

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06083

研究課題名(和文) 植物開花ホルモンによる花成促進・抑制の構造学的基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of flowering initiation and repression 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：フロリゲンは植物で花が咲く時期を決定している開花ホルモンであり、葉で合成され茎頂へ移動して花成を促進する。これまで我々はフロリゲン受容体を発見し、フロリゲンとの活性化複合体の構造を決定し開花促進機構を明らかにしてきた(Nature 2011)。この受容体は栄養成長期には花成リプレッサーとの相互作用を介し開花抑制を行っている事が新たに分かってきた。そこで本研究では花成リプレッサーと受容体からなる開花抑制複合体の解析を行い、分子構造を高分解能で決定する事に成功した。両複合体の構造比較と生化学的アッセイから、受容体上でフロリゲンと花成リプレッサーが競合し置き換わる開花促進抑制機構のモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は植物の花成研究において、フロリゲンを同定し、新規な受容体を発見し、間違いなく世界に先んじている。特に同定されたばかりの受容体の情報を独占的に用いて研究を進められる事は非常に大きなアドバンテージである。本研究はイネのフロリゲン研究のこれまでの蓄積を生かし、さらに世界をリードするフロリゲン生物学の展開を目指すものであり、研究手法も原子レベルの立体構造解析から細胞、個体レベルの機能解析、植物改良まで含む複合的な研究である。フロリゲンをを用いて改良した作物は遺伝子組換え技術を用いないため、現実的な食糧増産対策になり、産業に与える影響は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Florigen is a flowering hormone that determines when plants bloom. We have discovered the florigen receptor, determined the structure of the activation complex with florigen, and elucidated the flowering promotion mechanism (Taoka, Ohki, Tsuji et al., Nature 2011). Recently, we found that this receptor suppresses flowering through interaction with a flowering repressor during the vegetative state. In this study, we analyzed the flowering-suppressing complex consisting of a flowering repressor and the receptor, and succeeded in determining the molecular structure with high resolution. From the structural comparison and biochemical assay of both complexes, we constructed a model of the flowering promotion/suppression mechanism in which the florigen and repressor compete and replace on the receptor surface.

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 フロリゲン

1. 研究開始当初の背景

開花ホルモン・フロリゲンは植物で花が咲く時期を決定している分子量 20kDa の蛋白質性ホルモンであり、2007 年になって初めて同定された。フロリゲンは適切な日長条件下で葉で合成され、茎頂へと運ばれて花芽形成遺伝子の転写を促進し花成を促進する。これまでに、我々は茎頂細胞において未知であったフロリゲンの細胞内受容体を世界に先駆けて発見し、フロリゲンと受容体からなる「フロリゲン活性化複合体」の立体構造を決定する事で開花促進の分子機構を明らかにしてきた(図 1、Taoka, Ohki, Tsuji *et al.* Nature 2011)。

最近、この新規受容体は花成期だけでなく栄養成長期においても花成リプレッサーとの相互作用を介して開花の制御を行っている事が新たに分かってきた。

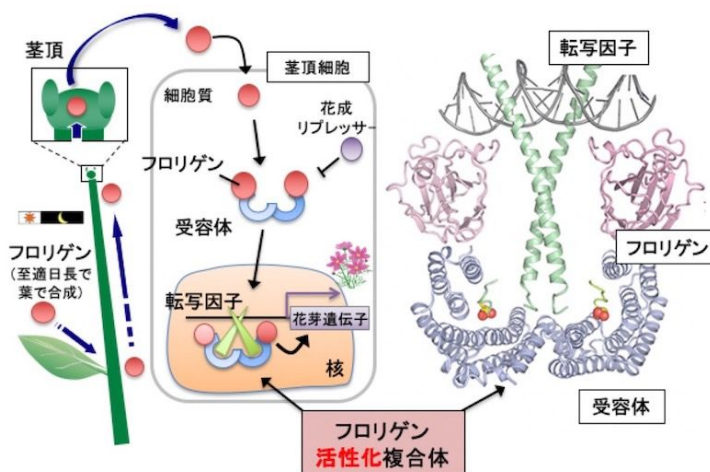


図1 フロリゲンと受容体による開花促進の分子メカニズム
(左) フロリゲンの葉から芽の先端(茎頂)への移動と、茎頂での受容体との結合による花成促進(右)フロリゲン活性化複合体の構造

2. 研究の目的

本研究は、この新規フロリゲン受容体を中心に、茎頂細胞内で受容体がフロリゲン(イネ Hd3a)あるいは花成リプレッサー(イネ RCN)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)に注目し、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

本研究では生化学と構造生物学の技法を用い、この新規受容体を含む2種類のフロリゲン複合体(花成期の活性化複合体と成長期の抑制複合体)及び関連した転写複合体の機能構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 花成の促進・抑制を行う2つの機能複合体による開花の制御機構

これまで、我々は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、花成リプレッサー(RCN/TFL1)が受容体に直接働きかけ、フロリゲン(Hd3a/FT)による開花を抑制している事が分かってきている。そこで、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ため、新たに花成リプレッサー、受容体と転写因子からなる「フロリゲン抑制複合体」の結晶構造解析を行い、2.65 分解能で立体構造の決定に成功した。

既に得られているフロリゲンと受容体からなる「活性化複合体」と、今回得られた逆の機能を持つ花成リプレッサーと受容体からなる「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、フロリゲンと花成リプレッサー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 pull down アッセイを用いた結合競合実験を行い、カラム上に固定した花成リプレッサー-受容体複合体にフロリゲンを添加する事で、リプレッサーが溶出し、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、フロリゲンの標的的花成遺伝子プロモーター配列 (*AP1*) を用いた EMSA アッセイから、フロリゲン同様、リプレッサーも標的プロモーターDNA 上で安定な複合体を形成できることが判明した。ITC を用いた熱測定から、フロリゲンとリプレッサーの受容体に対する結合定数 (KD) に大きな差は見られなかった。両者の存在比を変えた受容体への結合シミュレーションから、両複合体の存在比はシグモイダル曲線 (S 字) を示し、フロリゲン濃度がある閾値を超えることで交換が起こる安定なシステムとなっている事が示唆された。

以上の結果より、我々は次のようなフロリゲンと花成リプレッサーによる開花促進・抑制スイッチモデルを提唱した(図2)。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、栄養成長期に標的プロモーター上で転写抑制を行っていたリプレッサーと受容体からなる抑制複合体が、日長により葉から運ばれたフロリゲンと置き換わり活性化複合体となって花芽形成遺伝子の転写を引き起こし、相転換・開花が起こると考えられる(図2)。

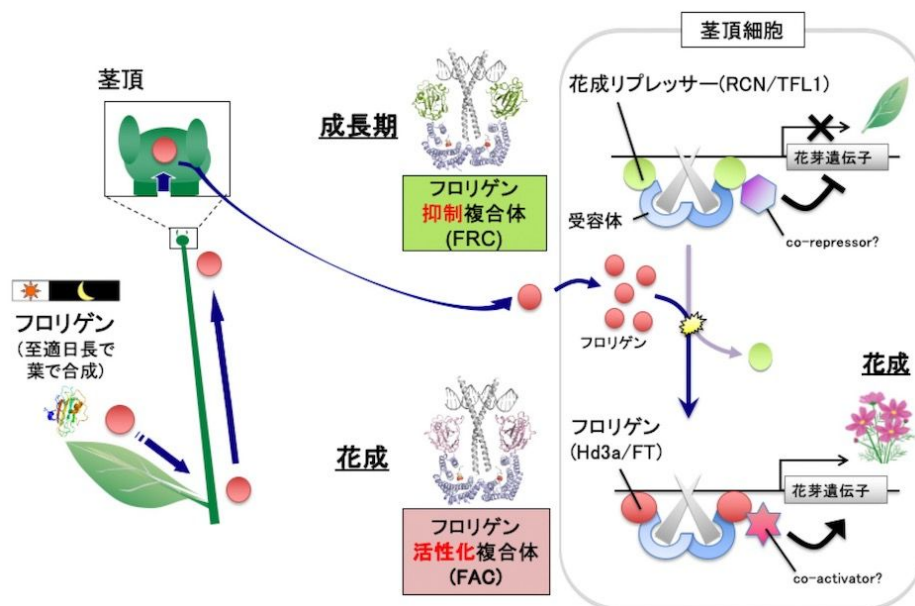


図2 フロリゲンと花成リプレッサーによる開花促進・抑制スイッチモデル

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いる。栄養成長期に標的プロモーター上で転写抑制を行っていた抑制複合体が、葉から運ばれたフロリゲンにより活性化複合体となることで花芽形成遺伝子の転写を引き起こし、相転換・開花が起こる

(2) フロリゲンと花成リプレッサーの機能差に関与する新規制御分子の探索

複合体交換モデルによる開花の抑制促進機構は比較的良く全体像を説明するが、まだいくつかの大きな未解決点が存在する。フロリゲン複合体 (フロリゲン/リプレッサー-受容体-転写因子の三者複合体) は転写活性化あるいは抑制ドメインを直接的には含まないため、実際に転写を遂行している分子 (転写リプレッサーあるいはアクチベーター) の同定及び機構解明、また、フロリゲンとリプレッサーの機能差に関与すると報告されている Segment-B 領域、アニオン結合ポケットの役割解明といった点が残されている。

Segment-B 領域とアニオン結合ポケットは、フロリゲン-受容体と DNA からなる複合体構造モデル上で、それぞれの相互作用面から離れて外部に露出しているため、この領域に機能差を發揮する何らかの未知因子 (低分子を含む) が相互作用することが強く示唆された。そこで新たな因

子の探索のため、異なる分子状態での構造解析や様々な低分子との相互作用解析を試みた。その結果、フロリゲンの共結晶構造からアニオン結合ポケットへの結合ペプチドが見つかった。結合ペプチドは、ポケット内に入りこんでフロリゲンのアミノ酸残基と相互作用を行っており、近傍の Segment-B 領域との接触も見られた。このペプチドは機能差を生み出している未知転写因子の部分配列の可能性が考えられ、現在、配列スクリーニングを進めている。また、差異を生み出す未知制御因子は DNA-フロリゲン-受容体-転写因子の四者が揃って初めて結合すると考えられるため、過渡的な四者複合体を安定化した結合アッセイ系の作成も進めている。他に NMR 解析から Segment-B 近傍の残基にリン脂質 (PE) との弱い相互作用が見られた。リン脂質 (PC/PE) との結合はこれまでもシロイヌナズナの花成リプレッサー (FT、文献 1) や花成リプレッサー (TFL1)、また FT ホモログの動物 PEBP で報告されている。NMR 解析で相互作用が見られたアミノ酸残基は、フロリゲンファミリー間で配列保存性が比較的高い領域内に存在していたため、フロリゲンとリプレッサー共通の機能であることが示唆された。この機能に関しては、細胞内局在や細胞間移動への関係を今後調べていく必要がある。

< 引用文献 >

1) Nakamura Y, Inaba K *et al.*, High-Resolution Crystal Structure of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T Illuminates Its Phospholipid-Binding Site in Flowering, *iScience* 21, 577-586 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyanishi K, Segawa T F, Takeda K, Ohki I, Onoda S, Ohshima T, Abe H, Takashima H, Takeuchi S, Shames A I., Morita K, Wang Y, Frederick T.-K., Terada D, Igarashi R, Kagawa A, Kitagawa M, Mizuochi N, Shirakawa M, Negoro M	4. 巻 2
2. 論文標題 Room-temperature hyperpolarization of polycrystalline samples with optically polarized triplet electrons: pentacene or nitrogen-vacancy center in diamond?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 33~48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5194/mr-2-33-2021	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 該当する
1. 著者名 Herbschleb E. D, Kato H, Maruyama Y, Danjo T, Makino T, Yamasaki S, Ohki I, Hayashi K, Morishita H, Fujiwara M, Mizuochi N	4. 巻 10
2. 論文標題 Ultra-long coherence times amongst room-temperature solid-state spins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11776-8	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 Iwakawa Naoto, Mahana Yutaka, Ono Arina, Ohki Izuru, Walinda Erik, Morimoto Daichi, Sugase Kenji, Shirakawa Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Backbone and side-chain resonance assignments of the methyl-CpG-binding domain of MBD6 from Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 59~62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-018-9851-2	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 Fujita Hiroaki, Tokunaga Akira, Shimizu Satoshi, Whiting Amanda L., Aguilar-Alonso Francisco, Takagi Kenji, Walinda Erik, Sasaki Yoshiteru, Shimokawa Taketo, Mizushima Tsunehiro, Ohki Izuru, Ariyoshi Mariko, Tochio Hidehito, Bernal Federico, Shirakawa Masahiro, Iwai Kazuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Cooperative Domain Formation by Homologous Motifs in HOIL-1L and SHARPIN Plays A Crucial Role in LUBAC Stabilization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1192-1204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.03.112	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 Kaneko-Suzuki Miho, Kurihara-Ishikawa Rie, Okushita-Terakawa Chiaki, Kojima Chojiro, Nagano-Fujiwara Misa, Ohki Izuru, Tsuji Hiroyuki, Shimamoto Ko, Taoka Ken-Ichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 TFL1-Like Proteins in Rice Antagonize Rice FT-Like Protein in Inflorescence Development by Competition for Complex Formation with 14-3-3 and FD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 458-468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy021	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17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 内田岳、藤原正規、大木出、鶴井明彦、劉明、西川正浩、水落憲和
2. 発表標題 爆轟法ナノダイヤモンド中のSiV中心を用いた温度センシング
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村将也、山下峻吾、森下弘樹、藤原正規、大木出、Ernst Herbschleb、徳田規夫、水落憲和
2. 発表標題 ダイヤモンド中のNV中心でのドレスト状態による温度センシング
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹村祐輝、林寛、小野田忍、阿部浩之、大島武、谷口尚、藤原正規、森下弘樹、大木出、水落憲和
2. 発表標題 NV中心量子センサのための広領域・広帯域マイクロ波アンテナの研究開発
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 E D.Herbschleb、Hiromitsu Kato、Yuichi Maruyama、Takuya Danjo、Toshiharu Makino、Satoshi Yamasaki、Izuru Ohki、Kan Hayashi、Hiroki Morishita、Masanori Fujiwara、Norikazu Mizuoch
2. 発表標題 Phosphorus-doped diamond: ultra-long coherence times and high magnetic sensitivity with nitrogen-vacancy centres
3. 学会等名 Hasselt Diamond Workshop 2020 - SBDD XXV (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 E. D. Herbschleb, H. Kato, Y. Maruyama, T. Danjo, T. Makino, S. Yamasaki, I. Ohki, K. Hayashi, H. Morishita, M. Fujiwara, N. Mizuochi
2. 発表標題 Single NV centres in phosphorus-doped diamond display the longest coherence times and highest sensitivities at room temperature
3. 学会等名 Spin-RNJ若手オンライン研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大木出、森田航希、藤原正規、水落憲和
2. 発表標題 ダイヤモンドNV中心と量子技術を使ったピコリットルNMRによる生体分子観察
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S.Frederick, A.Shames, D.Terada, T.Genjo, H.Morishita, I.Ohki, T.Oshima, S.Onoda, H.Takahsima, S.Takeuchi, E.Osawa, N.Mizuochi, R.Igarashi, M.Shirakawa, T.Segawa
2. 発表標題 Formation of Nitrogen-Vacancy centers in nanodiamonds: Size and type dependence
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田航希, 大木出, 藤原正規, 中野裕太, 吉本智貴, 徳田規夫, 水落憲和
2. 発表標題 ダイヤモンドNV 中心を使ったピコリットルNMRと単一細胞測定への展開
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮西孝一郎, Takuya F. Segawa, 大木出, 小野田忍, 大島武, 阿部浩之, 高島秀聡, 竹内繁樹, 武田和行, Frederick T.-K. So, 寺田大紀, 五十嵐龍治, 香川晃徳, 北川勝浩, 水落憲和, 白川昌宏, 根来誠
2. 発表標題 室温下でのダイヤモンド中NV中心とベンタセンによる ^{13}C pulsed-DNP
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 E D Herbschleb, Hiromitsu Kato, Yuichi Maruyama, Takuya Danjo, Toshiharu Makino, Satoshi Yamasaki, Izuru Ohki, Kan Hayashi, Hiroki Morishita, Masanori Fujiwara, Norikazu Mizuochi
2. 発表標題 Best magnetic-field sensitivities with single NV centres at room temperature
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 E D Herbschleb, Hiromitsu Kato, Yuichi Maruyama, Takuya Danjo, Toshiharu Makino, Satoshi Yamasaki, Izuru Ohki, Kan Hayashi, Hiroki Morishita, Masanori Fujiwara, Norikazu Mizuochi
2. 発表標題 Ultra-long coherence times amongst room-temperature solid-state spins
3. 学会等名 International Symposium on Hybrid Quantum Systems 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 E D Herbschleb, Hiromitsu Kato, Yuichi Maruyama, Takuya Danjo, Toshiharu Makino, Satoshi Yamasaki, Izuru Ohki, Kan Hayashi, Hiroki Morishita, Masanori Fujiwara, Norikazu Mizuochi
2. 発表標題 Ultra-long coherence times room-temperature amongst solid-state spins
3. 学会等名 The 2nd International Forum on Quantum Metrology and Sensing (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木出、森田航希、藤原正規、森下弘樹、白川昌宏、水落憲和
2. 発表標題 ダイヤモンドNV中心を使ったナノスケールの溶液NMR
3. 学会等名 第58回NMR討論会・SEST2019連合大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野皓介、山崎健太郎、西尾有輝、石綿整、藤咲貴大、大木出、岩崎孝之、波多野睦子、五十嵐龍治、白川昌宏
2. 発表標題 微小体積でのパラ水素超偏極NMR測定を目的としたフローセル付きダイヤモンド磁気センサの作製
3. 学会等名 量子生命科学会若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大木出、藤咲貴大、池上貴久、白川昌宏、水落憲和
2. 発表標題 溶液NMRにおける生体高分子の核超偏極技術の開発
3. 学会等名 第57回NMR討論会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大木出
2. 発表標題 量子技術で生体高分子の三次元構造動態を 見る－in vitroから細胞・生体まで
3. 学会等名 量子科学技術研究開発機構放射線影響研究部影響研究部セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 E D Herbschleb, Yuichi Maruyama, Takuya Danjo, Izuru Ohki, Hiromitsu Kato, Toshiharu Makino, Kan Hayashi, Hiroki Morishita, Masanori Fujiwara, Satoshi Yamasaki, Norikazu Mizuochi
2. 発表標題 Magnetic AC sensing with nitrogen-vacancy centres in phosphorus-doped diamond
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------