

総説

シロイヌナズナの側生器官分化における *ASYMMETRIC LEAVES2* 遺伝子の役割

氣多澄江, 中川彩美, 小島晶子, 町田千代子

中部大学・応用生物学研究科

要 旨

種子植物の地上部では未分化な細胞の塊であるメリステムから側生器官が分化し、栄養成長期には葉が、生殖成長期には花が形成される。シロイヌナズナの *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) 遺伝子は、葉および花器官原基で発現し、これらの初期発分化過程で機能する。*AS2* タンパク質は *ASYMMETRIC LEAVES1* (*AS1*) タンパク質と核小体に共局在することが示唆され、ともに転写抑制に関わることが明らかになっているものの、その分子機能はいまだ不明な点が多い。本稿では、種子植物における側生器官の分化と、分化制御に関わる鍵遺伝子である *AS2* について解説する。また、葉の器官分化と花の形態形成における *AS2* の分子機能について、最近我々が得た知見を紹介する。

1. はじめに

高等植物は、茎頂分裂組織（茎頂メリステム、shoot apical meristem; SAM）と根端分裂組織（根端メリステム、root apical meristem; RAM）と呼ばれる幹細胞的性質をもつ未分化な細胞塊から、器官発生部位において細胞が分化し、多様な側生器官が形成される。種子植物のモデル植物であるシロイヌナズナの地上部では、栄養成長期に茎頂メリステムから本葉が分化し、生殖成長期になると茎頂メリステムが花序分裂組織（花序メリステム）へと転換し、花茎が伸長する。そして花序分裂組織の周縁部に茎生葉、側芽、および花芽分裂組織（花芽メリステム）が形成される。さらに花芽分裂組織から花器官が分化する。これらの分化には複数の遺伝子制御ネットワークが関わる。

2. 側生器官の分化

2.1 葉の分化

扁平で左右相称な高等植物の葉の形成は、発生の過程において、基部から先端部へ向かう軸方向、

向軸（表）側と背軸（裏）側の軸方向、および中央から側方への軸方向の3つの軸に沿った成長と分化が厳密に制御されて完成すると考えられている^{1,2)}(図1)。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。葉原基は周辺部(PZ)から発生し、外側にある細胞層から隆起した突起として現れ、茎頂メリステムに近い側が向軸側の、遠い側が背軸側の性質をもつ細胞に分化する。向背軸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。また葉の中央部分には、維管束組織の木部が向軸側に、篩部が背軸側に発達する。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増殖・伸長するとともに、中央の軸から両側方へ向かう

で増殖・伸長することで左右相称な葉が形成され
ると考えられている^{2,3)}.

葉原基形成の初期段階では、茎頂メリステムと
その周縁部で発現する class 1 *KNOTTED-like*
homeobox (*KNOX*) 遺伝子である
BREVIPEDICELLUS (*BP*) /*KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6*
および *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⁴⁻⁶⁾.

class III homeodomain leucine zipper (*HD-ZIP III*)
ファミリーの3つの遺伝子, *PHABULOSA* (*PHB*),
PHAVOLUTA (*PHV*), および *REVOLUTA* (*REV*)
はいずれも葉の向軸側で発現し、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⁷⁻⁹⁾. これ
らの転写産物は、低分子RNAである *microRNA165*
(*miR165*) および *miR166* によって分解されるこ
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^{10,11)}. *PHB*, *PHV* および *REV*
遺伝子の機能獲得変異体では、向軸側化した棒状
の葉を形成する^{7,9,11)}.

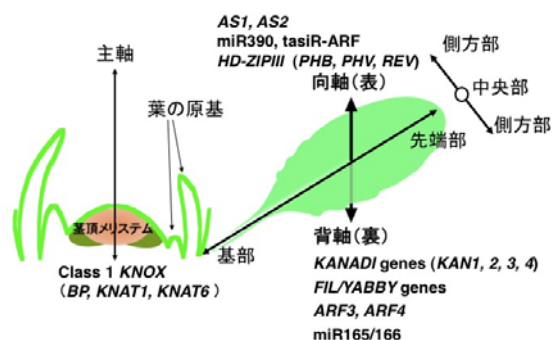


図1 3方向軸に沿った葉の分化の模式図

一方、*YABBY* ファミリーに属する
FILAMENTOUS FLOWER (*FIL*), *YABBY3* および
YABBY5 遺伝子, *KANADI* ファミリーに属する
KAN1, *KAN2*, *KAN3* および *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¹²⁾. 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¹³⁾. *ETT/ARF3* と *ARF4* は、

tasiR-ARF と呼ばれる低分子RNAである
trans-acting siRNA (*ta-siRNA*) による分解制御を
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^{14,15)} (図1).

2.2 花の分化

一方、花は生殖成長期に茎頂メリステムに由来
する少数の細胞から発生する。シロイヌナズナの
花は、がく片、花弁、雄蕊および雌蕊の4つの器
官からなり、これらの器官の形質はABCクラス
と呼ばれる花のホメオティック遺伝子によって
決定される¹⁶⁾. また、この経路と並行して花の器
官の数や相称性などを決める遺伝子群の存在も
明らかになっており、花序メリステムの維持・分
化においても茎頂メリステムの維持・分化と類似
したメカニズムの存在や遺伝子の関与が示唆さ
れている¹⁷⁾.

3. *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*) 遺伝子

3.1 葉および花器官分化の鍵遺伝子 *AS2*

シロイヌナズナの *AS2* 遺伝子は199アミノ酸残
基からなる核タンパク質をコードし、アミノ (N)
末端側に植物に特異的な配列をもつ¹⁸⁾. 約100ア
ミノ酸残基で構成されるこの領域は、*AS2/LOB*
ドメインと命名されており、4つのシステイン残
基の繰り返しからなる領域、保存されたグリシン
を含む中間領域、およびロイジンジッパー領域か
らなる^{18,19)}. *AS2* はこの領域をもつ他の41個の
ASYMMETRIC LEAVES2-like/LOB domain
(*ASL/LBD*) タンパク質とともにファミリーを構
成している^{18,20)}. *ASL/LBD* 遺伝子の中には互いに
機能的に重複して働くものも存在することが示
唆されているが、*AS2* 遺伝子と機能的に重複する
ASL/LBD 遺伝子はないことが示されている²⁰⁾.

3.2 *as2*, *as1* 変異体における側生器官の形態異常

as2 変異体は当初、中央側方軸に異常を示す変
異体として単離された²¹⁾. 国内外の複数のグルー
プの解析により、*as2* 変異体は *as1* 変異体と共通

した多面的な表現型異常を示すことが報告されている。*as2*, *as1* 変異体の葉は左右非対称に切れ込みが入り、下向きにカールし、表面が凸凹になる。また野生型の葉に比べ葉柄と葉身が短く、葉柄から左右非対称に小葉構造が形成される。葉の維管束にも異常が現れ、主脈が細くなり、二次脈との差が不明瞭になる。さらに高次脈の形成が不全となり、葉脈パターンが単純化する^{4,6,22)}(図2)。

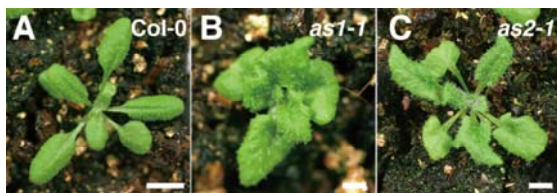


図2 シロイヌナズナの野生型 (Col-0), *as2-1* および *as1-1* 変異体植物。

また後述するように、花においても野生型とは異なり、雌蕊が突出した表現型を示す^{6,22,23)}。

AS1 遺伝子の機能欠損型変異体の葉は *as2* 変異体の葉とよく似た表現型を示す^{4,6)}。また、*as2 as1* 二重変異体の葉の表現型は、それぞれの単独変異体の表現型に類似している²⁴⁾。*AS2* の過剰発現植物体は野生型背景では顕著な表現型異常を示すが、*as1* 変異体背景ではその異常が見られないことから、*AS2* は *AS1* と葉の発生において同一もしくは重複した経路で働くことが示唆されている²⁵⁾。

4. 葉器官分化における *AS2* 遺伝子の転写制御

葉原基形成の初期において、*AS2*, *AS1* は class 1 *KNOX* 遺伝子である *BP*, *KNAT2* および *KNAT6* の転写を抑制する^{4,6)}。またこの転写抑制制御が *as2*, *as1* 変異体でみられる多面的な表現型に関わる²²⁾。*AS2*, *AS1* による遺伝子発現制御機構について、詳細は前報を参照されたい²⁶⁾。

5. 葉の向背軸形成において *AS2* と協調的に転写制御を行う因子

葉の向背軸分化における転写制御には、*AS2*, *AS1* 以外にこれと協調的に働く因子も存在する。

これまでに *as2* または *as1* 変異体背景で *as2*, *as1* 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²⁷⁾。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 *ELONGATA3* 遺伝子や、*NudC* タンパク質のホモログをコードする遺伝子が *AS2* と協調的に作用することを示した^{27,28)}。*ELONGATA3* 遺伝子の変異 (*east1*) は *as2* 変異体の葉の表現型異常を著しく亢進し、棒状やラッパ状の葉を形成する(図3)。しかしながらその分子メカニズムはまだ明らかではない²⁷⁾。

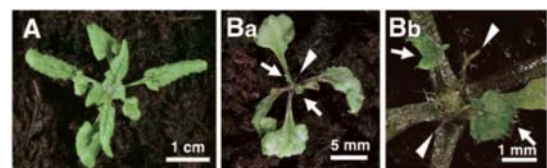


図3 *as2-1 east1-2* 二重変異体の表現型。

as2-1 単独変異体 (A), *as2-1 east1-2* 二重変異体 (Ba), および (Ba) における白枠で示した茎頂部分の拡大 (Bb)。矢じりは棒状の葉を、矢印はラッパ状の葉を示す。文献27, 図1を一部改変。

AS2 と協調的に働く因子の中で、複数のタンパク質は細胞内の核小体に局在する。また、核小体との関わりが推定される機能をもつ分子も多い。既に我々のグループは、*AS2* タンパク質が塊状の構造体 (*AS2* ボディ) を形成して *AS1* とともに核小体の周縁部に局在することを示しており、最近、その局在に必要な配列も示した^{29,30)}。*AS2* による転写制御機構には、核小体が重要な役割をもつ可能性が考えられる。

6. 花器官の初期分化過程に関わる遺伝子

シロイヌナズナにおける葉の背軸化因子としても知られる *FIL* 遺伝子はもともと花器官がフィラメント状になる変異体の原因遺伝子として単離された³¹⁾。*FIL* 遺伝子は出現し始めている花芽メリステムの背軸側で発現する^{31,32)}。*HD-ZIP III* ファミリーに属し、葉の向軸化因子として知られる *PHB*, *PHV* および *REV* 遺伝子は、花芽などの側生器官の向軸側運命の制御に関わる^{7,9)}。*rev* 変

異体では、いくつかの花芽メリステムのサイズが減少するのが観察され、*REV* が花芽メリステムの形成において重要な役割を果たすことが示されている³³⁾。さらに *fil rev* 二重変異体では著しい花器官の表現型異常の亢進が見られ、花芽メリステムが完全に小花柄になる³⁴⁾。また、*ARF6* および *ARF8* 遺伝子が class 1 *KNOX* 遺伝子群を抑制することも示されている³⁵⁾。class 1 *KNOX* 遺伝子の *STM* および *KNAT2* 遺伝子は、異所的に発現させた花において、心皮の形成を促し、胚珠から心皮へのホメオティックな変化を促進させる働きがあることが示されている^{36, 37)}。

7. 花の形態形成における *AS2* 遺伝子の機能

AS2, *AS1* 遺伝子は花器官形成にも関わる。*AS1* の転写産物は、開花時に cryptic bract に相当する花序頂端部の側面で検出される⁴⁾。花原基では、*AS1* の転写産物の蓄積は初期にはがく片の原基で検出され、続いて全ての花器官の原基で検出される⁴⁾。*AS2* は我々が、花芽で転写産物が蓄積し、組織レベルでも花器官の原基や初期の花器官において *AS1* の転写産物とほぼ同じ領域で蓄積することを示した^{18, 38)} (図 4, 5)。

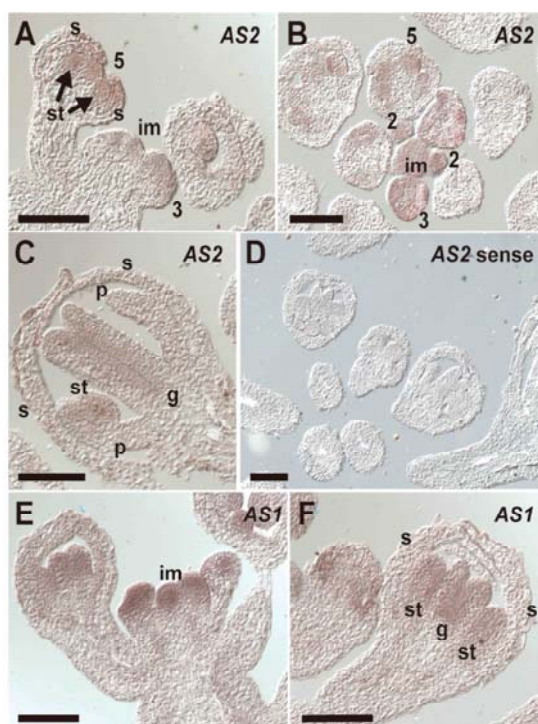


図 4 *in situ* ハイブリダイゼーションによる花器官における *AS2*, *AS1* 転写産物の検出。

(A-C) *AS2* アンチセンスプローブを用いた *AS2* 転写産物の蓄積パターン, (D) A, B, C のセンスプローブを用いたコントロール, (E, F) *AS1* アンチセンスプローブを用いた *AS1* 転写産物の蓄積パターン. (im) 花序メリステム, (s) がく片, (p) 花弁, (st) 雄蕊, (g) 雌蕊. 文献 38, 図 1 を一部改変。

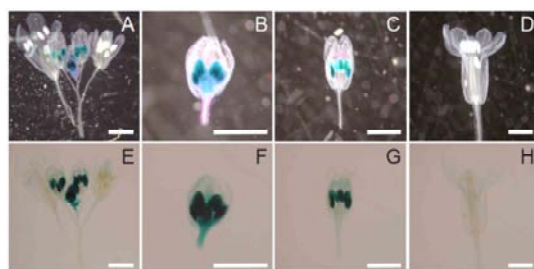


図 5 花器官における *GUS* レポーター遺伝子を用いた *AS2* の発現解析。

(A-H) *AS2p:GUS* を導入した植物体の花芽および花における *GUS* 活性. (A, E) 花序全体, (B-D, F-H) 開花前の花芽および花. A, B, C, D はそれぞれ E, F, G, H と同一のサンプルで、暗視野像(A-D)または明視野像(E-H). 文献 38, 図 2 を一部改変。

このことは、*AS2*, *AS1* 遺伝子は栄養成長期と同様、生殖成長期においてもほぼ同じ領域で共に機能する可能性を示唆する³⁸⁾。

as2 変異体では部分的に小花梗の長さが抑圧され、小花梗の原基が欠損することが報告された³⁹⁾。*as2*, *as1* 変異体の花では、雌蕊の柱頭が突出した特徴的な表現型が観察される (図 6)。がく片と花弁が細くなり下向きカーブルし、*as2*, *as1* 変異体のがく片と花弁は細くなる^{6, 22, 23)}。また、*as2*, *as1* 変異体の花の表現型異常は、class 1 *KNOX* 遺伝子群の三重変異により抑圧される²²⁾ (図 6)。

我々はさらに、花の発達段階における各花器官の長さを測定し、*AS2*, *AS1* が関わる花の形態と花器官の伸長を定量的に解析した³⁸⁾。その結果、*AS2*, *AS1* は主にながく片、花弁および雄蕊の長さ

の制御に関わることを示した (図 7). また class 1 *KNOX* 遺伝子群の変異により花器官の長さの比は野生型とほぼ同じに回復したことから、各花器官の長さの制御には、class 1 *KNOX* 遺伝子群の発現抑制を介することが示唆された³⁸⁾ (図 7). これらの結果から、*AS2*, *AS1* 遺伝子は各花器官の長さのバランスとがく片の形を制御することで、正常な花の形態形成に関わると考えられる³⁸⁾.

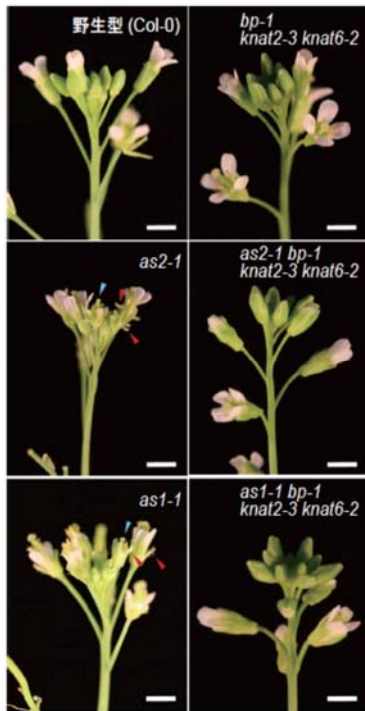


図 6 *as2-1*, *as1-1* 変異体の花の表現型の特徴と class 1 *KNOX* 遺伝子群の変異による影響. *as2-1*, *as1-1* 変異体で観察される雌蕊の突出した形質と、がく片が下向きにカールした形質をそれぞれ青色または赤色の矢じりで示す. 文献 38, 図 3 を一部改変.

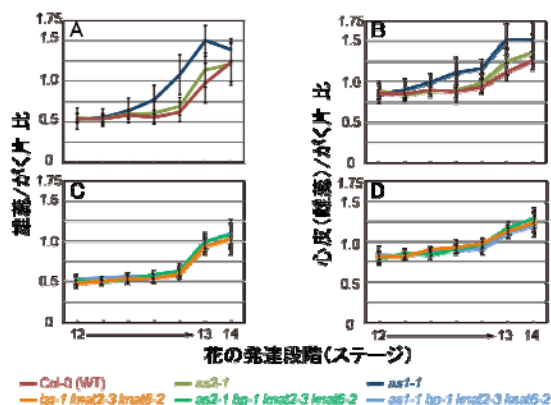


図 7 *as2-1*, *as1-1* 変異体における雄蕊/がく片比および心皮 (雌蕊) /がく片比とこれらに対する class 1 *KNOX* 遺伝子群の変異の影響. 文献 38, 図 5 を一部改変.

8. おわりに

AS2 は、欠損すると正常な側生器官が分化せず、分化において鍵となる遺伝子であると考えられるが、*as2* 変異体は全く側生器官が分化しなくなる訳ではない. 植物は物理的・生物的に様々な多様な環境条件のもとで生育する必要がある. このため、*AS2* は正常な分化を遂行するための守護神のような役割を担っており、側生器官の分化の進行に伴って時空間的に発現する各遺伝子の調節に関わるのかもしれない.

AS2 による転写制御機構の分子メカニズムはまだ明らかではないが、*AS2* の分子機能において、核小体との関わりが考えられる. 近年、核小体は、リボソーム合成以外に DNA 損傷応答、老化およびストレス応答にも重要な機能を持つことが示唆されており、植物のみならず他の生物においてもその重要性が注目されている. *AS2* とこれらと協調的に働く因子が側生器官の分化において、核小体とどのような関わりをもつのかを明らかにすることが今後の課題である.

謝辞

ここで紹介した研究は、中部大学植物バイオ研究センターの岩川秀和博士、名古屋大学大学院理学研究科の町田泰則教授、池崎征弥博士、インドネシア・ガジャマダ大学の Endang Semiarti 博士と、研究室の方々の協力のもとに行われた. この場をかりて謝意を表します. また、本研究の一部は、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) Steeves T.A., Sussex I.M.: Patterns in plant development. Cambridge University Press. (1989)
- 2) Hudson A.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 349-370 (2000)
- 3) Szakonyi D. et al.: J. Plant Res. 123: 281-290 (2010)
- 4) Byrne M.E. et al.: Nature 408: 967-971 (2000)
- 5) Ori N. et al.: Development 127: 5523-5532 (2000)
- 6) Semiarti E. et al.: Development 128: 1771-1783

- (2001)
- 7) Emery J.F. *et al.*: *Curr. Biol.* 13: 1768-1774 (2003)
 - 8) McConnel J.R. *et al.*: *Development* 125: 2535-2942 (1998)
 - 9) McConnell J.R. *et al.*: *Nature* 411: 709-713 (2001)
 - 10) Bao N. *et al.*: *Dev. Cell* 7: 653-662 (2004)
 - 11) Mallory A.C. *et al.*: *EMBO J.* 23: 3356-3364 (2004)
 - 12) Bowman J.L., Floyd S.K.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 67-88 (2008)
 - 13) Pekker I. *et al.*: *Plant Cell* 17: 2899-2910 (2005)
 - 14) Chitwood D.H. *et al.*: *Genes Dev.* 23: 549-554 (2009)
 - 15) Schwab R. *et al.*: *PLoS One* 4: e5980 (2009)
 - 16) Bowman J. ed.: *Arabidopsis, An Atlas of Morphology and Development.* Springer-Verlag (1994)
 - 17) Liu C. *et al.*: *Development* 136: 3379-3391 (2009)
 - 18) Iwakawa H. *et al.*: *Plant Cell Physiol.* 43: 467-478 (2002)
 - 19) Shuai B. *et al.*: *Plant Physiol.* 129: 747-761 (2002)
 - 20) Matsumura Y. *et al.*: *Plant J.* 58: 525-537 (2009)
 - 21) Rédei G.P., Hirono Y.: *Arabidopsis Inf. Serv.* 1: 9 (1964)
 - 22) Ikezaki M. *et al.*: *Plant J.* 61: 70-82 (2010)
 - 23) Byrne M.E. *et al.*: *Development* 129: 1957-1965 (2002)
 - 24) Serrano-Cartagena J. *et al.*: *Mol. Gene Genet.* 261: 725-739 (1999)
 - 25) Iwakawa H. *et al.*: *Plant J.* 51: 173-184 (2007)
 - 26) 小島ら. 中部大学生物機能開発研究所紀要. 11: 30-37 (2011)
 - 27) Kojima S. *et al.*: *Plant Cell Physiol.* 52: 1259-1273 (2011)
 - 28) Ishibashi N. *et al.*: *Biology Open* 1: 197-207 (2012)
 - 29) Ueno Y. *et al.*: *Plant Cell* 19: 445-457 (2007)
 - 30) Luo L. *et al.*: *J. Plant Res.* in press
 - 31) Sawa S. *et al.*: *Plant Cell* 11: 69-86 (1999)
 - 32) Siegfried K.R. *et al.*: *Development* 126: 4117-4128 (1999)
 - 33) Otsuga D. *et al.*: *Plant J.* 25: 223-236 (2001)
 - 34) Chen Q. *et al.*: *Development* 126, 2715-2726 (1999)
 - 35) Tabata R. *et al.*: *Plant Cell Physiol.* 51: 164-175 (2010)
 - 36) Pautot V. *et al.*: *Plant Cell* 13: 1719-1734 (2001)
 - 37) Scofield S. *et al.*: *Plant J.* 50: 767-781 (2007)
 - 38) Keta S. *et al.*: *Plant Biotech.* 29: 1-8 (2012)
 - 39) Yamaguchi N. *et al.*: *Plant J.* 5: 846-856 (2012)
- Title:** Roles of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in lateral organ development in *Arabidopsis thaliana*.
- Authors:** Sumie Keta, Ayami Nakagawa, Shoko Kojima, Chiyoko Machida
- Addresses:** Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan,
- Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, *ASYMMETRIC LEAVES2*, *ASYMMETRIC LEAVES1*, class 1 *KNOX*, floral organ, leaf development, proximal-distal axis