

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19570048
研究課題名（和文） 植物固有の AS2 ファミリータンパク質の分子機能の解析
研究課題名（英文） Analysis of molecular function of the AS2 domain of the AS2 protein family in plants
研究代表者
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

研究成果の概要：

植物界に特異的な AS2 ファミリーのメンバーは、極めて特徴のある約 100 アミノ酸からなるドメイン構造 (AS2/LOB ドメイン) をもつ。本研究においては、最も研究が進んでおり、シロイヌナズナの葉の発生・分化に重要な機能をもつことがわかっている *ASYMMETRIC LEAVES2* (AS2) に着目して解析した。AS2 の AS2/LOB ドメインは核と核小体周縁部の局在に必要であることがわかった。また、AS2/LOB ドメイン内のアミノ酸配列は AS2 の機能において極めて特異的であることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
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：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ、発生・分化、葉、核小体、核、

1. 研究開始当初の背景

分化は、細胞が機能的にその祖先の細胞と異なった性質を獲得する過程である。葉の細胞の分化過程では茎頂メリステムからの何らかのシグナルを受けて、葉の分化因子と多くのクロマチン関連因子が互いに相互作用し、分化状態の維持と継承がなされていると考えられる。我々は、本研究において、シロイヌナズナの葉の発生分化において上位で機能する *ASYMMETRIC LEAVES2*(AS2)に着目して研究することを提案した。AS2 を含む植物界に特異的な新奇なファミリー (AS2/LOB

ファミリー) のメンバーは、極めて特徴のあるドメイン構造 (AS2/LOB ドメイン) をもつ。AS2/LOB ドメインは、cysteine に富む特徴的な配列 (C-motif)、保存された glycine を含む領域 (Conserved-G) と leucine zipper 様配列の約 100 アミノ酸からなり、植物で広く保存されている。最近になり、複数の AS2/LOB ファミリーのメンバーについての報告がなされ、AS2/LOB ファミリーのメンバーは、それぞれ、機能部位は異なるが、植物の器官形成等において、何らかの共通な分子機構に関与している可能性が考えられた。しかしながら、

AS2/LOB ファミリーのメンバーが関わる分子機構については、ほとんどわかっていない。AS2/LOB ドメインが共通に、どのような機能をもつのか、明らかにすることは植物に特徴的な分化機構を知る上でも重要であろうと考えられた。我々は、AS2 が、核全体と核小体のまわりの特定の領域に局在すること、AS2 と共に機能する AS1 も核に局在し、AS2 存在下で、核小体のまわりの特定の領域に AS2 と共局在することを報告した (Ueno et al., *Plant Cell*, 2007)。又、我々は、メリステムに特異的に発現する class 1 *KNOX* に加えて AS2 及び、AS2 と共に機能する *ASI* が、裏側化因子である *KAN2*, *YAB5*, *ETT* を抑制制御すること、AS2 と *ASI* が、葉の発生・分化において、基部先端部軸、向背軸、中央側方軸形成の全てに関わることを示した (Iwakawa et al., *Plant J.*, 2007)。さらに、我々と海外のグループの結果から、AS2 と *ASI* が関わる発生・分化には、クロマチン関連因子、リボソーム関連因子、DNA 複製関連因子等様々な因子の機能が必要であることも明らかになった。このように、AS2 と *ASI* による葉の分化機構は、分化のメカニズムを解明する上で極めて優れたモデルとなると考えられた。

2. 研究の目的

植物に特徴的な AS2/LOB ドメインの機能を明らかにし、植物の発生・分化のメカニズムを解明にすることが本研究の目的である。AS2/LOB ドメインの中でも特に保存性の高い 3 つの領域の機能に着目する。第一に、AS2 について核と核小体局在に関わるアミノ酸を明らかにする。第二に、機能が明らかになっている唯一のメンバーである AS2 の特異的な機能に必要なアミノ酸配列を特定する。第三に、AS2 と相互作用する因子を同定し、AS2 に特異的な分子と AS2/LOB ファミリーのメンバーに共通な分子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞内局在解析

核局在に必要な AS2 タンパク質のアミノ酸配列を特定する事を目的として、AS2 の欠失、及びアミノ酸置換体に YFP を融合したタンパク質をつくらせるコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに導入した。得られた形質転換体の蛍光を観察した。

(2) AS2 ドメインのアミノ酸の機能解析 AS2 の AS2 ドメインのアミノ酸の機能を明らかにするために、*as2* 変異体に、AS2 ファミリーのメンバーの AS2/LOB ドメイン部分のみ置き換えたキメラ遺伝子を作製して *as2* 変異体に導入し、*as2* 変異の表現型を相補するか調べた。

(3) AS2 と相互作用する新規因子の同定 AS2 との相互作用因子を生化学的に同定するために AS2 プロモーターの下流に Flag タグ、TAP タグをそれぞれ融合した AS2 を導入し、形質転換体を得た。また、遺伝的に相互作用する因子の同定のため、*as2* 変異の亢進因子と抑圧因子を探索、同定した。

4. 研究成果

(1) 細胞内局在に必要な配列の解析

野生型の AS2 は、核内の核小体のまわりの特定の領域に局在する。AS2 の欠失、及びアミノ酸置換体に YFP を融合したタンパク質の細胞内局在を解析した結果、C-motif (CX₂CX₆CX₃C)配列内の 4 つのシステインと塩基性アミノ酸の配列は、AS2 が核小体周縁部に局在するために必要であること、leucine zipper 様配列は、AS2 が核に局在するために必要であることがわかった。C-motif は、シロイヌナズナ以外の植物も含めて極めてよく保存されている。このことから、核内の核小体のまわりの特定の領域に局在することは、AS2 ファミリーのメンバーに共通の機能において、重要であると考えられた(学会発表 ref.1, 13)。

(2) AS2 機能に必要なアミノ酸配列の解析

AS2 ドメイン内の配列が似ているものは機能的な類似性が高いと予測される。このことを検証するために、唯一単独変異体で表現型を示した *as2* 変異体に、AS2 ファミリーのメンバーの AS2/LOB ドメイン部分のみ置き換えたキメラ遺伝子を作製して導入し、*as2* 変異の表現型を相補するか調べた。AS2 ドメインのアミノ酸配列を *ASL1,2,3,4,15,18,23,37* に置き換えたキメラ遺伝子を作成し、相補実験を行った結果、どの場合にも *as2* 変異の表現型を相補しなかった。AS2 機能において、AS2 ドメインのアミノ酸配列は非常に特異性が高いと考えられる(雑誌論文 ref. 1 Matsumura et al., *Plant J.* 2009 on line; 学会発表 ref. 6, 21)。

(3) AS2 と相互作用する新規因子の同定

AS2 プロモーターの下流に Flag タグ、TAP タグをそれぞれ融合した AS2 を作成し、形質転換体を多数得た。これらのうち、*as2* 変異を相補するラインが得られ、AS2 タンパク質が合成されていることが確認できた。今後、これらを使って、相互作用する新規因子の同定する予定である。一方、ウイルス由来の betaC1 が AS2 に換わって AS1 と相互作用することを示した(雑誌論文 ref.3 Yang et al., *Genes & Develop.* 2008) また、遺伝的に相互作用する因子を多数同定した(学会発表 ref.4,5, 7, 10, 14, 16, 18-20) また、AS2 と AS1 による発現制御の経路について解析した(雑誌論文 ref. 2 Takahashi et al., *JBB*, 2008 ; 学会

発表 ref. 2, 3, 9, 11, 12, 15, 17)。

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)

- ① Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y., Machida, C.: Characterization of genes in the *ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB)* family in *Arabidopsis thaliana* and functional and molecular comparisons between AS2 and other family members. *Plant J.* on line.(2009) 査読有
- ② Takahashi, H., Iwakawa, H., Nakao, S., Ojio, T., Morishita, R., Morikawa, S., Machida, Y., Machida, C., Kobayashi, T.: Knowledge-based Fuzzy Adaptive Resonance Theory and its Application to the Analysis of Gene Expression in Plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 587-593 (2008) 査読有
- ③ Yang, J-Y., Iwasaki, M., Machida, C., Machida, Y., Zhou, X., Chua, N-H.: betaC1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes & Development* 22, 2564-2577 (2008) 査読有
- ④ Kitakura, S., Terakura, S., Yoshioka, Y., Machida, C., Machida, Y.: Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* oncoprotein *6b* and a tobacco nucleolar protein that is homologous to *TNPI* encoded by a transposable element of *Antirrhinum majus*. *J. Plant Res.* 121, 425-433(2008) 査読有
- ⑤ Ishikawa, T., Machida, C., Yoshioka, Y., Ueda, T., Nakano, A., Machida, Y.: *EMBRYO YELLOW* gene, encoding a subunit of the conserved oligomeric Golgicomplex, is required for appropriate cell expansion and meristem organization in *Arabidopsis thaliana*. *Genes to Cells* 13, 521-535 (2008) 査読有
- ⑥ Terakura S., Ueno Y., Tagami H., Kitakura S., Machida C., Wabiko H., Aiba H., Otten L., Tsukagoshi H., Nakamura K., Machida Y.: An oncoprotein from the plant pathogen *Agrobacterium* has histone-chaperone-like activity. *Plant Cell*, 19,2855-2865(2007) 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

- ① Luo Lilan A role of ASYMMETRIC LEAVES2 protein in morphogenesis of

leaves in *Arabidopsis*: The relationship between its nuclear localization and function 2009年3月21-24日 (名古屋大学)

- ② 岩川秀和 シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるAS1とAS2が制御する複数の遺伝子経路の解析 日本植物生理学会第50回年会 2009年3月21-24日 (名古屋大学)
- ③ 岩崎まゆみ シロイヌナズナのAS2による葉の背軸化遺伝子ETT/ARF3制御機構の解析 日本植物生理学会第50回年会 2009年3月21-24日 (名古屋大学)
- ④ 小島晶子 シロイヌナズナの葉の形態形成に関わるasymmetric leaves2亢進変異体#27のクローニング 日本植物生理学会第50回年会 2009年3月21-24日 (名古屋大学)
- ⑤ 松村葉子 シロイヌナズナの asymmetric leaves2 変異体の向背軸形成の異常を亢進する変異体の解析 日本植物生理学会第50回年会 2009年3月21-24日 (名古屋大学)
- ⑥ 渡邊ゆか オーキシン応答性を示すシロイヌナズナAS2-LIKE GENE 23 (ASL23/LBD19) 遺伝子の機能解析 日本植物生理学会第50回年会 2009年3月21-24日 (名古屋大学)
- ⑦ 松村葉子 シロイヌナズナのasymmetric leaves2変異体の向背軸形成の異常を亢進する変異体の解析 第31回日本分子生物学会年会 2008年12月9-12日 (神戸ポートアイランド)
- ⑧ 中川彩美 シロイヌナズナの葉の発生・分化に関わるASYMMETRIC LEAVES2遺伝子の発現制御機構の解析 第31回日本分子生物学会年会 2008年12月9-12日 (神戸ポートアイランド)
- ⑨ 岩川秀和 AS1とAS2は複数の遺伝子経路を制御して葉の軸形成に関わる第31回日本分子生物学会年会 2008年12月9-12日 (神戸ポートアイランド)
- ⑩ 安川沙織 シロイヌナズナの asymmetric leaves2 変異体の向背軸形成の異常を亢進する変異体の解析 日本植物学会第72回大会 2008年9月25-27日 (高知大学)
- ⑪ 町田千代子 シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるAS2, AS1 による新規遺伝的ネットワークの解明 日本遺伝子学会第80回大会 2008年9月3-5日 (名古屋大学) (BP賞)
- ⑫ 岩崎まゆみ シロイヌナズナの葉の極性の確立におけるAS2 によるETT/ARF3 制御機構の解析 日本遺伝子学会第80回大会 2008年9月3-5日 (名古屋大学)
- ⑬ 安藤沙友里 シロイヌナズナの葉の発生分化に関わるAS2 の核局在に必要な領域の解析 日本遺伝子学会第80回大会 2008年9月3-5日 (名古屋大学)

- ⑭ Iwasaki, M. A genetic screen for genes interacting with AS2 during leaf development. 19th International Conference on Arabidopsis Research, at Montreal, 2008年7月23-27日 Hyatt Regency Montreal(Canada)
- ⑮ 町田千代子 シロイヌナズナのAS2遺伝子による葉の表裏の極性に関わる *ETT/ARF3*の制御機構の解析 第10回RNAミーティング 2008年7月23-25日(札幌コンベンションセンター)
- ⑯ 松村葉子 シロイヌナズナの葉の発生に関わる *asymmetric leaves 2* の亢進変異体の解析 日本植物生理学会第49回年会 2008年3月20-22日(札幌コンベンションセンター)
- ⑰ 岩川秀和 扁平で左右相称的な葉の形成に関わるAS2の下流因子の探索日本植物生理学会第49回年会 2008年3月20-22日(札幌コンベンションセンター)
- ⑱ 小島晶子 シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)*遺伝子とともに葉の形態形成に関わる遺伝子の解析日本分子生物学会第30回大会 2007年12月11-15日(パシフィコ横浜)
- ⑲ 松村葉子 シロイヌナズナの葉の発生に関わる *asymmetric leaves 2*の亢進変異体の解析日本分子生物学会第30回大会 2007年12月11-15日(パシフィコ横浜)
- ⑳ 安川沙織 シロイヌナズナの *asymmetric leaves2*変異体の向背軸形成の異常を亢進する変異体の解析日本分子生物学会第30回大会 2007年12月11-15日(パシフィコ横浜)
- ㉑ 渡邊ゆか シロイヌナズナ *ASL23/LBD19* 遺伝子の機能解析日本分子生物学会第30回大会 2007年12月11-15日(パシフィコ横浜)

[その他]

アウトリーチ活動情報

ひらめきときめきサイエンス (H20 年度)

<http://www.jsps.go.jp/hirameki/ht20000/ht20093.html>

http://www.jsps.go.jp/hirameki/ht20000_jisshi/ht20093.pdf

ホームページ情報

http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/BioChem/labo/machida_lab/index.html

研究成果データベース

<http://www.chubu.ac.jp/about/faculty/profile/a6cde1928363540bd3162e39f6d033681deac316.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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