

総説

植物の葉の軸形成に関わる遺伝子発現制御ネットワークの解明

小島晶子^{1,2)}, 高橋広夫^{1,2)}, 佐藤信雄²⁾, 氣多澄江¹⁾, 町田千代子^{1,2)}

¹⁾中部大学・応用生物科学研究科, ²⁾中部大学・植物バイオ研究センター

要旨

葉は、茎頂メリステムとよばれる地上部の幹細胞からなる細胞群から発生・分化し、基部-先端部軸、向背軸、中央-側方軸に沿った3次元的な分化と成長の結果、扁平で左右対称的な形となる。近年、シロイヌナズナを中心として、葉の表と裏（向背軸）の確立に関与する様々な遺伝子が単離され、それらの遺伝子機能が解明されつつある。本稿では、最初に、葉の軸形成に関わる遺伝子について解説し、次に、葉の軸形成における遺伝子発現制御ネットワークの解明について、バイオインフォマティクスを用いた我々の方法を紹介する。さらに、ヒストン修飾因子や核小体に局在する因子等の葉の軸形成における機能について、最近の知見を紹介する。

1. はじめに

葉や花器官は地上部の主要な器官であり、左右相称で扁平な形がその特徴である。すなわち、3つの基部から先端部に向かう成長と分化、向軸（表）側と背軸（裏）側の分化、中央から側方軸方向の成長と分化という、3つの軸に沿って成長した結果、葉という器官が完成する¹⁾ (図1)。葉の原基は、ドーム状の茎頂メリステムの側面の周辺部領域から突起状の構造として生じる。植物の場合の軸方向は、動物の背腹軸とは異なり、葉が配置される中心の軸（主軸）に対する方向性を示す。主軸に面している表側を向軸側と言い、裏側を背軸側と言う。表側は光合成に、裏側はガス交換に適するように分化しており、それぞれ異なる機能を持つ細胞が並んでいる。中央には維管束系として木部が向軸側に、師部が背軸側に形成される。1995年、WaitesとHudsonはキンギョソウの *phantastica* (*phan*) 変異体において棒状の葉が観察されることを見出した。その表面は全て背軸側の性質を持つ細胞でおおわれ、中心には師部が木部を囲む形で存在していた。Hudsonは1950～1960年代の実験形

態学的観察の結果と *phan* 変異体の解析結果から、向背軸（表裏）の決定は葉原基形成の初期に起こり、表裏が決定されることが、扁平な葉身を形成するために必要であるという説を提唱した。その後の分子遺伝学的な解析からも、Hudsonの説は基本的には正しいことが示唆されている。すなわち、葉の表裏が決まらない場合には、中央から側方軸方向の成長ができないため棒状の葉が形成されると考えられる。

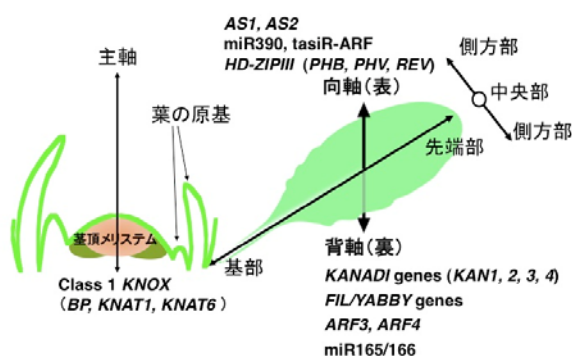


図1 葉の3つの軸形成の模式図

2. 植物の葉の3つの軸形成に関わる遺伝子群

2.1 基部-先端部軸形成

植物のホメオボックス遺伝子の一つのグループに属す class 1 KNOX 遺伝子群は、本来、未分化状態にある茎頂メリステム周辺部で発現し、茎頂メリステムの発生と維持に関わることが示唆されている。葉が発生する時には、まず、class 1 KNOX 遺伝子群の発現抑制が起こることが重要である。最初に葉原基予定領域で、class 1 KNOX 遺伝子群の転写物の消失が起こることが、トウモロコシとシロイヌナズナで示されているが、この消失に関わる因子は、未だ同定されていない。次に、葉原基予定領域から、最初は棒状の、いわゆる放射対称の突起ができる。双子葉のシロイヌナズナやキンギョソウ、また単子葉のトウモロコシでは、葉原基の形成初期に class 1 KNOX 遺伝子の発現が完全に抑制されることが、葉が基部から先端部に向かって正常に分化し成長していくために重要であることが示唆されている。このような、葉原基における class 1 KNOX 遺伝子の抑制には、キンギョソウの *PHAN*, トウモロコシの *ROUGH SHEATH2* (*RS2*), シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) が中心的な機能をもつ。これらの遺伝子は Myb ドメインをもつ転写因子をコードしており、互いにアミノ酸配列に強い相同性をもつ。これらの遺伝子の変異体は、葉で class 1 KNOX 遺伝子が異所的に発現しており、それぞれ、葉の基部から先端部に向けた分化が不十分な形の葉が形成される。シロイヌナズナでは、*AS2* 遺伝子が *AS1* と共に機能する。*AS2* は植物固有の新規なドメイン (*AS2* ドメイン) をもつタンパク質をコードする²⁾。*AS1* と *AS2* タンパク質は複合体を形成して機能し、class 1 KNOX 遺伝子を直接抑制制御している³⁾。*RS2*, *PHAN*, *AS1*, *AS2* は class 1 KNOX 遺伝子群の発現抑制の機能を通して、葉原基形成開始にあたって、まず茎頂メリステムの周辺部の葉原基予定領域の細胞を未分化状態

から分化状態にすると共に、葉の細胞の分化状態を保つことにより基部-先端部軸形成に関わると考えられる。

2.2. 向軸面-背軸面の形成

向背軸に関わる遺伝子として最初に同定されたのは、実は、先に述べたキンギョソウの *PHAN* 遺伝子である。*phan* 変異体は前述のように背軸化した棒状の葉を持つ（ただし、15 °C で生育させた場合と言う条件付きではあるが）ことから、*PHAN* は向軸側の分化にも関わると考えられる。シロイヌナズナの *AS1* と *AS2* も、同様に、向軸側の分化に関わる。その後、向軸側・背軸側の細胞分化に関わる多数の遺伝子群がシロイヌナズナを中心に同定された^{1,4,5)} (図 1)。葉原基形成初期から向軸側では *PHB*, *PHV*, *REV* (HD-ZIPIII ファミリーに属す遺伝子群) が特異的に発現する。これらの遺伝子はアミノ末端側にホメオドメインとロイシンジッパモチーフを持つ HD-ZIPIII ドメイン、その後ろに哺乳類でステロール/脂質結合部位にみられる配列 (START ドメイン) を共通に持つ。これらの三重欠失変異体 *rev phb phv* では外側が背軸面的性質を持つ棒状の子葉を 1 枚だけ持つ個体が観察される。従ってこれらの遺伝子は葉の細胞の向軸側化に関わると考えられる。一方、背軸側ではジンクフィンガーと HMG ドメインをもつ *YABBY* ファミリーに属する *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*), *YABBY3* (*YAB3*), *YAB5* 遺伝子、さらに *GARP* ファミリーに分類される *KANADI1* 遺伝子 (*KAN1*, *KAN2*, *KAN3*, *KAN4*) が特異的に発現しており、いずれも転写因子として機能すると推測されている。これらに加えて、*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。

2.3. シロイヌナズナの葉の向背軸確立における低分子 RNA の役割

シロイヌナズナの葉原基形成初期には、葉の向背軸化に関わる上記の転写因子に加えて、2種の低分子 RNA が鍵となる機能をもつ⁶⁾。すなわち、*HD-ZIPIII* (*PHB*, *PHV*, *REV*) 転写物の分解に関わる *miR165/166* と、*ETTIN/ARF3*, *ARF4* の転写物の分解に関わる *trans-acting siRNA* (*tasiR-ARF*) である (図 1)。*HD-ZIPIII* 遺伝子のひとつである *PHB* の優性変異体 *phb-1d* アリルをもつシロイヌナズナは、向軸側化した棒状の葉を形成するが、このアリルは、*miR165/166* の標的配列内に変異をもつために、*miR165/166* による分解をうけないと考えられ、その結果として、向背軸形成に異常をきたして、棒状の葉を形成したと推測される。*miR165/166* は、背軸側の細胞で *HD-ZIPIII* 遺伝子の転写後の制御に関わり、これらの向軸側因子の発現領域を葉の表側だけに特定しているようである。一方、*tasiR-ARF* は、*ETT/ARF3*, *ARF4* をターゲットとしてこれらの転写物の分解制御に関わり、*miR165/166* とは逆に、向軸側の細胞の確立に貢献している。すなわち、*ETT/ARF3*, *ARF4* の発現領域を背軸側だけに持続的に限定する役割をになっている。実際、*tasiR-ARF* の生成に必要な *microRNA390* と *tasiR-ARF* 自身は向軸側の細胞に検出される⁷⁾。葉の表裏の確立には、二重、三重の制御機構があるが、そのことの意味は興味深い。

2.4. 中央-側方軸形成

双子葉植物では前述のように向背軸の分化に異常をきたし、葉身を欠く変異体が多く報告されており、向背軸面の形成と中央-側方軸形成は密接に関連していると考えられている。*tasiR-ARF* に分解制御を受けない変異型 *ETT/ARF3* を導入すると、特に、中央側方軸方

向の成長にアンバランスを生じた葉を形成する⁸⁾。後に述べるが、*AS1* と *AS2* は、*ETT/ARF3* の抑制を通して側方軸方向の分化にも関わると考えられる。

3. 知識ベース FuzzyART 法による *AS1* と *AS2* が制御する遺伝子ネットワーク解明

近年、遺伝子の発現レベルを網羅的に解析するツールとして、マイクロアレイが使用される。マイクロアレイは、1991 年に公表された技術であるが、ガラス基板上に数千~数万の遺伝子 DNA を高密度に配列したデバイスであり、遺伝子発現プロファイルや遺伝子多型をゲノムスケールで解析することを可能にした。マイクロアレイを用いた実験では、一度に数千から数万の遺伝子発現データが得られるため、従来からある統計・情報学的な解析手法では解析が困難である。そこで、新しいアルゴリズムの開発が求められた。細胞が外部から何らかの刺激を受けた場合や、変異体などにおいて、マイクロアレイを用いて全遺伝子の発現プロファイル解析を行い、データの解析を適切なアルゴリズムを用いて解析することによって、系統的な機能解析を行うことができる。たとえば、がん細胞の遺伝子発現プロファイルを正常細胞と比較することによって、がん化のメカニズムを明らかにし、ターゲット遺伝子を解明し、抗がん剤の開発につなげることができる。

植物においても、2000 年にシロイヌナズナ的全ゲノム配列が発表されて以来、加速的に発現解析データが蓄積している。全ゲノム解析データによると、転写因子の候補となるタンパク質をコードする遺伝子の数は、全遺伝子の約 6~7%となっている。植物の発生・分化においても、動物と同様に、転写因子が重要な役割を果たしている。現在、発生・分化に関わる転写因子をはじめとした多くの遺伝

子の機能が明らかになった段階で、それらの遺伝子による発現制御機構の解明が精力的に行われている。一方、発生・分化の過程では、遺伝子発現の時間的、空間的制御が重要であると考えられるが、必ずしも、実験的に、これらを厳密に制御あるいは、細胞分割することは容易ではない。ある程度の時間的、空間的厳密性を保ちながら、多くの関連した遺伝子の発現の動きを見る事により、遺伝子発現のネットワークを明らかにすることが望まれる。このような実験材料を用いても、比較的小さな発現レベルの差から、遺伝子発現制御のしかたを予測できれば、理解が急速に進むと期待される。

筆者らは、このような解析の一つの例として、これまでに研究を行ってきた葉の発生と分化に関わる *AS1* と *AS2* 遺伝子を中心に、DNA マイクロアレイ解析を行った。シロイヌナズナの *AS1* と *AS2* 遺伝子は、先に述べたように、それらの変異体が非常に多面的な表現型を示すことから、3つの軸形成すべてに関わっている可能性が示唆された。class 1 *KNOX* 遺伝子群の発現を抑制する機能をもつことは2000年に既に示されていたが、葉の分化過程で、class 1 *KNOX* 以外の遺伝子の発現制御にも関与している可能性が考えられた。また、向軸側化に関わっていることが予想はされたものの、明確な遺伝子発現変化は示されていない。アレイ解析をしたものの、class 1 *KNOX* 遺伝子群も含めて発現レベルの変化は、1.5 倍から数倍程度であり、おそらく、未知遺伝子の発現レベルの変化があったとしても、小さいものであると予測された。従って、これらのデータについて新しいクラスタ解析が求められていた。

FuzzyART は、小林らが提案した新しいクラスタリング手法で、遺伝子発現データのようにノイズの多いデータに対してロバストな

手法⁹⁾であり、適応共鳴理論¹⁰⁾とファジィ理論¹¹⁾に基づいている。また、この方法に対し、最適なクラスタ数を決定する方法が高橋ら¹²⁾により報告されているため、容易にクラスタ数が最適化できるという特徴がある。

筆者らの解析においては、FuzzyART の改良版である既知情報に基づいた知識ベース FuzzyART (KB-FuzzyART) による解析が極めて有効であることがわかった¹³⁾。まず、我々は、この既知情報として、植物の発生分化に深く関わると考えられる転写因子群や植物ホルモン関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子を網羅した遺伝子リスト (322 遺伝子) を作成した。図2のように4種の株 (野性型, *as1* 変異体, *as2* 変異体, *AS1promoter::AS2/as2* 形質転換体 (*PAS1::AS2*)) の茎頂部から RNA を抽出し Affymetrix 社 GeneChip を用いて、22746 プローブの遺伝子発現解析を行った。*PAS1::AS2* 形質転換体は *AS2* の弱い過剰発現体と考えていただきたい。KB-FuzzyART 法によるクラスタリング解析のスキームを図3に示した。まず、作成したリスト遺伝子を既知遺伝子として、代表的パターンを構築した後、未知遺伝子のクラスタ分類を行った。この方法では、既知遺伝子のみでクラスタリングを行うので正確なクラスタリングが可能、かつ高速計算が可能である。実際、従来の方法では、1週間以上を要したがこの方法では、10秒程度でクラスタリングが可能である。この時点での解析で

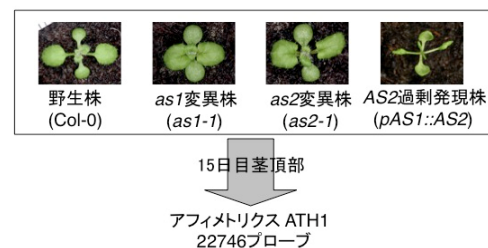


図2 DNA マイクロアレイ解析に使用したシロイヌナズナ

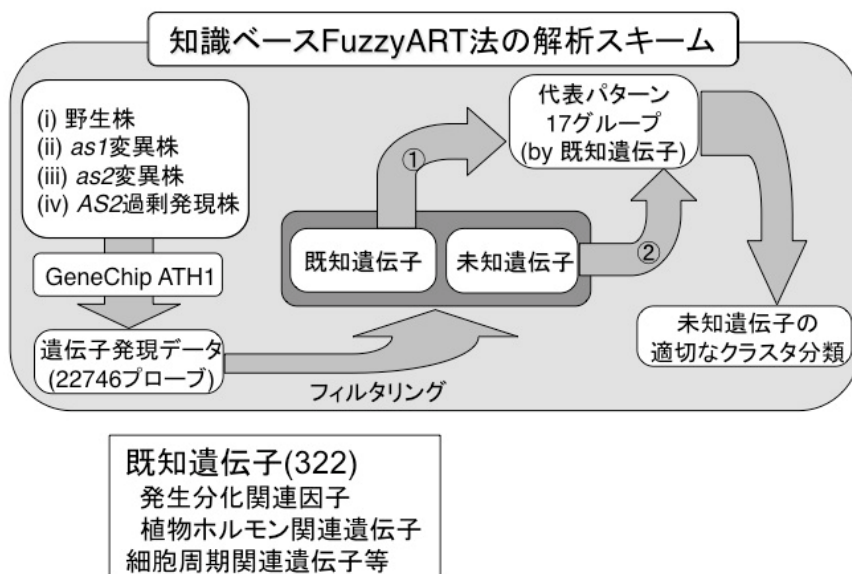


図3 知識ベースシステムを用いた新 FuzzyART (KB-FuzzyART) 法によるクラスタリング
知識ベース FuzzyART 法による、シロイヌナズナの *AS1* と *AS2* が制御する遺伝子ネットワーク
解明の模式図を示した。最初に既知遺伝子（322 遺伝子をリスト）で代表パターンを生成し、2
ステップ目で未知遺伝子を分類する新しいアプローチ方法である。

は、322 の既知遺伝子から発現の変化のない遺伝子を除去した 94 の遺伝子をクラスタリングして、17 クラスタに分類した（表 1）。その結果、既知遺伝子では class 1 *KNOX* 遺伝子である *BP* と背軸側の因子である *ETT/ARF3* が同じクラスタ 3 に分類された。次に、未知遺伝子についてクラスタ分類を行い、興味深い転写因子等を含む 48 遺伝子が抽出された。一方、に示したクラスタ 11 にも、class 1 *KNOX* と背軸化因子が分類されたので、*as1* 変異体、*as2* 変異体の茎頂部で転写物の蓄積レベルが上がるクラスタとして着目した。

次に、リアルタイム PCR で確認したところ、3 つの背軸化に関わると考えられる転写因子（*ETT/ARF3*, *KAN2*, *YAB5*）の蓄積レベルに変化があることが明確になった。このことから、*AS1* と *AS2* 遺伝子が、葉の裏側化に関わる遺伝子を負に制御することを初めて遺伝子発現レベルで示すことができた¹⁴⁾。

一方、*AS1* 遺伝子が、*BP* と *KNAT2* (class 1

KNOX 遺伝子) を直接制御していることが示されている³⁾。また、我々は、*AS1* と *AS2* 遺伝子が class 1 *KNOX* 遺伝子を負に制御することにより、基部-先端部軸にそった葉の分化に関わっていることを示した¹⁵⁾。現在、我々は、*AS1* と *AS2* 遺伝子による背軸化に関わる遺伝子（*ETT/ARF3*, *KAN2*, *YAB5*）に対する負の制御機構について解析を進めている。

以上の結果は、KB-FuzzyART 法を用いることにより、発現レベルの変化が小さくても、下流で制御される新奇な遺伝子を正確に抽出できることを示している。*as1*, *as2* 変異体は共に、葉に多面的な異常を示すが、このことと、複数の遺伝子の制御機能とはよく一致している。*AS1* と *AS2* は葉の分化初期過程で、茎頂部の細胞と背軸的性質を持つ細胞で発現している複数の遺伝子を、向軸側の細胞で発現しないように抑制することにより 3 つの軸形成の確立に機能していると考えられる。一方、裏側化因子である *KAN1* 遺伝子が逆に *AS2* の

Cluster number	Gene list-1	Categories in gene list-1			Ratio of gene list-1 (%)	Cluster member	Pattern		
		1	2	3			<i>as1-1</i>	<i>as2-1</i>	<i>as2-1/pAS1::AS2</i>
1	9	1	4	4	2	415	0	-	0
2	9	4	1	4	2	585	0	0	+
3	2	2	0	0	4	48	+	+	-
4	5	3	1	1	1	703	0	+	0
5	7	3	1	3	2	289	-	-	0
6	5	2	2	1	1	530	-	0	0
7	14	3	1	10	2	717	+	0	0
8	2	1	0	1	3	70	0	+	+
9	2	0	1	1	5	37	+	0	+
10	2	1	0	1	2	106	-	0	-
11	12	5	1	6	4	327	+	+	0
12	1	0	0	1	20	5	+	-	-
13	4	0	0	4	7	60	0	-	-
14	14	6	2	6	2	683	0	0	-
15	2	0	0	2	1	180	-	-	-
16	1	1	0	0	1	106	-	-	-
17	3	0	0	3	3	106	+	+	+
Outlier	0	0	0	0	0	98	ND	ND	ND
Over all	94	32	14	48	2	5065	ND	ND	ND

表1 FuzzyARTによるクラスタリング結果

+, -, 0, ND はそれぞれ、転写物の蓄積レベル増加、転写物の蓄積レベル減少、変化無し、判定できない場合を示している。Categories in gene list-1 の1は cell fate determination related genes, 2は、cell division related genes, 3は、plant hormone related genes を示す。

発現抑制に関わることも示された¹⁶⁾。以上の結果から得られた遺伝子制御ネットワークを図5にまとめた。

4. 葉の向背軸形成において *AS1*, *AS2* と協調的に働く因子の機能

先に述べたように, *tasiR-ARF* は, *AS1* と *AS2* が負に制御する *ETT/ARF3* の mRNA を分解制御する。実は, *tasiRNA* の生成に関わる遺伝子群 (*RDR6*, *SGS3*, *DCL4*, *AGO7*) は, *AS1*, *AS2* の機能と協調して, 向軸面の分化に関わる因子であることが遺伝学的な実験から示唆されている^{17, 18)}。低分子RNAの生成は, 核小体近傍で起こっている等の報告もある。さらに, 最近, 我々は, ヒストンアセチル化酵素活性ドメインを持つタンパク質をコードする *ELONGATOR3* 遺伝子が *AS1*, *AS2* と協調的に作用することも示した¹⁹⁾。また, リボソームタンパク質遺伝子, 26S プロテアソーム構成因子など核小体に局在する因子が *AS1*, *AS2* と協調的に作用することも示されている^{20, 21), 22)}。すでに, 筆者らは, *AS1*, *AS2* タンパク質が核小体の周縁部に局

在することを示した²¹⁾。*AS1* はヒストンシヤペロン活性のある *HIRA* と相互作用することも報告されている²³⁾。発生分化においては, ある遺伝子の抑制状態の恒久的維持が保障されること (エピジェネティックな制御) が重要であることが示唆されているものの, 未だ, その全貌は明らかになっていない。エピジェネティックな制御であるヒストン修飾や DNA メチル化の機構はまだ未解明な部分が多い。*AS1*, *AS2* による class 1 *KNOX* や背軸化因子の発現の抑制は, 核小体の周縁部で起こっているのかもしれない。低分子 RNA による制御と *AS1* と *AS2* による制御は, 核小体周縁部という場を共有しているのかもしれない。今後明らかにすることが重要であろう。

5. おわりに

植物の発生分化に関わる遺伝子がこの 10 年くらいの間に多数単離され, さまざまな転写因子が重要な機能をもっていることがわかってきた。また, 植物に特徴的なドメイン構造をもつ因子も同定された。地球上には, 実に多様な葉の形をした様々な植物が生育して

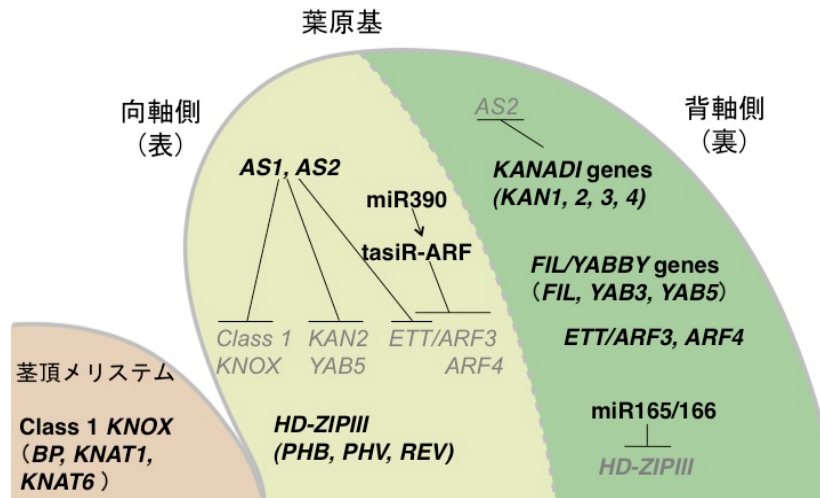


図4 葉の発生・分化に関わる遺伝子の制御ネットワーク

いる。本稿で述べた葉の発生分化過程で軸形成に関わる遺伝子機能のわずかの違いが、葉の形の違いとなって現れると考えられる。発生過程では、全体の中ではほんの一部のわずかな細胞で分化が起こっていると考えられ、レーザーマイクロダイセクション法を用いる等、細胞単位での遺伝子発現を調べるのが理想である。しかしながら、実際には、実験的に非常に困難な場合が多い。そのような状況でも、我々は、マイクロアレイと知識ベースシステムによるクラスタリング解析と遺伝学を併用することにより、遺伝子発現ネットワークを造ることができることを示した。本方法を応用することにより発生・分化の新しい知見が得られることを期待したい。

謝辞

ここで紹介した研究は、中部大学応用生物学研究科の小林猛教授、中部大学植物バイオ研究センターの岩川秀和博士、岩崎まゆみ博士、中川彩美博士、名古屋大学大学院理学研究科町田泰則教授と研究室の方々の協力のもとに行われた。この場をかりて感謝します。また、本研究は、文科省学術フロンティア推進事業の研究助成のもとで行われたものです。

引用文献

- 1) Hudson, A. (2000) DEVELOPMENT OF SYMMETRY IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 349-370.
- 2) Matsumura, Y., Iwakawa, H., Machida, Y. and 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: 525-537.
- 3) Guo, M., Thomas, J., Collins, G. and Timmermans, M.C. (2008) Direct repression of *KNOX* loci by the *ASYMMETRIC LEAVES1* complex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 48-58.
- 4) Tsukaya, H. (2006) MECHANISM OF LEAF-SHAPE DETERMINATION. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 477-496.
- 5) Bowman, J.L. and Floyd, S.K. (2008) Patterning and polarity in seed plant shoots. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 67-88.
- 6) Husbands A.Y., Chitwood D.H., D.H., Plavskin Y., Timmermans M.C. (2009) Signals

- and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes Dev.*, 23, 1986-1997 (2009)
- 7) Chitwood, D.H, Nogueira, F.T, Howell, M.D, Montgomery, T.A, Carrington, J.C and Timmermans, M.C. (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev.* 23: 549-554.
 - 8) Hunter, C., Willmann, M.R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. and Poethig, R. S. (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of *ETTIN* and *ARF4* regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133: 2973-2981.
 - 9) Tomita, T. Hanai, T. Honda, H. and Kobayashi, T., (2002) Analysis of expression profile using fuzzy adaptive resonance theory, *Bioinformatics*, 18, 1073-1083.
 - 10) Carpenter, G.A., Grossberg, S. and Reynolds, J.H. (1991) ARTMAP: supervised real-time learning and classification of nonstationary data by a self-organizing neural network. *Neural Networks*, 4, 565-588.
 - 11) Zahed, L.A. (1965) Fuzzy Sets. *Information and Control*, 8: 338-353.
 - 12) Takahashi, H., Tomida, S., Kobayashi, T., and Honda, H. (2003) Inference of common genetic network using fuzzy adaptive resonance theory associated matrix method. *J. Biosci. Bioeng.*, 96, 154-160.
 - 13) Takahashi, H., Iwakawa, H., Nakao, S., Ojio, T., Morishita, R., Morikawa, S. et al. (2008) Knowledge-based fuzzy adaptive resonance theory and the application to gene expression analysis of plants. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 587-593.
 - 14) Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H. et al. (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.
 - 15) Ikezaki, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Kojima, S., Ueno, Y., Machida, C. et al. (2011) 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
 - 16) Wu, G., Lin, W.C., Huang, T., Poethig, R.S., Springer, P.S. and Kerstetter, R.A. (2008) *KANADI1* regulates adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis* by directly repressing the transcription of *ASYMMETRIC LEAVES2*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105: 16392-16397.
 - 17) Li, H., Xu, L., Wang, H., Yuan, Z., Cao, X., Yang, Z., et al. (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.
 - 18) Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E. and Martienssen, R.A. (2006) Specification of Leaf Polarity in *Arabidopsis* via the *trans*-Acting siRNA Pathway. *Curr. Biol.* 16: 933-938.
 - 19) Kojima, S., Iwasaki, M., Takahashi, H., Imai, T., Matsumura, Y., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., Machida, Y. and 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.
 - 20) Byrne M.E. (2009) A role for the ribosome in

- development. *Trends Plant Sci.*, 14, 512-519.
- 21) Ueno Y., Ishikawa T., Watanabe K., Terakura S., Iwakawa H., Okada K. et al. (2007) Histone Deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 Are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 445–457.
- 22) Horiguchi, G., Mollá-Morales, A., Pérez-Pérez J.M., Kojima, K., Robles, P., Ponce M.R. et al. (2011) Differential contributions of ribosomal protein genes to *Arabidopsis thaliana* leaf development. *Plant J.* 65: 724–736.
- 23) Phelps-Durr, T.L., Thomas, J., Vahab, P. and Timmermans, M.C. (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: 2886-2298.

Title: Construction of the genetic regulatory network in the formation of leaves in plants.

Authors: Shoko Kojima^{1,2}, Hiro Takahashi^{1,2}, Nobuo sato², Sumie Keta¹, Chiyoko Machida^{1,2}

Addresses: ¹Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200

Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan,

²Plant Biology Research Center, Chubu

University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, ASYMMETRIC LEAVES2, cluster construction, gene expression, leaf development