

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号： 63904

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2007～2012

課題番号： 19060004

研究課題名（和文） 葉の発生における領域決定機構

研究課題名（英文） Molecular Mechanisms of determination of gene-expression domain in leaf development

研究代表者

岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)

基礎生物学研究所・所長

研究者番号： 50101093

研究成果の概要（和文）： 葉の発生過程において、表と裏の領域が決定される分子機構を解析し茎頂分裂組織で合成されるコハク酸セミアルデヒド (SSA) が葉の向背軸形成に関わる可能性を示した。葉の表側の細胞が葉の発生初期に裏側細胞の性質を持ち、途中で表側の性質を獲得することを見だし、この転換に関わる数理モデルを提案した。また、葉が平らに成長するために必要な制御遺伝子を同定し、表/中間/裏側の 3 領域の形成が必要であるとする新しいモデルを提案した。

研究成果の概要（英文）： We examined genetic molecular approaches to investigate mechanisms determining the adaxial and the abaxial sides of leaves, and proposed a hypothesis which succinate semialdehyde has a role in the mechanism. Second, found that the boundary separating cells expressing either the adaxial or the abaxial side-specific genes moved as the leaf grew. We proposed a mathematical model explaining the boundary shift. Third, we examined key genes necessary for lateral growth of leaves, and found that the genes are expressed newly-identified middle domain of the developing leaves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	13,500,000	0	13,500,000
2008 年度	13,500,000	0	13,500,000
2009 年度	13,500,000	0	13,500,000
2010 年度	13,500,000	0	13,500,000
2011 年度	13,500,000	0	13,500,000
2012 年度	13,500,000	0	13,500,000
総計	81,000,000	0	81,000,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学・植物生理・分子

キーワード： 植物発生、側生器官、葉の表裏、向背軸決定、マイクロ RNA、茎頂分裂組織、シロイヌナズナ

## 1. 研究開始当初の背景

葉や花器官などの側生器官は、植物の栄養成長と生殖を支える主要な器官として、茎頂分裂組織の周辺領域の中の空間的に定まった位置に形成され、先端-基部、中央-周縁、表-裏の三つの軸に沿って成長する。モデル植物としてのシロイヌナズナを用いた分子遺伝学解析によって、側生器官の形成を支配する遺伝子、特に転写制御因子をコードする遺伝子の解析が進んでいたが、側生器官の形成位置を決定し、軸に沿った細胞分裂と分化を促すシグナルについてはほとんど知られていなかった。そこで、遺伝学・生化学・細胞生物学に加えて、ゲノム解析とモデル化などの手法を用いてこれらの基本的な問題に挑戦した。

## 2. 研究の目的

軸に依存した葉原基の領域決定と成長パターンの制御に関わる分子の実体を明らかにするとともに、茎頂分裂組織において葉原基の形成される位置とタイミングを規定する分子機構の解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

葉および花器官の原基の形成と領域化に異常を示すシロイヌナズナの突然変異体からクローニングした変異遺伝子の機能と発現パターンを、分子遺伝学およびイメージングとモデリングの手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 葉の向軸側（表側）と背軸側（裏側）の領域を区別する機構を調べるために、初期段階から葉原基の裏側領域特異的に発現する *FIL* 遺伝子をマーカーとして、発現パターンが変化する突然変異体を網羅的に探索し、その中から二種類の突然変異体を選んで原因遺伝子を解析した。その一つである *enlarged fil expression domain1 (enf1)* 突然変異体は、*FIL* 遺伝子の発現領域が拡大する葉や逆に減少する葉が生じる。野生型と同様に *FIL* 遺伝子と表側特異的に発現する *PHB* 遺伝子の発現領域は明確に分かれていて重複やギャップがみられないことから、この突然変異体では表側と裏側の境界位置を中央に定める機構に異常が生じたと考えられた。*ENF1* 遺伝子は *Succinic semialdehyde (SSA)* を

*Succinic acid* に変換する酵素をコードしており、若い葉原基の表側領域で発現している。一方、*SSA* の合成酵素遺伝子 *GABAT* は茎頂分裂組織の中央領域の表皮細胞で発現している。さらに、発芽後 2-3 日のシロイヌナズナ芽生えの片方の子葉を切除し、その傷口に *SSA* を lanolin に混ぜて塗布すると、塗布位置に近接する第 3 または第 4 葉が裏表の領域形成に異常を示すことがわかった。これらの結果は、*SSA* またはその代謝産物が葉の裏表軸の形成に関わることを示唆する。さらに *enf1* の抑圧変異体の単離解析を行い、抑圧変異体の一つ *gsa2* 変異体がテトラピロール合成経路のグルタミン酸 1 セミアルデヒドアミノ基転移酵素に変異を持つことを示した。テトラピロール合成経路の別の酵素グルタミル tRNA 還元酵素をコードする遺伝子の変異体 *hema1* も *enf1* 変異体の表現型を抑圧した。*GSA2* は葉原基や若い葉のミトコンドリアで発現するが、*enf1* 突然変異体では発現が抑制されるなど、*SSA* の生合成に関わる *GABA* 経路とテトラピロール合成経路の相互作用が示唆された。

(2) 葉の細胞系譜を追った解析から、表側の細胞群も発生初期に裏側領域マーカーである *FIL* を発現するが、葉の発生にともなって *FIL* の発現は次第に背軸側領域のみに限定されてゆくことがわかった。*FIL* の発現が低下した細胞では相補的に *HD-ZIPIII (PHB, REV, PHV)* などの発現が見られることから、表側の細胞では表から裏側への領域転換（極性転換）が起きていると考えられる。*phb-1d* 変異体では裏側領域への進行の速度が速くなる。また、*phb rev* 二重欠損変異体ではこの転換がほとんど進行しないが、*phv rev* 二重欠損変異体では転換が遅れることから、向軸側で発現する *HD-ZipIII* 遺伝子群の発現量が、領域転換に重要な要因となっている可能性が示唆された。一方、葉緑体タンパク質の変異体 *enf2* ではこれが遅延すること、qRT-PCR による葉緑体遺伝子の発現量の網羅的解析から *enf2* 変異体では大部分の葉緑体遺伝子の発現量が低下していること、また、*enf2 gun1* 二重変異体ではこの転換が比較的正常に進行することから、*GUN1* 依存的な retrograde signal がこの過程を制御していることがわかった。さらに、この領域転換を説明する数理モデルとして、*PHB* を含む向軸側で発現する遺伝子群と、*FIL* と *miR165/166* を含む背軸側で発現する遺伝子群が相互抑制することが、発現領域のダイナ

ミクスが生じているという、改訂モデルを提唱した。

(3) 葉の成長と周縁部の分化に冗長的に機能する2つの *WOX* ファミリー遺伝子、*PRS/WOX3* 遺伝子と *WOX1* 遺伝子が、葉の若い原基の周縁部および向軸領域と背軸領域の中間の2層の細胞層で発現していることを明らかにした。*WOX1* 遺伝子を、*FIL* プロモーターを用いて葉の背軸側全体で発現させた形質転換体(*FIL<sub>p</sub>::WOX1*)では、葉の背軸側に異常な突起や周縁細胞が形成された。この結果は、*WOX1* が葉の成長と周縁細胞の形成に十分であること、*WOX1* の発現が限定されていることが成長方向と周縁細胞の形成部位の限定に重要である可能性を示している。さらに、*PRS/WOX3* 遺伝子は従来考えられていた表側領域と裏側領域の間の一部の細胞群(中間領域)で発現することを見出し、葉の発生における3領域モデルを提唱した。さらに、一過的過剰発現誘導系(*35S::WOX1:GR*)とシクロヘキシミド投与を組み合わせた定量的発現解析により、*WOX1* 遺伝子が、向背制御遺伝子群のうち *AS2*, *YAB5*, *ARF4* の発現を直接的に抑制し、*PHB* と *ETT* の発現を間接的に促進することによって3領域が形成・維持されることを示した。

(4) 表側領域の分化制御に関わる *HD-ZIPIII* 遺伝子の発現を抑制する *miRNA165/166* の発現制御機構の解析を進めた。*miR165* が機能する領域の決定には、一次転写産物 *pri-miR165a* の構造が必要であることから、*MIR165A* の3'側の非転写領域の機能領域決定機構への関与を検討した。非転写領域を含まない *MIR165A* ゲノムフラグメントを使って *miR165* を発現させると、機能する領域は裏側領域に限定されなくなることから、*MIR165A* の3'側非転写領域が転写のターミネーターとして機能することで正常な *pri-miR165a* が転写され、それにより *miR165* の機能領域が決定されると思われる。(奈良先端大中島准教授との共同研究)

(5) 奈良先端大の橋本隆教授との共同研究として、方向依存的な細胞伸長に関わる新規遺伝子 *ITOSUGI* (*ITG*) の機能解析を行った。方向依存的な細胞伸長の制御に表層微小管が深く関わっていることが知られているが、微小管の配向と動態がどのように制御されているか等、不明な点が多い。これまでの解析から、*ITG* は方向依存的な細胞伸長の制御に必要であることを明らかにしている。*ITG*

はアルマジロリピートと C2 ドメインからなるタンパク質をコードしており、タンパク質間相互作用を介して方向依存的な細胞伸長に関わると考えられる。*ITG* タンパク質が細胞表層においてドット状の局在パターンを示すこと、*ITG* の細胞表層への局在性には正常な表層微小管が必要なこと、*ITG* が表層微小管と共局在すること、*ITG* を含むドット状の構造体は細胞表層で直線状の移動性を示すことを明らかにした。この結果は方向依存的な細胞伸長制御には、*ITG* が表層微小管と共局在し、機能することが必要であることを示す。

#### 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 12 件) すべて査読あり。

① Nakata, M. & Okada, K.: The leaf adaxial-abaxial boundary and lamina growth. *Plants* (in press, 2013)

② Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M., Okada, K.: Pattern Dynamics in Adaxial-Abaxial Specific Gene Expression is Modulated by Plastid Retrograde Signal during Arabidopsis leaf development. *Plos Genetics* (in press 2013)

③ Takeda, S., Iwasaki, A., Matsumoto, N., Uemura, T., Tatematsu, K., Okada, K.: Physical interaction of floral organs controls petal morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 161, 1242-1250 (2013)

④ Nakata, M., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Rikirsch, E., Laux, T., Okada, K.: Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX* genes in early development of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 519-535 (2012).

⑤ Toyokura, K., Watanabe, K., Oiwa, A., Kusano, M., Tameshige, T., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Saito, K., Okada, K.: Succinic Semialdehyde Dehydrogenase is Involved in the Robust Patterning of Arabidopsis Leaves along the Adaxial-Abaxial Axis. *Plant & Cell Physiology* 52, 1340-1353 (2011).

⑥ Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., Okada, K.: Jasmonic acid control of GLABA3 links inducible defense and trichome patterning in Arabidopsis. Development 136, 1039-1048 (2009).

⑦ Tsugeki, R., Ditengou, F. A., Sumi, Y., Palme, K., Okada, K.: The Novel Nuclear Factor NO VEIN Mediates Auxin-Dependent Specification and Patterning in the Embryo, Shoot and Root. Plant Cell 21, 3133-3151 (2009)

⑧ Sakai, T., van der Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M., Smirnov, N., Okada, K. and Wasteneys, G.: Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal cell morphogenesis in Arabidopsis. Plant J. 53: 157-171 (2008).

[学会発表] (計 38 件)

① Tatematsu, K., Watanabe, K., Toyokura, K., Tameshige, T., and Okada, K.: The abaxial-side specific expression of *MIR165/166* clearly marks off the PHB-expression domain from the FIL-expression domain in Arabidopsis leaf primordia. The 20<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research. June 30-July 4, Edinburgh, Scotland. (2009).

② Okada, K.: Region-specific expression of regulatory genes in the lateral organ formation. SigNet International Symposium 2008. Korea University, Feb. 20-21,(2008).

③ Okada, K.: Axis-dependent gene expression in the lateral organ formation. The 18<sup>th</sup> International Conference on Arabidopsis Research, Beijing, China, June 20-23, (2007).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田清孝 (ODA KIIYOTAKA)

基礎生物学研究所・所長

研究者番号 : 50101093

### (2) 研究分担者

立松 圭 (TATEMATSU KIIYOSHI)

基礎生物学研究所・植物器官形成学研究室・助教

研究者番号 : 00373324

(H20→H24)

### (3) 連携研究者

和田 拓治 (WADA TAKUJI)

宮崎大学・農学部・IR 推進機構・研究員

研究者番号 : 50360673

富永 るみ (TOMINAGA RUMI)

宮崎大学・農学部・IR 推進機構・助教

研究者番号 : 20373334

槻木竜二 (TSUGEKI RYUJI)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号 : 50303805