

2017 年度博士論文

シロイヌナズナの AS1-AS2 が関わる葉の軸形成における
DNA 複製因子の役割の解明

指導教授 町田 千代子

中村 研三

大塚 健三

中部大学大学院 応用生物学研究科

応用生物学専攻博士後期課程

GR12807 LUONG QUY TOAN

目次

要旨.....	1
序論	
1. 葉の発生分化	9
2. 葉原基からの葉の発生分化モデル	9
3. 葉の発生分化に関わる遺伝子群	10
4. <i>AS1</i> 、 <i>AS2</i> に制御される葉の分化に関わる遺伝子群	11
5. 葉の向背軸形成における <i>AS1</i> 、 <i>AS2</i> 遺伝子による <i>ETT/ARF3</i> と <i>ARF4</i> の発現抑制	12
6. 葉の向背軸分化において <i>AS1</i> 、 <i>AS2</i> と協調的に働く modifier 因子	13
第 1 章 hydroxyurea 処理によるシロイヌナズナの葉の表現型解析	
1. hydroxyurea を処理したシロイヌナズナの生育について	15
2. hydroxyurea を処理したシロイヌナズナの葉の形態の解析	16
3. FILp:GFP を用いた、hydroxyurea の存在下におけるシロイヌナズナの棒状葉の性質の解析	17
4. まとめ	18
第 2 章 <i>AS1</i> 、 <i>AS2</i> 遺伝子に関わる葉の向軸側分化における <i>INCURVATA 2</i> の役割の解析	
1. <i>as1-1 icu2-1</i> 二重変異体、 <i>as2-1 icu2-1</i> 二重変異体の表現型解析	21

2. <i>as2-1 icu2-1</i> 二重変異体における葉の形成に関わる遺伝子の発現解析	22
3. まとめ	23
第3章 <i>AS2</i> 、 <i>AS1</i> 遺伝子に関わる葉の向軸側分化における <i>RFC3</i> の役割の解析 <i>as1-1 rfc3-1</i> 二重変異体、 <i>as2-1 rfc3-1</i> 二重変異体の表現型解析	24
考察	26
図表	29
材料と方法	38
謝辞	41
引用文献	42

要 旨

植物の葉は茎頂メリステムから分化する地上部の主要な器官である。植物の葉の向軸側（表側）領域と背軸側（裏側）領域の細胞は、それぞれ異なる性質を持つ。向軸側の細胞はトライコームが多く内部の細胞層は最大限に集光し光合成ができるように多くの葉緑体が配向している。背軸側の細胞は気孔が多く、内部の細胞層はガス交換に適した構造が形成されている。それぞれの領域が正常に機能する細胞に分化するには葉の初期の向背軸分化が規則正しく行われることが重要である。葉の発生・分化は、茎頂メリステムにおける葉原基の形成から始まる。まず、葉原基になるべき細胞が決定され、最初に隆起した突起状の葉原基は背軸側的性質を保持していると考えられている。次に、葉原基の細胞うちメリステムに近い側の細胞が、向軸側の性質を持つ細胞に分化する。さらに、向軸側の性質を持った細胞群と、背軸側の性質を持った細胞群の境界面において活発な細胞増殖を繰り返し、中央側方軸方向と基部先端部軸方向の分化が進行し、最終的に扁平で左右相称の葉が形成されると考えられる。これまでの町田研の研究から、向軸側の細胞では、背軸側領域の性質形成に関わる遺伝子群（背軸側化遺伝子群）の発現抑制制御、特に *AS1-AS2* による *ETT/ARF3*（以後 *ETT* と記述する）への抑制制御が重要であることが分かった。*AS1*、*AS2* が *ETT* を直接的に（TGS）また、*ETT* を small RNA による転写後に間接的に抑制し（PTGS）、さらに *ETT* 遺伝子の gene body の DNA メチル化に関わっており

ETT に対するエピジェネティックな制御も行うことが、町田研の研究により明らかになった。しかし、*AS1-AS2* が関わる *ETT* への抑制が、いつ、どこで確立され、また確立後の抑制機構がどのように維持されるのか等については、まだ明らかになっていない。一方、*as1* または *as2* 変異体にもう一つの特定の遺伝子の変異を導入すると、背軸的性質をもった棒状の葉やラッパ状の葉が観察されるようになる。このような特定遺伝子のことは *modifier* 遺伝子と呼ばれている。これらの二重変異体では、*ETT* の発現レベルがそれぞれの単独変異体のそれよりも高いこと、*as1* または *as2* と *modifier* 遺伝子の変異との二重変異体に *ett* の変異を導入すると、棒状葉やラッパ状の葉の形成が抑圧されることが町田研の研究より明らかになった。これらの解析結果より、*ETT* の発現上昇が棒状葉やラッパ状の葉の形成に関係していることが明らかになった。このように、背軸的性質を持った棒状やラッパ状の葉は、葉の向軸側領域を形成していく性質を持つ細胞における *ETT* への抑制制御に異常が起こったことによる表現型と考えられる。これまで、*AS1*、*AS2* とともに *ETT* への抑制制御に関わる様々な *modifier* 遺伝子の存在が報告された。Small RNA の生合成経路に関わる因子、リボソームの機能に関わる因子、細胞増殖に関わる因子などがそれである。さらには、DNA 複製の一環としてのクロマチン再編、クロマチン構造の修飾、DNA の修復などに関わる因子も、*modifier* 因子として同定された。しかし、これらの *modifier* 因子は、DNA 複製が行われる過程において働くものではあるが、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)の生成に基づく娘鎖の合成に

は関わっていないため、DNA 複製反応そのものではない。本研究は、DNA 複製反応そのものに関わる複数の遺伝子の中から、AS1-AS2 が関わる葉の向背軸分化において modifier 因子として働く遺伝子を同定することを研究目的とする。

AS1-AS2 が関わる葉の初期の向背軸分化における DNA 複製反応そのものの関与について調べるために、まず、DNA 複製を阻害する hydroxyurea を用いた植物の表現型を解析した。hydroxyurea はリボヌクレオチドレダクターゼ阻害により細胞内 dNTP 含量、特にプリン体 (dATP, dGTP) 含量を低下させ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸の生成に基づく DNA 合成を阻害する低分子化合物である。hydroxyurea を含んだ培地で育てた 21 日目のシロイヌナズナの野生型、*as1* 変異体、*as2* 変異体植物の表現型を観察し、それらの定量化を行った。第一に、hydroxyurea を含んだ培地で育てた植物から、本葉が形成されなかった表現型と、棒状の葉が形成された表現型が観察された。第二に、背軸側領域に特異的に発現する *FIL* 遺伝子のプロモーターに GFP をつないだ形質転換植物から形成された棒状の断面切片を作製し、*FILp:GFP* の発現領域を調べた。その結果、*FILp:GFP* が葉の向軸側だったはずの領域においても発現していることから、棒状の葉は、背軸側領域の性質を持っていることが分かった。第三に、野生型と、*as1* または *as2* 変異体における本葉形成不全、及び棒状葉形成の表現型を定量化した結果、野生型では本葉が形成された hydroxyurea の濃度 6 mM を用いた場合に、ほとんどの *as1* または *as2* 変異体植物では本葉が形成されなくなった。野生型で棒状の葉が形成された hydroxyurea の濃度より低い濃度で *as1* または *as2* 変

異体において、棒状の葉が高頻度で形成された。これらの結果から、*as1* または *as2* 変異体における *hydroxyurea* に対する感受性が野生型のそれより高いこと、また *AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化が正常に行われるには、DNA 複製反応が正常に進行することが重要であることが分かった。

DNA 複製反応そのもの、またその反応の進行に関わる因子が *AS1*、*AS2* が関わる葉の初期の向背軸分化にどのように関与しているのかについて調べるために、私は、DNA ポリメラーゼ α のサブユニットをコードする *INCURVATA2 (ICU2)* 遺伝子の変異と *as2* との二重変異体の解析を行った。DNA ポリメラーゼ α は、DNA 複製の最初のおよそ 20 塩基を合成する DNA 合成酵素である。また、*RFC3* (*Replication Factor C* の 3 番目のサブユニット) の変異と *as1* または *as2* との二重変異体についても解析を行った。第一に、*as1-1 icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 二重変異体の表現型解析より、頻度は低いものの、野生型やそれぞれの単独変異体では見受けられなかった棒状の葉とその弱い表現型としてのラップ状の葉が観察された。第二に、リアルタイム RT-PCR の解析より *as2-1 icu2-1* 二重変異体における *ETT* の mRNA の転写蓄積量がそれぞれの単独変異体より高いことが分かった。この解析結果から、*as2-1 icu2-1* 変異体で形成された棒状の葉やラップ状の葉は、今まで報告された *as2-1* と *modifier* 遺伝子の変異との二重変異体で見られた棒状やラップ状と共通して、*ETT* と *ARF3* の発現レベルの上昇が関係していると考えられる。*as2-1 icu2-1* 二重変異体で形成された棒状の葉やラップ状の葉もおそらく背軸側領域の性質を持っており、向軸側の分化不全が原因であると考え

えられる。第三に、*as1-1 rfc3-1* 及び *as2-1 rfc3-1* 二重変異体を作成し、葉の表現型解析より、頻度は低いものの、棒状の葉を持つ植物体が観察された。このように、DNA 複製反応そのものに必要である *ICU2* と *RFC3* 遺伝子は、*AS1* または *AS2* との間に遺伝学的な相互作用が認められた。DNA 複製反応に関わるこれらの因子は、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化に関わる modifier 因子としての性質を持っていることが示唆された。

DNA の娘鎖の合成に必要な遺伝子である *ICU2* 及び *RFC3* の変異と *as1* または *as2* との二重変異体を用いた遺伝学的解析より、*ICU2* 及び *RFC3* の変異が、*as1* または *as2* の遺伝背景を持つ植物体における葉の向背軸分化の異常を亢進することが示唆された。したがって、*ICU2* 及び *RFC3* が正常に働くことが、葉の向背軸分化にとって重要であると考えられる。DNA の娘鎖の合成に関わる他の遺伝子についても、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化に関与するかどうか、今後、調べる必要がある。では、*ICU2* と *RFC3* 遺伝子が、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化にどのように関与しているだろうか。我々の過去の研究より、扁平で左右相称な葉の形成には、向軸側領域の確立における *ETT/ARF3* 及び *ARF4* の発現への抑制が重要とである事が示されている。*icu2-1* 変異体では、*AS1-AS2* の標的遺伝子である *ETT/ARF3* の発現量が野生型のそれより上昇し、*as2-1 icu2-1* 二重変異体においては、さらに上昇した。このことから、*ETT/ARF3* が、葉の向背軸分化が行われる際における *AS1-AS2* との共通の抑圧ターゲットであることが示唆された。では、*AS1-AS2* との共通の抑圧ターゲットである *ETT/ARF3* の

発現への抑制には、**modifier** 因子としての *ICU2* と *RFC3* 遺伝子がどのように関わっているだろうか。AS1-AS2 は *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG サイトの維持型メチル化に関わっており、*ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御による発現調節を行っていることが示唆されている。*ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御による発現調節には *MET1* も関わっていることが報告されている。*MET1* は哺乳類の維持型メチル化酵素 (DNMT1) のホモログとしてシロイヌナズナで同定され、DNA 複製を介した CpG 部位の維持メチル化を担っている。*MET1* の変異体では、*ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位のメチル化が消えていること、茎頂メリステムにおける *ETT/ARF3* の転写蓄積量が上昇することも報告されている。これまでに DNA 複製に伴う CpG 部位のメチル化パターンの維持に関する分子機構の研究が動物においてなされてきた。DNA 維持型メチル化には、DNA 複製タンパク質 *LIG1*、*UHRF1*、*DNMT1* が必須である。*LIG1* は複製において、ラギング鎖合成時の岡崎フラグメントの連結を担う重要な複製関連因子であり、*PCNA* と複合体を形成して機能する。*LIG1* が N 末端側の領域にヒストン H3 様の配列をもち、G9a-GLP 複合体によりメチル化される。*LIG1* は、N 末端に DNA 複製に中心的な役割をもつ *PCNA* との結合ドメインをもつ。*PCNA* と結合することにより複製フォークに局在する *LIG1* は、そのメチル化に依存して *UHRF1* を複製フォークへとリクルートする。*UHRF1* は、その SRA ドメインにより DNA 複製後に生じたヘミメチル化サイトを認識して、また、ユビキチン化リガーゼとしての活性をもつ RING finger によ

り近傍のヒストン H3 をユビキチン化する。DNMT1 はその RFTS 領域によりユビキチン化ヒストン H3 を認識することで、ヘミメチル化サイトに集積し、新生鎖 DNA をメチル化する。これらのことから、DNA 複製と DNA の維持メチル化が一連の分子反応として、共役する可能性が示唆されている。また、DNA 複製タンパク質である LIG1 が、この DNA 複製に伴う DNA 維持メチル化にも関与することは興味深いのである。一方、*ICU2* と *RFC3* 遺伝子は、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも携わる一側面を呈示する報告もなされている。*ICU2* と、動物や酵母の HETEROCHROMATIN PROTEIN1 のオーソログをコードする *TERMINAL FLOWER2*、または Polycomb group (PcG) 遺伝子である *CURLY LEAF* との間には遺伝学的相互作用が観察された。また、FLC 領域及び PRC2 の他のターゲットなどにおける抑制性ヒストン修飾である H3K27me3 維持の安定化、ヘテロクロマチン・レトロエレメントにも関わっている。*ICU2* のこうしたエピジェネティックな機能より、*icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 変異体では、*ETT/ARF3* への発現抑制が行われないと考えられる。しかし、*ETT/ARF3* のプロモータ領域や AS1-AS2 の結合サイト、或いは少なくともそのコード配列には H3K27me の濃縮が検出されていない。一方、AS1-AS2 は *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位の維持メチル化に関わっている。*ICU2* も AS1-AS2 とともに *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位の維持型メチル化に関わる可能性が考えられる。今後明らかにする必要がある。さらに、シロイヌナズナにおける *ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御においても、その制御は、

DNA 複製と DNA 維持メチル化という一連の分子反応が進行している過程で確立される可能性が考えられる。このようなエピジェネティックな制御における AS1-AS2 の分子的役割についても明らかにする事が重要であろう。

序論

1. 葉の発生分化

高等植物の葉は、茎頂分裂組織（茎頂メリステム、shoot apical meristem; SAM）と呼ばれる幹細胞的性質をもつ未分化な細胞塊から葉原基として発生し、その後、3つの軸、すなわち基部先端部軸（proximal-distal axis）、向背軸（adaxial-abaxial axis）、中央側方軸（medial-lateral axis）に沿った細胞分化と細胞分裂を経て成長していく地上部の中心的な器官である。双子葉植物の葉は、多様な形をしているが、その基本的な形態は、扁平で左右相称的である（Hickey 1973, 1979; Sinha 1999）。基本的に、双子葉植物の葉は、扁平で左右相称の形質をもち、この形質は進化の過程で保存されてきたと考えられる。このような形態は、おそらく葉の本来の機能を最大限に発揮するためだと考えられる。すなわち、扁平な葉は一般的に向軸側（表側）領域と背軸側（裏側）領域の細胞からなり、それぞれ異なる働きを持っている。向軸側の細胞は、トライコームが多く暗緑色をしており、内部の細胞層は最大限に集光し、光合成ができるように多くの葉緑体が配向している。背軸側は、気孔が多く明るい緑色をしており、内部の細胞層はガス交換に適した構造が形成される。このように、向背軸のそれぞれの領域の細胞が正常に機能するには、葉の初期の向背軸分化が規則正しく行われることが重要である。

2. 葉原基からの葉の発生分化モデル

茎頂メリステムは中心部（central zone; CZ）と周辺部（peripheral zone; PZ）か

らなる。葉原基は分裂さかんな周辺部 (PZ) の細胞から発生し、隆起した放射対称な突起として現れる。この葉原基は、背軸側的な性質を持つと考えられている。次に、葉原基のメリステムに近い側の細胞群が、向軸側の性質をもつ細胞に分化する。そして、向軸側の性質を持った細胞群と、背軸側の性質を持った細胞群の境界面において活発な細胞増殖が起こり、葉の基部から先端部軸方向へ分裂・伸長するとともに、中央の軸から両側方へ向かって分裂・伸長し、扁平で左右相称な葉が形成されると考えられている。(Waites and Hudson 1995; Waites et al. 1998; Tsukaya 2006; Iwakawa et al. 2007; Moon and Hake 2010; Szakonyi et al. 2010)

3. 葉の発生分化に関わる遺伝子群

葉原基形成の初期段階では、茎頂メリステムの中心部とその周辺部で発現する class 1 *KNOTTED*-like homeobox (*KNOX*) 遺伝子である *BREVIPEDICELLUS* (*BP*) / *KNAT1*、*KNAT2*、*KNAT6* 及び *SHOOT-MERISTEMLESS* (*STM*) の発現を負に制御することで、茎頂メリステムの幹細胞的性質を抑制し、分化に向かわせる調節機能をもつと考えられている。(Lincoln et al. 1994; Long et al. 1996; Byrne et al. 2000; Ori et al. 2000; Semiarti et al. 2001; Hake et al. 2004; Iwakawa et al. 2007; Gou et al. 2008; Ikezaki et al. 2010; Ishibashi et al. 2011; Kojima et al. 2011)。

葉原基における向背軸の決定に関わる遺伝子は数多く報告されている。Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III) ファミリーの3つの遺伝子、*PHABULOSA* (*PHB*)、*PHAVOLUTA* (*PHV*)、及び *REVOLUTA* (*REV*) はいずれも葉の向軸側領域で発現し、向軸側化を正に制御する遺伝子であると考えられ

ている (McConnel and Barton, 1998; McConnel et al. 2001; Emery et al. 2003)。これらの遺伝子は、低分子 RNA である microRNA165 (miR165) 及び miR166 による転写後制御 (post-transcriptional gene silencing: PTGS) を受けて、その転写産物が分解されることで、発現領域が葉の向軸側だけに特定されていると考えられている (Bao et al. 2004; Mallory et al. 2004)。PHB、PHV 及び REV 遺伝子の機能獲得変異体では、向軸側化した棒状やラッパ状の葉を形成する (McConnel et al. 2001; Emery et al. 2003; Mallory et al. 2004; Zhong and Ye. 2004)。

一方、YABBY ファミリーに属する *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)*、*YABBY3*、及び *YABBY5* 遺伝子、*KANADI* ファミリーに属する *KAN1*、*KAN2*、*KAN3* 及び *KAN4* 遺伝子は背軸側の細胞運命の決定に関与すると考えられている (Bowman and Smyth 1999; Sawa et al. 1999; Siegfried et al. 1999; Eshed et al. 2001; Kerstetter et al. 2001; Kumaran et al. 2002; Eshed et al. 2008; Sarojam et al. 2010)。これらに加えて、互いに冗長的に機能するとされる *ETTIN (ETT)/AUXIN RESPONSE FACTOR3 (ARF3)*、*ARF4* が葉の背軸側化の因子として機能している (Pekker et al. 2005)。*ETT/ARF3* と *ARF4* は、*tasiR-ARF* と呼ばれる低分子 RNA である trans-acting siRNA (ta-siRNA) による PTGS を受けて、発現領域が背軸側だけに限定されていると考えられている (Montgomery et al. 2008; Chitwood et al. 2009; Schwab et al. 2009)。

4. *AS1*, *AS2* に制御される葉の分化に関わる遺伝子群

これまでの研究より、*AS1* と *AS2* は葉の初期分化過程において、複数の遺伝子を転写制御することにより葉の分化を制御することが分かった。葉原基形成の初期段階では、茎頂メリステムの中心部とその周辺部で発現する class 1

KNOTTED-like homeobox (*KNOX*) 遺伝子である *BREVIPEDICELLUS* (*BP*) / *KNAT1*、*KNAT2*、*KNAT6* 及び *SHOOT-MERISTEMLESS* (*STM*) の発現を負に制御することで、茎頂メリステムの幹細胞的性質を抑制し、分化に向かわせる調節機能をもつと考えられている。(Lincoln et al. 1994; Long et al. 1996; Byrne et al. 2000; Ori et al. 2000; Semiarti et al. 2001; Hake et al. 2004; Iwakawa et al. 2007; Gou et al. 2008; Ikezaki et al. 2010; Ishibashi et al. 2011; Kojima et al. 2011)。このうち、*BP*、*KNAT2* 及び *KNAT6* 遺伝子の転写は、*AS1*、*AS2* により制御されることが示されている (Byrne et al. 2000; Ori et al. 2000; Semiarti et al. 2001)。*BP*、*KNAT2* 遺伝子は、複合体を形成した *AS1* と *AS2* タンパク質によって直接的に制御される (Gou et al. 2008)。また *AS1*、*AS2* による *BP*、*KNAT2* 及び *KNAT6* 遺伝子の転写抑制制御が、*as1*、*as2* 変異体で見られた多面的な表現型に関わることが明らかとなっている (Ikezaki et al. 2010)。特に、基部先端部軸の伸長に関わる事が明らかになっている (Ikezaki et al. 2010)。また、葉の向背軸分化において、*AS1*、*AS2* は葉原基形成過程で、*ETT/ARF3*、*ARF4*、*KAN2* 及び *YAB5* 遺伝子の転写抑制において直接的または間接的に関わることを示されている (Iwakawa et al. 2007; Iwasaki et al. 2013)。このうち、*AS1*、*AS2* が *ETT/ARF3* と *ARF4* の発現を負に制御することが特に重要であることが明らかになった (Iwasaki et al. 2013)。

5. 葉の向背軸形成における *AS1*、*AS2* 遺伝子による *ETT/ARF3* と *ARF4* の発現抑制

上述したように、背軸側的な性質を持った葉原基が、向軸側的な性質を持つ細胞に分化する際、*AS1*、*AS2* が *ETT/ARF3* と *ARF4* の発現を負に制御すること

が特に重要であることが明らかになった (Iwasaki et al. 2013)。AS1 と AS2 は複合体を形成し、*ETT* のプロモーター領域に結合することにより、*ETT* の発現を直接的に抑制する (Iwasaki et al. 2013)。また、*AS1*、*AS2* は micro RNA 390 を介して、tasiR-ARF による *ETT* 及び *ARF4* メッセンジャーRNA の分解を制御することで、*ETT* と *ARF4* の発現を転写後に間接的に抑制する (Allen et al. 2005; William et al. 2005; Fahlgren et al. 2006; Hunter et al. 2006; Nogueira et al. 2006; Nogueira et al. 2007; Schwab et al. 2009; Chitwood et al. 2009)。さらに、*AS1*、*AS2* は *ETT* 遺伝子の gene body の DNA メチル化にも関わっており、*ETT* のエピジェネティックな制御にも関わることが示唆された (Iwasaki et al. 2013)。しかし、*AS1*、*AS2* が関わる *ETT* と *ARF4* の抑制がいつ、どこで、確立されるのか、また確立後の抑制機構がどのように維持されるの等についてはまだ明らかになっていない。

6. 葉の向背軸分化において *AS1*、*AS2* と協調的に働く modifier 因子

葉の向軸側分化には、*AS1*、*AS2* 遺伝子だけでなく、これらと協調的に働く複数の遺伝子群が関わるということが明らかになりつつある。*as1* または *as2* 変異体背景で *as1*、*as2* 変異体の葉の向背軸極性の異常を亢進する変異体として多数同定されている (Ori et al. 2000; Xu et al. 2003; Li et al. 2005; Phelps-Durr et al. 2005; Garcia et al. 2006; Huang et al. 2006; Xu et al. 2006; Yang et al. 2006; Ueno et al. 2007; Pinon et al. 2008; Yao et al. 2008; Horiguchi et al. 2011; Ishibashi et al. 2012; kijoma et al. 2011; Szakony and Byrne 2011; Xu et al. 2012; Machida et al., 2015; Matsumura et al.,

2016)。我々の過去の研究より *BOB/EAL*、*ELO3*、*FAS2* が同定された (Kojima et al. 2011; Ishibashi et al. 2012 ; Ishibashi et al. 2013)。*as1* または *as2* 変異体にこれらの遺伝子の変異を導入すると、それぞれの単独変異体では見られない背軸側的な性質を持つ棒状やラップ状の葉が形成されるとともに、*ETT* と *ARF4* の発現上昇も認められた。さらに、その後の遺伝学的解析から、棒状葉やラップ状葉の表現型が *ETT*、及び *ARF4* の変異の導入により、抑圧されることも分かった (Iwasaki et al. 2013; Takahashi et al. 2013; Matsumura et al. 2016)。これらの結果より、*BOB/EAL*、*ELO3*、*FAS2* は、*AS1*、*AS2* と協調的に *ETT* の発現を抑制することで、葉の向軸側分化に関わると考えられる。このような遺伝子は、*AS1-AS2* と共に機能し、葉の向軸側分化に関わる **modifier** 因子と呼ばれている。上述した *BOB/EAL*、*ELO3*、*FAS2* 以外にも、様々な **modifier** 遺伝子の存在が報告された。Small RNA の生合成経路に関わる因子、リボソームの機能に関わる因子、細胞増殖に関わる因子などがそれである。さらには、DNA 複製の一環としてのクロマチン再編、クロマチン構造の修飾、DNA の修復などに関わる因子も、**modifier** 因子として同定された。しかし、これらの **modifier** 因子は、DNA 複製が行われる過程において働くものではあるが、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) の生成に基づく娘鎖の合成には関わっていないため、DNA 複製における合成反応そのものに関わる因子ではない。

本研究は、DNA 複製反応そのものに関わる複数の遺伝子の中から、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化において **modifier** 因子として働く遺伝子を同定することを研究目的とする。

第 1 章

hydroxyurea 処理によるシロイヌナズナの葉の表現型解析

DNA 複製反応が *AS1*、*AS2* が関わる葉の向軸側分化に関与するかどうかを調べるために、まず、DNA 複製の阻害剤として知られる hydroxyurea を含んだ培地で育てたシロイヌナズナの野生型、*as1-1* 変異体、*as2-1* 変異体の葉の表現型解析を行った。

1. Hydroxyurea を処理したシロイヌナズナの生育について

hydroxyurea を含んだ培地で育てた植物は、野生型、*as1-1* 変異体、*as2-1* 変異体のいずれにおいても、濃度依存的に生育阻害が起こり、高濃度の hydroxyurea を含む培地で生育すると、個体の大きさや葉の大きさが小さくなる等厳しい生育阻害を受けた表現型を示した (図 1 A)。hydroxyurea によるこのような生育阻害は、berberine を含んだ培地で育てた時に見られたのに類似している (Nakagawa et al. 2012)。

では、hydroxyurea による生育阻害は、野生型と *as1* または *as2* との間に顕著な差が出るだろうか。これを調べるために、野生型と *as1-1*、*as2-1* 各植物を 1 ~ 10 mM の hydroxyurea を含んだ培地に播種し、22°C の人工気象器で生育させ、1 4 日目の植物体の本葉形成について定量化をした。

Hydroxyurea の濃度が 1 ~ 4 mM までは、野生型と *as1-1*、*as2-1* の植物はいずれも 90% 以上の割合で本葉が形成された。5 mM では、野生型は 90% 以上の割合を維持したが、*as1-1*、*as2-1* 変異体はそれぞれ 60%、70% ぐらいまで激減し

た (図 1 B)。

また、hydroxyurea の濃度が 6 mM になると、本葉が形成された植物体は、野生型でも 70% ぐらいまで減った。一方、*as1-1*、*as2-1* 変異体では本葉が形成された植物体がほとんど観察されなくなった (図 1 B)。

8 mM では野生型、*as1-1*、*as2-1* 変異体をとわず、ほとんどの植物体において本葉が形成されなかった (図 1 B)。

このように、本葉が形成された植物体の減少を hydroxyurea による生育阻害の指標として用いたこの実験の結果によれば、その阻害効果は hydroxyurea の濃度が 5 mM から初めて観察された。また、この濃度から、野生型と *as1-1*、または *as2-1* 変異体との間で、その阻害効果について有意の差が認められたが、6 mM で顕著な差が観察された。この結果から、*AS1*、*AS2* のなんらかの機能が、Hydroxyurea による生育阻害を軽減するのに必要であると考えられた。

2. Hydroxyurea を処理したシロイヌナズナの葉の形態の解析

Hydroxyurea を含んだ培地で育てた植物のもう一つの表現型として、一定の濃度範囲では、棒状葉が形成された個体が観察された。この表現型について定量化をしたところ、hydroxyurea を含んだ培地で育てた 21 日目の植物は、野生型の場合には、その濃度が 1~3 mM までは、棒状葉が形成された個体は観察されなかった。しかし hydroxyurea の濃度が 4 mM、5 mM、6 mM の時、棒状葉が形成された個体がそれぞれ 1%、9%、25% の頻度で観察された (図 1 C)。この結果から、野生型の植物においても hydroxyurea の濃度が高くなると、棒状葉が形成される個体が生じことが示された。

一方、*as1-1*、*as2-1* 変異体では、hydroxyurea 濃度が 3 mM という、野生型のそれより低い濃度でも、それぞれ 8%、19%の頻度で棒状葉をもつ個体が観察された。また、4 mM と 5 mM において、*as1-1* はそれぞれ 26%と 34%、*as2-1* はそれぞれ 38%と 46%という、野生型より高い頻度で棒状葉が形成された個体が観察された。6 mM の hydroxyurea を含んだ培地で育てた *as1-1*、*as2-1* 変異体はほとんどの植物体において本葉形成が観察されなかったことから、棒状葉が形成された個体の定量化は不可能であった (図 1 C)。

以上のように、本葉不形成及び棒状葉形成の定量結果から、*as1* または *as2* 変異体における hydroxyurea に対する感受性が野生型のそれより高いことが示された。

3. *FILp:GFP* を用いた、hydroxyurea の存在下におけるシロイヌナズナの棒状葉の性質の解析

さらに、*as1-1*、*as2-1* 変異体で観察された棒状の葉は、背軸側的な性質を持っているかどうかを調べるために、背軸側領域に特異的に発現する *FIL* プロモーターを *GFP* 遺伝子に融合した *FILp:GFP* が導入された形質転換の *as1*、*as2* 植物から形成された棒状の断面切片を作製し、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて、*FILp:GFP* の発現領域を調べた。野生型の葉原基は、扁平な形をして、*FILp:GFP* はその背軸側の領域でしか発現しない (Watanabe and Okada. 2003)。しかし、hydroxyurea を含んだ培地で育てた *as1-1*、*as2-1* 変異体から形成された棒状葉は、*GFP* のシグナルが外側の一層を形成する表皮細胞の領域に検出された (図 1 D)。すでに報告された *as2-1 fas2-1*、*as2-1 rh10-1* 等のような、*as1* また

は *as2* と *modifier* 因子との二重変異体においても、同様の *GFP* シグナルが検出されたため、その棒状葉は、背軸側的な性質を持っていることが認められている。したがって、*hydroxyurea* を含んだ培地で育てた *as1*、*as2* 変異体から形成された棒状葉は、背軸側的な性質を持っていると考えられた。

4. まとめ

以上のように、*hydroxyurea* を含んだ培地で育てた植物は、一定の濃度範囲において、本葉が形成されなくなり、形成された葉の一部は、棒状化した形態を示すなど、通常では見られない異常な表現型を示した。*Hydroxyurea* が、DNA 複製を阻害する低分子化合物であるため、これらの異常な表現型は *hydroxyurea* 処理によってもたらされた DNA 複製の異常による可能性がと考えられた。また、これらの異常な表現型をもつ個体の出現頻度は、野生型と *as1-1* または *as2-1* との間で有意な差が認められた (図 1 B, 1 C)。このことから、DNA 複製に異常が生じた際、もし *AS1* または *AS2* の機能が欠損すると、葉の異常な表現型が *AS1* または *AS2* の機能が正常である時と比べて、より生じやすいということが示唆された。さらには、*hydroxyurea* を含んだ培地で育った *as1-1* または *as2-1* 変異体から形成された棒状葉は背軸側的な性質を持っていることから、*as1* または *as2* 変異体で生じた DNA 複製の何らかの異常が、葉の向背軸分化に異常をきたす可能性があることが示唆された。換言すれば、葉の向背軸分化が行われる際には、DNA 複製過程と、*AS1*、*AS2* が関わる葉の向背軸分化の間には、強い関連性があると考えられる。なお、*hydroxyurea* の処理によって生じた DNA 複製の異常による棒状葉の形成は、*as1* または *as2* の変異体においても、3 mM 以上という濃

度が高い条件のもとで生じたため、葉の向背軸分化の異常による棒状葉の形成は容易に起こることはないことが示唆された。すなわち、*as1* または *as2* の変異体においても、DNA 複製の異常が多少生じても、棒状葉が簡単に形成されないように、葉の向背軸分化が正常に行われることが高度に保障されているように見える。

第 2 章

AS1、*AS2* 遺伝子が関わる葉の向軸側分化における *INCURVATA2* の役割の解析

(*as1-1 icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 二重変異体について)

DNA 複製を阻害する低分子化合物である hydroxyurea 処理によるシロイヌナズナの葉の表現型解析より、*AS1*、*AS2* 遺伝子が DNA 複製が行われる過程において何らかの役割を果たして、葉の向軸側分化に関与する可能性が示された。この可能性を遺伝学的に検証するためには、DNA 複製に関わる因子の変異体と、*as1* または *as2* との二重変異体を作製し、その二重変異体における葉の向軸側分化の異常に関する解析を行う必要がある。DNA 複製機構で働く DNA 複製因子は数多く同定されている。しかし、hydroxyurea は、リボヌクレオチドレダクターゼの阻害剤であり、細胞内 dNTP 含量、特にプリン体 (dATP、dGTP) 含量を急激に低下させ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸の生成に基づく DNA 合成を阻害する低分子化合物であることが知られている。一方、DNA の複製は、複製開始、複製伸張反応、複製後の DNA メチル化の維持、ヒストンの修飾状態の維持等の一連の反応が行われている。そこで、さらに、DNA 複製過程で起こる一連の事象の中のどれが、*AS1*、*AS2* 遺伝子が関わる葉の向背軸分化と関係があるのかを明らかにするために、まず DNA 複製に関わる因子群から、*AS1*、*AS2* による葉の向軸側分化と関係がある因子を同定し、次に葉の向背軸分化におけるこれらの因子の役割や *AS1*、*AS2* との関わり等を解析する必要があると考えた。

1. *as1-1 icu2-1* 二重変異体、*as2-1 icu2-1* 二重変異体の表現型解析

本研究は、まず DNA 複製機構で働く DNA ポリメラーゼの中で、プライマーゼと複合体を形成し、新生 DNA 鎖の合成開始を司ることができる唯一の酵素である DNA ポリメラーゼ α に着目し、DNA ポリメラーゼ α をコードする遺伝子が *AS1*、*AS2* 遺伝子が関わる葉の向軸側分化に関与するかどうかについて調べた。

INCURVATA2 (ICU2) は、*Arabidopsis thaliana* の DNA polymerase α の触媒サブユニットをコードする遺伝子である。本研究では、*icu2-1* 変異体を用いて、*as1-1* または *as2-1* との二重変異体の解析を行った。*icu2-1* 変異体は、第 24 番エキソン内のシトシンがチミンに一塩基置換しており、1273 番のアルギニンがシステインに置換しているミスセンス変異体である。*icu2-1* 変異体は以下のような多面的な表現型を示すことが報告されている (Barreno *et al.* 2007)。ロゼット葉は、野生型に比べてやや小さく、左右非対称となり、扁平さが失われてカールする。また側枝の数が増え、花では一部のがく片が心皮に、花弁が雄蕊に変わる表現型が見られる。さらに野生型の *Enkheim-2 (En-2)* エコタイプに比べ、開花と抽だいが早くなり、ロゼット葉の枚数が減少する (Barreno *et al.* 2007)。この他に葉身の幅が細くなり、葉の上向きカールも観察される。*as1-1 icu2-1* または *as2-1 icu2-1* 二重変異体では、植物体が矮小化し、葉柄の長さが短くなる傾向を示した (舟橋、未発表データ)。またこれらの二重変異体では、初期の葉において頻度は低いものの、ラッパ状と棒状といった異常な表現型を示す葉が観察された (図 2)。各二重変異体におけるこれらの異常な表現型の葉が形成される個体の出現頻度は表 1 をまとめた (表 1)。ラッパ状と棒状の葉は、野生型と、*as1-1*、*as2-1* 及び *icu2-1* 単独変異体では観察されなかったことから、*as1-1 icu2-1* 二重変異体、

as2-1 icu2-1 二重変異体では、これら単独変異体の表現型異常が亢進されたことが示唆された。

2. *as2-1 icu2-1* 二重変異体における葉の形成に関わる遺伝子の発現解析

また、播種後 15 日目の幼植物体の茎頂部から total RNA を精製し、これを鋳型として合成した cDNA を用いて、class 1 *KNOX* 遺伝子群と向背軸遺伝子群の転写産物の蓄積を定量的リアルタイム RT-PCR 法により調べた。Class 1 *KNOX* 遺伝子の *BP/KNAT1*、*KNAT2* は基部先端部軸方向の成長に関わり、*STM* は、茎頂メリステムの未分化状態の維持に関わるホメオボックス遺伝子であり、野生型植物の茎頂メリステムとその周辺部で発現する。HD-ZIP III ファミリーの遺伝子である *PHB* は葉の向軸側の細胞運命決定に関わる遺伝子である。これに対して、*ETT/ARF3*、*ARF4*、*KAN2*、*FIL*、*YAB5* は背軸側の細胞運命決定に関わる遺伝子であることが既に明らかになっている。これらの遺伝子のうち、特に *ETT/ARF3*、*ARF4* は葉の向軸側分化と直接に関係しており、その発現レベルの上昇がラッパ状葉と棒状葉の形成につながることで、またラッパ状葉と棒状葉の形成が *ett*、*arf4* の変異の導入により抑圧されることが、我々の過去の研究により明らかになっている (Iwasaki et al., 2013; Takahashi et al., 2013; Matsumura et al., 2016)。

as2-1 icu2-1 二重変異体では、向軸側化遺伝子である *PHB* の転写産物の蓄積は野生型と比べて減少した。一方、背軸側化因子の *ETT/ARF3* は野生型の 3 倍以上に上昇した。また、*icu2-1* 単独変異体における *ETT/ARF3* の発現レベルが *as2-1*

単独変異体のそれより高かった。class 1 *KNOX* 遺伝子である *BP*、*KNAT2*、*STM* 及び背軸側化遺伝子 *ARF4*、*YAB5* の転写産物蓄積も野生型より上昇したが、*ETT/ARF3* ほど顕著ではなかった。一方、背軸側因子の *KAN2*、*FIL* は野生型と比べて変化がなかった (図 3)。この解析結果から、*as2-1 icu2-1* 二重変異体では、class 1 *KNOX* 遺伝子群の転写産物が著しく蓄積したことから、野生型の葉の細胞に比べて、より未分化な状態にあることが示唆された。また、*as2-1 icu2-1* 二重変異体におけるラッパ状と棒状の葉の形成には *ETT* の過剰発現が関係している可能性が考えられた。この解析結果は、*as2-1 elo3-1*、*as1-1 elo3-1* 及び *as2-1 eal-1*、*as1-1 eal-1* 及び *as2-1 fas2-2* で得られた解析結果と類似している (Kojima *et al.* 2011; Ishibashi *et al.* 2013)。

3. まとめ

以上の結果から、シロイヌナズナの *ICURVATA2* 遺伝子 *ICU2* は、*AS2*、*ASI* と独立した経路で、class 1 *KNOX* 遺伝子群と葉の背軸側化遺伝子である *ETT/ARF3* の発現抑制に関わり、また葉原基の幹細胞的性質と予備向軸側領域における *ETT/ARF3* の抑制を通して葉の向軸側分化に関わる可能性が示唆された。

第 3 章

AS2、AS1 遺伝子が関わる葉の向軸側分化における RFC3 の役割 の解析

(*as2-1 rfc3-1* 及び *as1-1 rfc3-1* 二重変異体の表現型解析)

as2-1 icu2-1 変異体の表現型解析及び定量的リアルタイム RT-PCR 解析より、新生 DNA 鎖の合成開始を司る DNA ポリメラーゼ α が、AS1-AS2 が関わる葉の向背軸分化に関与していることが示唆された。しかし、DNA 複製機構で働く他の DNA 複製関連因子も AS1-AS2 が関わる葉の向背軸分化に関与しているだろうか。このことを調べるために、*rfc3-1* 変異体を用いた解析を行なった。

rfc3-1 は *atRFC3* の対立遺伝子の一つであり、シロイヌナズナの Replication Factor C subunit 3 のホモログをコードする遺伝子である (Xia et al, 2009; 2010)。*rfc3-1* 変異体は、2 番エキソン内のグアニンがアデニンに一塩基置換しており、無極性の脂肪族である Gly-84 が負電荷をもつアスパラギンに置換しているミスセンス変異体である (Xia et al, 2009)。RFC3 は、RFC1、RFC2、RFC4、RFC5 とともに RFC 複合体を形成し、PCNA (proliferating cell nuclear antigen の略) に結合し、PCNA の環状構造を歪めることで PCNA の開環に関わっている。

rfc3-1 単独変異体は、野生型よりも植物体が小さい (Xia et al, 2009)。また、葉は細くて、先端が尖り、下向きカールしている (図 4)。これらは、*as1* または *as2* の表現型異常を亢進する modifier 因子が持つ特徴でもある。

as2-1 rfc3-1、*as1-1 rfc3-1* 二重変異体では、いずれも葉の下向きカールが強くなる傾向を示した。また、葉の向背軸分化の異常が生じた表現型である、ラッ

パ状と棒状の葉が観察された。このような葉の異常の表現型は、野生型と単独変異体では観察されなかった (図 4)。*as2-1 rfc3-1*、*as1-1 rfc3-1* 二重変異体におけるラッパ状と棒状葉が生じた個体の出現頻度は表 2 に示したとおりである。

この観察結果より、*rfc3-1* 変異により *as1* または *as2* 変異体の遺伝的背景における葉の向背軸分化の異常が亢進されたと考えられた。

考察

DNA の娘鎖の合成に必要な遺伝子である *ICU2* 及び *RFC3* の変異と *as1* または *as2* との二重変異体を用いた遺伝学的解析より、*ICU2* 及び *RFC3* の変異が、*as1* または *as2* の遺伝背景を持つ植物体における葉の向背軸分化の異常を亢進することが示唆された。したがって、*ICU2* 及び *RFC3* が正常に働くことが、葉の向背軸分化にとって重要であると考えられる。DNA の娘鎖の合成に関わる他の遺伝子についても、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化に関与するかどうか、今後、調べる必要がある。

では、*ICU2* と *RFC3* 遺伝子が、*AS1-AS2* が関わる葉の向背軸分化にどのように関与しているだろうか。我々の過去の研究より、扁平で左右相称な葉の形成には、向軸側領域の確立における *ETT/ARF3* 及び *ARF4* の発現への抑制が重要とある事が示されている。*icu2-1* 変異体では、*AS1-AS2* の標的遺伝子である *ETT/ARF3* の発現量が野生型のそれより上昇し、*as2-1 icu2-1* 二重変異体においては、さらに上昇した。このことから、*ETT/ARF3* が、葉の向背軸分化が行われる際における *AS1-AS2* との共通の抑圧ターゲットであることが示唆された(図5)。

では、*AS1-AS2* との共通の抑圧ターゲットである *ETT/ARF3* の発現への抑制には、modifier 因子としての *ICU2* と *RFC3* 遺伝子がどのように関わっているだろうか。*AS1-AS2* は *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位の維持型メチル化に関わっており、*ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御による発現調節を行っていることが示唆されている (Iwasaki et al. 2013)。*ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御による発現調節には *MET1* も関わっている

ことが報告されている。*MET1* は哺乳類の維持型メチル化酵素 (DNMT1) のホモログとしてシロイヌナズナで同定され、DNA 複製を介した CpG 部位の維持メチル化を担っている (Long et al. 2013)。*MET1* の変異体では、*ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位のメチル化が認められないこと、茎頂メリステムにおける *ETT/ARF3* の転写蓄積量が上昇することも報告されている (Iwasaki et al. 2013)。

これまでに DNA 複製に伴う CpG 部位のメチル化パターンの維持に関する分子機構の研究が動物においてなされてきた。DNA 維持型メチル化には、DNA 複製タンパク質 *LIG1*、*UHRF1*、*DNMT1* が必須である。*LIG1* は複製において、ラギング鎖合成時の岡崎フラグメントの連結を担う重要な複製関連因子であり、*PCNA* と複合体を形成して機能する。*LIG1* が N 末端側の領域にヒストン H3 様の配列をもち、*G9a-GLP* 複合体にリジンがメチル化される。*LIG1* は、N 末端に DNA 複製に中心的な役割をもつ *PCNA* との結合ドメインをもつ。*PCNA* と結合することにより複製フォークに局在する *LIG1* は、そのメチル化に依存して *UHRF1* を複製フォークへとリクルートする (Ferry et al. 2017)。*UHRF1* は、その *SRA* ドメインにより DNA 複製後に生じたヘミメチル化サイトを認識して、また、ユビキチン化リガーゼとしての活性をもつ *RING finger* により近傍のヒストン H3 をユビキチン化する (Nishiyama et al. 2013)。*DNMT1* は、ユビキチン化ヒストン H3 を認識することで、ヘミメチル化サイトに集積し、新生鎖 DNA をメチル化する。これらのことから、DNA 複製と DNA の維持メチル化が一連の分子反応として、共役する可能性が示唆されている。また、DNA 複製タンパク質である *LIG1* が、この DNA 複製に伴う DNA 維持メチル化にも関与するこ

とは興味深い。

一方、*ICU2* と *RFC3* 遺伝子は、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも携わる一側面を呈示する報告もなされている。*ICU2* と動物や酵母の HETEROCHROMATIN PROTEIN1 のオーソログをコードする *TERMINAL FLOWER2*、または Polycomb group (PcG) 遺伝子である *CURLY LEAF* との間には遺伝学的相互作用が観察された (Barrero et al. 2007)。また、*FLC* 領域及び PRC2 の他のターゲットなどにおける抑制性ヒストン修飾である H3K27me3 維持の安定化、ヘテロクロマチン・レトロエレメントにも関わっている (Huyn et al. 2013)。*icu2-1* 変異体における *ICU2* のこのようなエピジェネティックな機能の低下は、*icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 変異体において、*ETT/ARF3* への発現抑制が不十分になる事と関わりがあるかもしれない。しかし、*ETT/ARF3* のプロモータ領域や AS1-AS2 の結合サイト、或いは少なくともそのコード配列には H3K27me の濃縮が検出されていない (Husbands et al. 2015; Iwasaki et al. 2013; Roudier et al. 2011; Zhang et al. 2007)。一方、AS1-AS2 は *ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位の維持メチル化に関わっている。*ICU2* も AS1-AS2 とともに、*ETT/ARF3* 遺伝子のコード領域における CpG 部位の維持型メチル化に関わる可能性が考えられる。今後明らかにする必要がある。さらに、シロイヌナズナにおける *ETT/ARF3* に対するエピジェネティックな制御においても、その制御は DNA 複製と DNA 維持メチル化という一連の分子反応が進行している過程で確立される可能性が考えられる。このようなエピジェネティックな制御における AS1-AS2 の分子的役割についても明らかにする事が重要であろう。

表 1. *as1-1 icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 二重変異体の表現型解析におけるラッパ状葉と棒状葉が形成された植物体の出現頻度

Genotype	実験回数	全観察数	ラッパ状葉が形成された植物体の数 (%)	棒状葉の葉が形成された植物体の数 (%)
Col-0	1	180	0 (0)	0 (0)
	2	165	0 (0)	0 (0)
	3	173	0 (0)	0 (0)
<i>as1-1</i>	1	113	0 (0)	0 (0)
	2	104	0 (0)	0 (0)
	3	97	0 (0)	0 (0)
<i>as2-1</i>	1	273	0 (0)	0 (0)
	2	193	0 (0)	0 (0)
	3	209	0 (0)	0 (0)
<i>icu2-1</i>	1	251	0 (0)	0 (0)
	2	186	0 (0)	0 (0)
	3	215	0 (0)	0 (0)
<i>as1-1 icu2-1</i>	1	120	23 (19.2)	21 (17.5)
	2	138	36 (26.1)	30 (21.7)
	3	116	19 (16.4)	21 (18.1)
<i>as2-1 icu2-1</i> (C2)	1	255	11 (4.3)	19 (7.5)
	2	231	7 (3.0)	27 (11.7)
	3	241	10 (4.1)	24 (10.0)
<i>as2-1 icu2-1</i> (E7)	1	227	8 (3.5)	18 (7.9)
	2	238	13 (5.5)	11 (4.6)

() 内の数字は、割合を表す。C2 及び E7 とは、*as2-1* と *icu2-1* を交配させてきた子孫世代の異なるラインを示す。植物は 22°C で栽培した播種後 21 ~ 23 日目のものである。

表 2 . *as1-1 rfc3-1* 及び *as2-1 rfc3-1* 二重変異体の表現型解析におけるラッパ状葉と棒状葉が形成された植物体の出現頻度

Genotype	実験回数	観察数	ラッパ状葉が形成された植物体の数 (%)	棒状葉の葉が形成された植物体の数 (%)
Col-0	1	90	0 (0)	0 (0)
	2	78	0 (0)	0 (0)
	3	85	0 (0)	0 (0)
<i>as1-1</i>	1	93	0 (0)	0 (0)
	2	90	0 (0)	0 (0)
	3	71	0 (0)	0 (0)
<i>as2-1</i>	1	68	0 (0)	0 (0)
	2	76	0 (0)	0 (0)
	3	81	0 (0)	0 (0)
<i>rfc3-1</i>	1	86	0 (0)	0 (0)
	2	85	0 (0)	0 (0)
	3	80	0 (0)	0 (0)
<i>as1-1 rfc3-1</i>	1	102	7 (6.9)	8 (7.8)
	2	85	5 (5.9)	4 (4.7)
	3	85	7 (8.2)	6 (7.1)
<i>as2-1 rfc3-1</i>	1	63	0 (0)	8 (12.7)
	2	76	2 (2.6)	11 (14.5)
	3	81	1 (1.2)	9 (11.1)

() 内の数字は、割合を表す。植物は 22℃で栽培した播種後 21 ~ 23 日目のものである。

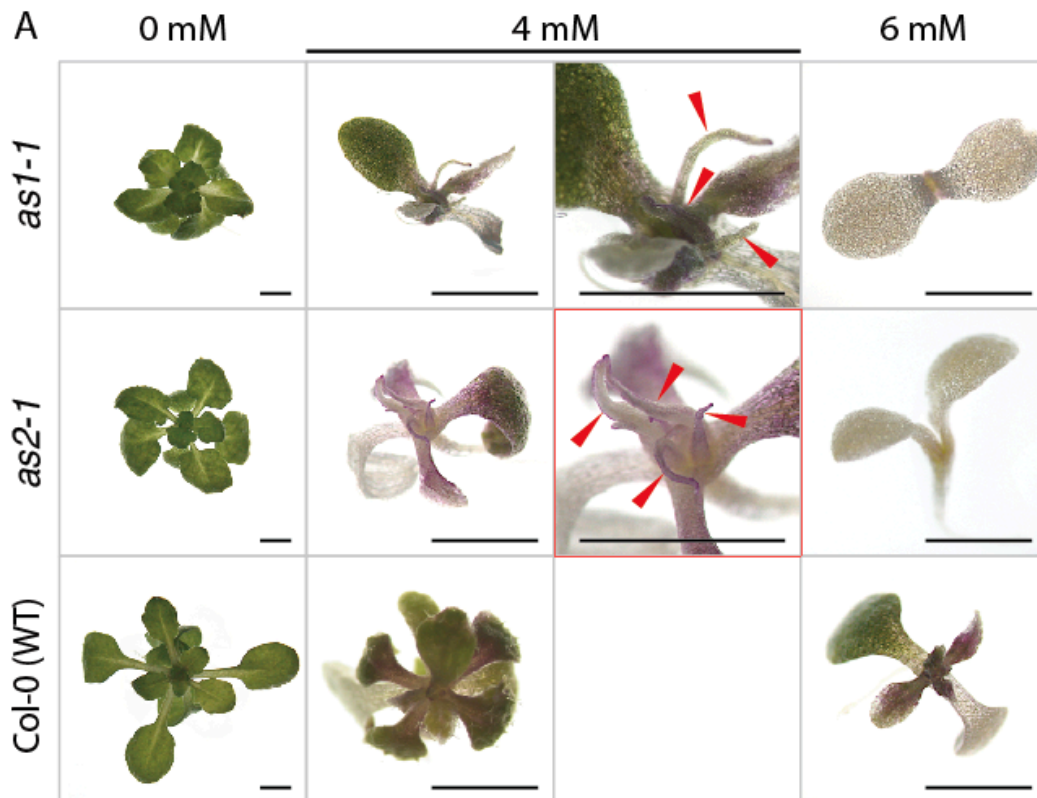


図 1 . Hydroxyurea 処理による Col-0 (WT)、*as1-1*、*as2-1* 植物体の表現型解析

A 0 mM、4 mM、6 mM の hydroxyurea を含んだ MS 培地で生育させた播種後 21 日目の Col-0 (WT)、*as1-1*、*as2-1* 植物体の表現型。赤色の矢じりは、拡大した棒状葉を示す。スケールバー = 2 mm。

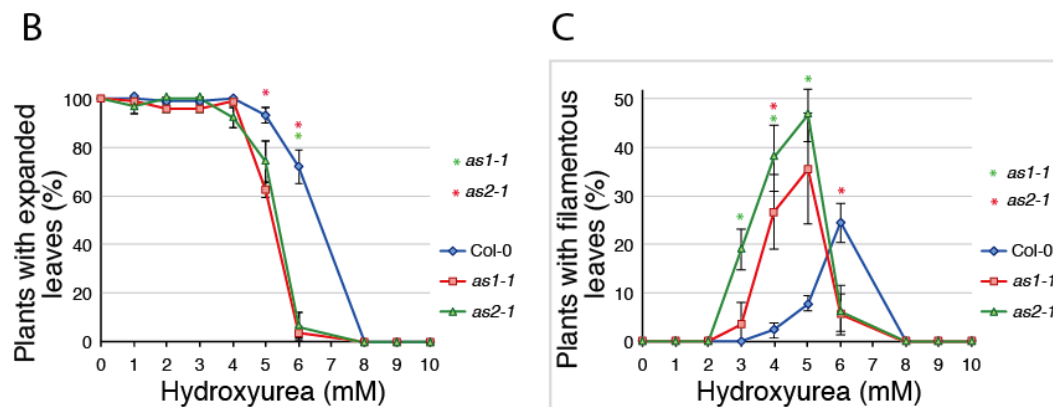


図 1. Hydroxyurea 処理による Col-0 (WT)、*as1-1*、*as2-1* 植物体の表現型解析

B hydroxyurea を含まない MS 培地で生育させた場合と hydroxyurea を含んだ MS 培地で生育させた場合における本葉が形成された植物の割合。観察数 (n) = 30。植物は 22°C で栽培した。表現型観察は、播種後 21 日目に行った。エラーバーは、標準誤差を示す。野生型との有意差検定は、Student's *t*-test を用いて行い、その結果は*で示した (** p<0.01)。

C hydroxyurea を含まない MS 培地で生育させた場合と hydroxyurea を含んだ MS 培地で生育させた場合における棒状葉が形成された植物の割合。全観察数 (n) = 30。植物は 22°C で栽培した。表現型観察は、播種後 21 日目に行った。エラーバーは、標準誤差を示す。野生型との有意差検定は、Student's *t*-test を用いて行い、その結果は*で示した (** p<0.01)。

D

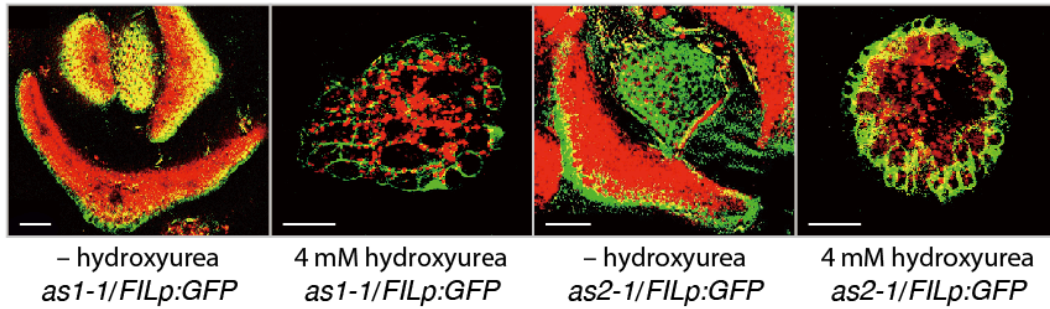


図 1 . Hydroxyurea 処理による Col-0、*as1-1*、*as2-1* 植物体の表現型解析

D 葉切片における *FILp:GFP* の発現パターン。緑色のシグナルは GFP、赤色は自己蛍光によるもの。葉切片の作成に用いた *as1-1/FILp:GFP* 及び *as2-1/FILp:GFP* 植物は 4 mM の hydroxyurea を含んだ MS 培地で生育させ、播種後 21 日目のものである。

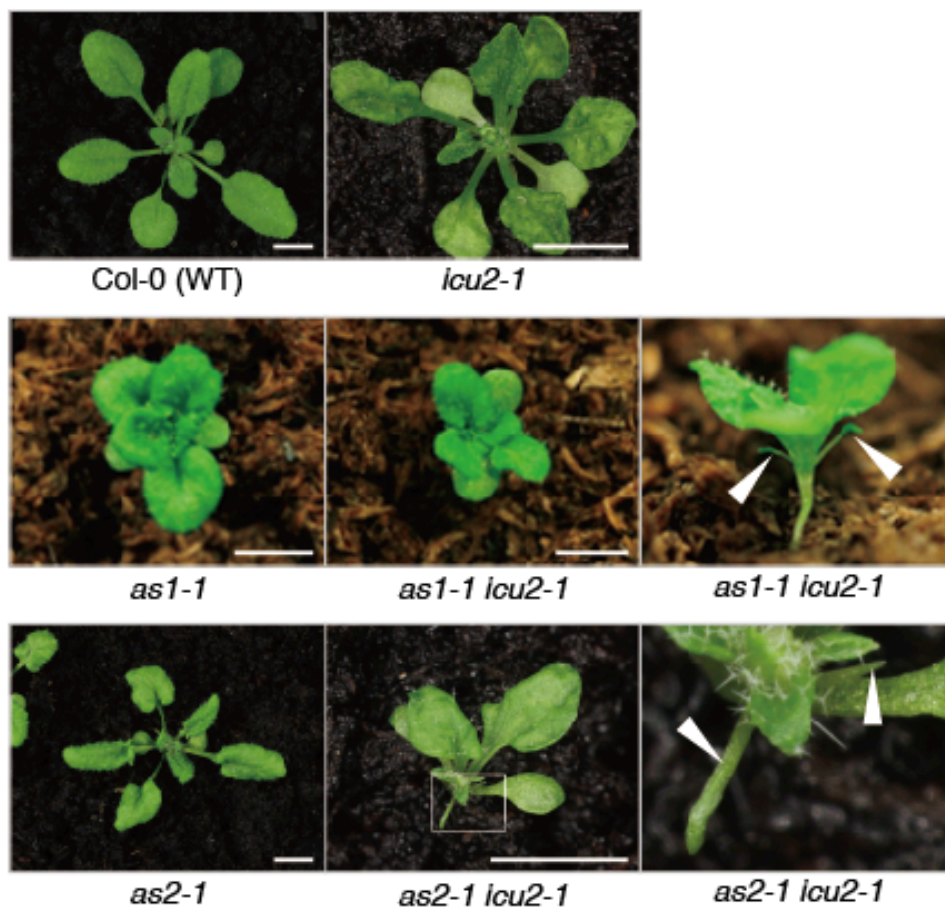


図 2 . 播種後 21 日目の *as1-1 icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 二重変異体植物の表現型

写真にある植物の生育条件は、「材料と方法」に記載されたとおり。*as1-1 icu2-1* 及び *as2-1 icu2-1* 二重変異体では、棒状葉が観察された。矢じりは棒状葉を示す。スケールバー = 5 mm。

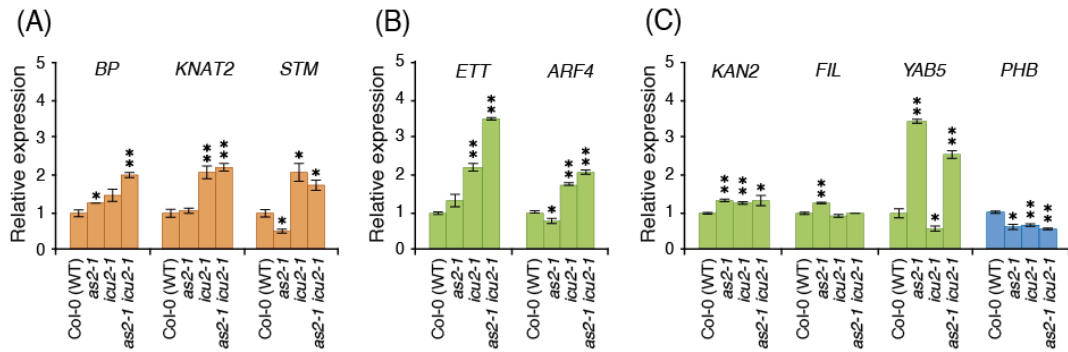


図 3. Class 1 *KNOX* 遺伝子及び葉の向背軸領域決定の関わる遺伝子の転写産物の蓄積

(A) class 1 *KNOX* 遺伝子の相対的発現レベル

(B) 葉の背軸側領域の確立に関わる遺伝子 (*ETT* 及び *ARF4*) の相対的発現レベル

(C) 葉の背軸側領域の確立に関わる他の遺伝子 (*KAN2*, *FIL*, *YAB5*) 及び向軸側領域の確立に関わる遺伝子 (*PHB*) の相対的発現レベル

試料は、播種後 14 日目の Col-0、*as2-1*、*icu2-1*、及び *as2-1 icu2-1* の茎頂部から抽出した RNA を用いた。各遺伝子の転写量は、*ACTIN2* 遺伝子 (*ACT2*, at3g18780) の転写産物量で標準化し、野生型 (Col-0) の値を 1 とした時の相対値で示す。データは 3 反復の実験の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。野生型との有意差検定は、Student's *t*-test を用いて行い、その結果は*で示した (* p < 0.05, ** p < 0.01)。

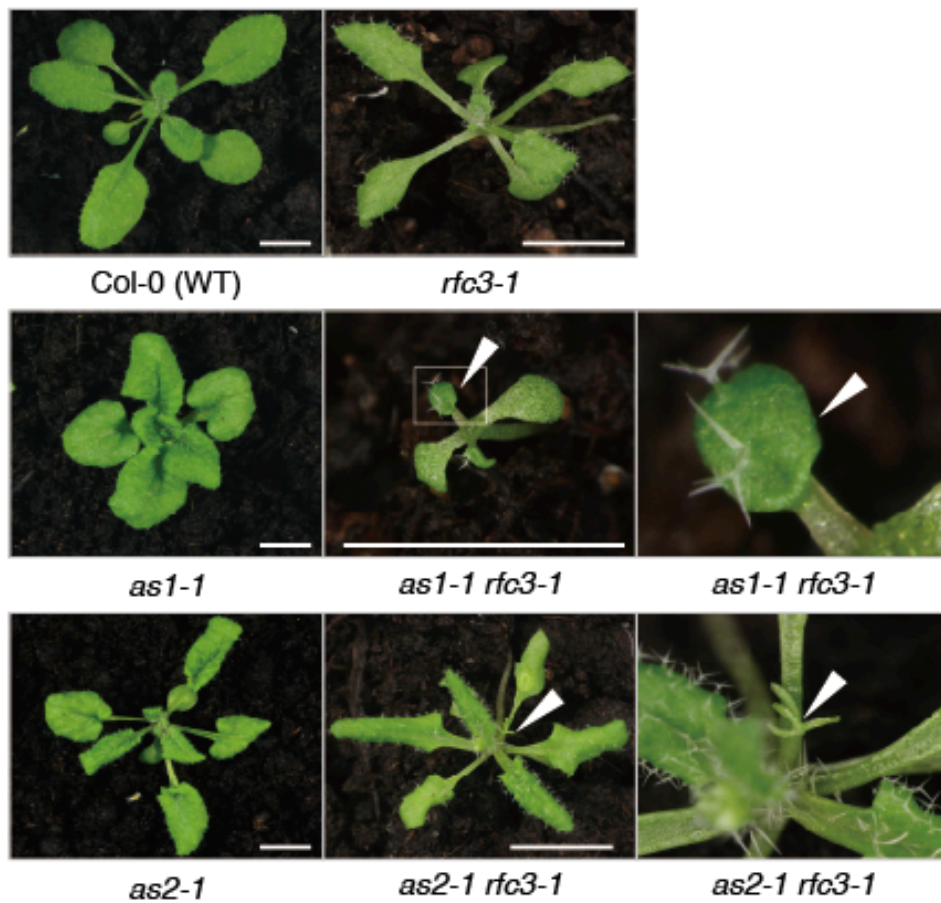


図 4 . 播種後 21 日目の *as1-1 rfc3-1* 及び *as2-1 rfc3-1* 植物の表現型

rfc3-1 変異は、*as1-1* 及び *as2-1* の表現型を亢進した。*as1-1 rfc3-1* 二重変異体は、ラッパ状葉を示している。*as2-1 rfc3-1* 二重変異体は、棒状葉を示している。矢じりは、拡大したラッパ状葉または棒状葉を示している。スケールバー = 5 mm。

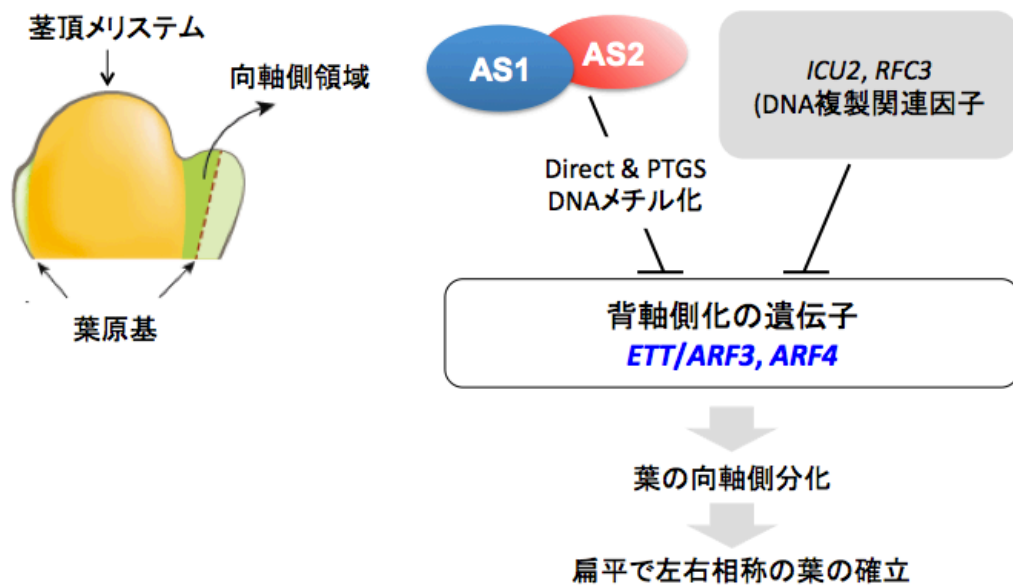


図 5. シロイヌナズナの葉の形成における AS1-AS2、*ICU2*、*RFC3* の役割

AS1-AS2 複合体は、DNA 複製関連因子である *ICU2* または *RFC3* とともに、葉の背軸側領域の確立に関わる *ETT/ARF3* 及び *ARF4* への発現抑制に関わっている。扁平で左右相称の葉の確立には、向軸側領域の確立における *ARFs* の発現への抑制は重要である。

材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型は Columbia-0 (Col-0) 及び Enkheim-2 (En-2)、変異体は *as2-1*、*as1-1* (Semiarti *et al.* 2001)、*icu2-1* (Barreno *et al.* 2007)、*rfc3-1* (Xia *et al.* 2009) を用いた。Col-0、*as1-1*、*as2-1* の種子は、名古屋大学大学院理学研究科の Endang Semiarti 博士(現・Gadjah Mada University) 及び町田泰則教授より、*En-2*、*icu2-1* の種子は、Universidad Miguel Hernández の José Luis Micol 教授より、*rfc3-1* の種子は Hunan Agricultural University の Shitou Xia 博士より、それぞれご好意により分与して頂いた。栽培は、バーミキュライト(日東ヒル石、いなべ)とピートモス(KEKKILA、Tuusula、Finland) を 1:1 で混合したもの、または 0.8% (w/v) アガロースで固化した MS 培地に播種した。植物は播種後 2 日間暗所 4°C で低温処理を行った後、長日条件 (16 時間明期、8 時間暗期) または連続光条件下に移し、22°C で栽培した。

ゲノム DNA 抽出と遺伝子型の確認

播種後 21 日目前後の植物体の若い葉の一部を切り取り、DNA 抽出溶液 (250 mM NaCl、25 mM EDTA を含む 200 mM Tris-HCl、pH7.5) を加えて混合し、ジルコニアボール (アズワン、大阪) とともに細胞破砕機 (Tissuelyser ; Qiagen、Hilden、Germany) で粉砕した。得られた抽出液を室温で 1 分間遠心分離した後、上清にイソプロパノールを加えて攪拌し、

室温で 15 分間遠心分離した。得られた沈殿を 70% (v/v) エタノールでリンスし室温で 5 分間遠心分離した。沈殿を風乾した後、TE に溶解して以降の実験に用いた。得られたゲノム DNA 溶液を鋳型として、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて PCR 法より遺伝子型を確認した。

RNA の抽出と cDNA の合成

土で栽培した播種後 14 日目のシロイヌナズナ植物体の茎頂部を採取し、液体窒素中で直ちに凍結し、RNA の調整まで-80°Cで保存した。試料を乳鉢と乳棒で摩砕し、Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) を用いて得られた摩砕液から全 RNA を抽出した。電気泳動確認後、DNase 処理を行い、ゲノム DNA を分解した。逆転写反応は ReverTra Ace (東洋紡、大阪)、Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Life technologies Corporation、Carlsbad、USA) を用いて行った。

定量的リアルタイム RT-PCR

得られた cDNA を鋳型として、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life technologies Corporation、Carlsbad、USA) を用いてプロトコルに従い PCR 反応を行った。SYBR Green の蛍光の測定、及び PCR 反応は StepOnePlus Real-Time PCR system (Life technologies Corporation、Carlsbad、USA) を用いた。内部標準として ACTIN2 を使用し、各遺伝子の相対的転写量を算出した。用いたプライマーの配列は表 3 の通りである。

***FILp:GFP* の発現解析**

FILp:GFP が導入された Col-0 の種子は、基礎生物学研究所の岡田清孝教授より、*Filp:GFP* が導入された *as1-1* 変異体及び *as2-1* 変異体の種子は、名古屋大学大学院理学研究科の上野宜久博士（現・農業生物資源研究所）より、それぞれ分与して頂いた。変異体の遺伝子型は PCR 法により確認し、*FILp:GFP* の導入は植物体における蛍光シグナルを蛍光顕微鏡で確認した。*FILp:GFP* 導入個体の葉原基または棒状の葉を含む茎頂周辺部を 7% (w/v) アガロースに包埋し、葉原基または棒状の葉の横断面の薄層切片を作製した。共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510 ; Carl Zeiss Inc., Jena, Germany) を用いて横断面における GFP の蛍光シグナルを検出した。

DNA 複製阻害剤である hydroxyurea の処理

0.8% (w/v) アガロースを含む MS 培地をオートクレーブし、滅菌水に溶解した hydroxyurea (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) を終濃度が 0、1、2、3、4、5、6、8 及び 10 mM となるようにそれぞれ加えて固化した。作製したプレートに表面殺菌した種子を播種して 21 日間栽培し、植物体の表現型を観察した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心にご指導を賜りました中部大学応用生物学研究科応用生物学専攻の町田千代子教授に、心より深く御礼申し上げます。また、多大なご助言やご指導を賜りました名古屋大学大学院理学研究科の町田泰則教授にも、厚く御礼申し上げます。

また日頃の研究や実験において、技術的なご指導や多くのご助言を賜りました、中部大学応用生物学部の小島晶子講師、中部大学町田研究室の氣多澄江博士、中川彩美博士、名古屋大学大学院理学研究科の石橋奈々子博士に心より感謝申し上げます。町田研究室の大学院生、舟橋晴華さん、浅井俊晴さんには、変異体の解析の貴重なデータを共有させていただきました。感謝申し上げます。研究を進める上で貴重なご意見、ご助言を賜りました、中部大学応用生物学の中村研三教授、大塚健三教授に深く感謝致します。最後に中部大学町田研究室の、大学院生、及び卒業生の皆様に心より感謝致します。なお本研究は、平成26年度中部大学特別研究費（D）の研究助成を頂きました。ここに謝意を表します。

引用文献

Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Cerrington JC (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221

Bao N, Lye KW, Barton MK (2004) MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNA are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* 7: 653-662

Barrero JM, Gonzalez-Bayon R, del Pozo JC, Ponce MR, Micol JL (2007) INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 2822-2838

Bowman JL, Smyth SK (1999) CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126: 2387-2396

Bowman JL, Floyd SK (2008) Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annu. Rev. Plant Biol* 59: 67-88

Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA

(2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature* 408: 967-971

Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, Timmermans MC (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev* 23: 549-554

Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13: 1768-1774

Eshed Y, Baum SF, Bowman JL (1999) Distinct mechanisms promote polarity establishment in carpels of *Arabidopsis*. *Cell* 99: 199-209

Eshed Y, Baum SF, Perea, JV, Bowman JL (2001) Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr. Biol.* 11, 1251-1260

Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC (2006) Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Curr Biol* 16: 939-944

Ferry L, Fournier A, Tsusaka T, Adelmant G, Shimazu T, Matano S, Kirsh O, Amouroux R., Dohmae N, Suzuki T, et al. (2017) Methylation of DNA Ligase 1 by G9a/GLP recruits UHRF1 to replicating DNA and regulates DNA methylation. *Mol Cell* 67: 550-565

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* result in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8449-8454

Garcia D, Collier SA, Byrne ME, Martienssen RA (2006) Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the *trans*-acting siRNA pathway. *Curr Bior* 16: 933-938

Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans MC (2008) Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 48-58

Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J (2004) The role of Knox genes in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 125-151

Horiguchi G, Nakayama H, Ishikawa N, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Tsukaya H (2011a) ANGUSTIFOLIA3 plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiol* 52: 112-124

Horiguchi G, Mollá-Morales A, Pérez-Pérez JM, Kojima K, Robles P, Ponce MR, Micol

JL, Tsukaya H (2011b) Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J* 65: 724-736

Huang W, Pi L, Liang W, Xu B, Wang H, Cai R, Huang H (2006) The proteolytic function of the *Arabidopsis* 26S proteasome is required for specifying leaf adaxial identity. *Plant Cell* 18: 2479-2492

Hudson A (2000) Development of symmetry in plants. *Annu Rev Plant Physiol plant Mol Biol* 51: 349-370

Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutierrez-Nava M, Poethig SR (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133: 2973-2981

Husbands AY, Benkovics AH, Nogueira FTS, Lodha M, Timmermans MCP (2015) The ASYMMETRIC LEAVES complex employs multiple modes of regulation to affect adaxial-abaxial patterning and leaf complexity. *The Plant Cell* 27: 3321-3335

Hyun Y, Yun H, Park K, Ohr H, Lee O, Kim DH, Sung S, Choi Y. The catalytic subunit of *Arabidopsis* (2013) DNA polymerase alpha ensures stable maintenance of histone modification. *Development* 140:156-166

Inagaki S, Nakamura K, Morikami A (2009) A link among DNA replication, recombination, and gene expression revealed by genetic and genomic analysis of *TEBICHI* gene of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5: e1000613

Ishibashi N, Kanamaru K, Ueno Y, Kojima S, Kobayashi T, Machida C, Machida Y (2012) *ASYMMETRIC-LEAVES2* and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of *AUXIN-RESPONSE-FACTOR* and class 1 *KNOX* homeobox genes for development of flat symmetric leaves in *Arabidopsis*. *Biol Open* 1: 197-207

Ishibashi N, Machida C, Machida Y. (2013) *ASYMMETRIC LEAVES2* and *FASCIATA2* cooperatively regulate the formation of leaf adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 30: 411-415

Iwakawa H, Iwasaki M, Kojima S, Ueno Y, Soma T, Tanaka H, Semiarti E, Machida Y, Machida C (2007) Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J* 51: 173-184

Iwakawa H, Ueno Y, Semiarti E, Onouchi H, Kojima S, Tsukaya H, Hasebe M, Soma T, Ikezaki M, Machida C, et al. (2002) The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a

novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol* 43: 467-478

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, Machida C.. (2013) 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: 1958-1969

Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS (2001) *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 706-709

Kojima S, Iwasaki M, Takahashi H, Imai T, Matsumura Y, Fleury D, Van Lijsebettens M, Machida Y, Machida C (2011) Asymmetric leaves2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 52: 1259-1273

Kumaran MK, Bowman JL, Sundaresan V (2002) YABBY polarity genes mediate the repression of KNOX homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2761-2770

Li H, Xu L, Wang H, Yuan Z, Cao X, Yang Z, Zhang D, Xu Y, Huang H (2005) The Putative RNA-dependent RNA polymerase RDR6 acts synergistically with

ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 to repress *BREVIPEDICELLUS* and MicroRNA165/166 in Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 17: 2157-2171

Lincoln C, Long J, Yamaguchi J, Serikawa K, Hake S (1994) A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6: 1859-1876

Long HK, Blackledge NP, Klose RJ (2013) 1ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans* 41: 727-740

Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69

Luo L, Ando S, Sasabe M, Machida C, Kurihara D, Higashiyama T, Machida Y (2012) Arabidopsis *ASYMMETRIC LEAVES2* protein required for leaf morphogenesis consistently forms speckles during mitosis of tobacco BY-2 cell via signals in its specific sequence. *J. Plant Res* 125: 661-668.

Machida C, Nakagawa A, Kojima S, Takahashi H, Machida Y (2015) 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: 655-671

Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, Barton MK, Bartel DP (2004) MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* 23: 3356-3364

Matsumura Y, Iwakawa H, Machida Y, Machida C (2009) 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.* 58: 525-37

Matsumura Y, Ohbayashi I, Takahashi H, Kojima S, Ishibashi N, Keta S, Nakagawa A, Hayashi R, Saez-Vasquez J, Echeverria M, et al. (2016) A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis* *Biol. Open* , 5: 942-954

McConnell JR, Barton MK (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125: 2935-2942

McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, Barton MK (2001) Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411: 709:713

Montgomery TA, Yoo SJ, Fahigren N, Gilbert SD, Howell MD, Sullivan CM, Alexander A, Nguyen G, Allen E, Ahn JH, Carrington JC (2008) AGO1-miR173 complex initiates phased siRNA formation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20055-20062

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

Nakata M, Okada K (2013) The leaf adaxial-abaxial boundary and lamina growth. *Plants* 2: 174-202

Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K, Shimamura S, Arita K, Kodama T, Ishikawa F, et al. (2013) Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* 502: 249-253

Nogueira FT, Madi S, Chitwood DH, Juarez MT, Timmermans MC (2007) Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev* 21: 750-755

Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman JL, Hake S (2000) Mechanisms that control knox gene expression in the Arabidopsis shoot. *Development* 127: 5523-5532

Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y (2005) Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *Plant Cell* 17: 2899-2910

Phelps-Durr TL, Thomas J, Vahab P, Timmermans MC (2005) Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain knox gene silencing and determinacy during organogenesis. *Plant Cell* 17: 2886-2898

Pinon V, Etchells JP, Rossignol P, Collier SA, Arroyo JM, Martienssen RA, Byrne ME (2008) Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* 135: 1315-1324

Redei GP, Hirono Y (1964) Linkage studies. *Arabidopsis Inf Serv* 1: 9

Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, Giraut L, Després B, Drevensek S, Barneche F, Dèrozier S, Brunaud V, Aubourg S, Schnittger A, Bowler C, Martin-Magniette ML, Robin S, Caboche M, Colot V. Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* 2011 18: 1928-38.

Saban N, Bujak M (2009) Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64: 213

Sarojam R, Sappl PG, Goldshmidt A, Efroni I, Floyd SK, Eshed Y, Bowman JL (2010) Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities. *Plant Cell* 22: 2113-2130

Sawa S, Watanabe K, Goto K, Kanaya E, Morita EH, Okada K (1999) *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of Arabidopsis, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. *Genes Dev* 13: 1079-1088

Schwab R, Maizel A, Ruiz-ferrer V, Garcia D, Bayer M, Crespi M, Voinnet O, Martienssen RA (2009) Endogenous TasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in Arabidopsis thaliana. *PloS One* 4: e5980

Semiarti E, Ueno Y, Tsukaya H, Iwakawa H, Machida C, Machida Y (2001) The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128: 1771-1783

Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, Bowman JL (1999) Members

of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* 126: 4117-4128

Steeves TA, Sussex IM (1989) *Patterns in Plant Development*. 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge

Szakonyi D, Byrne ME (2011) Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65: 269-281

Szakonyi D, Moschopoulos A, Byrne ME (2010) Perspectives on leaf dorsoventral polarity. *J Plant Res* 123: 281-290

Takahashi H, Iwakawa H, Ishibashi N, Kojima S, Matsumura Y, Prananingrum P, Iwasaki M, Takahashi A, Ikezaki M, Luo L, Kobayashi T, Machida Y, Machida C (2013) Meta-analyses of microarrays of *Arabidopsis asymmetric leaves1* (as1), 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: 418–431

Takahashi H, Iwakawa H, Nakao S, Ojio T, Morishita R, Morikawa S, Machida Y, Machida C, Kobayashi T (2008) Knowledge-based fuzzy adaptive resonance theory and its application to the analysis of gene expression in plants. *J Biosci Bioeng* 106:

Takami Y, Ono T, Fukagawa T, Shibahara K, Nakayama T. (2007) Essential role of chromatin assembly factor-1-mediated rapid nucleosome assembly for DNA replication and cell division in vertebrate cells. *Mol Biol Cell* 18:129-141

Tsukaya H (2013) Leaf development. *Arab Book* 11: e0163.

Tsukaya H, Uchimiya H (1997) Genetic analyses of the formation of the serrated margin of leaf blades in *Arabidopsis*: combination of a mutational analysis of leaf morphogenesis with the characterization of a specific marker gene expressed in hydathodes and stipules. *Mol Gen Genet* 256: 231-238

Ueno Y, Ishikawa T, Watanabe K, Terakura S, Iwakawa H, Okada K, Machida C, Machida Y (2007) Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 445-457

Waites R, Hudson A (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality in leaves of *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143-2154

Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, Xu L (2011) *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin

development. *Plant Physiol* 157:1805-1819

Watanabe K and Okada K (2003) Two discrete cis elements control the Abaxial side-specific expression of the *FILAMENTOUS FLOWER* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2592-2602

Xia S, Xiao L, Gannon P, Li X. (2010) RFC3 regulates cell proliferation and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 2010 5:168-170

Xia S, Zhu Z, Hao L, Chen JG, Xiao L, Zhang Y, Li X (2009) Negative Regulation of Systemic Acquired Resistance by Replication Factor C Subunit 3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150: 2009-2017

Xu D, Huang W, Li Y, Wang H, Huang H, Cui X (2012) Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 792-808

Xu L, Xu Y, Dong A, Sun Y, PiL, Xu Y, Huang H (2003) Novel as1 and as2 defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130: 4097-4107

Yang JY, Iwasaki M, Machida C, Machida Y, Zhou X, Chua NH (2008) betaC1, the

pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes Dev* 22: 2564-2577

Yang L, Huang W, Wang H, Cai R, Xu Y, Huang H (2006) Characterizations of a hypomorphic *argonaute1* mutant reveal novel *AGO1* functions in *Arabidopsis* lateral organ development. *Plant Mol Biol* 61: 63-78

Yao Y, Ling Q, Wang H, Huang H (2008) Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. *Development* 135: 1325-1334

Yin H, Zhang X, Liu J, Wang Y, He J, Yang T, Hong X, Yang Q and Gong Z (2009) Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid signaling are influenced by DNA Polymerase epsilon mutation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 386-402

Yuan Z, Luo D, Li G, Yao X, Wang H, Zeng M, Huang H, Cui X (2010) Characterization of the *AE7* gene in *Arabidopsis* suggests that normal cell proliferation is essential for leaf polarity establishment. *Plant J* 64: 331-342

Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J, Jacobsen SE. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5: e129.

Zhong R, Ye ZH (2004) Amphivasal vascular bundle 1 , a gain-of-function mutation of the IFL1/REV gene, is associated with alteration in the polarity of leaves, stems and carpels. *Plant Cell Physiol* 45: 369-385

