

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 5 月 31 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570053

研究課題名（和文）葉の形態形成にかかわるヒストンアセチル化酵素遺伝子の解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of histone acetyltransferase gene involved in leaf development.

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

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナの *ELONGATA3* (*ELO3*) 遺伝子は、葉の形態形成に関わる因子の一つでヒストンアセチル化酵素をコードする。本研究では *AS2* と *ELO3* の遺伝解析を行い、*as2 elo3* 二重変異体の葉の表側分化異常は、葉の裏側化因子 *ETTIN* (*ETT*) と *ARF4* の発現上昇が原因であることを示した。さらに *as2 elo3* と *as2 eal* 変異体を用いたマイクロアレイ解析の結果、*AS2*、*ELO3* の下流でサイトカイニン合成遺伝子や細胞分裂制御因子が機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The *ELONGATA3* (*ELO3*) gene in *Arabidopsis thaliana* that encodes histone acetyltransferase is involved in leaf development. To clarify the mechanism by which *ELO3* affects the establishment of leaf polarity, we performed genetic analysis. We found abaxial identity genes, *ETTIN* (*ETT*) and *ARF4*, were responsible for defects in leaf adaxial-abaxial polarity in *as2 elo3* mutant plants. We analyzed expression microarray data with *as2 elo3* and *as2 eal* to search for genes downstream of *ELO3* and *AS2*. We found cytokinin biosynthesis genes and cell cycle related genes might function downstream of *ETT*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物・植物分子・生理科学

キーワード：発生・分化・ヒストンアセチル化・クロマチン・マイクロアレイ解析・遺伝子

1. 研究開始当初の背景

葉は植物地上部の主要な器官であり、その発生の分子機構を解明することは、基礎研究、応用研究をする上で重要である。双子葉植物では葉原基が形成され、初期に向背軸（表裏）が決定した後に側方への伸長が始まり、細胞増殖と

細胞伸長により扁平な形状の葉身を形成する。これまで国内外の研究で、葉の表側と裏側の細胞分化には複数の遺伝子ファミリーや低分子 RNA が関わるということが明らかにされてきた。しかし、それらの特異的な発現を制御する分子機構

は不明な点が多かった。シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) 遺伝子は表側特異的に発現し、葉の形成の様々な経路に関与すると考えられる。我々は *as2* の葉の裏側化を亢進する変異体の一つとして、*ELONGATA3* (*ELO3*) 遺伝子を同定した。*as2 elo3* 変異体では、葉の表側細胞分化の不全により、裏側化した棒状の葉を生じる。これまでの解析から *ELO3* は葉の表側、裏側の細胞分化決定に *AS2* とは別の経路で働くことが明らかになったが、その作用機作は全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では葉の形態形成の分子メカニズムの詳細を、ヒストンアセチル基転移活性ドメインを持つタンパク質をコードする *ELO3* の解析により明らかにすることを目的とした。特に *ELO3* がヒストンアセチル化酵素複合体 *Elongator* として葉の形態形成にかかわるか否か、*ELO3* がどのような系路を介して葉の形態形成に関わるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの変異体を用いた遺伝解析と real-time PCR による発現解析

ELO3 が葉の形態にどのように関わるか、他の *Elongator* 複合体関連因子の変異体、葉の表側裏側の細胞分化の変異体と遺伝解析を行い、*ELO3* が作用する系路を考察した。

(2) *ETT* が *AS2/AS1* の直接の標的であるか否かをクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) により解析した。また *ETT* の DNA メチル化レベルをバイサルファイトシーケンス法により解析した。

(3) マイクロアレイデータ解析

葉の形態形成に関与する複数の変異体のマイクロアレイデータを、我々が開発したプログラムである知識ベース FuzzyART 法を用いて解析し、発現パターンによりクラスターに分類した。

4. 研究成果

(1) *ELO3* および *AS2* の作用する系路の解析

① *ELO3* は *Elongator* 複合体として葉の形態形成に関わる

as2-1 elo3-27 二重変異体は、葉の表側細胞分化が欠損した結果、裏側化した棒状の葉を生じる。遺伝解析の結果、*Elongator* 複合体の他の因子の変異体と *as2-1* の二重変異体においても、効果は弱いながらも、葉の表側の細胞分化異常が確認された。従って *ELO3* は葉の形態形成に *Elongator* 複合体として、*AS2* とは異なる系路を介して葉の分化に関与すると考えられた。

② *ETT* は *AS2* の直接の標的である

我々のグループは *ETT* が *AS2/AS1* の直接の標

的であることを、*AS1* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降により示した。*ETT* ゲノム領域の ChIP 解析を行なった結果、*as2-1*, *as1-1* 変異体では、ヒストン修飾については顕著な変化は認められなかったが、*as2* 変異体において DNA のメチル化レベルが低下している事が明らかとなった。従って、*AS2* による *ETT* の抑制系路にはエピジェネティックな制御が関わると考えられた。

③ 葉の表側裏側分化には *ETT* が重要な役割を果たす

これまでの解析で共同研究者の石橋らが別の亢進変異体 *as2-1 eal-1* の表現型が *ett-13* 変異により抑圧されることを示していた。また *as2-1* 変異体と *as2-1 elo3-27* 二重変異体で *ETT* mRNA の蓄積量が上昇していたことから、*ETT* は *AS2*, *EAL*, *ELO3* の共通の下流である可能性があった。そこで *as2-1 elo3-27* 変異体に *ett-13 arf4-1* 変異を重ねあわせた 4 重変異体を作製した結果、棒状の葉の表現型が抑制された (図 1)。以上の結果から、棒状の葉の形成には、*ETT* の mRNA 蓄積量の上昇が大きな影響を与えていることが明らかとなった。

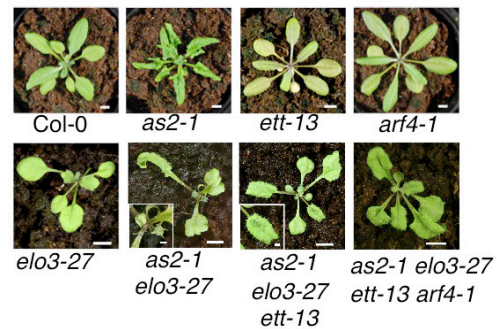


図1 播種後 28 日目のシロイヌナズナ野生型 (Col-0) と変異体の個体を示した。*as2-1 elo3-27* 二重変異体は、棒状の葉をもつ個体を形成するが、*ett-13 arf4-1* 変異は、*as2-1 elo3-27* の棒状の葉の表現型を抑圧する。スケールバー: 5 mm. (Takahashi et al. 2013 の図を改変)

(2) マイクロアレイデータ解析による *AS2* と *ELO3* の下流候補因子の同定

as2-1 elo3-27 変異体と、*as2-1 eal-1* 変異体棒状の葉をもつ系統 2 種のマイクロアレイ発現解析を行った。得られたデータを知識ベース FuzzyART 法により解析し、共通の因子を検索して *AS2*, *ELO3*, *EAL* 共通の下流因子の候補を絞った。候補遺伝子をさらに *as1-1*, *as2-1*,

AS2 過剰発現個体のアレイデータと重ね合わせてメタ解析を行った。共通で発現が上昇する遺伝子群の中から、葉の発生分化に直接かかわるものとして、植物ホルモンの生合成や細胞分裂関連遺伝子に着目し、Kip-related protein2 (KRP2), KRP5 遺伝子、サイトカイニン合成酵素 Isopentenyl transferase 3 (IPT3) を見出した。

KRP2, KRP 5 は細胞周期に関わる CDKA;1 の活性を阻害するタンパク質である。また IPT3 はシロイヌナズナの地上部で主に働く IPT 遺伝子である。real-time PCR により、KRP2, KRP5, IPT3 の mRNA 蓄積量は、実際に *as2-1 eal-1*, *as2-1 elo3-27* 二重変異体で上昇していることが確認された。さらに *as2-1 eal-1 ett-13 arf4-1* では、棒状の葉の表現型抑圧に伴い、*KRP2*, *KRP5*, *IPT3* の発現が低く抑えられていた。従って、*KRP2* または *KRP5* が *ETT* の下流に位置づけられる可能性がある。

以上の結果から、*AS2*, *ELO3* は *ETT* を抑制し、*KRP2* または *KRP5* による細胞分裂抑制を解除し、サイトカイニン合成を適度に抑えることで、茎頂メリステムから葉の表側の細胞分化を促すという制御モデルを提案した(図2)。今後は、これらの因子により実際に細胞分裂や、サイトカイニン合成に変化が生じ、葉の発生につながるかを解明することが重要である。

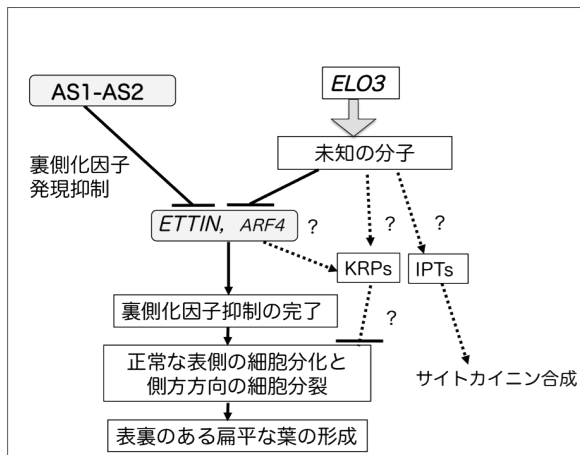


図2 AS1-AS2, ELO3によるシロイヌナズナの葉の表側細胞分化における分化関連遺伝子制御機構モデル

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9件)

- ① 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). 査読有

DOI: 10.1242/dev.085365

- ② Takahashi H., Iwakawa H., Ishibashi N., Kojima S., Matsumura Y., Prananingrum P., Iwasaki M., Takahashi A., Ikezaki M., Luo L., Kobayashi T., Machida Y. and Machida C.: Meta-Analyses of Microarrays of Arabidopsis asymmetric leaves1 (*asl*), *as2* and Their Modifying Mutants Reveal a Critical Role for the ETT Pathway in Stabilization of Adaxial-Abaxial Patterning and Cell Division During Leaf Development. *Plant Cell Physiol*. 54(3), 418-431 (2013). 査読有

DOI: 10.1093/pcp/pct027

- ③ Takahashi H., Nakagawa A., Kojima S., Takahashi A., Cha B. Y., Woo J., Nagai K., Machida Y. and Machida C.: Discovery of novel rules for G-quadruplex-forming sequences in plants by using bioinformatics methods. *J. of Bioscience and Bioengineering* 114, 570-575 (2012). 査読有

DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.05.017

- ④ Nakagawa A., Takahashi H., Kojima S., Sato N., Ohga K., Cha B. Y., Woo J., Nagai K., Horiguchi G., Tsukaya H., Machida Y. and Machida C.: Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 79, 569-581 (2012). 査読有

DOI: 10.1007/s11103-012-9929-7.

- ⑤ Keta S., Iwakawa I., Ikezaki M., Semiarti E., Kojima S., Machida Y. and Machida C.: Roles of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in floral organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 29, 1-8 (2012). 査読有

DOI:10.5511/plantbiotechnology.11.1101a

- ⑥ Ishibashi N., Kanamaru K., Ueno Y., Kojima S., Kobayashi T., Machida, C. and Machida Y.: *ASYMMETRIC-LEAVES2* and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of class 1 *KNOX* homeobox genes for development of

flat symmetric leaves in *Arabidopsis*. *Biology Open* 1, 197-207 (2012). 査読有

DOI:10.1242/bio.2012406

- ⑦ Kojima S., Iwasaki M., Takahashi H., Imai T., Matsumura Y., Delphine Fleury, Mieke Van Lijsebettens, Machida Y. and Machida C.: ASYMMETRIC LEAVES2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52, 1259-1273 (2011). 査読有
DOI: 10.1093/pcp/pcr083
- ⑧ Semiarti E., Indrianto A., Purwanto A., Martiwi I. N. A., Feroniasanti Y. M. L., Nadifah F., Mercuriana I. S., Dwiyani R., Kojima S., Machida Y., and Machida C. Establishment of High-frequency Genetic Transformation Method of Indonesian Orchid Species Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of Nagoya International Orchid Congress 2011*, 32-39 (2011). 査読なし
- ⑨ Ikezaki M., Kojima M., Sakakibara H., Kojima S., Ueno Y., Machida C., Machida Y.: Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *Plant J.* 61, 70-82 (2010). 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04033.x.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 小島晶子・高橋広夫・石橋奈々子・松村葉子・Pratiwi Prananingrum・岩崎まゆみ・Arista Handayani・高橋アンナ・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 下流因子のマイクロアレイ解析による探索 第54回日本植物生理学会年会、2013年3月21日 (岡山)
- ② 町田千代子・岩崎まゆみ・高橋広夫・中川彩美・Vial-Pradel Simon・Prananingrum Pratiwi・小島晶子・町田泰則. シロイヌナズナの葉の発生分化における AS1-AS2 による ARF 遺伝子のエピジェネティック制御機構 (Epigenetic Regulation of Genes for Auxin-Response-Factors by AS1-AS2 in Leaf Development in *Arabidopsis Thaliana*) 第35回日本分子生物学会、2012年12月11-14日 (福岡)
- ③ Kojima S.: Identification of downstream targets of ASYMMETRIC LEAVES2 and ELONGATA3 during leaf development in *Arabidopsis thaliana*. 4th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium "Arabidopsis and Emerging Model Systems". November 20, 2012 (Okazaki)
- ④ 町田千代子・中川彩美・岩崎まゆみ・高橋真理・Simon Vial-Pradel・石橋奈々子・松村葉子・小島晶子・町田泰則. シロイヌナズナの葉の向背軸確立に関わる AS1-AS2 の標的因子

ETTIN の抑制機構 日本植物学会第76回大会、2012年9月16日 (姫路)

- ⑤ 松村葉子・林里香・大林祝・小島晶子・杉山宗隆・町田千代子・町田泰則. シロイヌナズナ ASYMMETRIC LEAVES2 遺伝子とリボソーム RNA 前駆体のプロセッシング因子の不全が葉の向背軸性の確立にもたす影響 日本植物学会第76回大会、2012年9月16日 (姫路)
- ⑥ Nakagawa A., Takahashi H., Kojima S., Sato N., Ohga K., Cha B. Y., Woo J., Nagai K., Horiguchi G., Tsukaya H., Machida Y. and Machida C.: Berberine enhances defects in the establishment of leaf adaxial-abaxial polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*. 23rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2012). July 4-7, 2012. (Vienna, Austria)
- ⑦ 町田千代子・岩崎まゆみ・中川彩美・舟橋明華・浅井俊晴・高橋広夫・小島晶子・町田泰則. シロイヌナズナの葉の発生分化における AS2 と AS1 による ARF 遺伝子の二重の抑制機構と後成的制御 第53回日本植物生理学会年会、2012年3月17日. (京都)
- ⑧ 松村葉子・林里香・大林祝・小島晶子・Julio Saez-Vasquez・Manuel Echeverria・杉山宗隆・町田千代子・町田泰則. シロイヌナズナ ASYMMETRIC LEAVES2 遺伝子とリボソーム RNA 前駆体のプロセッシングに関わる因子は葉の軸性の確立に必要である、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月17日 (京都)
- ⑨ 石橋奈々子・金丸京子・上野宜久・小島晶子・小林哲夫・町田千代子・町田泰則. シロイヌナズナの ASYMMETRIC LEAVES2 と NudC (Nuclear distribution gene C) ドメインタンパク質のオルソログは扁平で左右相称な葉の形成に必要である、第53回日本植物生理学会年会、2012年3月16-17日 (京都)
- ⑩ 小島晶子・岩崎まゆみ・高橋広夫・今井智哉・松村葉子・Delphine Fleury・Mieke Van Lijsebettens・町田泰則・町田千代子. ASYMMETRIC LEAVES2 and Elongator, a Histone Acetyltransferase Complex, Mediate the Establishment of Polarity in Leaves of *Arabidopsis thaliana*. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日 (横浜)
- ⑪ 小島晶子・岩崎まゆみ・高橋広夫・今井智哉・松村葉子・Delphine Fleury・Mieke Van Lijsebettens・町田泰則・町田千代子. シロイヌナズナの葉の形態形成における ELONGATA3 遺伝子の解析、日本植物学会第75回大会、2011年9月17日 (東京)
- ⑫ 町田千代子・岩崎まゆみ・高橋広夫・岩川秀和・小島晶子・町田泰則. シロイヌナズナの葉の軸形成に関わる AS1 と AS2

- が直接制御する因子の解析、日本植物学会第75回大会、2011年9月17日（東京）
- ⑬ Machida C., Iwasaki M., Iwakawa H., Takahashi H., Matsumura Y., Keta S., Eshed Y., Ueno Y., Kojima S. and Machida Y. Spatiotemporal Regulation of Establishment of Leaf Polarity through tasiRNA-ARF and AS1/AS2 in *Arabidopsis thaliana*. The 16th Annual Meeting of the RNA Society (RNA 2011). June 15-16, 2011. (Kyoto)
- ⑭ 小島晶子・岩崎まゆみ・今井智哉・松村葉子・上野宜久・町田泰則・町田千代子. シロイヌナズナのヒストンアセチル化酵素遺伝子は *asymmetric leaves2* 変異体の向背軸性異常を亢進する 日本植物学会第74回大会、2010年9月10日（春日井）
- ⑮ 石橋奈々子・上野宜久・金丸京子・小島晶子・小林哲夫・町田千代子・町田泰則. シロイヌナズナの *asymmetric leaves2(as2)* および *as1* 変異体背景において葉の向背軸性の確立に影響を及ぼす新規変異 *eal* は細胞分裂異常を引き起こす 日本植物学会第74回大会、2010年9月10日（春日井）
- ⑯ 中川彩美・高橋広夫・佐藤信雄・車柄允・禹濟泰・永井和夫・小島晶子・町田泰則・町田千代子. 2010年9月10日 シロイヌナズナのグアニン四重鎖配列の機能解析 日本植物学会第74回大会（於春日井）
- ⑰ 深澤弘・岩崎まゆみ・池崎仁弥・小島晶子・町田泰則・町田千代子. シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, *AS2* による葉からの不定芽形成抑制機能の解析 日本植物学会第74回大会、2010年9月10日（春日井）
- ⑱ Kojima S., Iwasaki M., Imai T., Matsumura Y., Ueno Y., Machida C.: #27 mutation affects leaf polarity and leaf venation patterns in *Arabidopsis thaliana*. The 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010). June 7-9, 2010. (Yokohama)
- ⑲ Iwasaki M., Iwakawa H., Takahashi H., Pekker I., Eshed Y., Ueno Y., Kojima S., Machida Y., Machida C.: Dual regulation of expression of ETT/ARF3 by *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* and *AS1* for establishment of the medial-lateral leaf polarity in *Arabidopsis thaliana*. The 21st International Conference on Arabidopsis Research (ICAR 2010). June 7-9, 2010. (Yokohama)

〔図書〕（計1件）

佐藤豊・小島晶子・町田千代子 共立出版、植物のシグナル伝達 III. シュート形成調節における低分子 RNA の役割（2011）pp. 139-147.

〔その他〕

ホームページ等

http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Environment_Bio/labo/kojima_lab/index.html

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