成するタンパク質の構造要因が明らかとなり、フロリゲンの機能多様性に関する理解が深まると予測される。しかし、FAC-DNA 複合体は、結晶が得られておらず、溶液構造を決定する必要がある。

2. 研究の目的

FAC を形成するタンパク質の構造特性を明らかにし、フロリゲンの機能多様性を理解するために溶液 NMR による高分子量タンパク質の構造解析法を開発し、FAC-DNA 複合体の溶液構造を解析する。

3. 研究の方法

FAC-DNA 複合体の立体構造の解明を目指し、FAC の各構成因子のうち、フロリゲンおよび 14-3-3 の溶液 NMR 解析と FAC-DNA 複合体の X 線小角散乱実験を行なった。

(1) フロリゲンの立体構造解析

フロリゲン (8-160) (K31A/E57A) 変異体について U-¹⁵N 標識及び U-¹³C, ¹⁵N 標識試料を作成し、主鎖及び側鎖の帰属のための一般的な一連の NMR スペクトル (¹H-¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB, (H)CC(CO)NH, H(CCCO)NH, HCCH-TOCSY, 1H-1H NOESY, (HB)CB(CGCD)HD) 側鎖二面角決定のための芳香族残基の ³J(N-C)、距離情報取得のための ¹³C-edited および ¹⁵N-edited NOESY スペクトルの測定を行なった。また、常磁性緩和促進 (PRE) 効果による距離情報を取得するため、フロリゲンに含まれるシステインをセリンに置換し、かつ任意の 1 残基をシステインに置換した変異体を 9 種類作成した。これらについて U-¹⁵N 標識変異体を作成し、ジスルフィド結合により S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate (MTSL) を付加し、¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを測定し、信号強度を解析した。化学シフトの帰属等のスペクトル解析には Sparky を用いた。NOE の帰属及び構造計算には CYANA を用いた。

(2) 14-3-3 タンパク質の主鎖信号の帰属

まず、14-3-3 タンパク質の均一 ²H, ¹³C, ¹⁵N 標識サンプルを作成し、主鎖帰属のための一連の NMR スペクトル (1H-15N TROSY, non-uniform sampling (NUS)-TROSY(tr)HNCA, NUS-trHN(CO)CA, NUS-trHN(CA)CB, NUS-trHN(COCA)CB, trHNCO, NUS-trHN(CA)CO) を測定した。また、Arg/Leu/Ile/Ala の 4 種類のアミノ酸について、大腸菌による発現系で選択的 ¹³C, ¹⁵N 標識試料を作成し、これらについて ¹⁵N-¹³C spin echo difference により編集した 1H-15N TROSY スペクトルを測定した。貴族はまず、均一標識サンプルのスペクトルを用い、MagRO-FLYA により、主鎖の自動帰属を行なった。次にアミノ酸選択標識サンプルのスペクトルを用い、手作業で帰属結果を確認、修正し、帰属の追加を行った。

(3) FAC-DNA 複合体の X 線小角散乱実験

FAC-DNA 複合体の X 線小角散乱実験を行うため、フロリゲン、14-3-3、転写因子、プロモーター配列を含む DNA 断片の混合液、およびそれをゲル濾過クロマトグラフィーに供し、4 者複合体を形成しているを予測されるフラクションを分離した試料を調製した。これらの試料について希釈系列を作成し、X 線小角散乱測定を行なった。

4. 研究成果

(1) フロリゲンの立体構造解析

野生型のフロリゲンは高濃度条件下において凝集傾向が見られたため、立体構造解析には安定な K31A/E57A 変異体を用いた。また、フロリゲンの N 末端および C 末端は異種核 NOE 実験から明確な構造を持たないことが知られていたため、N 末端 7 残基と C 末端 8 残基を削った。すなわち、フロリゲン (8-160) (K31A/E57A) の構造解析を行った。この変異体について 3. 研究の方法に記載した一連のスペクトルを用い、主鎖および側鎖の帰属を行なった。その結果、80.4% の ¹H, ¹⁵N、および ¹³C の帰属を達成した。得られた主鎖化学シフトをもとに、TALOS+プログラムにより主鎖二面角 (ϕ , ψ) を決定した。また、芳香族 ³J(N-C) の測定から、5 個の側鎖二面角 (χ_1 , χ_2 , χ_3 , χ_4 , χ_5)

かを検証するため、1次元¹H NMR測定によりDNAのイミノプロトン領域をモニターしながら、FAC構成因子を種類ずつ添加する実験を行なった。まず、DNAに転写因子を添加したところ、DNAへの転写因子の結合が確認された。次に、14-3-3を添加し他ところ、14-3-3の転写因子への結合が確認された。しかし、フロリゲンを添加したところ、DNAがいくらかFACから遊離する様子が観測され、少なくとも実験に用いたDNA断片とFACとの複合体は不安定であると考えられた。

X線小角散乱の試料として、FAC構成因子およびDNAの混合液と、混合液をゲル濾過クロマトグラフィーに供し、4者複合体を含むフラクションを単離した試料を用意した。これらについて濃度を数点変えた試料を調製し、X線小角散乱の測定を行なった。どちらの試料も濃度依存的な慣性半径の変化は見られず、凝集は起きていないことが示された。測定データから分子形状モデルを作成することも可能であったが、実験に用いた試料は解離状態と複合体との平衡にあると考えられるため、意味のある構造情報を得ることはできなかった。

<引用文献>

- (1) Taoka, K. *et al.* 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**, 332-5 (2011).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

- (1) Sugiki, T., Furuita, K., Fujiwara, T. & Kojima, C. Amino Acid Selective¹³C Labeling and¹³C Scrambling Profile Analysis of Protein and Side-Chain Carbons in *Escherichia coli* Utilized for Protein Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* **57**, 3576-3589 (2018). 査読あり
DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00182

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。