

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291056

研究課題名(和文) 長鎖ノンコーディングRNAによる葉形成の分子機構の研究

研究課題名(英文) A mechanism of leaf formation induced by long intergenic non-coding (linc) RNA

研究代表者

町田 泰則 (Machida, Yasunori)

名古屋大学・理学研究科・研究員(名誉教授)

研究者番号：80175596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はAS2と長鎖ノンコーディング(linc) RNAを基軸としてシロイヌナズナの葉の表・裏が形成される仕組みを研究したが、linc RNAの同定は不成功だった。一方、linc RNAと関連している次のような研究が進んだ。1. AS2は核小体近傍で顆粒(AS2 body)を形成する。AS2のCxxCジンクフィンガー様配列(ZFL配列)は、AS2 body形成と葉の発生に必要だった。2. AS2はZFL配列依存的に標的遺伝子であるETTのエキソン1に結合した。3. ETTのエキソン6にあるCGは90%以上メチル化されていた。AS2と3つの核小体蛋白質はCGのメチル化の維持に必要だった。

研究成果の概要(英文)：Focusing on long intergenic non-coding (linc) RNAs generated from the promoter region of AS2-target gene ETT, we have attempted to investigate mechanisms of development of adaxial and abaxial domains of leaves in Arabidopsis. However, we failed to amplify the linc RNA molecules by RT-PCR although a molecule was detected at the corresponding position. We also have studied mechanisms of formation of AS2 bodies, which are found at the nucleolar periphery, and supposed to include non-coding RNAs, and its function in leaf development. 1. Our results showed that the zinc-finger-like (ZFL) motif in AS2, which is similar to the zinc finger-CxxC domain in CpG binding proteins of vertebrates, is required for the formation of AS2 bodies. 2. AS2 binds the specific sequence in exon 1 of ETT and the ZFL motif is essential for the AS2 binding. 3. Exon 6 of ETT contains six CpG sites that are fully methylated. AS2 and three nucleolar proteins are involved in maintenance of these methylated CpGs.

研究分野：Plant molecular developmental biology

キーワード：Arabidopsis leaf development linc RNA AS2 and AS1 gene body methylation DNA methylation nucleolar bodies epigenetics

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程では、時系列に従って次々と新しい組織が分化する。その過程では、新しい遺伝子の発現だけでなく、一つ前の分化段階で働いた遺伝子の発現を抑制することも重要である。我々はシロイヌナズナの葉の発生過程には、植物固有のタンパク質がこのような抑制に働いていることを提唱しているが、その分子機構についてはまだ十分には解明していなかった。葉は3つの軸 [基部—先端部軸、向—背(表—裏)軸、中央—側方(左右)軸] に沿って、茎頂の幹細胞から発生・分化する。これらの軸にそった発生・分化のうち、向-背軸形成はその後の左右軸にそった発生・分化を規定する大事なステップである。葉原基形成ではまず背軸側が分化し、その後一部の細胞が向軸側化する。

本研究を開始した当初、我々は、*ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* と *AS1* 遺伝子が、背軸側領域から向軸側領域が分化する際の鍵因子であることを見いだしていた (Machida et al., 2015)。具体的には、*AS2* と *AS1* は葉の向軸側の決定因子であり、二つのタンパク質は複合体 (*AS2-AS1*) を形成し、背軸側化の遺伝子である *ETTIN (ETT)/ARF3* の発現を、予定向軸側領域で抑制することが向軸側分化 (及び分化状態の維持) にとって必須であることを報告した (Iwasaki et al., 2013)。この抑制には少なくとも次のような3つの仕組みが関わっている。(1) *AS1-AS2* タンパク質は *ETT* の 5' 上流にあるプロモータへ直接結合する(主に *AS1* の機能)、(2) *ETT* mRNA の分解に関わっているトランス・アクティング siRNA (tasiR-ARF) 量を増大する、(3) *ETT* 遺伝子のジーン・ボディー (タンパク質コード領域) の CpG メチル化の維持に関わる。さらに *AS2* は核小体内やその近傍で顆粒 (*AS2 body* と命名) として存在すること、*AS1* も *AS2 body* に共局在することがわかっていた (Ueno et al., 2007; Luo et al., 2012)。また我々を含む複数のグループにより、*ETT* のプロモータ領域にある *AS1* が結合する DNA の両鎖から長鎖遺伝子間ノンコーディング RNA [long intergenic non-coding (linc) RNA] が転写される可能性が指摘されていた。動物の linc RNA は、タンパク質と複合体を作り、ヒストンのメチル化などを通して遺伝子発現に関わる機能があるが、相補的な関係にある linc RNA についての研究例は報告されていなかった。

引用文献

1. Machida et al. *WIREs. Dev. Bio.* 4: 655-671 (2015)
2. Iwasaki et al. *Development* 140: 1958-1969 (2013)
3. Ueno et al. *Plant Cell* 19: 445-457 (2007)

4. Luo et al. *J. Plant Res.* 125: 661-668 (2012)

2. 研究の目的

- (1) Linc RNA とタンパク質複合体の構造を明らかにする

二種類の linc RNA (Fli と Rli と命名した) の正確な構造を明らかにすると同時に、これらの分子が細胞内においてタンパク質と複合体構造を形成している可能性を検討する。我々はすでに、*AS2 body* を同定しており、*AS1* も含まれていることを報告している。*AS1* は linc RNA 遺伝子領域の DNA と結合することから、*AS2 body* が linc RNA を含む可能性はある。

- (2) *ETT* 遺伝子発現と葉の形態形成における linc RNA の役割を解明する

Fli と Rli linc RNA 遺伝子領域の変異体を用いて、*ETT* 遺伝子発現に対する影響と、葉の形態に及ぼす効果を研究する。また、linc RNA が作用する可能性のある未知の遺伝子を探索し、影響を調査する。

- (3) Linc RNA の *ETT* ジーン・ボディーの CpG メチル化に及ぼす影響を研究する

AS2 と *AS1* は *ETT* コード領域の CpG のメチル化の維持に必要であり、そのメチル化は METHYLTRANSFERASE1 (*MET1*) によって行われる (Iwasaki et al., 2013)。そこで、linc RNA や *MET1* の変異体を用いて、*ETT* DNA のメチル化との関連性を解明する。また、*AS2* や *AS1* と葉形成において遺伝的に相互作用する核小体因子の変異体を用いて、CpG のメチル化との関連性を研究する。*AS2 body* 形成との関連性も研究する。この過程におけるヒストンのメチル化などの修飾の関与を研究する。

3. 研究の方法

- (1) Fli と Rli linc RNA を RT-PCR により増幅すると同時に、5' 及び 3' RACE 法により、末端配列を決定し、完全なヌクレオチド配列を明らかにする計画であった。さらにその後それぞれの転写プロモータ領域を同定する計画であった。*AS2 body* 形成に関与する *AS2* のアミノ酸残基を遺伝学的に同定する。*AS2 body* 形成不能な変異体と葉の形成機能との関連性を解析する。*AS2 body* を精製し、Fli と Rli linc RNA が存在するかどうかどうかを検討する計画であった。

- (2) (1) に基づいて、linc RNA の機能欠失型の変異体や過剰発現体を獲得し、*ETT* 遺伝子発現に及ぼす影響を調べる。また、葉の表現型を解析し、分子的・発生的役割を解明する。さらに、*ETT* 以外の linc RNA 制御遺伝子を探索し、発生における機能を解明する。

- (3) Linc RNA が、*AS2 body* 以外のタンパク質複合体に含まれている可能性も追求する。

そのために、MS2 タンパク質に結合する RNA を Linc RNA に連結したキメラ RNA を発現する DNA をシロイヌナズナに導入し、MS2 を指標として複合体の候補タンパク質を単離・同定する計画であった。さらに、それに対応する遺伝子を同定し、遺伝学的・細胞生物学的解析などにより、lincRNA の植物発生における役割を解明する。

(4) LincRNA や AS2 body 形成による *ETT* DNA のメチル化への影響を調べ、メチル化の仕組みを解明する。

4. 研究成果

(1) Linc RNA の構造とタンパク質複合体の構造を明らかにする研究

平成 26 年度は、栄養成長期の葉原基を含む茎頂部より抽出した RNA を用いて、RT-PCR により、Fli と Rli と命名した Linc RNA 分子のクローニングはできなかった。RNA 量を増やし、繰り返し試みたがクローニングできなかった。一方下記に述べるように、Fli と Rli RNAs に対応する DNA 領域に T-DNA が挿入されている株からの RNA を用いて RT-PCR をすると、Rli の量が減少した。これは、期待される DNA 領域から RNA が転写されていることを支持する。しかし、我々ではこれ以上の解析は困難であると判断し、平成 27 年度から RNA の専門家である東京大学の渡邊雄一郎教授を分担者として加え、Rli と Fli RNA の同定・分離を試みたが、成功しなかった。具体的には期待される大きさの分子は検出されたが、配列は別物であった。平成 28 年度には、花原基（葉原基に対応する）を多数含む生殖成長期の頂芽から RNA を抽出し、Linc RNA の検出・同定を試みたが、成功しなかった。不成功の理由としては、Linc RNA の量が極めて少ないか、何らかの理由で RT-PCR による増幅が不適切だった可能性もある。しかし、この Linc RNA は二つの異なる研究グループのマイクロアレーでも検出されている。RT-PCR 法を改良する必要があるのかもしれない。

一方我々は、AS2 body の構造と機能の研究を通して、何らかのノンコード RNA の研究を目指すことにした。まず、AS2 body 形成に必要な AS2 のアミノ酸残基を同定した。その結果、AS2 の AS2/LOB ドメインに含まれる CxxC タイプのジンクフィンガー様配列 (ZFL motif) が必要であることがわかった (論文準備中)。ZFL motif の点突然変異体は AS2 として機能できないことから、この motif は AS2 body 形成と葉の正常な発生にとって必要であることがわかった (論文準備中) また AS2 が、標的遺伝子である *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域 (exon 1) に結合すること、この結合にも ZFL motif が必要であるこ

とがわかった (Simon et al., 2018)。AS1 と Linc RNA 配列をコードしている *ETT* プロモータ領域の DNA が結合すること、AS1-AS2 は複合体を作ること、AS2 が *ETT/ARF3* の exon 1 に結合すること、AS2 と AS1 は AS2 body に共局在することから、この AS2 body に含まれる可能性がある RNA 分子に興味を持たれ、これは今後の重要な課題であろう。

(2) *ETT* 遺伝子発現と葉の形態形成における linc RNA の役割を解明する

上記したように、Fli と Rli に対応するゲノム DNA への T-DNA 挿入変異体を分離した。その結果、1 つの変異体では Rli の量が減少した。この結果から、このゲノム領域は *ETT/ARF3* 発現に対する正の因子として機能している可能性が示唆された。またこの変異体では花芽形成に至るまでの栄養成長期が長くなっていた。以上から、Rli Linc RNA は花芽形成に対して促進的に機能している可能性が考えられる (論文準備中)。

(3) Linc RNA の *ETT* ジーン・ボディー (タンパク質コード領域) の DNA メチル化に及ぼす影響を研究する

ETT/ARF3 遺伝子の exon 6, exon 9, exon 10 は CpG のシトシンがメチル化されている。特に、exon 6 には 6 箇所の CpG があり、すべての CpG が 90%以上メチル化されている。すでに我々は、このメチル化は脊椎動物の CpG の維持メチル化酵素 *DNMT1* のシロイヌナズナのホモログである *MET1* により起こることを報告した (Iwasaki et al., 2013)。すでに我々は、AS2 が exon 6 の CpG のメチル化に必要であることを報告した。今回さらに、少なくとも 3 つの核小体タンパク質も exon 6 の別な部位のメチル化に関わっていることがわかった。

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 13 件)

1. Luong, Q.-T., Keta, S., Asai, T., Kojima, S., Nakagawa, A., Micol, J.-L., Xia, S., Machida, Y., Machida, C.: A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and DNA replication factors in establishment of adaxial-abaxial leaf polarity of Arabidopsis. *Plant Biotechnology* 35, 39–49 (2018). 査読有
doi:10.5511/plantbiotechnology.18.0129b.
2. Vial-Pradel, S., Keta, S., Nomoto, M., Luo, L., Takahashi, H., Suzuki, M., Yokoyama, Y., Sasabe, M., Kojima, S., Tada, Y., Machida, Y., Machida, C.: Arabidopsis zinc-finger-like protein ASYMMETRIC

- LEAVES2 (AS2) and two nucleolar proteins maintain gene body DNA methylation in the leaf polarity gene *ETTIN* (*ARF3*). *Plant & Cell Physiology* (2018). pcy0312018.2.5 査読有
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy031>
3. Ohbayashi, I., Lin, C.-Y., Shinohara, N., Matsumura, Y., Machida, Y., Horiguchi, G., Tsukaya, H., Sugiyama, M. Evidence for a role of ANAC082 as a ribosomal stress response mediator leading to growth defects and developmental alterations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29: 2644-2660 (2017). 査読有 doi:10.1105/tpc.17.00255.
 4. Li, H., Sun, B., Sasabe, M., Deng, X.-G., Machida, Y., Lin, H., Lee Y.-R., Liu, B.: *Arabidopsis* MAP65-4 Plays A Role in Phragmoplast Microtubule Organization and Marks the Cortical Cell Division Site. *New Phytologist* (2017). 査読有 doi: 10.1111/nph.14532.
 5. Suzuki, T., Matsushima, C., Nishimura, S., Higashiyama, T., Sasabe, M. Machida, Y.: Identification of Phosphoinositide-binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of *Arabidopsis* MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* (2016). 査読有 Aug;57(8):1744-55. doi: 10.1093/pcp/pcw098. Epub 2016 May 19.
 6. Matsumura, Y., Ohbayashi, I., Takahashi, H., Kojima, S., Ishibashi, N., Keta, S., Nakagawa, A., Hayashi, R., Saéz-Vásquez, 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* 5(7):942-954 (2016). 査読有 doi: 10.1242/bio.019109
 7. Kawamoto, N., Sasabe, M., Endo, M., Machida, Y., and Araki, T.: Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation. *Sci Rep.* (2015). Feb 9; 5: 834. 査読有 doi: 10.1038/srep08341.
 8. Saito, T., Fujikawa, H., Haga, N., Suzuki, T., Machida, Y., Ito, M.: Genetic interaction between G2/M phase-specific transcription factor MYB3R4 and MAPKKK ANP3 for execution of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* (2015). 10(3):e990817. 査読有 doi: 10.4161/15592324.2014.990817.
 9. Sasabe, M., Ishibashi, N., Haruta, T., Minami, A., Kurihara, D., Higashiyama, T., Nishihama, R., Ito, M., and Machida, Y.: The carboxyl-terminal tail of the stalk of *Arabidopsis* NACK1/HINKEL kinesin is required for its localization to the cell plate formation site. *J. Plant Res.* 128:327-336 (2015). 査読有 doi: 10.1007/s10265-014-0687-2
 10. 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*. *WIREs Dev Biol.* 4(6):655-71 (2015). 査読有 doi: 10.1002/wdev.196.
 11. Ito, M. and Machida, Y.: Reprogramming of plant cells induced by 6b oncoproteins from the plant pathogen *Agrobacterium*. *J. Plant Res.* 128, 423-435 (2015). 査読有 doi: 10.1007/s10265-014-0694-3.
 12. Ishibashi, N., Kitakura, S., Terakura, S., Machida, C. and Machida, Y.: Protein encoded by oncogene *6b* from *Agrobacterium tumefaciens* has reprogramming potential and histone chaperone-like activity. *Front. in PLANT SCI.* vol. 5, Article 572, p1-7 (2014). 査読有 doi: 10.3389/fpls.2014.00572
 13. Sasabe, M. and Machida, Y.: Signaling pathway that controls plant cytokinesis. in *Signalling Pathways in Plants*: ed. by Yasunori Machida, Chentao Lin & Fuyuhiko Tamanoi, *THE ENZYMES*, vol. 35, Burlington: Academic Press, pp. 145-165 (2014). 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801922-1.00006-3>
- 〔学会発表〕(計 47 件)
1. 町田千代子、ほか6名：シロイヌナズナの zinc-finger様タンパク質AS2と核小体タンパク質は葉の裏側化因子*ETT/AF3*のgene body DNAメチル化維持に関わる、第59回日本植物生理学会年会 (2018)
 2. 町田泰則、ほか5名：Zinc-finger様タンパク質であるAS2は*ETT/ARF3*遺伝子のコード領域にあるCpGリピートに結合する、第59回日本植物生理学会年会 (2018)
 3. 町田泰則：葉形成に関わるepigenetic因子AS2の核顆粒と核への局在におけるzn-finger-様motifの領域の役割、第40回日本分子生物学会年会 (2017)

4. 高橋広夫、ほか5名：シロイヌナズナの葉の細胞分化と分裂の制御機構の解明における発現解析データのデータマイニングの方法の開発、第39回日本分子生物学会年会（2016）
5. Yasunori Machida, ほか10名: The nucleolus and plant-specific nuclear protein complex AS1-AS2 play a critical role in establishment of the dorso-ventral polarity of Arabidopsis leaves, 第39回日本分子生物学会年会（2016）
6. 町田泰則、ほか9名：シロイヌナズナの葉の極性確立におけるAS1-AS2複合体と核小体の役割、日本植物学会第80回大会(2016)
7. 町田千代子、ほか6名：Epigenetic regulator AS1-AS2 and modifiers control the level of DNA methylation of the ETTIN locus in establishment of leaf adaxialabaxial polarity in Arabidopsis thaliana, 第57回日本植物生理学会年会（2016）
8. 高橋広夫、ほか4名：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）
9. 町田千代子、ほか5名：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）
10. 町田泰則：植物に特徴的な細胞分裂の分子機構の研究、2015年日本植物生理学会賞・受賞講演（2015）
11. 町田千代子、ほか5名：シロイヌナズナの葉の向背軸分化に関わるAS2タンパク質の分裂期における核小体周縁部局在の解析、第37回日本分子生物学会年会（2014）

ほか 36 件

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ジェミニウイルス病の防御に有効なペプチドとその利用法

発明者：町田泰則、他4名

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2017/026196

出願年月日：2017年7月20日

国内外の別：国内・国外

〔その他〕

ホームページ等

発生メカノセルバイオロジー

（<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~yas/dmcb/index.jp.html>）

伊藤研究室

（https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~bunka/ito_title%20page.html）

高橋研究室

（<https://www.takahashi-lab.com/>）

町田千代子研究室

（https://www3.chubu.ac.jp/faculty/machida_chi_yoko/）

6. 研究組織

(1)研究代表者

町田 泰則（MACHIDA Yasunori）

名古屋大学・大学院理学研究科・研究員

（名誉教授）

研究者番号：80175596

(2)研究分担者

伊藤 正樹（ITO Masaki）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10242851

高橋 広夫（TAKAHASHI Hiroo）

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授

授

研究者番号：30454367

渡邊 雄一郎（WATANABE Yuichiro）

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：60183125

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