

博士学位論文

「シロイヌナズナの葉の発生分化における **ASYMMETRIC LEAVES2** と核小体タンパク質の機能解明」

中部大学大学院 応用生物学研究科 応用生物学専攻

安藤 沙友里

博士論文要約

真正双子葉類シロイヌナズナの葉は、茎頂にある未分化な細胞群である茎頂メリステムから発生する。葉は、基部から先端部へ向かう基部先端部軸、向軸（表）側と背軸（裏）側を決定する向背軸、葉の中央から側方へ広がる中央側方軸の 3 つの軸に沿って分化と成長することにより、扁平で左右相称な形態となる（Steeves and Sussex, 1989; Waites and Hudson, 1995; Machida et al., 2015）。発生初期において、背軸側的性質を持つ葉原基の細胞のうち、茎頂メリステムに近い側の細胞が向軸側的性質を獲得することで葉の向背軸性が確立されると、側方方向の分裂が盛んになり、扁平な葉が形成される。シロイヌナズナの **ASYMMETRIC LEAVES2** (AS2) と **ASYMMETRIC LEAVES1** (AS1) は、葉の発生初期において、背軸側因子である *ETTIN* (*ETT*) /*AUXIN RESPONSE FACTOR3* (*ARF3*)、*ARF4* の発現を抑制することで向軸側化に関わる、向背軸性の確立における鍵因子である（Iwasaki et al, 2013）。AS2 は植物に固有の AS2/LOB ドメインを持つ核タンパク質、AS1 は myb ドメインを持つ核タンパク質であり、AS2 と AS1 は複合体を形成して転写抑制因子として機能する（Iwakawa et al., 2002; Byrne et al., 2000; Yang et al., 2008）。AS2/LOB ドメインは Zinc finger-motif (ZF-motif)、保存されたグリシン (conserved G) を含む領域 (IcG)、Leucine-zipper like 配列 (LZL) から構成される（Iwakawa et al., 2002; Shuai et al., 2002）。AS2 は標的である *ETT/ARF3* の exon 1 に結合すること、このような DNA への結合には

ZF-motif が必要であることが示されている (Vial-Pradel et al., 2018)。また AS2 に蛍光タンパク質 YFP を連結した AS2-YFP 融合タンパク質のシグナルはシロイヌナズナの葉の向軸側の細胞で核質全体に弱く、核小体周縁部に塊状に強く検出される (AS2 body と命名、Ueno et al., 2007; Luo et al., 2012)。このような AS2 の特徴的な核局在と AS2 の機能との関連についてはまだ不明な点が多い。そこで、AS2 の特徴的な細胞内局在と AS2 の機能との関連を明らかにすることを目的として、(1) AS2 body 形成に必要な AS2 の部位と機能の解析、(2) AS2/LOB ドメインを構成するアミノ酸残基の機能の解析、(3) AS2 body と共局在する因子の解析、(4) AS2 と協調的に働く核小体局在タンパク質遺伝子の変異体における AS2 body の局在性の解析を行った。

(1) AS2 body 形成に必要な AS2 の部位と機能の解析

AS2 の AS2/LOB ドメインよりも N 末端側、C 末端側、その両方を欠失した AS2/LOB ドメインのみの 3 種の欠失 AS2-YFP のシグナルはいずれも野生型の AS2-YFP と同様に核質全体に弱く、核小体周縁部に AS2 body が検出された。このことから AS2-YFP は AS2/LOB ドメインがあれば核に移行し AS2 body を形成するために十分であることが明らかになった。一方、AS2 の N 末端から ZF-motif までを欠失した AS2(Δ N Δ ZF)-YFP は核質でシグナルが検出されたが、AS2 body は検出されなかった。このことから ZF-motif は AS2 body の形成に必要なことが明らかになった。

(2) AS2/LOB ドメインを構成するアミノ酸残基の機能の解析

as2-snp1 変異体は 2 塩基置換により、ZF-motif を構成する 4 残基のシステインのうち、最も N 末端側のシステインの両隣のアミノ酸がそれぞれプロリンか

らセリン、アラニンからバリンに置換されている。*as2-5* 変異体は 1 塩基置換により、保存されたグリシン (conserved G) がグルタミン酸に置換されている (Iwakawa et al., 2002)。いずれの変異体も左右非対称で下向きカールしたロゼット葉を形成する (Semiarti et al., 2001)。*as2-snp1* タンパク質と *as2-5* タンパク質にそれぞれ YFP を連結した *as2*-YFP 融合タンパク質の細胞内局在を、シロイヌナズナで観察した。また、AlphaScreen system (Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay System) を用いた、*as2-snp1* タンパク質および *as2-5* タンパク質と *ETT* exon 1 のタンパク質-DNA 結合実験を行った。これらの解析から、ZF-motif を構成する 4 残基のシステインの 1 番目のシステインの両隣にあるプロリン残基とアラニン残基は AS2 body の形成と *ETT* exon 1 への結合に必要であること、conserved G は AS2 body の形成には必要であるが、*ETT* exon 1 への結合に必要ではないことが明らかになった。

(3) AS2 body と共局在する因子の解析

DAPI による核染色で特に塊状に強く染色される部分にはヘテロクロマチンが凝縮しており、chromocenter と呼ばれる。核小体周縁部に局在する chromocenter には 45S rDNA が凝縮されていることが既に報告されている (Pontes et al., 2003; Pontes et al., 2007; Pontvianne et al., 2007)。AS2 body も核小体周縁部に局在することから、AS2 の AS2 body での機能の一端を明らかにするために、核小体周縁部での AS2 body と chromocenter の共局在性を解析した。その結果、AS2 body は核小体周縁部で chromocenter の近傍に局在、もしくは部分的に共局在していた。さらに 5S rDNA、45S rDNA の FISH 解析の結果、AS2 body は 45S rDNA と部分的に共局在していることが明らかにされた (Plant J., in press)。

(4) AS2 と協調的に働く核小体局在タンパク質遺伝子の変異体における AS2 body の局在性の解析

AS2 と協調的に働く因子、AS2 modifier には核小体機能に関連する因子が多数含まれている (Machida et al., 2015)。核小体タンパク質 NUCLEOLIN1 (NUC1) と RNAHELICASE10 (RH10) は AS2 と共に *ETT/ARF3* の発現抑制に関わる AS2 modifier である (Matsumura et al., 2016)。AS2 body が核小体周縁部に局在することから、AS2 body 形成における核小体の役割を明らかにすることを目的として、*nuc1-1* 変異体と *rh10-1* 変異体における AS2 body の核内の局在性を解析した。その結果、NUC1 と RH10 が AS2 body の形成と局在性に関わることが明らかになった。以上の解析から、AS2 が関わる葉の発生分化において、核内の構造体である核小体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。AS2 は核小体の周縁部の凝縮した 45S rDNA と共局在して、*ETT/ARF3* のエピジェネティックな抑制制御に関わっているのかもしれない。核小体タンパク質である NUC1 と RH10 は、そのようなエピジェネティックな抑制の場としての核小体の構造的維持に必要な因子である可能性が考えられる。

以上の (1) (2) (3) (4) の解析から、AS2 が関わる葉の発生分化において、核内の構造体である核小体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。AS2 は核小体の周縁部の凝縮した 45S rDNA と共局在して、*ETT/ARF3* のエピジェネティックな抑制制御に関わっているのかもしれない。核小体タンパク質である NUC1 と RH10 は、そのようなエピジェネティックな抑制の場としての核小体の構造的維持に必要な因子である可能性が考えられる。