別紙（詳細）

ストレス環境下でも双子葉植物の扁平な葉を形成させる AS2 タンパク質の分子機能を解明

― 環境変化に強い植物の分子的理解への貢献に期待 ―

■発表概要

● 研究成果のポイント

光合成を担う植物の葉器官が扁平な形に形成されることは地球環境においても大変重要である。植物は、常にさまざまなストレスにさらされながら発生・分化し、成長している。ストレスに植物がさらされると核小体 (1) に構造的、機能的不全を起こすことが知られており、核小体ストレス (2) という。核小体は真核生物の細胞の核の中にある膜のない構造体であり、生命活動の根幹となるタンパク質合成を行うためのリボソームの構築の場である。本研究では、双子葉植物の葉の初期発生に関わる ASYMMETRIC LEAVES2 タンパク質は、植物体が核小体ストレスに晒されたとしても、葉の表裏を確立して側方方向の細胞分裂を促進し、扁平な葉を形成するストレス緩和の機能を持つことを明らかにした。

● 研究の背景

葉は、茎の先端の成長点にある幹細胞（茎頂メリステム (3)）から分化する地上部の主要な光合成器官である。このような光合成を担う葉器官が扁平で左右相称な形に展開することは地球環境においても大変重要である。モデル植物であるシロイヌナズナを用いた 我々の研究から、葉の発生・分化過程では、ASYMMETRIC LEAVES2（AS2）と ASYMMETRIC LEAVES1（AS1）(4) が、裏側化因子である *ETTIN/AUXIN RESPONSE FACTOR3*（*ETT/ARF3*）遺伝子の発現を抑制し維持することにより表側の細胞が分化し、その境界面で細胞分裂が起こり、扁平で左右相称な葉が形成されることが明らかになっている（図 1）。

AS2 は植物界にのみ存在する AS2/LOB ドメインを持つ AS2/LOB ファミリーのメンバーの一つである。AS2/LOB ドメインはジンクフィンガーモチーフ（ZF motif）、ICG sequence、 LZL motif からなる特徴的な構造を持つ（図 2）。ZF motif は DNA 結合に必要である。AS2 は、Myb ドメインを持つ転写因子である AS1 と複合体を形成し、葉の発生初期に、まず、メリステム維持に関わるホメオボックス遺伝子である class 1 *KNOX* 遺伝子（*BP, KNAT2, KNAT6*）の抑制に関わる。さらに、裏側化因子である *ETT/ARF3* の遺伝子上流域に結合して直接転写を抑制すること、低分子 RNA を介して *ETT/ARF3* と *ARF4* の mRNA を標的とした抑制に関わっていること、*ETT/ARF3* 遺伝子の DNA メチル化の維持に関わっていることが明らかになっている。さらに興味深いことに、AS2 は *ETT/ARF3* の遺伝子領域 第一エキソンの特定の DNA 配列（CGCCGC/GCGGCG）に結

合する。

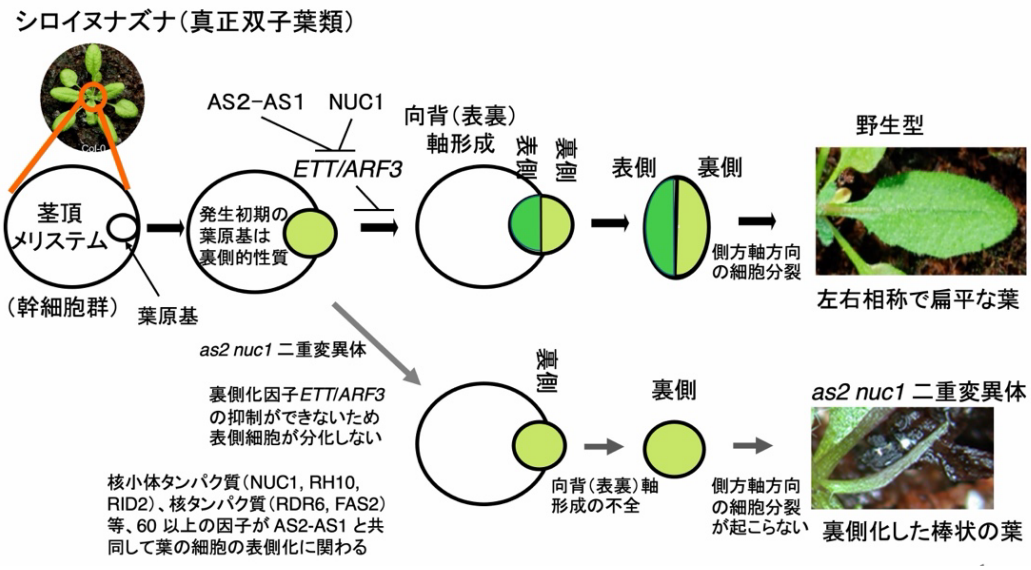


図 1 真正双子葉類の左右相称で扁平な葉形成の仕組み

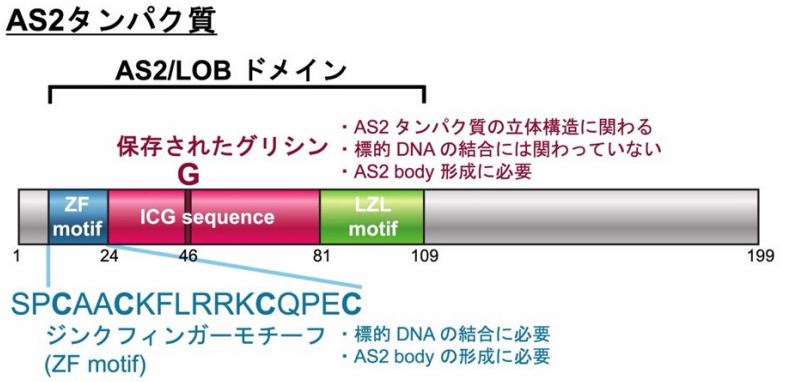
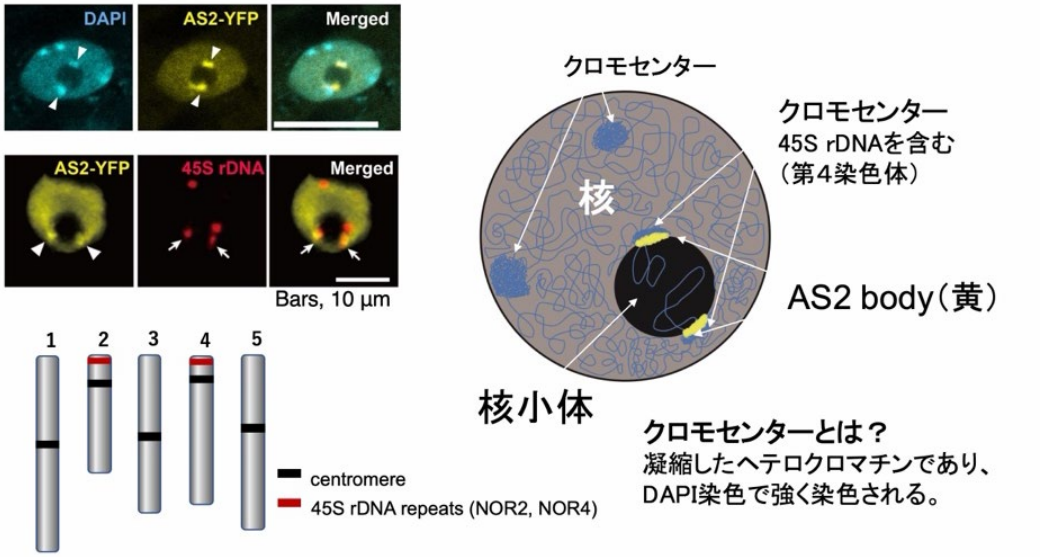


図 2　AS2 タンパク質の構造と AS2/LOB ドメインの機能

AS2 はシロイヌナズナの葉原基の表側の細胞で発現する。AS2 タンパク質は核質全体で弱く、核小体のまわりにかたまり状に２個の AS2 body として存在する（図 3）。AS2 body は、核小体周縁部のクロモセンター[5]（45S rDNA[6] リピートを含む）と部分的に共局在する。また、核小体タンパク質 NUCLEOLIN1 (NUC1)、RNA HELICASE10 (RH10)、ROOT INITIATION DEFECTIVE2 (RID2)や DNA 合成に関わる因子をはじめとする 60 以上の因子の遺伝子の変異体と *as2* 変異体の二重変異体では表側細胞が分化せず、裏側的性質を持つ細胞からなる棒状の葉を形成することが、国内外の多くの研究グループが報告していた（Machida et al., 2015; 図 1）。しかしながら、これら 60 以上の遺伝子の変異体

と *as2* 変異体の二重変異体の葉がなぜ棒状化するのかは不明であった。



AS2 body は核小体周縁部の 45S rDNA repeats（第4染色体由来）を含むクロモセンターと部分的に共局在する (Luo, Ando & Sakamoto et al., *Plant J.* 2020)。

図 3 核小体周縁部の 45S rDNA を含むクロモセンターと部分的に共局在する AS2 body

● 本研究の成果

本研究では、主に天然から単離された化合物を中心としたケミカルライブラリーを用いて、*as2* 変異体に投与した時に棒状化を誘導する低分子化合物をスクリーニングした。その結果 8 種の低分子化合物が *as2* 変異体背景で棒状の葉を形成した（表１）。

これら 8 種の低分子化合物は、その分子標的は異なっているものの、動物細胞において、抗腫瘍活性を持つ分子として報告されているものであった。8 種の低分子化合物にはカンプトテシンが含まれていた。カンプトテシンは IB 型トポイソメラーゼの特異的インヒビターであることから、遺伝学的解析とケミカルの両面からの解析が可能となった。カンプトテシンと IB 型トポイソメラーゼについては、動物細胞を使った多くの研究がなされており、IB 型トポイソメラーゼは、核小体にも局在すること、リボソーム RNA 遺伝子の転写に関わることが報告されていた。さらに、カンプトテシンは核小体ストレスを誘導することも報告されていた。本研究において、カンプトテシンとシロイヌナズナの IB 型トポイソメラーゼをコードする *TOP1α* 遺伝子の解析により以下の３点が明らかになった。

第一に、トランスクリプトームと scRNA-seq の解析結果と遺伝学的解析から、TOP1α と AS2 は独立して裏側化因子である *ETT/ARF3* を抑制すること、*ETT/ARF3* を介して CDK inhibitor をコードする遺伝子の一つである *KRP5/ICK3* 遺伝子の発現を抑制することがわかった。TOP1α と AS2 は、表側の細胞の分化と引き続く側方方向の細胞増殖を促進し、扁平な葉の形成に関わることが明らかになった（図 4）。

Molecular characteristics	Substance	Comments
DNA トポイソメラーゼの阻害剤	**camptothecin**	TOPI 阻害剤、トポイソメラーゼ I-DNA 共有結合複合体を形成
	9-hydroxy-camptothecin	
	10-hydroxy-camptothecin	
	etoposide	TOPII 阻害剤、トポイソメラーゼ II-DNA 共有結合複合体を形成
DNA 損傷試薬	**bleomycin A5**	二本鎖切断の誘導剤
	bleomycin A2+B2	
	mitomycin C	DNA のプリン塩基への架橋導入による DNA 合成阻害剤
	hydroxyurea	DNA 複製阻害剤
	berberine chloride	DNA インターカレーター
	coptisine	
	N-methylmesoporphyrin IX (NMM)	
	tricostatin A	エピジェネティック制御、HDAC 活性の阻害剤
	5-aza-2'-deoxycytidine	エピジェネティック制御、DNA メチル化阻害剤
リボソームをターゲットとする化合物	**fusidic acid**	真核生物と原核生物のペプチド成長因子に結合
	G-418	70S と 80S リボソームをターゲットとするタンパク質合成阻害剤
	G-418 diastereomer	70S と 80S リボソームをターゲットとするタンパク質合成阻害剤となりうる分子
K^+ トランスポーターの阻害剤	**monensin**	K^+トランスポーター阻害剤：がん細胞のアポトーシスを誘導するアンドロゲンシグナル伝達の阻害剤
HMG-CoA レダクターゼの阻害剤	**lovastatin analog**	HMG-CoA レダクターゼの阻害剤となりうる分子
	lovastatin	代謝の重要な調節因子である HMG-CoA レダクターゼを阻害し、血中のコレステロールや脂質を低下させる薬剤として用いられる分子。
	mevastatin	

表１ *as2-1* 変異体背景で棒状葉を誘導した低分子化合物。太字の化合物は、ケミカルスクリーニングによって同定された分子を示す。

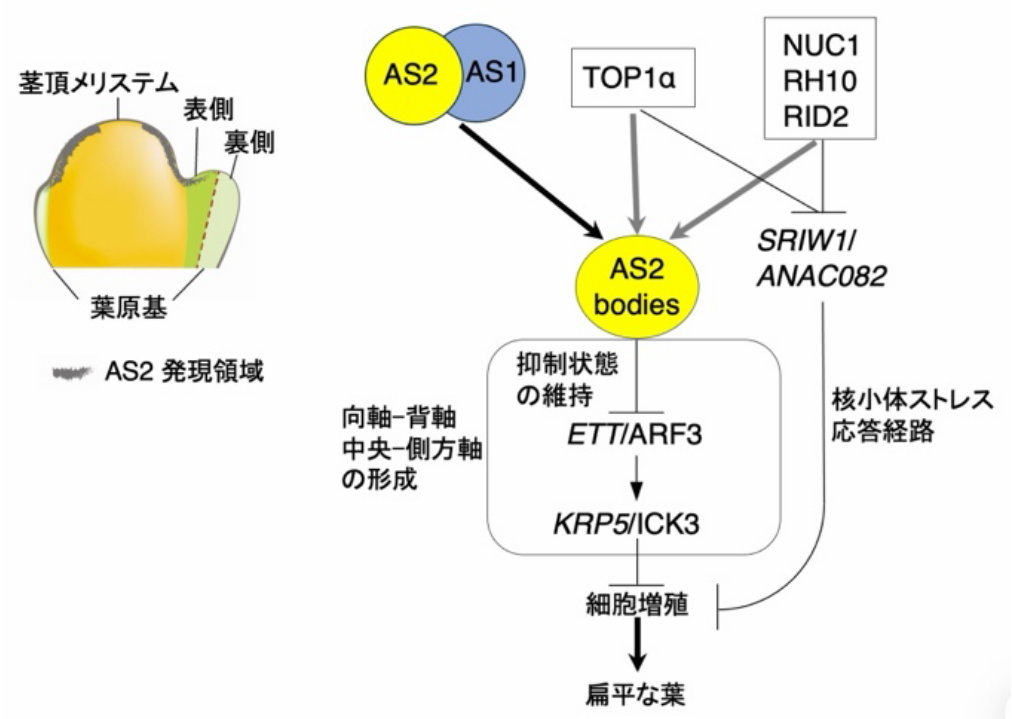


図 4 シロイヌナズナの葉の発生・分化過程における AS2-AS1、TOP1α、および核小体タンパク質による AS2 body を介した *ETT/ARF3* と *KRP5*/ICK3 の抑制制御の経路と *SRIW1/ANAC082* を介した核小体ストレス応答経路

第二に、カンプトテシンを投与したシロイヌナズナ、あるいは *top1α*変異体のいずれの場合にも小さい AS2 body が核小体の周縁部の内側に検出されるとともに、核小体の内部にも AS2 body が散在していることを見出した（図 5）。このような AS2 body の局在性は、核小体の構造に異常が見られる *nuc1* 変異体、*rh10* 変異体と *rid2* 変異体と類似していた（Ando et al., 2023）。カンプトテシンを投与した場合に、核小体内の NUC1 タンパク質の局在が不均一になっていることもわかった。葉の正常な初期成長には AS2 body が核小体の周縁部に２個のかたまりとして存在することが重要であり、そのためには核小体の正常な構造が保たれていることが必要であることが示唆された（図 5）。

第三に、TOP1αは、核小体ストレス応答に関わる *ANAC082* の発現を抑制していた。*ANAC082* の変異（*sriw1*）が *as2 top1α*二重変異体の棒状葉の表現型を抑圧し、*as2* 単独変異体の葉の表現型となった。二重変異体の棒状は *ANAC082* の発現上昇による細胞増殖抑制が原因であると考えられた。すなわち、*top1α*変異によって核小体ストレスが誘導されたとしても野生型の AS2 が機能すれば、扁平な葉が形成されることが示された。AS2 は、葉の発生過程において核小体ストレスから防御する機能を持つと考えられる（図 4）。

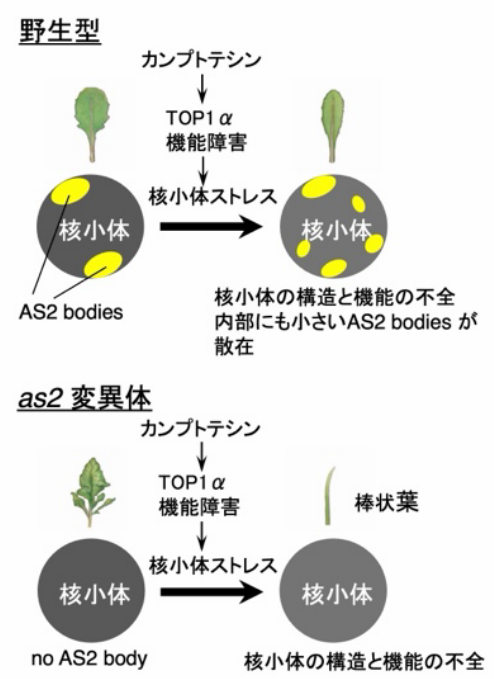


図 5 核小体ストレスを誘導した場合の、野生型（Col-0）および *as2* 変異体における葉の表現型と AS2 body の局在

● 今後の期待

我々は、さらに、TOPII の阻害剤であるエトポシド、DNA のキレート剤マイトマイシン C、DNA 合成阻害剤ブレオマイシン A5 等について調べたところ、カンプトテシンと同様に、*as2* 変異体に投与した場合に、葉の棒状化を誘導することがわかった。同様の効果を示した化合物について表 1 に示した。これらは、すべて動物細胞において抗腫瘍活性を持つことが報告されている分子であり、核小体ストレスを誘導する可能性が考えられる。*as2* との二重変異体にすると棒状化することが報告されている約 60 の遺伝子の機能と核小体ストレスとの関連性も明らかにする必要がある。

植物は動く事ができないために環境の変化にも耐えて巧みに生存する機能を持つと考えられている。シロイヌナズナを用いた研究から、様々なストレスによって核小体機能が低下することが知られている。*as2* 単独変異体に、表 1 に示した低分子化合物をそれぞれ投与すると、棒状化した葉を形成する。同じ濃度の低分子化合物を野生型に投与しても棒状化せずに扁平な葉を形成できる。しかしながら、より高い濃度の低分子化合物を投与すると、野生型の植物でも棒状葉を形成する。このことから、野生型の AS2 は植物が多少のストレスを受けても生きられるように働く守護神の役割を果たしていると考えられる。ま た、TOP1α は、核小体ストレス応答経路を通して葉の細胞増殖に関わることを示した。本研究で同定したカンプトテシン以外の低分子化合物の作用機作、核小体ストレスとの関連性についても、まだ不明な点が多い。今後明らかにすることが必要であろう。また、核小体スト

レスを受けた時の AS2 body の役割を明らかにすることが重要であろう。
　気候変動によって増大する環境変化は植物にさまざまなストレスを与えると予測される。本研究が環境変化に強い植物の分子的理解に貢献できることを期待したい。

■成果掲載誌
本研究成果は the company of Biologists「development」誌 (2026) 153 (18)に掲載された。
URL: https://doi.org/10.1242/dev.205275

論文タイトル：Arabidopsis epigenetic factor AS2 mitigates nucleolar stress and promotes flat leaf development by repressing CDK inhibitor
(シロイヌナズナのエピジェネティック因子である ASYMMETRIC LEAVES2 は核小体ストレスを緩和し、CDK inhibitor を抑制する事により扁平な葉の発生・分化を促進する)

著者：Ayami Nakagawa; Hidekazu Iwakawa; Hiro Takahashi; Simon Vial-Pradel; Mari Takahashi; Kazuomi Ohga; Takuma Ito; Motoki Tamai; Eri Takada; Sumie Keta; Nanako Ishibashi; Sayuri Ando; Iwai Ohbayashi; Masaki Ito; Mami Yamazaki; Ayato Sato; Masaaki Umeda; Byung-Yoon Cha; Je-Tae Woo; Michiko Sasabe; Munetaka Sugiyama; Shoko Kojima*; Yasunori Machida*; Chiyoko Machida*
（中川彩美、岩川秀和、高橋広夫、Simon Vial-Pradel、高橋真理、大賀一臣、伊藤卓馬、玉井元樹、高田絵里、気多澄江、石橋奈々子、安藤沙友里、大林祝、伊藤正樹、山崎真己、佐藤綾人、梅田正明、車炳允、禹済泰、笹部美知子、杉山宗隆、小島晶子*、町田泰則*、町田千代子*）*責任著者

■研究体制と支援
本研究は、
中部大学大学院 応用生物学研究科：中川彩美、岩川秀和、Simon Vial-Pradel、大賀一臣、伊藤卓馬、玉井元樹、高田絵里、気多澄江、安藤沙友里、車炳允、禹済泰、小島晶子、町田千代子
名古屋大学 ITbM：佐藤綾人、中川彩美
名古屋大学大学院 理学研究科：高橋真理、石橋奈々子、町田泰則
国立成功大学 生命科学系：大林祝
金沢大学 理工学域生命理工学類：伊藤正樹、岩川秀和
金沢大学 医薬保健学域：高橋広夫
千葉大学大学院 薬学研究院：山崎真己
奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科：梅田正明
弘前大学大学院 農学生命科学研究科：笹部美知子

東京大学大学院 理学系研究科：杉山宗隆（現神奈川大学）
の共同研究成果です。

日本学術振興会 科学研究費補助金（JP21K06218, JP20K06702, JP19K06730）、文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究（JP20H05402, JP22H04709）の支援を受けて行われた。 Open Access の支援は中部大学による。
This work was supported by the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI (grant nos. JP21K06218, JP20K06702, and JP19K06730; the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) KAKENHI (grant nos. JP20H05402 and JP22H04709). Open Access funding provided by Chubu University.

「Development」誌に掲載されるすべての論文について、Woodland Trust との提携により、英国ダービーシャーにある「Young People's Forest」に新しい木が植樹される。
新たな生物多様性保全の取り組みである「The Forest of Biologist」については
URL: https://forest.biologists.com/about/
を参照。

■用語解説
(1) 核小体：光学顕微鏡で明瞭に観察できる核内構造体である。rDNA が転写、プロセシングされ、リボソームタンパク質とともにリボソームの大サブユニットと小サブユニットが構築される場。液―液相分離を介して形成される構造体である。内部は、fibrillar center（FC），dense fibrillar component（DFC），granular component（GC）と、中央には VC と呼ばれるサブコンパートメントからなる。
(2) 核小体ストレス：リボソームの生成の各々の段階における不全は、核小体の機能と形態に変化を引き起こし、このような現象を核小体ストレスと言う。
(3) 茎頂メリステム：茎頂分裂組織ともいう。地上部のすべての器官を形成する能力を持った幹細胞。葉は茎頂メリステムの周縁部領域の細胞から分化する。
(4) ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)：Myb ドメインを持つ転写因子。*as1* 変異体の葉は、左右非対称な下向きカール（上偏成長）していることからこのような名前がついた。*as1* 変異体と *as2* 変異体は 1960 年代に単離された変異体である。
(5) クロモセンター：DNA 染色試薬で強く染まる領域。セントロメア近傍にある巨大なヘテロクロマチン領域は密に凝集しており、DNA 染色試薬で強く染まる。このような部分をクロモセンター（染色中心）という。
(6) 45S rDNA (45S リボソーム DNA)：rDNA は RNA 情報を基にアミノ酸を連結しタンパク質を合成するリボソームの部品であるリボソーム RNA をコードする遺伝子。シロイヌナズナのリボソーム RNA（18S、5.8S、25S）をコードする遺伝子である 45S rDNA

は、第二染色体と第四染色体の短腕のテロメア近傍に座位している。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の 45S rDNA は、ハプロイドゲノムあたり約 900 コピーあり、大部分は、凝縮して不活化されている。核小体周縁部に局在しているクロモセンターに含まれる第四染色体の 45S rDNA リピートの一部が核小体内部に入り、転写されている。

(7) 核小体ストレス応答因子：動物細胞における核小体ストレス応答においては、転写因子である p53 とその分解に関わる MDM2 が中心的な役割を担っている。一方、植物では、核小体ストレス応答において中心的な役割を果たす転写因子として、NAC ドメインをもつ ANAC082 がシロイヌナズナから同定された。ANAC082 は核小体ストレスに応答して発現が誘導され細胞増殖を抑制する機能を持つことから、動物の p53 に相当する機能をもつと考えられるが、ANAC082 の発現制御機構と ANAC082 が細胞増殖を抑制する機構についてはまだ不明な点が多い。

■参考文献

Machida, C., Nakagawa, A., Kojima, S., Takahashi, H. and 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. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 4, 655–671. doi:10.1002/wdev.196

Luo, L., Ando, S., Sakamoto, Y., Suzuki, T., Takahashi, H., Ishibashi, N., Kojima, S., Kurihara, D., Higashiyama, T., Yamamoto, K.T., Matsunaga, S., Machida, C., Sasabe, M. and Machida, Y. (2020). The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc-finger DNA-binding motif in Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2. Plant J. 101, 1118–1134. doi:10.1111/tpj.14579

Ando, S., Nomoto, M., Iwakawa, H., Vial-Pradel, S., Luo, L., Sasabe, M., Ohbayashi, I., Yamamoto, K.T., Tada, Y., Sugiyama, M., Machida, Y., Kojima, S. and Machida, C. (2023). Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 and nucleolar factors are coordinately involved in the perinucleolar patterning of AS2 bodies and leaf development. Plants 12, 3621–3640. doi:10.3390/plants12203621