

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570133

研究課題名(和文)結晶構造解析と新規NMR法を組み合わせた植物ホルモン複合体の相互作用解析

研究課題名(英文)Structural study of florigen and the receptor complex

研究代表者

大木 出(Ohki, Izuru)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80418574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：フロリゲンは植物において花が咲く時期を決定している花成ホルモンであるが、開花タイミングの制御機構は未だ明らかでない。本研究では、最近我々が同定したフロリゲン受容体に注目し、フロリゲンと受容体あるいは花成リプレッサーと受容体が形成する2種の転写調節複合体の機能構造解析を行った。

構造学的知見より、フロリゲンとリプレッサーは受容体に拮抗的に結合し、2つの複合体は相互に交換しうることが判明した。これより、フロリゲンは花成抑制複合体からリプレッサーを追い出すことで活性化複合体を形成し、花成のスイッチを入れるモデルを提唱した。また、平行してNMRを用いた相互作用解析法の開発を行い、有効性を確認出来た。

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

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶解析 NMR 植物 植物ホルモン 構造生物学 花成

1. 研究開始当初の背景

フロリゲンは、花芽形成に適した日長におかれた植物の葉において作られ、茎頂に運ばれることにより花成を促進する花成ホルモンとして 1930 年代に提唱されたが、その分子実体は長い間謎のままであった。それから約 70 年後の 2007 年に、我々を含む日本とドイツの研究グループにより、その実体が分子量 2 万ほどの小さなタンパク質(イネ Hd3a、シロイヌナズナでは FT) であることが初めて示された。フロリゲン Hd3a/FT は葉で合成され茎頂に運ばれるが、茎頂細胞内での花成誘導メカニズムの詳細は不明であった。

研究開始当初の 2011 年に、我々はイネフロリゲン Hd3a の細胞内受容体 GF14 を同定し、さらにフロリゲン・受容体・花成転写因子の三者複合体(フロリゲン活性化複合体)の立体構造を決定する事で、花成促進の詳細なメカニズムを明らかにした(Taoka, **Ohki**, Tsuji *et al.*, *Nature* 2011, 図 1)。

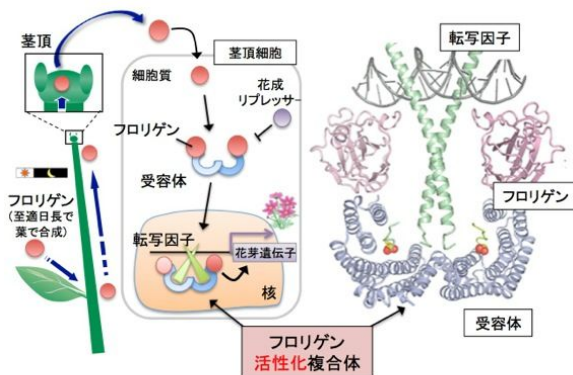


図 1. フロリゲンが花成を引き起こす仕組み

(左) 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メカニズム(右) フロリゲン活性化複合体の立体構造

この新規受容体は、開花促進時にはフロリゲンと活性化複合体を形成するが、最近の研究から、植物成長期の開花が抑制されている状態では花成リプレッサー-RCN/TFL1 と「抑制」複合体を形成して花成を抑えていることが分かってきた。そのため、開花の全貌解明には、このフロリゲン受容体を中心とした促進・抑制の相反する 2 つの制御機構の解明が必要となってきた。

2. 研究の目的

本研究では構造解析の手法を駆使し、同定した新規受容体と花成リプレッサーを含むフロリゲン「抑制」複合体の機能構造解析を行い、これまで我々が明らかにしてきた「活性化」複合体の知見と合わせて、フロリゲンによる開花促進・抑制機構、切替え機構の全貌を解明することを目的としている。

また、フロリゲン複合体のような分子量の大きな複合体においても、溶液中で相互作用

解析が可能となるような新規 NMR 解析技術の開発も合わせて行った。

3. 研究の方法

研究は 3 つのテーマ、1) 花成リプレッサー及び抑制複合体の機能構造解析、2) フロリゲンと花成リプレッサーの拮抗的作用の解明、3) 高分子量蛋白質の相互作用解析のための新規 NMR 解析法の開発、に分けて行った。

いずれのテーマに関しても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、多面的なアプローチにより花成の分子機能の解明を試みた。

4. 研究成果

4-1) 花成リプレッサーの構造と機能

花成リプレッサーによる開花の「抑制」機構を明らかにするために、イネ花成リプレッサー蛋白質 RCN の結晶構造解析を行い、立体構造の決定に成功した。イネフロリゲン Hd3a との比較により、Hd3a で受容体との結合に関与する領域の配列、立体構造はリプレッサーにおいても保存されており、受容体との結合能は保たれていることが示唆された。花成リプレッサーと受容体の *in vitro* GST-pull down 結合アッセイ及び、花成リプレッサー、受容体、転写因子、標的遺伝子プロモーター DNA (*API*) の 4 者による DNA ゲルシフトアッセイ (EMSA) より、花成リプレッサーにおいてもフロリゲンと同様に DNA 上で受容体を含む安定な 4 者複合体(フロリゲン抑制複合体と命名)を形成する事が判明した。

シロイヌナズナにおいて、Segment B と呼ばれるループ領域がフロリゲンと花成リプレッサーの機能差に重要だと報告されているが、イネフロリゲンとイネ花成リプレッサーにおいても、Segment B 領域の構造に大きな差が見られた。この領域は、既に報告しているフロリゲン活性化複合体構造上で、外側に完全に露出した部位に存在しており、他因子 (co-activator や co-repressor) がこの部位の構造の違いを認識して結合する事で、機能差が生じている可能性が示唆された。

4-2) 花成促進/抑制のスイッチング機構

構造解析の結果より、フロリゲンと花成リプレッサーは受容体上の同一部位に結合する、つまり受容体上で二者は拮抗的に結合する事が考えられた。そこで、受容体を固定したカラムを用いて *in vitro* pull-down 結合競合実験を行い、実際に受容体上でフロリゲンと花成リプレッサーが置き換わる事を確認した。受容体に対するフロリゲン及び花成リプレッサーの結合定数は同程度であり、花成

リプレッサー-受容体複合体（抑制複合体）に対してフロリゲンを添加するに従い、シグモイダルにフロリゲン-受容体（活性化複合体）量が増加した。この競合結合の特徴により、フロリゲンが極少量存在する成長期の茎頂細胞においてはフロリゲン標的遺伝子（*OsMADS15* 等）プロモーター上で活性化複体の形成（花成）が抑えられ、ある一定量のフロリゲンが来て初めて抑制複合体から活性化複合体への転換が一気に進むのかもしれない。

以上の結果より、フロリゲンと花成リプレッサーによる花成制御モデルを提唱した（図2）。花成の促進・抑制は、茎頂細胞内でのフロリゲン活性化複合体とフロリゲン抑制複合体の2つの複合体の量的バランスにより制御されており、受容体上で花成リプレッサーがフロリゲンへ置換される事により花成が引き起こされると考えられる（図2）。

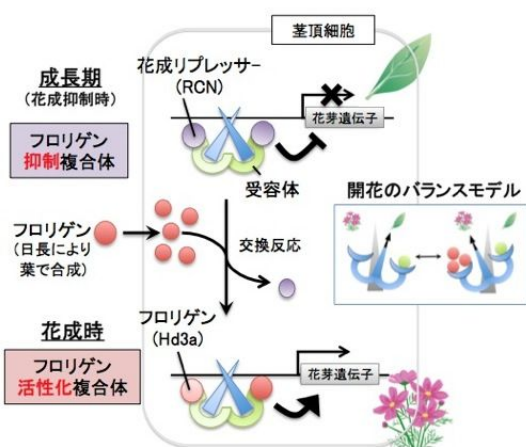


図2. 2つのフロリゲン複合体による花成制御モデル
受容体上での花成リプレッサーからフロリゲンへの置き換わりにより花成が引き起こされる。花成は抑制・活性化の2つの複合体のバランスにより制御される

今後は Segment B に特異的に結合する因子の検索を進め、フロリゲン活性化複合体が形成された後の転写制御機構について明らかにしていく予定である。また、今回、植物の花成制御には促進と抑制機構のバランスが重要であることが示されたが、得られた促進・抑制複合体の分子構造情報と合わせて、バランスに摂動を与えるような改変フロリゲンや低分子化合物を設計し、作物やパイオマス植物の機能改変や育種技術への応用を計画している。

4-3)新規 NMR 相互作用解析法の開発

新規 NMR 相互作用解析法の開発についても研究を進めた。これは、蛋白質を安定同位体の炭素 ^{13}C を含むアルデヒドで修飾することでリジン残基特異的に ^{13}C 標識したメチル基を導入し、NMR で解析を行う手法の開発

である。標識の実験条件の検討を行い、手法をいくつかの標準蛋白質に適用し、分子量の大きな蛋白質複合体の相互作用解析に有効であることを示した (Hattori, Ohki *et al.*, *J.B.NMR* 2013)。今後は高感度化に向けた技術改良を加え、より汎用的に利用できる手法として確立していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Kosami K*, Ohki I*, Nagano M*, Furuita K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, Kojima C# (***筆頭著者**、#**責任著者**), The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase, *J Biol Chem.* 289, 8569-78 (2014). 査読有
2. Kosami K, Ohki I#, Hayashi K, Tabata R, Usugi S, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, Kojima C#, (#**責任著者**) Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1, *Acta Crystallogr F* 70, 113-5 (2014). 査読有
3. 田岡健一郎, 大木出, 辻寛之, 児嶋長次郎, 島本功, 「花成ホルモン フロリゲンとその受容体の構造解析からみえてきたフロリゲン機能の分子基盤」, 化学と生物 Vol.50 No.9, pp.654-659 (2012). 査読無し
4. 服部良一, Jakub Sebera, Vladimir Sychrovsky, 古板恭子, 大木出, 池上貴久, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 「メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究」, 日本核磁気共鳴学会機関誌 第5巻, pp.56-59, (2014). 査読無し
5. Nakano T, Ohki I, Yokota A, Ashida H, MtnBD is a multifunctional fusion enzyme in the methionine salvage pathway of *Tetrahymena thermophila*, *PLoS One* 8, e67385 (2013). 査読有
6. Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Kojima C, Shimamoto K, Structure and function of florigen and the receptor complex, *Trends Plant Sci.* 18, 287-94 (2013). 査読有
7. Hattori Y, Furuita K, Ohki I#, Ikegami T, Fukada H, Shirakawa M, Fujiwara T, Kojima C# (#**責任著者**), Utilization of lysine ^{13}C -methylation NMR for

protein-protein interaction studies, *J. Biomol. NMR* 55, 19-31 (2013). 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. **大木出**、「結晶構造を用いた NMR による相互作用解析と Structural Imaging への展望」、大阪大学蛋白研セミナー「結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線」、大阪大学、2014年2月8日
2. 田岡健一郎、**大木出**、辻寛之、島本功、児嶋長次郎、「花咲か爺さんの灰を求めて-構造生命科学からのアプローチ」、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・アグリバイオシンポジウム、奈良、2013年11月30日
3. 服部良一、Jakub Sebera、Vladimir Sychrovsky、古板恭子、**大木出**、池上貴久、藤原敏道、児嶋長次郎、「メチル化リジンの化学シフトと塩橋との相関に関する理論的・実験的研究」、第52回NMR討論会、金沢、2013年11月14日
4. 鷲田 治彦、辻 寛之、**大木出**、田岡 健一郎、島本功、「膜透過ペプチドを利用したイネフロリゲンタンパク質直接導入による人為的開花制御」、日本育種学会第124回講演会、2013年10月13日 鹿児島大学
5. **大木出**、「立体構造から見た植物花成ホルモン(フロリゲン)の花成制御機構」、奈良先端大バイオサイエンス研究科セミナー、奈良、2013年1月28日
6. **大木出**、古板恭子、林こころ、田岡健一郎、辻寛之、中川敦史、島本功、児嶋長次郎、「植物花成ホルモン(フロリゲン)受容体による花成制御機構の分子基盤」、招待講演、「タンパク質-II」セッション3T08、第85回日本生化学会年会、福岡、2012年12月16日
7. **大木出**、服部良一、古板恭子、池上貴久、深田はるみ、白川昌宏、藤原敏道、児嶋長次郎、「リジンの¹³Cメチル化標識法を使ったNMRによる蛋白質間相互作用解析の有効性」、招待講演、ワークショップ「NMRで見るタンパク質の機能発現」2W4II、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月12日

〔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〕

本研究を取り上げた高校教科書、副読本等

1. 新課程 高校生物副教材、「高校生物解説書植物編」、pp.60-63、講談社、2014年.
2. 新課程 高校生物副教材、「フォトサイエンス生物図録」、第5章 生物の生活と環境 p.189、数研出版、2013年.

○ホームページ等

1. <http://bsw3.naist.jp/kojima/>
2. <http://researchmap.jp/read0154552/>
3. http://www.moleng.kyoto-u.ac.jp/~moleng_01/index.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

大木 出(OHKI IZURU)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・
研究員

研究者番号: 80418574

(2)研究分担者

(3)連携研究者