

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26520307

研究課題名(和文) フロリゲンを利用した食糧増産のための遺伝子組換えによらない作物改良技術

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the floral initiation by florigen and its application to breeding

研究代表者

大木 出 (Ohki, Izuru)

京都大学・工学研究科・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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物の開花ホルモンであるフロリゲンは、2007年に同定されたばかりであり、フロリゲンの生物学はまだまだ黎明期と言える。その分子機能、作用メカニズム、植物改良へ応用の可能性、など多くの重要な分野が、未開拓のままである。本研究においては、フロリゲンの分子機能の解明、及びフロリゲンの植物改良への展開に集中し、次の2つのテーマ、1)フロリゲンと花成リプレッサーによる花成制御の分子構造、分子機構の解明、2)分子構造に基づく人工フロリゲンの開発と大量調整法の確立、植物への導入技術開発、に分けて研究を進め、フロリゲンに関する新しい重要な知見と応用技術を得ることを目的としている。

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 of flowering remains unclear. In this study, we focused on an anti-florigen, which suppresses floral induction antagonizing with florigen, to clarify the role in flowering regulation. From structural and biochemical analysis, anti-florigen was found to form a stable complex with florigen receptor on target promoters and inhibited a formation of florigen-receptor complex. The bindings of florigen and anti-florigen to the receptor were exchangeable, suggesting that the balance of the two proteins is important for determining the timing of floral transition.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶解析 植物 植物ホルモン 花成

1. 研究開始当初の背景

植物において花を咲かせるホルモン、フロリゲンの同定

フロリゲン (花成ホルモン) は、開花を誘導するスイッチとして、75 年前にその存在が提唱されていたが、その実体は 2007 年に我々のグループがイネで (Tamaki et al., Science, 2007)、ドイツのグループがシロイヌナズナで (Corbesier et al. Science 2007) 同時に明らかにした。このふたつの報告は Nature, Science, Cell のニュース記事にも取り上げられ大きな反響を呼んだ。フロリゲンは Hd3a/FT 遺伝子がコードする 22 kD の蛋白質であり、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、花を咲かせる (図 1 左)。

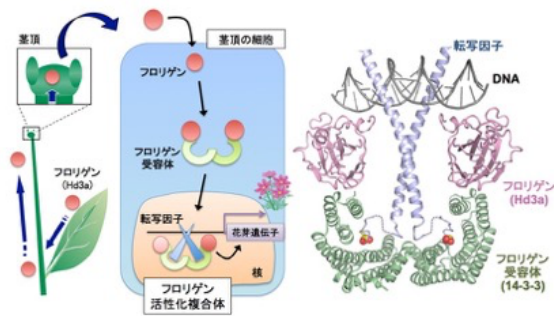


図1. フロリゲンは日長に応じて葉から芽の先端 (茎頂) へ移動し、茎頂細胞で受容体と結合する事で開花を促進する。右はフロリゲン-受容体 (フロリゲン活性化複合体) の立体構造。

フロリゲン受容体の発見による花成の詳細な分子メカニズムの解明

我々はさらに、生化学的なアプローチにより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

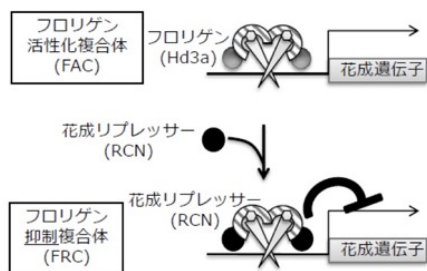


図2. 花成リプレッサー-RCNはフロリゲンと高い相同性を持つが、一部のアミノ酸配列が異なる。フロリゲンと類似のメカニズムにより抑制複合体を形成する。

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も解明した (図 1, Taoka, Ohki, Tsuji et al. Nature 2011)。また、フロリゲンは花成以外にも多様な組織分化能を持ち、ジャガイモにおいてイモの形成を促進していることを報告した (Navarro et al., Nature 2011)。最近、さらに花成リプレッサー-RCN/TFL1 が受容体上でフロリゲンと拮抗して花成時期を調節していることが分かってきた。

フロリゲンの食糧増産にむけた植物改良技術への可能性

フロリゲンのユニークな特徴は、植物体内で長距離移動能を持ち、接ぎ木で植物間を移動して花成を誘導出来る性質を持っていることにある。つまり、任意の植物に対して、おとぎ話の「花咲か爺さんの灰」のように、外部からフロリゲン蛋白質を注入して強制的に花を咲かせることが可能であり、遺伝子組換えによらない植物改良技術への可能性について大きな関心が集まっている。

既に我々はシロイヌナズナにおいて、フロリゲン分子を外部から投与することで花成促進を行わせることに成功しており、その予備的結果に基づき本研究「フロリゲンによる植物改良への展開」を計画した。

2. 研究の目的

フロリゲンは 2007 年に発見されたばかりであり、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、植物改良へ応用の可能性、など多くの重要な分野が、未開拓のままである。本研究では、我々が新たに同定したフロリゲン受容体による花成制御機構、特に受容体とフロリゲン、あるいは受容体と花成リプレッサーが形成する 2 種類の転写制御複合体 (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、花成の促進・抑制機構を明らかにする事を目的とした。

また、得られた花成制御の分子機構、分子構造の情報を基に、植物体への導入と花成制御技術への応用も目指した。

3. 研究の方法

本研究は大きく2つのテーマ、

・フロリゲンと花成リプレッサーによる花成制御の分子構造、分子機構の解明

・分子構造に基づく人工フロリゲンの開発と大量調整法の確立、植物への導入技術開発

に分けて研究を進めた。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

(1) 花成リプレッサーと受容体からなるフロリゲン抑制複合体の分子構造

我々はこれまでの研究で、フロリゲン-受容体-花成転写因子の三者からなるフロリゲン活性化複合体の立体構造を決定し、花成「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、花成を抑制している事が分かってきた。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、花成リプレッサーと受容体の詳細な解析も必要である事が分かってきた。

そこで我々は、花成リプレッサー、受容体、花成転写因子の三者からなる「フロリゲン抑制複合体」のX線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、花成リプレッサー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。花成リプレッサー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 やアニオン結合ポケット) 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

と花成リプレッサーの機能差が生じている可能性を示唆している。

現在、フロリゲンのこの領域に特異的に結合する短いペプチドが得られており、それを基に結合因子の検索を進めている。

(2) フロリゲンと花成リプレッサーによる開花促進・抑制切り替えの分子機構

既に得られているフロリゲン、受容体、花成転写因子からなる「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花成リプレッサー、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 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、花成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、花成リプレッサーも標的プロモーターDNA上で複合体 (花成リプレッサー-受容体-転写因子-プロモーターDNA 四者からなる抑制複合体) 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。フロリゲンと花成リプレッサー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示唆された。

以上の結果より、以下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・抑制切り替えモデルを提唱した (図3)。花成の促進・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、受容体上の花成リプレッサー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、花成が引き起こされると考えられる。

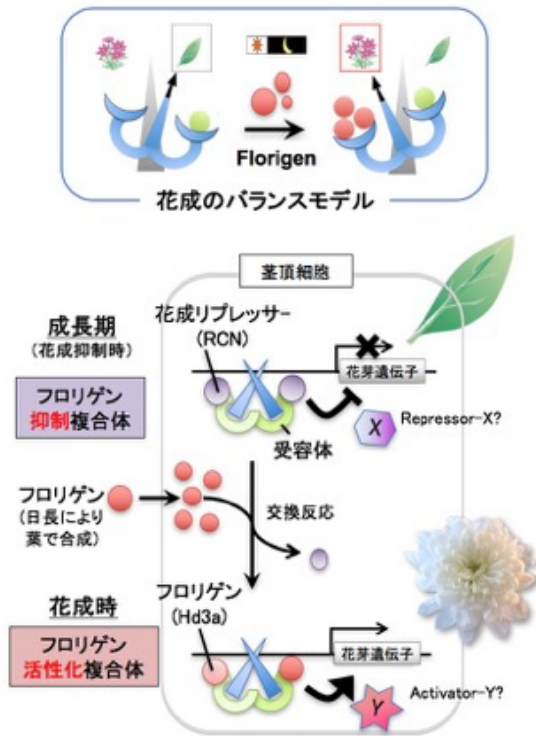


図3. 二つのフロリゲン複合体 (抑制/活性化) による開花制御
受容体上で花成リプレッサーがフロリゲンに置き換わる事で相転換、花成が引き起こされる。花成は抑制・活性化の2つの複合体のバランスにより制御される

(3)分子機能に基づくフロリゲンの改変と大量調整法の確立、植物への導入技術

得られた分子構造に基づき、受容体との結合部位や表面残基に改変を行い、安定性や開花能を増強させたフロリゲン (人工フロリゲン) の設計を行った。フロリゲン自体は、溶液中で弱い会合体を形成するが、フロリゲン結晶内で格子間のパッキングに関与していた荷電性アミノ酸残基の変異体は、分散性・安定性が増加し、開花能が上がる事が判明した。また、受容体と相互作用を行っているアミノ酸残基を改変する事で、開花までの時期を様々に調整出来るフロリゲンを作成出来る事が判明した。

フロリゲン自体の調整については、cDNA の配列最適化を行い、さらに大腸菌での発現精製条件を検討することにより、50-100mg 単位の高純度フロリゲンを一度の調整 (培養精製)

で得ることが可能となった。配列最適化を行っていない野生型フロリゲンの発現量は同培養スケールで 1-5mg であり、10 倍以上の調製効率化となった。これにより 100 株スケールへの直接導入が低コストで可能となった。

現在は、この大量調整法により得た改変フロリゲン及び花成リプレッサータンパク質を用いて (それぞれ単体あるいは両者混合し)、培養細胞やシロイヌナズナ幼植物体に対してエレクトロポレーション法を応用した高効率導入を試みている。

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 3 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. 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

[学会発表] (計 5 件)

1. **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）
2. 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）
3. **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）
4. 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～4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
5. **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

〔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://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・大学院工学研究科
研究員
研究者番号：80418574

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者