

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440144

研究課題名(和文) 葉の形態形成における初期分化スイッチ制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular switch for cell differentiation in leaf primordium

研究代表者

小島 晶子 (KOJIMA, Shoko)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：10340209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物では、茎頂メリステムと呼ばれる分裂組織から葉の原基が生じる際に、細胞が分裂すると、一つの細胞は未分化状態を維持し、もう一方は、器官分化のスイッチが入ると考えられる。本研究では、シロイヌナズナの葉の器官形成に関わる遺伝子が、サイトカイニンの生合成を調節し、葉の分化のスイッチとして機能する可能性について示した。葉の表裏に異常のある変異体のメリステムでは内性のサイトカイニン量が上昇していた。遺伝解析と発現解析より、葉の分化の際にはサイトカイニンが関与する経路、それ以外の複数の経路が存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Leaf primordia are derived from the undifferentiated cell groups in shoot apex known as shoot apical meristem (SAM). The peripheral cells in SAM divide asymmetrically to self-renew and generate differentiated cells with leaf identity. The mechanism of this switching to cell differentiation remains unclear. We performed genetic analysis using Arabidopsis *as2 eal* and *as2 elo3* mutants with defects in leaf differentiation. We found the levels of transcripts of ISOPENTENYLTRANSFERASE3 (IPT3) gene encoding a key enzyme in cytokinin biosynthesis are increased in these mutants as compared to those in wild type. Cytokinin, one of important plant hormones for organ initiations. The endogenous cytokinins in shoot apices were increased in these mutants. The *ipt3* mutation suppressed leaf defective phenotypes in *as2 eal* mutants but did not in *as2 elo3* mutants. These results indicate that cytokinin-dependent and -independent pathways are involved in switching for cell differentiation.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：植物 発生・分化 シロイヌナズナ マイクロアレイ サイトカイニン 茎頂メリステム AS1・AS2 IPT3

1. 研究開始当初の背景

植物の茎頂メリステムからは、葉や花などの器官原基が作られる。この際、幹細胞では細胞分裂後に、一方の細胞は未分化状態を維持し、もう一方の細胞は分化のためのスイッチが入ると考えられる。しかし、このスイッチがどのような分子機構によるものかは未解決である。申請者は、これまでにシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉の形態形成に関わる遺伝子である *ASYMETRIC ELAVES1 (AS1)*、*AS2* と異なる経路で働く複数のモディファイアー遺伝子の解析を行ってきた。その中には、ヒストンアセチル化酵素遺伝子 *ELONGATA3 (ELO3)* や核小体局在タンパク質の *RNA HELICASE10 (RH10)* 遺伝子などの因子が含まれていた。その後、マイクロアレイデータを用いたメタ解析により、*AS1-AS2-ETT* の下流で、サイトカニン生合成の鍵となる酵素の遺伝子 *ISOPENTENYLTRANSFERASE3 (IPT3)* と細胞周期進行制御にかかわる因子が働いている予想された。サイトカニンはオーキシシンと共に植物の器官形成に重要な役割を果たす植物ホルモンであることから、これらの因子は、分化のスイッチとして働く可能性が考えられた。

2. 研究の目的

初期の葉原基に関わる分化スイッチの分子メカニズムを明らかにするため、シロイヌナズナの葉の表側の細胞分化に異常のある *as2* とそのモディファイアー因子 *elo3*、*rh10* などとの二重変異体を用いて、分子遺伝学的な解析を行った。(1) 茎頂部分での内性のサイトカニン量を測定し、分化制御との関連について検討する。(2) 細胞周期の進行を制御すると予想される因子との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サイトカニンは、植物の器官形成にかかわる植物ホルモンであることから、野生型と葉の表側細胞分化が不全となる変異体の茎頂メリステム部分を採取し、理研 CSRS 榊原博士との共同研究によりサイトカニン量を、測定した。(2) サイトカニン合成酵素遺伝子の変異が、*as2 elo3*、*as2 rh10* の二重変異体の葉の表と裏の細胞分化の異常を抑圧するかを、遺伝学により解析した。(3) 葉の分化のスイッチに関わる新たな因子を同定するため、マイクロアレイデータのメタ解析から候補の因子を解析し、発現解析と遺伝解析を行った。

4. 研究成果

(1) サイトカニン合成酵素遺伝子 *IPT3* の転写蓄積量の上昇と、サイトカニンレベルの測定と *ett* 変異によるこれらの表現型の部分的な抑圧との関係について

葉の表裏の確立ができず、葉身のない棒状

の葉を形成する *as2 elo3* 変異体と、*ett* 変異をさらに導入して、葉の表現型が一部回復した *as2 elo3 ett* 変異体に関して、茎頂部の活性型サイトカニンおよびその前駆体を測定した。この結果、*as2 elo3* 二重変異体ではイソペンテニルアデニン型の活性型サイトカニンと前駆体の量が野生型に比べて上昇しており、*as2 elo3 ett* 変異体では、その上昇が抑えられていた。従って、*IPT3* の発現上昇により、サイトカニン量が上昇することが明らかになった。また、これらの表現型は *ett* 変異により部分的に抑圧された。

TCSn:GFP レポーター遺伝子により、茎頂部のサイトカニン応答を観察したところ、*as2 elo3* では、野生型の個体や単独の変異体よりも、やや強い GFP シグナルが観察されたことから、サイトカニン応答のレベルも上昇していると考えられた。

(2) *AS1*・*AS2-ETT* の下流因子の葉の分化における役割の解明

左右非対称な葉器官の形成への影響

サイトカニン合成酵素遺伝子 *IPT3* には、地上部で発現する *IPT5*、*IPT7* などの相同な遺伝子が存在する。解析の結果、左右相称な葉を形成するには、これらの *IPT* 遺伝子の発現が適切なレベルに抑えられる必要があることが、遺伝学的に示された。

葉の表と裏の細胞分化への影響

as2 elo3 または *as2 rh10* 二重変異体 で発現が上昇している *IPT3* の影響を調べるため、遺伝解析を行った。*as2 elo3 ipt3* と *as2 rh10 ipt3* 三重変異体では、表現型は抑圧されなかった。一方、*as2 eal* 二重変異体の表現型は *ipt3* または *knp5* 変異により、部分的に抑圧される事が明らかとなった。したがって、*EAL* は主に *IPT3* または *KRP5* が関与する経路を介して葉の分化に関わるが、*ELO3* では、主に *IPT3* と *KRP5* 以外の経路を介していると考えられた。研究を開始した際には、葉の表と裏の細胞分化の決定には、複数の変異体で共通に関与する経路を同定する予定であったが、予想とは異なる結果となった。

(3) マイクロアレイ解析による候補遺伝子の解析

as2 elo3、*as2 rh10*、*as2 eal* 二重変異体でいずれも *ALOG* ファミリーに属し、器官境界領域で発現する *LSH3*、*LSH4* の転写蓄積量が上昇していたことから、*as2* に *lsh4-1* 変異と *LSH3 RNAi* を導入し、これらの遺伝子の働きを抑えたが、表現型は変化せず、*as2 elo3* の葉の表裏の分化の不全にも影響を与えなかった。また、*ELO3* の標的となると予想される複数の遺伝子について、発現解析を行ったが、二重変異体で著しく発現量が低下しているものは、見つかっていない。

新しい経路に関わる因子を得るため、*as2 elo3* と *as2 rh10* で2つの変異体で発現が上昇していた *AtNAC* 遺伝子の変異を導入した。この変異は、葉の表裏の異常を抑圧したことから、*ELO3* と *RH10* が関わる経路では、*AtNAC* が関わる経路の抑制が必要であると考えられる。最近申請者らのグループで、*RH10* は、核小体に局在し、リボソーム RNA のプロセシングに関わる Small subunit processome (SSUP) 複合体に含まれることを明らかにし、この複合体と相互する因子を複数、AS2 のモディファイアーとして同定した (Matsumura *et al.*, in press)。AS2 は核小体周縁部に局在することから、分化のスイッチにはクロマチンの構造変化に関わる可能性がある。今後は、複数の経路を区別して解析することで、新しい制御機構を明らかにしたいと考えている。

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 6 件)

Matsumura Y., Ohbayashi I., Takahashi H., Kojima S., Ishibashi N., Keta S., Nakagawa A., Hayashi R., Saez-Vasquez J., Echeverria M., Sugiyama M., Nakamura K., Machida C., and Machida Y. A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*. *Biology Open* (in press) 査読有
Machida C., Nakagawa A., Kojima S., Takahashi H., Machida Y. The complex of ASYMMETRIC LEAVES (AS) proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in *Arabidopsis*. (2015) *WIREs Developmental Biology* 4, 655-671.

DOI 10.1002/wdev.196 査読有
岩崎まゆみ・高橋広夫・深澤弘・町田泰則・小島晶子・町田千代子: シロイヌナズナの葉の裏と表の発生分化の仕組みを探る - 葉の左右相称性と表側の細胞分化の鍵因子 AS1-AS2 の標的遺伝子 *ETTIN* (*ARF3*) の同定と制御機構 - 中部大学生物機能開発研究所紀要、査読なし、14:35-43 (2014)

高橋広夫・岩川秀和・尾之内均・小島晶子・町田千代子、どう活かす他人のデータバイオインフォマティクス活用法、**生物工学会誌** 続・生物工学基礎講座 バイオよもやま話、査読なし、91:521-525 (2013) http://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9109/9109_yomoyama.pdf
Iwasaki M., Takahashi H., Iwakawa H., Nakagawa A., Ishikawa T., Tanaka H.,

Matsumura Y., Pekker I., Eshed Y., Vial-Pradel S., Ito T., Watanabe Y., Ueno Y., Fukazawa H., Kojima S., Machida Y. and Machida C.: Dual regulation of *ETTIN* (*ARF3*) gene expression by AS1-AS2, which maintains the DNA methylation level, is involved in stabilization of leaf adaxial-abaxial partitioning in *Arabidopsis*. *Development*. **140**(9): 1958-1969. (2013) doi: 10.1242/dev.085365 査読有

中川彩美・大賀一臣・車炳允・禹濟泰・小島晶子・町田千代子. シロイヌナズナの葉の裏と表の発生分化の仕組みを探る - 葉の表側の分化を阻害するベルベリンの作用機作 - 中部大学生物機能開発研究所紀要、査読なし、13:41-50 (2013)

[学会発表](計 26 件)

小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・中川彩美・榊原 均・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸性確立における AS1・AS2-ETT 経路を介したサイトカイニン生合成制御の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

中川彩美・ヴィアルーブラデル シモン・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸形成におけるエピジェネティックレギュレーター AS1-AS2 と TOP1α の役割の解明、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

香田佳那・石橋奈々子・小嶋美紀子・中川彩美・高橋広夫・榊原 均・町田泰則・町田千代子・小島晶子: シロイヌナズナの AS1・AS2-ETT 経路を介した葉の発生・分化における *AtIPT3* とその相同遺伝子の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

玉井元樹・中川彩美・小島晶子・町田泰則・町田千代子: ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナの葉の向背軸分化と細胞分裂における AS1-AS2 の役割の解析、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

川崎和明・中川彩美・渥美有香・車炳允・禹濟泰・永井和夫・小島晶子・三輪錠司・町田千代子: シロイヌナズナの成長の促進または阻害に関わる新規低分子化合物の探索、第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市)

Machida C., Vial-Pradel S.,

Nakagawa A., Ito T., Iwasaki M., Machida Y. and Kojima S.: Epigenetic regulator AS1-AS2 and modifiers control the level of DNA methylation of the *ETTIN* locus in establishment of leaf adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis thaliana* 第 57 回日本植物生理学会年会、2016 年 3 月 18-20 日、岩手大学 (岩手県盛岡市) 中川彩美・高橋広夫・伊藤卓馬・玉井元樹・小島晶子・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸形成に関わる転写因子 AS1-AS2 による CDK inhibitor 遺伝子の発現抑制機能の解明、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市) 小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・榊原 均・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸性確立における *AtIPT3* の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 高橋広夫・小島晶子・中川彩美・町田泰則・町田千代子: 植物オミックス解析におけるデータクレンジングとデータマイニング - 葉の発生分化機構解明への応用 -, 日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 中川彩美・高橋広夫・伊藤卓馬・小島晶子・町田泰則・町田千代子: ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナの葉の向背軸性の確立における AS1-AS2 と共に働く因子の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 町田千代子・中川彩美・高橋広夫・玉井元樹・小島晶子・町田泰則: シロイヌナズナの葉の軸形成における AS1-AS2-ETT 経路の役割、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) 香田佳那・石橋奈々子・小嶋美紀子・中川彩美・高橋広夫・榊原 均・町田泰則・町田千代子・小島晶子: シロイヌナズナの AS1・AS2-ETT 経路を介した葉の発生・分化における *IPT3* とその相同遺伝子の解析、日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 6-8 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市) Nakagawa A., Takahashi H., Kojima S., Machida Y. and Machida C.: Chemical genetic analyses infer that AS1-AS2 protects developing leaves from camptothecin influence by

repressing ARF3 and KRP5. 2015 FASEB Science Research Conferences (SRC), Mechanisms in Plant Development, August 2-7, 2015, Saxtons River, Vermont (USA) 香田佳那・石橋奈々子・小嶋美紀子・中川彩美・高橋広夫・榊原 均・町田泰則・町田千代子・小島晶子: シロイヌナズナの葉の向背軸極性分化における ETT 下流因子 *IPT3* 遺伝子の役割の解明、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16-18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区) 玉井元樹・中川彩美・伊藤卓馬・大賀一臣・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子: ケミカルバイオロジーによるシロイヌナズナの葉の向背軸形成に関わる因子の探索、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16-18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区) 小島晶子・石橋奈々子・香田佳那・小嶋美紀子・高橋広夫・榊原 均・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸性の確立における AS1-AS2-ETT 経路を介したサイトカイニン合成遺伝子の制御 第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16-18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区) 町田泰則・松村葉子・石橋奈々子・氣多澄江・小島晶子・町田千代子: シロイヌナズナの葉の表・裏分化における AS2-AS1 複合体と核小体の役割、2014 年 11 月 25-27 日、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 小島晶子・石橋奈々子・小嶋美紀子・高橋広夫・香田佳那・榊原均・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生において AS1・AS2 はサイトカイニン合成を制御する 日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12-14 日、明治大学 生田キャンパス (神奈川県川崎市) Takahashi H., Nakagawa A., Ishibashi N., Kojima S., Machida Y., Machida C.: Knowledge-based bioinformatic analyses of microarrays predict that epigenetic regulator AS1- AS2 controls cell division through ETTIN in leaf adaxial-abaxial patterning The 25th International Conference on Arabidopsis Research, ICAR2014 July 28 – August 1, 2014, Vancouver (Canada) Kojima S., Takahashi H., Ishibashi N., Handayani A., Matsumura Y., Machida Y., Machida C.: ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 regulate the expression of *AtIPT3* through *AUXIN RESPONSE FACTOR3/ETTIN* function during leaf development in *Arabidopsis thaliana*. June 29-July 4, 2014 International Symposium on

- Auxins and Cytokinins in Plant Development, Prague (Czech Republic).
- 21 Ishibashi N., Kojima S., Kojima M., Sakakibara H., Takahashi H., Machida C. Machida Y: AS2 and BOB1 synergistically regulate cytokinin levels and the establishment of leaf adaxial-abaxial polarity through the ETT/ARF3-IPT3 pathway in *Arabidopsis thaliana*. June 29-July 4, 2014 International Symposium on Auxins and Cytokinins in Plant Development, Prague (Czech Republic).
- 22 Kojima S., Takahashi H., Ishibashi N., Handayani A., Matsumura Y., Prananingrum P., Machida Y. and Machida C.: Identification of downstream targets of ASYMMETRIC LEAVES2 and its modifiers during leaf development in *Arabidopsis thaliana*. FASEB Science Research Conferences (SRC) for 2013, Mechanisms in Plant Development, August 11-16, 2013, Saxtons River, Vermont (USA)
- 23 小島晶子・石橋奈々子・小嶋美紀子・高橋広夫・香田佳那・榊原 均・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の発生初期におけるAS1・AS2-ETT 経路によるサイトカニン合成の制御、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)
- 24 町田泰則・松村葉子・大林 祝・杉山崇高・石橋奈々子・サエスーヴァスケス ジュリオ・小島晶子・町田千代子: シロイヌナズナのAS1:AS2-ARF3 経路はリボソームRNA 前駆体のプロセッシング阻害による葉の向背軸性の崩壊を防ぐ、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18-20日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)
- 25 伊藤卓馬・中川彩美・高橋真理・石橋奈々子・高橋広夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の向背軸形成におけるAS1-AS2 によるKRP5 遺伝子発現の抑制機能の解明、2014年3月18-20日、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)
- 26 小島晶子・高橋広夫・石橋奈々子・松村葉子・Prananingrum Pratiwi・町田泰則・町田千代子: シロイヌナズナの葉の形態形成に関わるASYMMETRIC LEAVES2 下流因子の探索、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

{図書}(計 0 件)

{その他}

ホームページ等

http://www3.chubu.ac.jp/faculty/kojima_shoko/

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 晶子 (KOJIMA, Shoko)
中部大学・応用生物学部・講師
研究者番号：10340209

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高橋 広夫 (TAKAHASHI, Hiro)
千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授
研究者番号：30454367

町田 千代子 (MACHIDA, Chiyoko)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：70314060