

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19184

研究課題名（和文）フロリゲンの転写活性化能を制御する化合物による花成制御

研究課題名（英文）Chemical regulation of florigen activation complex

研究代表者

辻 寛之（Tsuji, Hiroyuki）

横浜市立大学・木原生物学研究所・准教授

研究者番号：40437512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：フロリゲン（正体はFT/Hd3aタンパク質）は受容体である14-3-3タンパク質及びbZIP型転写因子FDから構成されるフロリゲン活性化複合体を形成して機能している。本研究ではフロリゲン活性化複合体の形成と機能の人為制御を目指して、フロリゲン活性化複合体の形成阻害剤の開発に取り組んだ。in vitroのハイスループットスクリーニング、植物培養細胞を用いた複合体形成アッセイ系、細胞内における複合体再構築系を活用した機能アッセイ系、および植物体への処理実験を実施することにより、フロリゲン活性化複合体の形成阻害剤となる化合物を2種同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の花芽分化のタイミングを制御することは重要な農業形質である。この花芽分化のタイミングをもっとも強力に制御する因子は、植物に普遍的な花成ホルモンであるフロリゲンである。したがって花芽分化のタイミングを人為的に制御するために、フロリゲンの合成がしばしば制御対象となってきた。しかしフロリゲン遺伝子制御系には植物種ごとの多様性が大きいため、普遍的な人為制御法の開発には至っていない。複合体形成と機能を幅広い植物種間で普遍的に制御可能な方法として有効なのは化合物による制御である。本研究では、この制御化合物を同定した。同定した化合物はフロリゲンの分子機能解明や花芽分化制御の端緒となる。

研究成果の概要（英文）：Florigen is the globular protein encoded by the FT/Hd3a genes and functions as a protein complex called the florigen activation complex, which consists of Hd3a, 14-3-3 proteins, and the bZIP transcription factor FD. In this study, we sought to develop inhibitors that prevent the formation of the complex in order to artificially control florigen function. By combining in vitro high-throughput screening, an in vivo assay that detects complex formation, a cellular assay that detects transcriptional activation by the complex, and an in-planta assay, we finally found two hits that inhibit the formation of the complex and suppress its function.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：フロリゲン フロリゲン活性化複合体 化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の花芽分化のタイミングを制御することは重要な農業形質である。なぜなら花芽分化のタイミングは作物の生育可能な地域や時期を規定するし、作物の収量や品質も左右するからである。例えば東北以北での水稻生産では秋の気温低下が訪れる前に出穂して早く出穂できるイネ品種が好まれるし、葉物野菜等では抽苔するタイミングをできるだけ遅くしたほうが高品質となる。このように花芽分化のタイミングの制御は重要な農業形質である。

花芽分化のタイミングをもっとも強力に制御する因子は、植物に普遍的な花成ホルモンであるフロリゲンである。フロリゲンの正体は FT/Hd3a と呼ばれる遺伝子にコードされた球状タンパク質である。フロリゲンは葉で合成され茎の先端に輸送され、茎の先端に位置する幹細胞組織の茎頂メリステムにおいて「フロリゲン活性化複合体」を形成して機能する。フロリゲンはこのような分子機能によって花芽分化のタイミングを制御している。

したがって花芽分化のタイミングを人為的に制御するために、フロリゲンの合成がしばしば制御対象となってきた。遺伝学的には、葉におけるフロリゲン FT の発現量を変化させるような遺伝子が多数見出されており、さまざまな植物種において育種利用されている。生理学的にも、電照菊のように特殊なタイミングで光照射することによってフロリゲン遺伝子の発現を抑制することで花芽分化のタイミングをコントロールする技術が開発されている。フロリゲンの合成過程、すなわち FT 遺伝子の発現がさまざまな方法で制御され、花芽分化のタイミングの制御が行われている。

しかしフロリゲン遺伝子制御系には植物種ごとの多様性が大きいと、普遍的な人為制御法の開発には至っていない。フロリゲン遺伝子の上位の制御系遺伝子には、種が変わると寄与が大きく変化したり真逆の機能を発揮したりする遺伝子が知られている。また電照などの方法も植物種ごとにその効果は大きく異なる。このことから植物に普遍的な花芽分化の人為的な制御方法が求められているが、これまでにそのような方法は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フロリゲンの分子機能の中でも普遍的であると考えられる複合体形成とその機能を標的とすることで、化合物による花芽分化のタイミングの制御を可能にすることである。

フロリゲンの分子機能のなかでも普遍的であるのはフロリゲン活性化複合体の形成による転写活性化である。フロリゲン活性化複合体はフロリゲン、フロリゲン受容体 14-3-3 タンパク質、転写因子 FD から構成される転写複合体である。この複合体が花芽分化を直接的に引き起こす下流転写因子等の転写を活性化することで、花芽分化が誘導される。フロリゲン、14-3-3、FD の相互作用部位は種間の保存性が高い。このことから、複合体形成と機能は普遍的な制御標的となりうる。

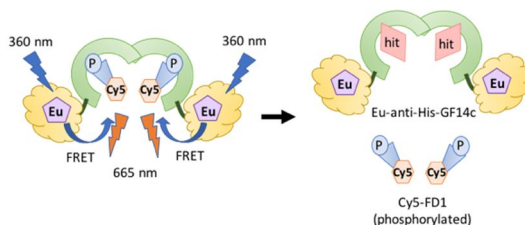
複合体形成と機能を幅広い植物種間で普遍的に制御可能な方法として有効なのは化合物による制御であろう。フロリゲン活性化複合体の構成要素間の相互作用部位はよく保存されているため、例えばこの相互作用を阻害するような化合物は広範な植物種におけるフロリゲン活性化複合体の形成を阻害することが期待できる。

これらの検討を踏まえて、本研究ではフロリゲン活性化複合体の形成を阻害する化合物を発見し、これによってフロリゲン活性化複合体の機能を阻害することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は 4 つのステップで実施することにした。(1) *in vitro* ハイスループットスクリーニング、(2) 植物細胞内における複合体形成の検証、(3) 植物細胞内における複合体機能の検証、(4) 植物体における機能の検証、である。

(1) *in vitro* ハイスループットスクリーニングでは、フロリゲン活性化複合体の NMR 構造解析と結晶構造解析の過程で確立したフロリゲンフロリゲン活性化複合体の各因子の大量発現系を活用して各因子を大量調整した。これらのタンパク質に蛍光色素を結合させ、それぞれの相互作用を蛍光エネルギー共鳴移動(FRET)で検出する実験系を構築した。ここに化合物ライブラリの 2 万化合物を順次添加し、FRET を指標に相互作用の変化を検討した。



(2)植物細胞内における複合体形成の検証では、植物細胞内におけるフロリゲン活性化複合体の形成を検証する独自の実験系を構築した。フロリゲン、FD それぞれに転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインを付加した融合タンパク質を細胞内に発現させ、両者が相互作用した場合に細胞内のレポーター遺伝子(Luc)の発現が活性化する系を構築した。この実験系を用いて、(1)でスクリーニングした化合物が植物細胞内においても機能を発揮するのかを検討した

(3)植物細胞内における複合体機能の検証では、フロリゲン活性化複合体の標的遺伝子 OsMADS15 にジーンターゲットングで nanoLuc 遺伝子を挿入した系統を開発した。私たちは植物培養細胞においてフロリゲンと FD を共発現させることでフロリゲン活性化複合体を再構成する実験系をすでに構築している。この再構成系とジーンターゲットングのレポーター系統を組み合わせることによって、複合体形成や化合物の効果レポーターの強度によって測定した。

(4) 植物体における機能の検証では、イネやシロイヌナズナ、ウキクサにおける花芽分化の検証をおこなった。これらの植物に対して(1)から(3)までのスクリーニングで選ばれた化合物を処理して花芽分化のタイミングを測定した。また、ジャガイモ塊茎形成もフロリゲン活性化複合体によって誘導される現象であることから、ジャガイモ塊茎形成を指標とした化合物の検証も実施した。

4. 研究成果

(1)約 2 万化合物を対象とする in vitro ハイスクリーンによって、フロリゲン活性化複合体の形成を阻害するヒット化合物を 119 見出した。これらは 14-3-3 と FD の相互作用を阻害する化合物であった。また数は少ないが、フロリゲンと 14-3-3 の相互作用に影響を与える化合物も見出した。みいだした化合物に対して、その阻害作用の確かささと相互作用への影響をさらに追求した。方法には阻害効果がタンパク質の濃度依存性を示すかどうか、及び NMR による相互作用の検証を行った。これによってさらに 24 のヒット化合物に絞り込んだ。

(2)植物細胞内における複合体形成の検証では、得られた 24 のヒット化合物を細胞内での相互作用の検証に当てた。また細胞の生育に悪影響を与える化合物も特定した。この検証において、細胞の生育に悪影響を与えずに複合体形成を阻害する化合物として 9 つの化合物を選定した。

(3)植物細胞内における複合体機能の検証では、ジーンターゲットングで作成したレポーター系統に対してフロリゲン活性化複合体の植物細胞内再構築を行い、レポーターの活性を低下させる化合物を選定した。この際に濃度依存性を期待通りに示す化合物を選定した。これにより、化合物の候補を 2 つにまで絞り込んだ。

(4) 植物体における機能の検証では、イネやシロイヌナズナ、ウキクサにおける花芽分化の検証をおこなった。今回見出した化合物は、イネやシロイヌナズナでは花成を遅延させることができなかった。しかしながらウキクサの花成を遅延させる効果があった。ウキクサでは化合物処理後に化合物を洗浄すると効果が消失したことから、この化合物の効果は化合物との共存中のみであると考えられた。花成以外のフロリゲン活性化複合体の機能についても阻害効果を示すかを調べたところ、フロリゲンの機能として知られているジャガイモの塊茎形成とイネの分げつの増加がこの化合物処理によって抑制できることが分かった。

1st screening High Throughput Screening (HTS) by TR-FRET

Library	Drug size
The Spectrum collection	2320
FDA-approved drug	1134
Drug-like set	20160
Total	23614

119 hits

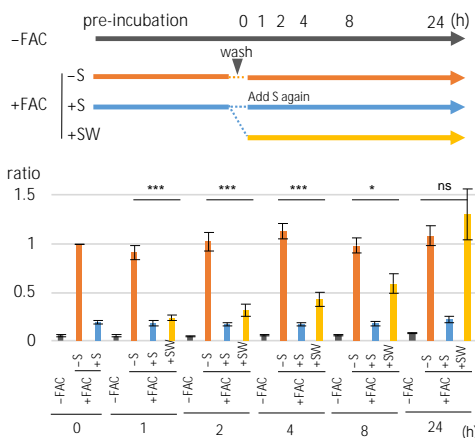
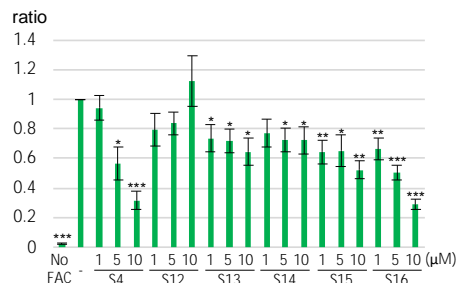
TR-FRET (does-dependency), NMR experiments

Library	Hits
The Spectrum collection	6
FDA-approved Drug	2
Drug-like Set	16
Total hits	24 (S1-S24)

2nd screening
Cell viability and interaction in plant cells
9 candidates (S1, S4, S12-16, S18, S21)

3rd screening
Dose-dependency test for hit compounds with rice protoplasts
2 inhibitors (S4, S16)

4th screening
Phenotypic analyses with the two hits in rice, duckweeds, and potato plants



これらの検証を通して、フロリゲン活性化複合体の形成阻害剤として2つの化合物を特定することに成功した (Taoka et al. 2022, Plant J., Harada et al. 2022 Sci. Rep.)。

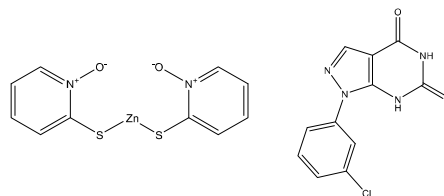


図. 本研究で発見したフロリゲン活性化複合体の形成阻害剤

本研究で得られたヒット化合物はフロリゲン活性化複合体の形成を直接阻害することによってその機能を阻害することのできる世界初の化合物である。これまでに花芽分化を抑制させる化合物は複数の例が知られているが、いずれも複雑な光周性花成経路への影響を経てフロリゲンの合成経路に結果的に作用するものであった。これらの化合物は植物種ごとに効果が異なり場合によっては真逆の効果を示す可能性もあることや、広範な副次的作用を的確に制御しつつ使用する必要がある。これに対して本研究で見出した化合物はその標的がフロリゲン活性化複合体として特定されているため、この複合体が関与する発生現象を特異的に阻害することが期待される。

本研究で得られたヒット化合物は、水溶液との接触性の高いウキクサでは花成を遅延させることができたが、イネやシロイヌナズナにおいては花成を遅延させる効果を得られなかった。この原因は植物体内への取り込みと輸送がまだ最適化されていないことに由来すると考えられている。一般的に化合物が作用できない場合は、細胞への毒性や細胞内で分解されてしまい効果を発揮できない等の理由が考えられる。しかしながら本研究で見出した化合物に関してはこの可能性は低い。なぜなら細胞への毒性は(2)および(3)のスクリーニングのステップで細胞の増殖性に対する化合物の濃度効果を検証しており、細胞増殖に問題のなかった化合物を使用しているからである。また植物細胞内における複合体形成の阻害効果、およびこの複合体形成阻害が複合体による標的遺伝子の転写活性化を抑制できるレベルの阻害であることも確認しているからである。したがってイネやシロイヌナズナにおいて本研究のヒット化合物が花成遅延効果を発揮できなかった理由は、これ上記以外の理由として想定できる植物体内への取り込みと輸送であろうと考えられる。より実用性を高めるためには、本研究で見出されたヒット化合物をスタートとして植物細胞への取り込みを向上させつつ機能を損なわないような構造上の改変を実施する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taoka Ken ichiro, Kawahara Ikumi, Shinya Shoko, Harada Ken ichi, Yamashita Eiki, Shimatani Zenpei, Furuita Kyoko, Muranaka Tomoaki, Oyama Tokitaka, Terada Rie, Nakagawa Atsushi, Fujiwara Toshimichi, Tsuji Hiroyuki, Kojima Chojiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Multifunctional chemical inhibitors of the florigen activation complex discovered by structure-based high-throughput screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Ken-ichi, Furuita Kyoko, Yamashita Eiki, Taoka Ken-ichiro, Tsuji Hiroyuki, Fujiwara Toshimichi, Nakagawa Atsushi, Kojima Chojiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Crystal structure of potato 14-3-3 protein St14f revealed the importance of helix I in StFDL1 recognition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15505-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inada Yuki, Ono Yuichiro, Okazaki Kyo, Yamashita Takuma, Kawaguchi Tomoyuki, Kawano Shingo, Kobashigawa Yoshihiro, Shinya Shoko, Kojima Chojiro, Shuto Tsuyoshi, Kai Hirofumi, Morioka Hiroshi, Sato Takashi	4. 巻 174
2. 論文標題 Hydrogen bonds connecting the N-terminal region and the DE loop stabilize the monomeric structure of transthyretin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 355 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hoch Jeffrey C, Baskaran Kumaran, Burr Harrison, Chin John, Eghbalnia Hamid?R, Fujiwara Toshimichi, Gryk Michael?R, Iwata Takeshi, Kojima Chojiro, Kurisu Genji, Maziuk Dmitri, Miyanoiri Yohei, Wedell Jonathan?R, Wilburn Colin, Yao Hongyang, Yokochi Masashi	4. 巻 51
2. 論文標題 Biological Magnetic Resonance Data Bank	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 D368 ~ D376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac1050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuita Kyoko, Inomata Kouki, Sugiki Toshihiko, Kobayashi Naohiro, Fujiwara Toshimich, Kojima Chojiro	4. 巻 16
2. 論文標題 1H, 13C, and 15N resonance assignments of human glutathione peroxidase 4	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 267 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-022-10090-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Takeshi, Furuita Kyoko, Sakurabayashi Shuhei, Nomura Makoto, Kojima Chojiro, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 50
2. 論文標題 NMR determination of the 2:1 binding complex of naphthyridine carbamate dimer (NCD) and CGG/CGG triad in double-stranded DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9621 ~ 9631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac740	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yoshiyuki, Yamanaka Daichi, Morioka Saori, Yamaguchi Taishi, Morikawa Masayuki, Kodama Takashi S., Sychrovsk? Vladim?r, Kojima Chojiro, Hattori Yoshikazu	4. 巻 2
2. 論文標題 Physicochemical Characterization of the Catalytic Unit of Hammerhead Ribozyme and Its Relationship with the Catalytic Activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysica	6. 最初と最後の頁 221 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biophysica2030022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Shoko, Katahira Ritsuko, Furuita Kyoko, Sugiki Toshihiko, Lee Young-Ho, Hattori Yoshikazu, Takeshita Kohei, Nakagawa Atsushi, Kokago Aoi, Akagi Ken-ichi, Oouchi Muneki, Hayashi Fumiaki, Kigawa Takanori, Takimoto-Kamimura Midori, Fujiwara Toshimichi, Kojima Chojiro	4. 巻 13
2. 論文標題 19F chemical library and 19F-NMR for a weakly bound complex structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1100 ~ 1111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2md00170e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimaru Kota, Yamaguchi Koji, Harada Kenichi, Nishio Yusaku, Hori Momoka, Ishikawa Kazuya, Inoue Haruhiko, Shigeta Shusuke, Inoue Kento, Shimada Keita, Yoshimura Satomi, Takeda Takumi, Yamashita Eiki, Fujiwara Toshimichi, Nakagawa Atsushi, Kojima Chojiro, Kawasaki Tsutomu	4. 巻 13
2. 論文標題 Cooperative regulation of PBI1 and MAPKs controls WRKY45 transcription factor in rice immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30131-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ta Kim Nhung, Shimizu Sato Sae, Agata Ayumi, Yoshida Yuri, Taoka Ken ichiro, Tsuji Hiroyuki, Akagi Takashi, Tanizawa Yasuhiro, Sano Ryosuke, Nosaka Takahashi Misuzu, Suzuki Toshiya, Demura Taku, Toyoda Atsushi, Nakamura Yasukazu, Sato Yutaka	4. 巻 115
2. 論文標題 A leaf emanated signal orchestrates grain size and number in response to maternal resources	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 175 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.16219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 榎本麻由1、安澤すあい1、小泉優香1、古板恭子2、田岡健一郎3、4、西田敬二4、近藤昭彦4、児玉高志2、藤原敏道2、辻寛之3、5、児嶋長次郎1、2
2. 発表標題 イネ花成ホルモン蛋白質複合体によるLLPS形成と花成制御機構の解明
3. 学会等名 蛋白質科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎本麻由1、安澤すあい1、小泉優香1、古板恭子2、田岡健一郎3、4、西田敬二4、近藤昭彦4、児玉高志2、藤原敏道2、辻寛之3、5、児嶋長次郎1、2
2. 発表標題 フロリゲン活性化複合体が形成する液-液相分離凝集体の制御機構
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎本麻由1、安澤すあい1、小泉優香1、田岡健一郎2、古板恭子3、児玉高志3、藤原敏道3、辻寛之2、児嶋長次郎1,3
2. 発表標題 花成ホルモン蛋白質複合体の液-液相分離と花成制御機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田岡健一郎1,2, 田中真理1, 西田敬二2, 近藤昭彦2, 児嶋長次郎3,4, 辻寛之1,5
2. 発表標題 フロリゲン活性化複合体が形成する核内凝集体の機能
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sato, M., Tsuji, H
2. 発表標題 Florigen Function in the Shoot Apical Meristem
3. 学会等名 aiwan-Japan Plant Biology 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻 寛之
2. 発表標題 植物リソース配分の成長相転換
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	児嶋 長次郎 (Kojima Chojiro) (50333563)	横浜国立大学・大学院工学研究院・教授 (12701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------