

植物に特徴的な GATA タイプジンクフィンガータンパク質を
コードするシロイヌナズナ *ZIM* の機能解析

四方 雅仁

2003

目次

略語	4
緒論	5
第1章 新規 GATA ファミリーの同定	11
第2章 ZIM の転写活性化能の解析	26
第3章 ZIM 過剰発現体の解析	34
結論	58
謝辞	60
参考文献	61
論文目録	74

略語

ATP	adenosine 5'-triphosphate
BR	brassinosteroid
Brz	brassinazole
CaMV	cauliflower mosaic virus
EST	expressed sequenced tag
EtBr	ethidium bromide
GA	gibberellin
GAL4-DBD	GAL4 DNA-binding domain
GM	germination medium
LD	long day
LUC	luciferase
NMR	nuclear magnetic resonance
ORF	open reading frame
PAC	paclobutrazol
RLUC	<i>Renilla</i> luciferase
SD	short day
SEP	SEPALLATA
UTR	untranslated region
WT	wild type
XTH	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
ZIM	zinc-finger protein expressed in inflorescence meristem
ZIM-ox	<i>ZIM</i> -overexpressing plant
ZML	<i>ZIM</i> -like protein

緒論

生物は遺伝情報に従って一生の生命活動を営んでいる。植物の場合、受精卵が分裂を繰り返し、胚発生を行う。成熟した種子は発芽し芽生えとなり、その後茎を伸長させ葉を展開して栄養を蓄積する栄養生長期を経て、次世代を残すための花を形成する生殖生長期へと生長する。このような生物の発生、分化、形態形成が正しく行われるためには、それぞれの働きを行う遺伝子が正しく適切な時期や位置で発現することが必要であり、そのための制御機構が存在する。生物の遺伝情報は、DNA から RNA への転写、そしてタンパク質へ翻訳されることで伝達され、機能する。遺伝子発現はこの転写、転写後、翻訳、翻訳後の各段階で制御されている。真核生物の DNA はヒストンに巻きついたヌクレオソーム構造をとっており、クロマチンとして格納されている。この状態は遺伝子が不活性な状態であり、転写が行われる際にはクロマチン構造変化を伴う。このクロマチンリモデリングに関わる因子として、アセチル化やユビキチン化などを行うヒストン修飾因子や、SWI/SNF のような ATP 依存的リモデリング因子がある。また、DNA のメチル化によって転写が抑制されるという現象もある。転写因子が DNA 上の制御配列に結合すると、このヌクレオソーム構造が破壊され、mRNA への転写が開始される。転写後の調節として、真核生物の mRNA はスプライシングを受けるが、選択的スプライシングにより 1 種の転写産物から複数種の mRNA、例えば機能的な mRNA と機能的でない mRNA が作られることにより、遺伝子の発現の調節が行われているものもある。また、~22 ヌクレオチドからなる microRNA 分子が相補配列を持つ RNA に結合して二本鎖 RNA となり、分解へ導くという機構も近年明らかになっている (Jones, 2002; Carrington and Ambros, 2003)。高等植物のミトコンドリアや葉緑体では、転写された RNA のシトシン(C)がウラシル(U)に変換される RNA エディティングという機構があり、開始コドンの生成やコドン変換によるアミノ酸の置換がおこっている (Maier et al., 1996)。翻訳時には、タンパク質合成の開始因子の不活化や、mRNA のリボソーム結合部位に結合することにより翻訳効率を低下させる因子などが知られている。さらに、タンパク質の翻訳後の調節機構として、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、ADP リボシル化、糖鎖付加などの修飾が知られている。タンパク質が核やミトコンドリアに局在して働く場合、リン酸化や多量体化などによって移行が制御される例もある。

このように多くの段階で遺伝子発現は制御されているが、すべては DNA が転写されることに始まり、それゆえに転写制御は、遺伝子発現制御の根幹に関わるものである。DNA の配列を mRNA へと転写を行うのは RNA ポリメラーゼである。真核生物では基本転写因子と呼ばれる複合体が転写開始に必要であり、DNA 上には基本転写因子が結合する TATA ボックスのようなシス配列が存在し、転写開始点を

決定している。しかしながら RNA ポリメラーゼや基本転写因子は遺伝子の発現を厳密に制御することはできない。時間的、空間的に発現を制御するためには転写因子の働きが必要になる。転写因子は DNA に結合し、基本転写因子や RNA ポリメラーゼに働き、その構造変化の誘導や安定化、RNA ポリメラーゼがプロモーターに集結する速度を変化させることで転写の効率を上昇していると考えられている (Ptashne and Gann, 1997)。このように、転写因子が遺伝子発現の最初の段階となる制御を行っており、転写因子の機能を解析することは発生、分化、形態形成の仕組みの解明につながるものである。

植物の発生、分化、形態形成において、様々な転写因子が関与していることが、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた解析から明らかになってきている。また、同じファミリーに属する転写因子群が同じような役割を行うといった、それぞれの転写因子群によるある程度の機能分担が見られることが示されてきた。例えば、植物に特徴的な器官である花の形態形成に関わる遺伝子として、*APETALA3* (*AP3*)、*PISTILLATA* (*PI*)、*AGAMOUS* (*AG*)、*SEPALLATA1* (*SEPI*)、*SEP2*、*SEP3* が同定されているが、全て転写因子である MADS ファミリーに属している。これらが複合体を形成し、その組み合わせでがく片、花弁、雄ずい、心皮の分化が決定される (Jack et al., 1992; Goto and Meyerowitz, 1994; Yanofsky et al., 1990; Pelaz et al., 2000)。地上部組織の源となる茎頂分裂組織では、NAC ファミリーと呼ばれる植物特異的な転写因子である CUP-SHAPED COTYLEDON1 (*CUC1*)、*CUC2* が働き、茎頂分裂組織の形成と器官分離に関わっている (Takada et al., 2001)。KNOX ファミリーに属する SHOOT MERISTEMLESS (*STM*) も茎頂分裂組織の形成に関与し、茎頂分裂組織の維持にはホメオドメインタンパク質の WUSCHEL (*WUS*) が働く。葉への分化には Myb 型転写因子である ASYMMETRIC LEAVES1 (*AS1*) や (Long et al., 1996; Mayer et al., 1998; Byrne et al., 2000)、*AS1* によって制御される *KNAT1* などの働きが知られている (Semiarti et al., 2001)。葉の背腹性を決定しているのは HD-ZIPIII タイプに属するタンパク質をコードする *PHABULOSA* (*PHB*) や *PHAVOLUTA* (*PHV*)、YABBY ファミリーの *FILAMENTOUS FLOWER* (*FIL*) や *YABBY2* (*YAB2*) などである (McConnell et al., 2001; Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999)。根においては、*NAC1* が側根形成に、GRAS ファミリーの *SCARECROW* (*SCR*) や *SHORT-ROOT* (*SHR*) が内皮や皮層の分化に機能している (Xie et al., 2000; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000)。根毛やトライコームは Myb ファミリー、bHLH ファミリー、ホメオボックスなどの転写因子の働きにより形成される。さらに、植物ホルモンの応答に関与する転写因子や、光や温度、塩、低温などの環境応答に関わる転写因子、病傷害抵抗性に関わる転写因子も数多く同定されている。このように、生育の各段階で転写因子が機能しており、転写制御は発生、分化、形態形成に必要不可欠である。

転写因子の特徴として、生物種を超えて保存された DNA 結合モチーフが存在することがあげられる (表 1)。ヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) モチーフは 2 つ

表 1. 各生物の転写因子の分類

ファミリー	<i>A. thaliana</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
bZIP	81	21	25	21
Myb	190	6	3	10
MADS	82	2	2	4
bHLH	139	46	25	8
HB	89	103	84	9
AP2/EREBP	144	0	0	0
NAC	109	0	0	0
GRAS	32	0	0	0
GARP	56	0	0	0
C2H2 (Zn)	105	291	139	53
C3H-type1 (Zn)	17	3	15	3
WRKY (Zn)	72	0	0	0
C2C2 (Zn)				
GATA	28	6	9	10
Dof	37	0	0	0
CO-like	33	0	0	0
YABBY	6	0	0	0
合計	1533	635	669	209

DNA 結合モチーフの相同性をもとに分類したタンパク質の数を示した。(Zn)は、亜鉛結合モチーフを表す。示したのは一部の DNA 結合モチーフであり、合計は全遺伝子に対する転写因子数を表している。

Riechmann et al. (2000)より改変。

の α -ヘリックスが短いアミノ酸の鎖で連結された構造をとる。ロイシンジッパー(bZIP)モチーフは塩基性アミノ酸領域とそれに続くロイシン残基の繰り返し配列を持つ。Myb タンパク質は 2~3 の反復配列からなる DNA 結合領域を持つ。MADS ドメインは酵母の MCM1、シロイヌナズナの AGAMOUS、キンギョソウの DEFICIENCE、ヒトの SRF に共通して見られる領域であることから名付けられ、 α -ヘリックスとそれに続く 2 つの β -シート構造からなる。亜鉛を配位するジンクフィンガーは大きなファミリーを形成している。全転写因子に占める亜鉛結合モチーフを持つものの割合は、シロイヌナズナで約 22%、ショウジョウバエで約 51%、線虫で約 64%、出芽酵母で約 56%を占める(Riechmann et al., 2000)。ジンクフィンガーはシステイン(C)とヒスチジン(H)が亜鉛を配位する構造をとるが、その構造によってジンクフィンガー型転写因子はさらにグループ分けできる。タンパク質のドメ

インのデータベースである InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)によると、これまでに同定されているジンクフィンガーは C_2H_2 、 C_4 、 C_3HC_4 、 C_2HC_5 、 C_4HC_3 など、サブタイプも含めると 70 以上ものタイプに分類される。古くから知られているものには、 C_2H_2 の TFIIIA タイプ、 C_4 のグルココルチコイド受容体タイプ、 C_6 の GAL4 タイプ、 C_2C_2 の GATA タイプなどがある。

以上の DNA 結合モチーフは生物界で広く保存されているものであるが、植物にはこれらに加え、植物特異的な DNA 結合モチーフが存在する。例えば、68 アミノ酸残基を単位とする反復配列を持つ AP2/EREBP ファミリー、ペチュニアの NO APICAL MERISTEM (NAM) やシロイヌナズナの CUC2 などが属する NAC ファミリーが知られている。それに対し GRAS ファミリーは、bZIP モチーフ、VHID モチーフ、SH2 モチーフという、多くの生物で見られるモチーフを持つが、その組み合わせは植物特異的である。ジンクフィンガーモチーフの中にも植物特異的なタイプが存在しており、 C_2C_2 の Dof や YABBY、 C_2H_2 または C_2HC の WRKY といったものが知られている(Harison, 1991; Takatsuji, 1998; Riechmann et al., 2000)。

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)は 2000 年 12 月に、植物で初めて全ゲノム配列の解読が終了し、配列から各遺伝子の機能が予測された(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。その結果、上述のような DNA 結合モチーフをもとに、約 26,000 遺伝子のうち 5.9%が転写因子をコードしていると推測された。これは出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の 3.5%、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の 4.5%、線虫(*Caenorhabditis elegans*)の 3.5%と比較すると明らかに多い(Riechmann, 2000)。また、シロイヌナズナの機能未知のタンパク質の中にもまだ多くの転写因子が含まれていると考えられ、さらに高い割合を占めると思われる。このように、植物では他の生物よりも転写因子の割合が高く、また植物特異的な転写因子も存在することから、植物における転写制御の重要性がうかがわれる。これは、植物が移動することができないために、通常の発生や分化に加えて、様々な環境変化や乾燥、低温、塩などのストレスに対処できるよう、また病原菌に対する防御のために遺伝子発現を調節する必要があるためであることが考えられる。

植物の発生段階の全てにおいて転写因子が働いていることや、植物特異的な転写因子が存在することから、植物の転写因子を解析することは植物特有の現象の解明につながるかもしれない。シロイヌナズナの 1500 以上あるとされている転写因子の多くは、DNA 結合領域の相同性から予測された転写因子であり、そのうち機能が明らかになっているのはごくわずかである。既知の転写因子と相同性が高い場合、分子的、生理学的な研究の進んでいる動物や菌類の情報をもとにある程度機能は予測できるが、植物特異的な転写因子の場合、生体内での働きを知るためには実験的な機能解析が必要である。例えば、実際に転写因子として機能するかどうかを検証するため、DNA 結合能や転写活性化能の解析が行われる。DNA 結合領域の特性を調べるために、認識配列の同定が、特に植物特異的な転写因子の場合は必要である。

転写因子は複合体を形成して働くものも多く知られていることから、相互作用タンパク質の探索も行われる。転写因子の植物体内での機能を探るためには、センスやアンチセンスコンストラクト導入植物体や、RNAi、T-DNA タグなどの手法を用いた形質転換体による解析、すなわち機能欠失変異体や機能獲得変異体を用いた逆遺伝学的な解析が有効である。

我々の研究室では、植物の花成や形態形成の機構を解明するため、シロイヌナズナの花序組織由来の均一化 cDNA ライブラリーを用いたディファレンシャルスクリーニングが行われ、花芽特異的かつ低発現性の遺伝子が 384 クローン得られている (Takemura et al., 1999)。そのうち ZIM (*Zinc-finger protein expressed in Inflorescence Meristem*) はそのアミノ酸配列から N 末端側に転写活性化領域と考えられる酸性領域、C 末端側に DNA 結合領域と考えられるジンクフィンガーモチーフを持つことが予測された (Nishii et al., 2000)。GFP を用いた解析から ZIM タンパク質は核に局在することが確かめられ、転写因子として働くことが推測された。

ジンクフィンガーモチーフは、前述のように亜鉛を配位するシステインとヒスチジンの数と配置により様々なタイプに分類される。ZIM が持つジンクフィンガーは C_2C_2 の GATA タイプ (InterPro accession No. IPR000679) のものと相同性を示した。GATA タイプジンクフィンガーを持つ GATA 因子群は脊椎動物で最初に同定された。これらは赤血球分化に特異的な転写制御因子であり、(A/T)GATA(A/G) という配列を認識する (Evans et al., 1988; Martin et al., 1989)。その後アカパンカビで窒素同化に関わる因子が GATA タイプジンクフィンガーを持つことがわかり (Ballario et al., 1996)、現在までに酵母や粘菌、植物において数多くの GATA 因子が同定されている。GATA タイプジンクフィンガーは 4 つのシステインが亜鉛を配位する $C-X_2-C-X_{17-19}-C-X_2-C$ というモチーフを持ち、2 番目と 3 番目のシステインに挟まれたアミノ酸がループを形成する (図 1)。ZIM のジンクフィンガーはこれとは少し異なり、ループを形成するアミノ酸が 20 残基であった。脊椎動物や菌類などの GATA タイプジンクフィンガーのループ領域は 17-19 残基であり、植物においてこれまでに報告されている GATA 因子のモチーフも 18 残基であることから、 $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ モチーフを持つ ZIM は新規の GATA タイプジンクフィンガータンパク質であった。

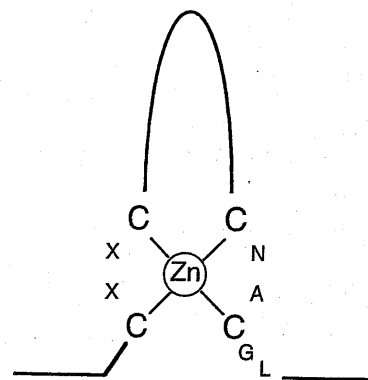


図1. GATAタイプジンクフィンガーの模式図
亜鉛を配位するシステインと特に保存されているアミノ酸残基を示した。

本研究は、シロイヌナズナの新規 GATA タイプジンクフィンガータンパク質をコードする *ZIM* の機能の解明を目的とした。まず相同性検索などのバイオインフォマティックスにより、*ZIM* の構造上の特徴付けを行った。さらに転写活性化能の解析を行うことにより *ZIM* の分子的な機能の解明を行った。また、*ZIM* を植物体内で過剰に発現させたときに与える影響として、表現型の観察、およびマイクロアレイによる遺伝子レベルでの解析を行うことにより、植物体内での *ZIM* の働きを考究した。

第1章 新規 GATA ファミリーの同定

序論

2000 年 12 月に、植物では初めてとなるシロイヌナズナ的全ゲノム配列の解読が完了した(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。シロイヌナズナには約 26,000 の遺伝子が存在することが示されたが、配列だけから機能を同定することは容易ではない。その一方で、様々な生物種における急速なゲノムプロジェクトの進行や EST (expressed sequence tag) の情報蓄積などにより、データベースの充実が進んだ。そのため、既知の遺伝子およびタンパク質と比較することにより、機能の推測が容易に行えるようになってきている。ポストシーケンスの時代を迎えた現在、こういったバイオインフォマティックスの手法による機能解析が注目される。モデル植物であるシロイヌナズナのゲノムプロジェクトの完了により、個々の遺伝子の機能の比較はもとより、全体像として植物と他生物との遺伝子構成の比較を行うことができるようになった。植物では転写因子の割合が高いことも、ショウジョウバエや線虫などと比較することにより明らかになった。植物の転写因子には、bZIP、bHLH、Myb など他生物にも共通して見られるものと、AP2/EREBP や NAC、GRAS のように植物特異的なものが存在することが示された。植物特異的な転写因子は、植物の転写制御の重要性を示唆するものである。これらの機能を解明することは、植物と動物や菌類との分子的な比較において有効な手がかりになると考えられる。

我々の研究室で単離されたシロイヌナズナの ZIM は GATA タイプジンクフィンガータンパク質をコードする(Nishii et al., 2000)。脊椎動物の GATA 因子は C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C モチーフのジンクフィンガーを 2 つ持つ。C 末端側のフィンガーが DNA を認識し、N 末端側のフィンガーは他のタンパク質との相互作用に働く。C 末端側のフィンガーが(A/T)GATA(A/G)という塩基配列を認識することからこの名前がつけられている。その後、酵母やカビ、粘菌などで解析が進み、ジンクフィンガーを 1 つしか持たないもの、ループを形成する 2 番目と 3 番目のシステインを隔てるアミノ酸数が 18 残基のものが見つかった。さらに酵母では GAT3 (Ylr013w) と GAT4 (Yir013c) の 2 つが 19 残基の GATA タイプジンクフィンガーとして同定された(Teakle and Gilmartin, 1998)。一方植物の GATA タイプジンクフィンガーの研究はほとんど進んでおらず、タバコの NTL1 とシロイヌナズナの GATA-1~GATA-4、GATA-20、および本研究の対象である ZIM が報告されているにすぎない(Daniel-Vedele and Caboche, 1993; Nishii et al., 2000; Teakle et al., 2002; Jeong and Shih, 2003)。植物の GATA 因子はジンクフィンガーを 1 つ持つ。ZIM のジンクフィンガーの特徴として、動物や酵母、他の植物の GATA タイプジンクフィンガーのモチーフと異なり、2 番目と 3 番目のシステインが 20 アミノ酸残基で隔てられているモチーフを持ってい

た。この C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つ GATA タイプジンクフィンガーはこれまでに報告されておらず、ZIM は新規の GATA タイプジンクフィンガータンパク質であると考えられた(Nishii et al., 2000)。

本章では、ZIM が持つ特徴的な GATA タイプジンクフィンガーについて、構造上の特徴を詳細に記述するため、バイオインフォマティックスの手法による解析を行った。それにより ZIM が新規の転写因子群に属し、このファミリーは植物特異的であることが示されたことについて言及する。また、植物体内での特徴付けを行うため、ZIM を含むシロイヌナズナの ZIM ファミリーの発現パターンの詳細な解析を行った。

材料と方法

バイオインフォマティクス

バイオインフォマティクスによる解析のために、以下のウェブサイトを利用した。MIPS *Arabidopsis thaliana* database (MATB; <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) ; CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) ; The TIGR Gene Indices (TGI; <http://www.tigr.org/tdb/tgi/>) ; InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

植物材料

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*, Columbia ecotype)を用いた。土または0.8%の寒天を含むGM (germination medium; Valvekens et al., 1988)に播種し、明期16時間／暗期8時間の長日条件の22°Cの人工気象器で生育させた。

ZIM-like 遺伝子のサブクローニング

シロイヌナズナから調製したRNAより、ReverTra Ace α - (Toyobo, Osaka, Japan)を用いてMXL-K3 (5'-AATGTGCCCACATAGACTGAGATTAACCCA)およびF5D-K3 (5'-TGATAAAGCTACAGAACCTGAGGCGATTCA)の各プライマーにより逆転写し、生成した1st strand DNAを鋳型にMXL-c5 (5'-ATTGTTTCGCGTGAATTAGCTCTGCA AAGG)とMXL-K3、およびF5D-c5 (5'-GCGTTATCCATCGGTTCAATTGTCATCTTC)とF5D-K3を用いてPCRにより増幅した。これをpGEM[®]-Tベクター(Promega, Madison, WI, USA)にTAクローニングすることにより、ZML1とZML2をそれぞれサブクローニングした。得られたクローンについてM13Fプライマー(5'-CAGTCAC GACGTTGTAAAACGACGGCCAGT)を用いて配列を決定した。

ノザンプロット解析

植物体の各組織よりRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)またはSepasol-RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を用いてtotal RNAを調製した。1.0%アガロース／ホルムアルデヒドゲルで泳動し、ナイロンメンブレン (Hybond-N, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)にブロッティングした。プローブ断片はZIMにはZIM249 (5'-ATCGATTGGTACATTGAGGGATCTC)とZIM-T3 (CGGTTACGGTTTCTA TAATACATGTGATG)を、ZML1にはZML1-F (5'-TGGAATTCTGCACATTGGTGTAG CG)とZML1-R (5'-AAGAGCTCAAACCTGTCCCTGGAAGG)を、ZML2にはZML2-F (5'-CCGAATTCTGCACATTAGAGAAGCTC)とZML2-R (5'-TTGAGCTCACTGATCTC CTTGTTAC)をプライマーに用いてRT-PCRすることにより作製した。ZIMには全長cDNA (DDBJ the accession number AB035310)も用いた。各プローブは正しいものがPCRによって増幅されていることを塩基配列の決定により確認した。これをStrip-EZ DNA (Ambion, Austin, TX, USA)を用いて³²P標識して使用した。ハイブリダイゼーションは常法に従った (Church and Gilbert, 1984)。

結果

ZIM の GATA タイプジンクフィンガーモチーフ

我々の研究室で単離されたシロイヌナズナの ZIM は、309 アミノ酸からなる約 33 kDa のタンパク質をコードしており、そのアミノ酸配列から、N 末端側から順に、酸性領域、塩基性領域、ジンクフィンガーモチーフを持つことが示されていた(Nishii et al., 2000)。酸性領域は転写活性化、ジンクフィンガーは DNA 結合にそれぞれ働くことが予測されている。また、塩基性領域には核移行シグナル様の配列が見られ、GFP との融合タンパク質を用いた局在解析より ZIM 全長タンパク質が核に局在することが示された。これらの特徴は、ZIM が転写因子として働くことを示唆するものである。ZIM の特徴についてさらに詳細に調べるため、ZIM のアミノ酸配列を用いてデータベース検索を行った。

まず、ジンクフィンガーモチーフについて検証した。ZIM のジンクフィンガーは $C-X_2-C-X_n-C-X_2-C$ モチーフで表される。ループを形成する 2 番目と 3 番目のシステインを隔てるアミノ酸残基数(n)が ZIM では 20 残基あり、これまで知られている GATA タイプジンクフィンガーは 17-19 残基である。ZIM が GATA タイプに属するかを検証するため、ZIM が持つ $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ のジンクフィンガーと $C-X_2-C-X_{17-19}-C-X_2-C$ のジンクフィンガーを比較したところ、システイン以外のアミノ酸残基も比較的保存されていた (図 2A)。それに対してシロイヌナズナの CONSTANS (CO) や DAG1 のジンクフィンガーモチーフも $C-X_2-C-X_n-C-X_2-C$ モチーフで表すことができるが、システイン以外のアミノ酸が保存されておらず、それぞれ B-box ファミリーと Dof ファミリーに分類されている(図 2B) (Robson et al., 2001; Papi et al., 2000)。これにより、ZIM のジンクフィンガーは GATA タイプのものと相同性を示す、新規の GATA タイプジンクフィンガータンパク質であることが確認された。

保存性の高い、C 末端側のシステインを含む 6~7 残基は $C-X_2-C-X_{17}-C-X_2-C$ モチーフにおいて DNA 結合に関わることが示されている(Omichinski et al., 1993)。ZIM においてこれらのアミノ酸が保存されていることは、 $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ モチーフが DNA 結合能を持つことを示唆する。 $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ と $C-X_2-C-X_{17-19}-C-X_2-C$ のタイプの違いで特徴的なものが、ZIM のループの 10 番目に相当するアミノ酸が、これまでに知られている全ての GATA タイプジンクフィンガーではトリプトファンであるのに対し、ZIM ではメチオニンであった (図 2A)。後述する ZIM と相同性を示す他の $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ を持つタンパク質においてもこの位置のアミノ酸残基はメチオニンであり (図 3、6)、これが $C-X_2-C-X_{20}-C-X_2-C$ モチーフのジンクフィンガーのアミノ酸配列上の大きな特徴のひとつであった。

(A)	
C-X ₂ -C-X ₁₇ -C-X ₂ -C	
NIT2 (<i>N.crassa</i>)	TTCTNCFTQTTPPLWRRNPDGQPLCNACGLFLKLH
AREA (<i>A.nidulans</i>)	TTCTNCFTQTTPPLWRRNPEGQPLCNACGLFLKLH
GLN3 (<i>S.cerevisiae</i>)	IQCFNCKTFKTPPLWRRSPEGNTLCNACGLFQKLH
DAL80 (<i>S.cerevisiae</i>)	PTCQNCFTTVKTPPLWRRDEHGTVLCNACGLFLKLH
GATA-1 (<i>M.musculus</i>)	TOCTNCQTSTTTLWRRNASGDPVCNACGLYFKLH
GATAa (<i>D.melanogaster</i>)	LCCTNCGTRTTTLWRRNNDGEPVCNACGLYYKLH
C-X ₂ -C-X ₁₈ -C-X ₂ -C	
StkA (<i>D.discoideum</i>)	RSCEFCGSSQTPTWRRGPSCKGSLCNACGLIKWRLK
WC1 (<i>N.crassa</i>)	RDCANCHTRNTPEWRRGPSGNRDLNCSGLRWAKQ
GAT3 (<i>S.cerevisiae</i>)	EFCFHCGETETPEWRKGPYCTRILCNACGLFYRKV
NTL1 (<i>N.tabacum</i>)	KKCTHCQVTKTPPWREGPLGPKTLCNACGLVYRSG
GATA-1 (<i>A.thaliana</i>)	RKCOHC GAETTPQWRAGPAGPKTLCNACGLVRYKSG
PBP (<i>F.solani</i>)	YVCTDCGTLDSPFWRRGPSCKPTLCNACGLRWAKK
C-X ₂ -C-X ₁₉ -C-X ₂ -C	
GAT4 (<i>S.cerevisiae</i>)	RTCGQCGEIKTSLQWREGPNCAACL CNACGLFFRKL
GAT3 (<i>S.cerevisiae</i>)	RRCPQCAVIKTSPQWREGPDGEVTLCNACGLFYRKI
C-X ₂ -C-X ₂₀ -C-X ₂ -C	
ZIM (<i>A.thaliana</i>)	ISCTHC GISSKCTTPMRRGPSGPRTL CNACGLFWANR
(B)	
CO (<i>A.thaliana</i>)	RPCDTCRSNACTVYCHADSAYLCMSQDAQVHSA
DAG1 (<i>A.thaliana</i>)	VNCPRCNSTNTKFCYNNYSLTQPRYFCCKGCRRYWTEG

図2. GATAタイプジンクフィンガーモチーフ

(A) 各生物のこれまでに知られているモチーフのアライメントとZIMのジンクフィンガーモチーフ。亜鉛を配位するシステイン残基を*で示した。全てのモチーフで保存性の高いアミノ酸残基を黒で示した。本文で言及しているトリプトファン残基とメチオニン残基を○で示した。(B) GATAタイプに属さないジンクフィンガーモチーフ。

シロイヌナズナの C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C タイプの GATA 因子

シロイヌナズナにおける GATA タイプジンクフィンガーを持つタンパク質をデータベースより検索したところ、27 のタンパク質が存在することが明らかになった。ジンクフィンガー領域を用いて作製した系統樹とアライメントを図3に示した。シロイヌナズナの GATA 因子は、ZIM が属する C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C のタイプと、C-X₂-C-X₁₈-C-X₂-C のタイプの2つに分類された。その多くは後者に属するものであり、前者は ZIM と At3g21175、At1g51600 の3つであった。

シロイヌナズナの C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つタンパク質である At3g21175 と At1g51600 について、データベースに登録されている EST の配列(EMBL accession No. AY042817 (At3g21175), AY045906 (At1g51600))をもとに全長 ORF を網羅するようにプライマーを設計し、RT-PCR により各遺伝子をサブクローニングした。アミノ酸配列を比較したところ、At3g21175 と At1g51600 は ZIM と約 44% の相同性を示すことが明らかになり、それぞれ ZML1 (ZIM-like 1; DDBJ accession No. AB119060)、ZML2 (ZIM-like 2; AB119061) と名付けた。ZML1 と ZML2 では約 75% の相同性を示

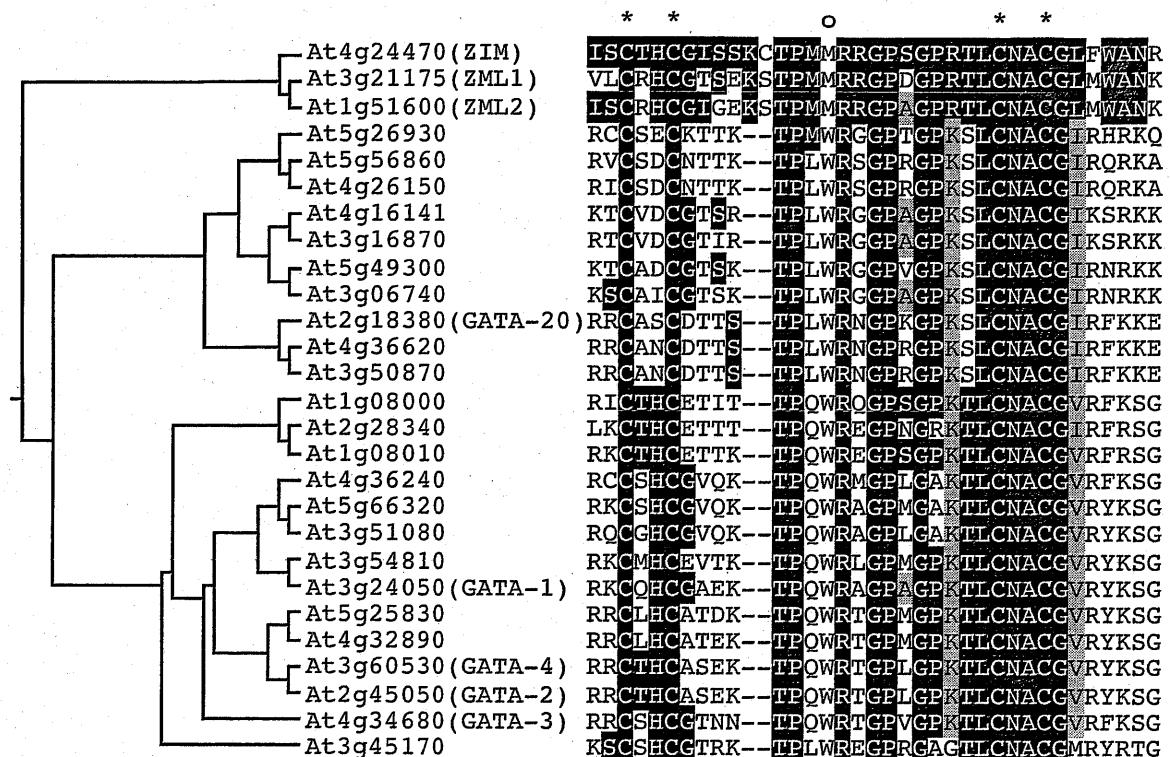


図3. シロイヌナズナのGATA因子のジンクフィンガードメイン

CLUSTAL W(<http://clustalW.genome.ad.jp/>)とneighbor-joining法を用いて系統樹を作製した。アライメントはZIMと同一アミノ酸を黒で、類似アミノ酸を灰色で示した。亜鉛を配位するシステイン残基を*で、本文で言及しているトリプトファン残基とメチオニン残基を○で示した。

した。ゲノム配列と比較することでイントロン挿入部位を決定したところ、ZML1、ZML2はZIMと全く同様のエキソン-イントロン構造を持つことが明らかになった(図4)。イントロン挿入部位におけるコドンの分割のされ方もZIMとZML1、ZML2で全く同じであり、完全に一致するものであった。

ZIM、ZML1、ZML2のアミノ酸配列を比較したところ、ジンクフィンガー領域以外でも保存されている部分が見出された(図4)。ひとつは、これまでにZIMの塩基性領域とされていた領域であり、CONSTANS(CO)、CO-like、TIMING OF CAB1(TOC1)/APRR1に保存されているCCTドメインに相当することが明らかになった(図5A)。この領域はZIMの核局在に必要であることが示唆されており(Nishii et al., 2000)、APRR1やCOにおいてもCCTドメインが核局在に必要であることが示されている(Makino et al., 2000; Robson et al., 2001)。さらに、CCTドメインはタンパク質間相互作用にも働くと考えられており(Robson et al., 2001)、ZIMが他のタンパク質と相互作用して働くことが予測された。

ZIM 1 ---MFGRHSIIPNNQIGTASASAGEDHVSASATSGHIPYDDMEEIPHPDSIYGAASDLIP
 ZML1 1 MDDLHGRNGRMHIGVAONPMHVQYEDHGLHHIDNENSMMDDHAD----GGMDEGVETDIP
 ZML2 1 MDDLHGSNARMHIREAQDPMHVQFEHHEALHHIHNGSGMVDDOADDGNAGCMSEGVETDIP

ZIM 58 DGSQLVAHRS D GSELLVSRPPEGANOLTISFRGOVYVFDVAGADKVDVAVLSILGGSTELA
 ZML1 57 SHP---GNSADNRGEVVDRCIENGCDQLTLSEFOGOVYVFDVRSPEKVCVAVLLLLGGREVPH
 ZML2 61 SHP---GNVTDNRGEVVDRCSEOGDQLTLSEFOGOVYVFDVSLPEKVCVAVLLLLGGRELPO

ZIM 118 PGQVMELAQOONHM-PVVEYQSRCSLPORAOSLDRTFRKKRNARCFEKKVRYGCVROEVAL
 ZML1 114 TLPTTLGSPHONNRVGLSGTPORLSVPORLASLLRFREKKRGRNFDKTIIRYTVRKEVAL
 ZML2 118 AAPPLGSPHONNRVSSLPCTPQRFESIPORLASLVRFREKKRGRNFDKKIIRYTVRKEVAL

ZIM 177 RMARNKGQFTSSKMT-DGAYNSGTDODSAQ-----DDAHPEISCTHCGISSKCTPMMR
 ZML1 174 RMORSKGQFTSAKSSNDDSGSTGSDWGSNOSWAVEGTETOKPEVLCRHCGTSEKSTPMMR
 ZML2 178 RMORNKGQFTSAKSNDEAASAGSSWGSNOTWAISSSAOHOEISCRHCGIGEKSTPMMR

ZIM 229 RGPSGPRTLCNACGLEFWANRGTLRDLSKKTEENQALMKP----DDGGSVADAANNLNTE
 ZML1 234 RGPDPGRTLCNACGLMWANKGTLRDLSKVPPPPOTPOHLSLNKNEDANLEADQ--MMEVTG
 ZML2 237 RGPAGPRTLCNACGLMWANKGAFRDLSKASP-OTAONLPLNKNEDANLETDHQIMITVAN

ZIM 285 AASVEEHTSMVSLANGDNSNMLGDH
 ZML1 292 DISNTQ-----
 ZML2 297 DISNSQ-----

図4. ZIMとZML1、ZML2のアライメント

3つのタンパク質で保存されているアミノ酸とZIM-likeタンパク質間で保存されているアミノ酸を、黒と灰色でそれぞれ表した。ジンクフィンガー領域を下線、CCTドメインを二重下線、機能未知領域を点線でそれぞれ示した。イントロン挿入部位を▼で示した。

(A)

ZIM	RAQSLDRFRKKRNARCEEKKVRYGVROEVALRMARNKGOETSSKM
ZML1	RLASLLRFREKRKGRNFDKTI RYTVRKEVALRMORSKGQFTSAKS
ZML2	RLASLVRFREKRKGRNFDKTI RYTVRKEVALRMORNKGQFTSAKS
APRR1/TOC1	REEALLKFRRKRNRQCFDKKTI RYVNRKRLAERRPRVKGFVRKMN
APRR3	REAALMKFRLKRKERCFEKKVRYHSRKKLAEQRPVKGQFIRKRD
APRR5	REAALTKEFMKRKDRCEYKKVRYESRKKLAEQRPRIKGQFVRQVQ
APRR7	REAALTKEFRQKRKERCERKKVRYQSRKKLAEQRPVRVGQFVRKTA
APRR9	REAALMKFRLKRKDRCFDKKVI RYQSRKKLAEQRPVKGQFVRTVN
CO	REARVLRVREKKKMRKEEKTIRYASRKAYAEKRPRIKGRFAKKKD
COL1	REARVLRVREKKKMRKEEKTIRYASRKAYAEKRPRIKGRFAKKKD
COL2	REARVLRVREKKKTRKFDKTI RYASRKAYAEIRPRIKGRFAKRIE

(B)

ZIM	83	OLTISFRGQVYVEDAVGADKVDVAVLSLLGGS	146	RAQSLDRFRKKRNAR
ZML1	79	OLTISFQGGVYVEDRVSPKQVAVLLLLGGR	143	RLASLLRFREKRKGR
ZML2	83	OLTISFQGGVYVEDSVLPKQVAVLLLLGGR	147	RLASLVRFREKRKGR
At5g20900	57	OLTIFEGGCVTVEDGIPSEKVOELIRIAAKA	142	RRHSLORFLEKRDR
At3g43440	45	OLTIFEGGSCRVNGVPAQKVQELIRIAFAG		
	131	OLTIFEGGSFSDGIPAEKVQELIRIAAAA	200	RRRSLORFFEKRHR
At3g17860	178	OLTIFYAGSVGVDDISPEKAKAIMLLAGNG	305	RKASLARFLEKRKER
At1g70700	119	OLTIFYGGTISVENDISPDKAQAIMLCAGNG	223	RKASLARFLEKRKER
At1g48500	122	OLTIFYAGSVLVQDIAPKQAQAIMLLAGNG	237	RKASLARFLEKRKER
At1g19180	126	PLTIFYAGOVIVENDFSAEKAKEVINLASKG	205	RRASLHRFLEKRKDR
At1g74950	119	PLTIFYGGRVMVEDDFSAEKAKEVIDLANKG	207	RRASLHRFLEKRKDR
At1g72450	106	OLTIFEGGKVMVNEFPEDKAKEIMEVAKQA		
At1g17380	98	OLTIFEGGKVLVNEFPVDKAKEIMEVAKQA	184	RRASLHRFFAKRKDR
At4g14720	157	OMTIFYSGKVNVDGVPPEKARSIMHFAANP	236	RKVSLORYLEKRKDR
At4g32570	238	OMTIFYGGOAHVFDVHPNKVILPNTYTLDI		

機能未知領域

CCTドメインN末端側

図5. ZIMの保存された領域

ZIMと同一アミノ酸を黒で、類似アミノ酸を灰色で示した。(A)CCTドメインのアライメント。
(B)機能未知領域のアライメント。At3g43440はこの領域を2つ持つ。CCTドメインのN末端側を持つものは後に続けて示した。数字はアミノ酸番号。

ZIM ファミリー間で保存されていたもうひとつの領域は、これまで同定されていない機能未知の領域であった。C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つタンパク質以外にもこの領域を保持しているタンパク質がいくつかあることが、シロイヌナズナのデータベースの検索により明らかになった (図 5B)。これらのタンパク質はいずれも機能未知タンパク質であるが、ひとつの特徴として、その C 末端側に CCT ドメインの N 末端側 15 アミノ酸を持つものが多いことが明らかになった。この機能未知領域の役割の解明が期待される。

植物に特徴的な C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフ

シロイヌナズナにおいて、ZIM、ZML1、ZML2 の 3 つのタンパク質が C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つことが明らかになった。このモチーフを持つタンパク質はこれまでに報告されていなかったが、EST を連結させることにより再構築した遺伝子のデータベースである The TIGR Gene Indices (TGI; <http://www.tigr.org/tdb/tgi>) (Quackenbush et al., 2000) を検索した結果、イネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイズ (*Glycine max*)、トマト (*Lycopersicon esculentum*) にこのモチーフを持つものがそれぞれ 1~5 遺伝子見出された。植物だけでなく、ヒト (*Homo sapiens*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) にも存在することがわかった (図 6)。しかしながら、酵母とアカパンカビのものは、植物で TP(M/A)M に保存されている、2 組のシステインを繋ぐループ領域の 7~10 番目のアミノ酸が保存されていないなど、保存性が低かった。そのため、酵母とアカパン

ZIM			*	*		O		*	*
ZML1									
ZML2									
maize TC181525									
maize TC181526									
maize TC187944									
rice TC135001									
rice TC119807									
rice TC117187									
rice TC129995									
barley TC83985									
barley TC71761									
barley TC70002									
barley AV834946									
wheat TC73736									
wheat TC91963									
wheat TC94455									
tomato TC118842									
soybean TC152145									
soybean TC168599									
soybean TC166807									
soybean TC148453									
soybean BE822609									
human AW857766									
f_yeast NP269534									
neurospora NP619700									

図6. 各生物におけるC-X₂-C-X₂₀-C-X₂-Cモチーフのアライメント

高い保存性を示すZIMと同一のアミノ酸を黒で示した。亜鉛を配位するシステインを*で、本文で言及しているトリプトファン残基とメチオニン残基を○で示した。

カビのジンクフィンガーは、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフの中でも ZIM のものとは異なるタイプに分類できた。ヒトのものは植物のものと相溶性が高かった。検索で得られた C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つタンパク質はいずれも EST として登録されているものの、その機能はわかっていない。マウス(*Mus musculus*)、コウジカビ(*Aspergillus nidulans*)、タマホコリカビ(*Dictyostelium discoideum*)、クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)の TGI のデータベースには C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つものは含まれていなかった。調べた全ての植物には C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つタンパク質が必ず存在することから、植物に特徴的なモチーフであることが明らかになった。

検索で得られた C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つタンパク質の、ジンクフィンガー以外の領域を、EST 配列より得られる ORF (open reading frame) から予測した。その結果、植物のものの多くはジンクフィンガー領域以外にも ZIM と相溶性を示し、全長で 37~52%の相溶性(identity)を持っていた (図 7)。ZML1、ZML2 にも保存されていた機能未知領域と CCT ドメインを持ち、これらの領域は 60~92%の高い相溶性(identity)を示した。さらに、ZIM は N 末端側に 22%の酸性アミノ酸 (グルタミン酸およびアスパラギン酸) を含む酸性領域を持つが、これらのタンパク質

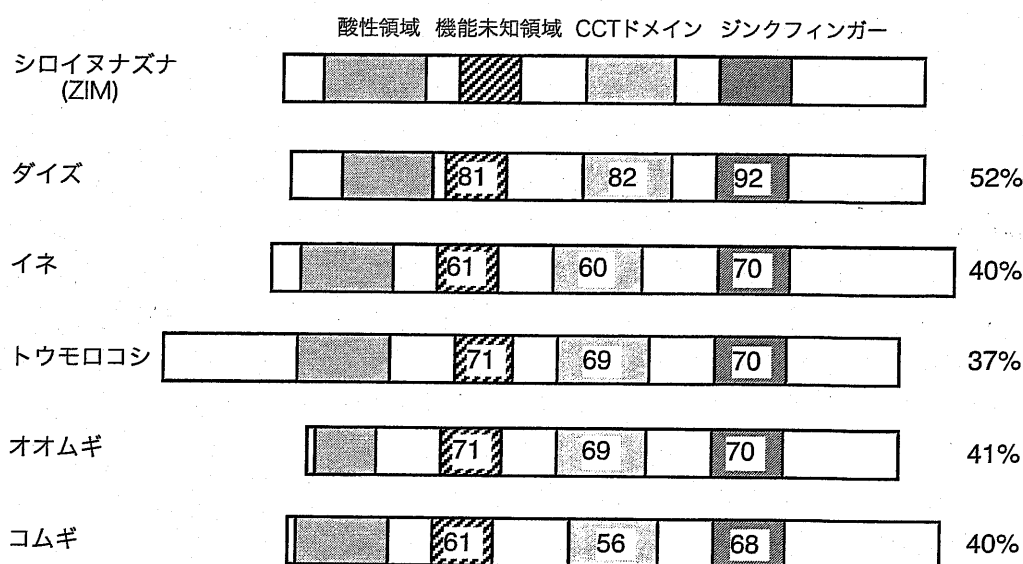


図7. 各植物におけるZIMと相溶性を示すタンパク質

ESTから予測されるORFをもとにアミノ酸配列を決定し、ZIMとの相溶性を示した。トウモロコシ TC181526、イネTC117187、オオムギTC71761、コムギTC73736、ダイズTC152145の配列を用いた。枠内の数字は各領域内のZIMとの相溶性 (同一アミノ酸、%)、右の数字は全長でのZIMとの相溶性を示した。保存性の高い領域については図5を参照のこと。

も同様に N 末端側には酸性アミノ酸が 28~56%含まれており、タンパク質全長にわたって構造が類似したタンパク質であった。これら個々を ZIM-like タンパク質、総称を ZIM ファミリーと呼ぶことにした。ヒトのものは、公開されている EST から得られる ORF はジンクフィンガー領域を含めて 107 アミノ酸残基であり、酸性領域、機能未知領域、CCT ドメインを含まない短いものであった。以上ことから、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つ新規 GATA ファミリーが植物特異的に存在することが示唆された。

ZIM、ZML1、ZML2 の空間的発現解析

ZIM は生殖生長期の花や花芽で発現するものとして単離されてきた(Nishii et al., 2000)。これまでに *GUS* レポーター遺伝子を用いた ZIM のプロモーター解析から、ZIM は栄養生長期の茎頂と、花序茎頂、雄ずい、雌ずいで発現することが示されていた(藤田、1998; 西井、2000)。植物特異的新規 GATA 因子をコードする ZIM の時間的、空間的発現パターンを mRNA レベルで詳細に解析するため、栄養生長期(発芽後 14 日目)および生殖生長期(発芽後 1 ヶ月)の植物体を用いて組織別にノザン解析を行った。その結果、発現量に差はあるものの、調べた全ての組織で発現が認められた(図 8)。栄養生長期の茎頂と根、生殖生長期の花序で発現が高く、葉での発現量は低いものであった。

ZIM と相同性を示す ZML1 と ZML2 についても同様に空間的な発現解析を行ったところ、ZIM と同様の発現パターンを示した(図 8)。このことは、これら ZIM-like 遺伝子が ZIM と重複した機能を持つのではないかということを示唆している。

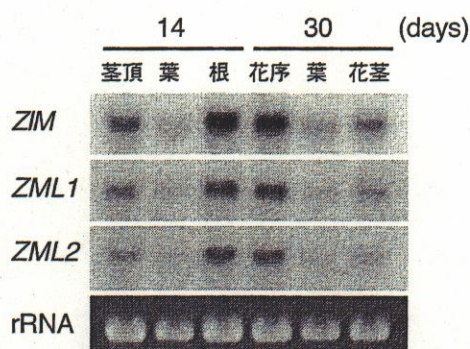


図8. ZIM、ZML1、ZML2の空間的発現解析

長日条件で生育させた14日目および30日目の植物体の各組織より調製した10 μ gのtotal RNAを用いて、各遺伝子特異的なプローブによるノザンプロット解析を行った。ローディングコントロールとして25S rRNAのEtBr染色を示した。

ZIMの時間的発現解析

ZIM は CCT ドメインを持っている。CCT ドメインを持つ CO や COL1、COL2、TOC1/APRR1、APRR3、APRR5、APRR7、APRR9 をコードする遺伝子は、発現パターンが 24 時間周期で増減する概日リズムを示すことが知られている (Suárez-López et al., 2001; Ledger et al., 2001; Makino et al., 2000; Strayer et al., 2000; Matsushika et al., 2000)。CCT ドメインが概日リズムを示す遺伝子に特徴的なドメインなのではないかと考え、ZIM の発現パターンを経時的に調べた。長日条件で生育させた植物体の発芽後 10 日目より 4 時間おきに各 50 個体程度サンプリングし、total RNA を調製し、ノザン解析を行った。その結果、10 日目は発現量に変動はなかったが、11 日目、12 日目に発現量が上昇する時刻が見られた (図 9A, B)。しかしながら発現量の増減のリズムは 24 時間周期ではなかった。なお、概日リズムを示すことが知られている CAB では、これまで報告されているような規則的な 24 時間周期の発現量の増減が見られた (図 9A, B)。発芽後 14 日目からも同様にノザン解析を行ったところ、大きな発現変動は見られなかった (図 9C)。なお、図 9 の A と C は同時に実験を行っていないため、発現量の比較はできない。このような 24 時間周期ではない発現変動は、12 時間明期/12 時間暗期の条件においても、長日条件と同様の生育段階である本葉 4 枚程度の時期に確認された。このことから、ZIM の発現量は 1 日の中で変動する時期があるものの、それは概日リズムではないことがわかった。この発現量の変動が何により制御されているのかは今回の実験では明らかにできなかった。

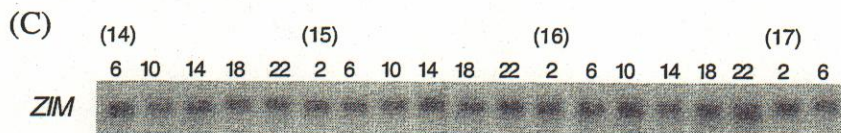
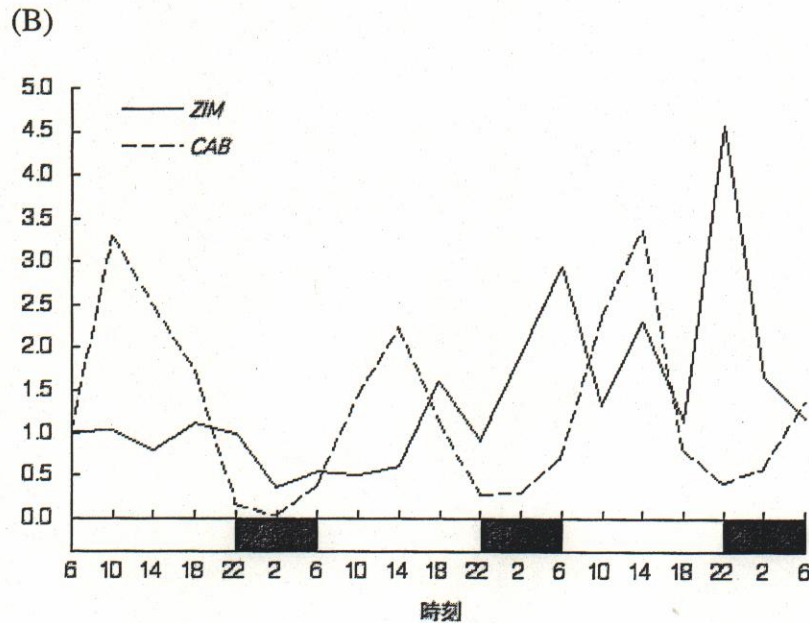
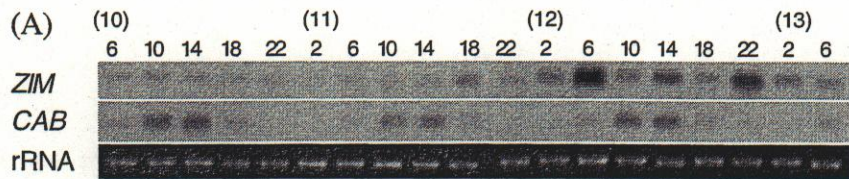


図9. ZIMの時間的発現パターン

(A) 長日条件で生育させた10日目から13日目の植物体を用いてノザン解析を行った。コントロールとして25S rRNAのEtBr染色を示した。上の数字は時刻を、括弧内の数字は発芽後の日数を表す。

(B) 発現量をEtBr染色した25S rRNAのシグナル強度により標準化し、10日目6時の発現量を1として相対値として、発現変動をグラフに示した。下に示した箱は白が明期、黒が暗期を表す。

(C) 長日条件で生育させた14日目から17日目の植物体を用いてノザン解析を行った。上の数字は時刻を、括弧内の数字は発芽後の日数を表す。

考察

ZIM のジンクフィンガーは GATA タイプのものと相同性を示したが、ループを形成する 2 番目と 3 番目のシステインが 20 残基隔てられており、これまで知られている GATA タイプジンクフィンガーとは異なるものであった (図 2)。ZIM が持つ C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフの GATA タイプジンクフィンガーは、双子葉であるシロイヌナズナやダイズ、単子葉のイネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギで見られ、植物界に広く存在するモチーフであることが示唆された (図 6)。そしてこのモチーフを持つタンパク質の多くは ZIM と同様、酸性領域と CCT ドメインと機能未知領域を持ち、全長で相同性を示す植物界で保存されたタンパク質であった (図 7)。このことから、ZIM タンパク質群は植物に特異的かつ普遍的な転写因子であると予測された。

C-X₂-C-X₁₇₋₁₈-C-X₂-C モチーフの GATA タイプジンクフィンガーは (A/T)GATA(A/G) という DNA 配列を認識する。シロイヌナズナにおいても、GATA-1、GATA-2、GATA-3、GATA-4 が GATA を含む配列に結合することが示されている (Teakle et al., 2002)。C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C モチーフを持つニワトリの GATA-1 において、核磁気共鳴 (NMR; nuclear magnetic resonance) による DNA と結合した状態の三次元構造解析が行われている (Omichinski et al., 1993)。それによると、図 2A に示した、多くの GATA 因子において保存性の高い残基が DNA の認識に関わるアミノ酸残基であることがわかっており、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C のモチーフにおいてもこれらのアミノ酸の多くは保存されているため、このモチーフが DNA に結合できることを強く示唆している。それでは認識配列も他のモチーフと同じなのだろうか。シロイヌナズナの GATA-20 は、GATA-1~GATA-4 と同じ C-X₂-C-X₁₈-C-X₂-C モチーフを持つにもかかわらず、GATA 配列を含む DNA への結合は検出されない (Jeong and Shih, 2003)。GATA-20 は系統的に GATA-1~GATA-4 とは異なっており (図 3)、この違いが DNA 認識配列の違いをもたらしているのかもしれない。ZIM ファミリーが持つジンクフィンガーはループを形成するアミノ酸残基の数が 20 であり、認識配列が異なる可能性は十分ある。C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフではループの 10 番目がメチオニンであり、他のモチーフで保存されているトリプトファンとは異なっていたが、このトリプトファンは DNA 認識ではなくジンクフィンガーの構造維持に必要な残基であった (Omichinski et al., 1993)。これは他のモチーフと異なる構造をとる可能性を示唆している。さらにニワトリの GATA では、ジンクフィンガーに続く C 末端側の領域が DNA の小さい溝 (minor groove) に入り込んで認識配列の特異性を高めていることもわかっており、この領域は ZIM との相同性はない。また、タバコの AGP は、DNA への結合には C-X₂-C-X₁₈-C-X₂-C の C 末端側の 2 つのヒスチジン残基が必要であることがわかっており、AGATCC 配列を認識する (Sugimoto et al., unpublished results)。ZIM はこのヒスチジン残基は持っていない。ZIM は DNA には結合するが認識配列

は GATA や AGATCC とは異なるのかもしれない。ZIM が持つ C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフの GATA タイプジンクフィンガーがどのような DNA 配列を認識するのかを調べることにより、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフの DNA 結合モチーフとしての特徴がより明らかになるであろう。

シロイヌナズナにおける、植物特異的新規 GATA 因子をコードする *ZIM*、*ZML1*、*ZML2* の発現パターンを解析したところ、この 3 遺伝子は茎頂、根、花序で発現が高く葉で低いという同様の空間的発現パターンを示した (図 8)。このことはこれらが重複した機能を持つことを示唆している。*ZIM* と *ZML1*、*ZML2* は、イントロンの挿入部位が全く同一であることから (図 4)、進化的にも近縁であると考えられ、これらが機能的に重複しているという考えが支持された。また、*ZIM* は花芽特異的かつ低発現性の遺伝子として単離されてきたが (Nishii et al., 2000)、ノザンの結果では調べた全ての組織で *ZIM* mRNA が検出され、発現量も total RNA を用いたノザンで検出できるほどの高いものであった (図 8)。生殖生長期における各組織の発現量を比較すると、花芽と花が含まれる花序で高く、葉や花茎ではそれに比べると低かった。Nishii et al. (2000) のデータでは、葉と花茎において mRNA が検出できていなかったが、おそらく検出感度が低かったと考えられる。すなわち、いずれの組織でも *ZIM* は発現しており、特に花序で発現量が高いということが本研究から明らかになった。

ZIM の経時的な発現パターンの解析を行った結果、発現量の変動する時期があるという結果が得られた (図 9)。CCT ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子の発現は概日リズムを示すが、*ZIM* の発現パターンは概日リズムではなかったことから、CCT ドメインが概日リズムを示す遺伝子に特徴的な領域ではないと考えられる。現時点ではどのような機構により *ZIM* の発現量の変動しているのかは不明である。解析をおこなった長日条件での発芽後 11 日目頃は、栄養生長期から生殖生長期への転換がおこる時期であり、茎頂分裂組織の属性が変化する時期だと考えられる。*ZIM* は茎頂で発現量が高いことから (図 8)、*ZIM* が花成制御に関与している可能性はあるが、*ZIM* の発現変動時における既知の花成制御遺伝子の発現解析を行うなど、今後詳細な解析が必要である。今回の解析では複数個体より RNA を調製してノザン解析を行ったが、発現量の変動が正確に表れるためにはある程度個体間で *ZIM* の発現時期が同調している必要がある。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を *ZIM* プロモーターに連結することで、植物体を固定せずに生体のまま発現変動をモニターできるような系を用い、1 個体での *ZIM* の発現変動を調べることで、*ZIM* の時間的発現変動の機構を明らかにすることができるであろう。

第2章 ZIMの転写活性化能の解析

序論

転写因子は標的となる遺伝子のシス配列に結合し、基本転写因子や RNA ポリメラーゼに作用することで転写を制御していると考えられている。転写因子の DNA に結合する領域と転写制御を行う領域は明確に分けることができ、それぞれを切り離しても独立して機能することができる。これらの領域に加えて、転写因子自身の機能を調節する領域として、リン酸化や多量体化のためのタンパク質間相互作用領域や、ホルモンや金属補因子などを結合するためのリガンド結合領域を持つものもある。これらの領域も機能的に独立して働き、転写因子は独立した領域が組み合わされたモジュール構造をとっている。酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合領域と単純ヘルペスウィルスの VP16 の転写活性化領域とのキメラタンパク質が、DNA 上の GAL4 結合部位に結合して強力な転写活性化能を示したことから、転写因子のモジュール構造の概念が認知された(Sadowski et al., 1988)。また、この実験は転写因子の各領域が生物種を超えて機能することも示している。このモジュール構造の原理を利用したものとして、タンパク質間相互作用を検出する酵母 two-hybrid 法がある。DNA 結合領域と転写活性化領域が、それぞれ X と Y というタンパク質との融合タンパク質として存在するとき、X と Y が相互作用すれば転写活性化能を持ったタンパク質複合体となり、レポーター遺伝子の活性を測定することにより相互作用の有無を判定できる、というものである。モジュール構造を利用した別の実験系として、ステロイドホルモン受容体のホルモン結合領域との融合タンパク質 Z の、タンパク質機能誘導がある。ホルモン非存在下では、ステロイドホルモン結合領域が複合体を形成し、Z の機能を抑制する。ホルモン存在下では複合体が解離し、Z の機能が回復することより、タンパク質の機能を誘導できる系である。このように、転写因子の領域が独立して機能することが利用されている。

DNA 結合領域は保存された配列からなる明確なモチーフが存在するが、転写の活性化能や抑制能を与える制御領域はそのようなコンセンサス配列を持たない。しかしながら、アミノ酸の組成によりいくつかのグループに分類することができる。転写活性化に働く領域としては、酸性アミノ酸に富む領域、グルタミンに富む領域、プロリンに富む領域などが同定されている。酸性アミノ酸に富む領域を持つ転写因子として、酵母の GAL4 や GCN4 などが知られている(Ma and Ptashne, 1987; Hope and Struhl, 1986)。Sp1 はグルタミン、CTF/NF- κ B はプロリンに富む領域を持つ転写活性化因子である(Chourey and Tjian, 1988; Mermoud et al., 1989)。転写活性化領域は上記のようなアミノ酸の割合だけで決まるわけではなく、例えば酸性領域が転写活性化領域として働くには、疎水性アミノ酸残基や芳香族アミノ酸残基も重要であること

も知られている (Triezenberg, 1995)。転写活性化能の解析は、転写因子のモジュール構造の特徴を生かして行われてきた。すなわち、解析したいタンパク質と、GAL4 の DNA 結合領域との融合タンパク質を用いて、GAL4 結合部位を上流に持つレポーター遺伝子の転写量を、そのタンパク質の活性を測定することにより評価を行うことができる。これまで酵母や哺乳類、ショウジョウバエ、植物の細胞を用いた転写活性化能の解析が行われてきている(Ma et al., 1988)。

植物特異的 GATA 因子 ZIM は、転写活性化領域と考えられる酸性領域、核局在とタンパク質間相互作用に働くと考えられる CCT ドメイン、DNA に結合するためのジンクフィンガー領域を持ち、転写因子として働くと予測されている。しかしながらそのタンパク質としての機能は、ZIM 全長タンパク質が核に局在することが確かめられているだけであり(Nishii et al., 2000)、転写因子として機能するかどうかは不明である。本章では、ZIM が転写因子としての機能を有するのかを、転写活性化能を解析することにより検証した。また、酸性領域が転写活性化領域であると考えられることから、転写因子のモジュール構造を利用した転写活性化領域の同定を行った。

材料と方法

転写活性化能解析用コンストラクトの構築

転写活性化能の解析は、酵母 GAL4 の DNA 結合領域(GAL4-DBD)と ZIM との融合タンパク質をエフェクターとし、GAL4 結合領域を上流シス配列に持つルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとするシステムを利用した。ルシフェラーゼ遺伝子上流に結合した GAL4 融合タンパク質が転写活性化能を有するならば、ルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化され、ルシフェラーゼ活性として検出することができる。

エフェクター構築のために用いた 35S-GAL4 コンストラクト、レポーターコンストラクト、内部標準コンストラクトは平塚博士(横浜国立大学)から分与していただいた。35S-GAL4 コンストラクトは CaMV 35S プロモーターの下流に酵母 GAL4 全長および E9 ターミネーターが連結したものが pUC19 プラスミドベクター(GenBank accession No. L09137)に挿入されたものである。レポーターコンストラクトは pBluescript 由来であり、6 個の GAL4 結合部位(UAS)の下流に Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S プロモーターの-46 配列とルシフェラーゼ遺伝子が連結されたものである。内部標準コンストラクトは、pBI221 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA)由来であり、CaMV 35S プロモーターの下流にウミシイタケ(*Renilla*)のルシフェラーゼが挿入されている。

各エフェクターのコンストラクトを構築するために、まず 35S-GAL4 コンストラクトより、GAL4 全長と E9 ターミネーターを含む *Xba*I-*Sma*I 断片を、pBI221 の CaMV 35S プロモーターの下流となる *Xba*I-*Sma*I 部位に挿入したものの(pBI-GAL4)を作製した。このコンストラクトの *Cla*I-*Sac*I 部位に遺伝子を挿入することで GAL4-DBD との融合遺伝子を構築することができる。ZIM 全長のコンストラクト(Full)は、ZIM cDNA を鋳型として *Cla*-ZIM (5'-CCACGATGTTTGGTCGCCATTC)と ZIM-*Sac*-*Cla* (5'-CCATCGATGAGCTCTATCTTCTGATTC)を用いて増幅し、*Cla*I-*Sac*I 断片を pBI-GAL4 の *Cla*I-*Sac*I 部位に挿入し、構築した。C 末端側を欠失させたコンストラクト(204、147、71)は、ZIM 全長コンストラクトの 205、148、72 番目のアミノ酸をコードする塩基を TransformerTM Site-Directed Mutagenesis Kit (BD Biosciences Clontech)を用いて停止コドンに置換することによりそれぞれ構築した。塩基置換に用いたプライマーは、ZIM-204R (5'-GGGCATCATCTTAGGCAGAATCTTG)、ZIM-147R (5'-TATCCAAGGATTATGCCCGTTGCGG)、ZIM-72R (5'-CCGAGAAACAAGT TATTCAGAGCC)である(太字が置換した塩基)。ZIM の C 末端側を GAL4-DBD に融合させたコンストラクト(C)は、ZIM cDNA を鋳型に ZIM249-309 (5'-ATCGATTGG TACATTGAGGGATCTC)と ZIM-*Sac*-*Cla* のプライマーを用いて増幅し、*Cla*I-*Sac*I 断片を pBI-GAL4 の *Cla*I-*Sac*I 部位に挿入することにより構築した。GAL4-DBD コンストラクトは、35S-GAL4 コンストラクトを鋳型として M13R (5'-TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC)と GAL4BD-*Sac* (5'-CCTGAGCTCTA

ATCGATACAGTCAAC)を用いて増幅した *Xba*I-*Sac*I 断片を pBI221 の *Xba*I-*Sac*I 部位に挿入し、構築した。

ルシフェラーゼ活性の測定

トランジェントアッセイに用いたタバコ培養細胞 BY-2 は関根博士 (奈良先端科学技術大学院大学) より供与いただき、一週間ごとに改変 LS 培地(Nagata et al., 1981) に植え継いだ。植え継ぎ後 5 日目の BY-2 の培養液 2 ml を 1%寒天を含む改変 LS 培地に広げたものに、エフェクター、レポーター、内部標準プラスミドを、パーティクルガン(PDS-1000/He, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて導入した。導入条件は、真空度 28 inches Hg、ヘリウム圧 1100 psi、試料までの距離 12 cm とした。プラスミド DNA は各 0.8 μ g、金粒子は直径 1.6 μ m (Bio-Rad)のものを用いた。導入後、遮光して 25°Cで一晩静置した。BY-2 を氷冷した乳鉢で氷上で破碎し、得られた抽出液を用いて、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega)のプロトコールに従いルシフェラーゼ活性を測定した。活性は luminometer (Lumat LB9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)により発光強度を測定することで評価した。

結果

転写活性化能の解析

ZIM は転写活性化領域と考えられる酸性領域を N 末端側に持つため、転写活性化能を有するかどうかを、GAL4 の DNA 結合領域(GAL4-DBD)との融合タンパク質とルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いることにより解析した。GAL4-DBD に ZIM 全長を連結させたコンストラクトを作製し、GAL4 結合部位を上流シス配列に持つルシフェラーゼレポーター遺伝子のコンストラクトと同時にタバコ培養細胞 BY-2 に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した (図 10A)。

図 10B に示すように、ZIM 全長を GAL4-DBD に融合させた場合 (コンストラクト Full)、GAL4-DBD のみの場合 (コンストラクト GAL4) よりも約 2 倍ルシフェラーゼ活性が高かったことから、ZIM が転写活性化能を持つことが示された。転写活性化領域は N 末端側の酸性領域であると考えられることから、これを検証するため、様々な C 末端側欠失コンストラクトを作製した。二次構造をもとにして、ジンクフィンガー領域、CCT ドメイン、機能未知領域以降の C 末端側を欠失させるように、site-directed mutagenesis により 205 番目のグルタミン、148 番目のグルタミン、72 番目のロイシンをコードするセンスコドン (それぞれ CAA、CAA、TTA) を停止コドン(TAA)に置換した (コンストラクト 204、147、71)。これらのコンストラクトを用いてルシフェラーゼ活性を調べたところ、ジンクフィンガー領域を含む 205-309 アミノ酸、CCT ドメイン以降の 148-309 アミノ酸の領域を欠失させたもの (コンストラクト 204、147) では活性の低下は見られず、全長と同等のルシフェラーゼ活性を示した。このことから、ZIM が標的遺伝子の転写を活性化させるためには CCT ドメインやジンクフィンガー領域は必要でないことが示された。72-147 アミノ酸の領域は機能未知領域を含むが、そのうち 121-129 アミノ酸の領域は 9 残基中 4 残基がグルタミンである。一般にグルタミンに富む領域は転写活性化領域として働くことから、このグルタミンクラスター領域も転写活性化に働くのではないかと考えられた。この 72-147 アミノ酸の領域を欠失させると (コンストラクト 71)、全長のものよりもルシフェラーゼ活性は低下するが GAL4-DBD のみよりも活性は約 1.5 倍高かった。このことから、72-147 アミノ酸の領域も転写活性化に必要であるようだが、71 アミノ酸までの領域でも十分であることが明らかになった。1-71 アミノ酸の領域のうち、22-71 アミノ酸の領域は、50 残基中 11 残基(22.0%)が酸性アミノ酸である領域であり、ZIM の N 末端側の酸性領域が転写活性化能を持つことが示唆された。また、C 末端側にも、38 残基中 9 残基(23.7%)が酸性アミノ酸である領域(253-290)が見られたため、この領域を含む領域(249-309)の転写活性化能も調べた。しかしながら、GAL4-DBD に対する有意なルシフェラーゼ活性の差は検出されず、コンストラクト 204 を用いた結果と同様、この領域は転写活性化には必要ではないと考えられる。

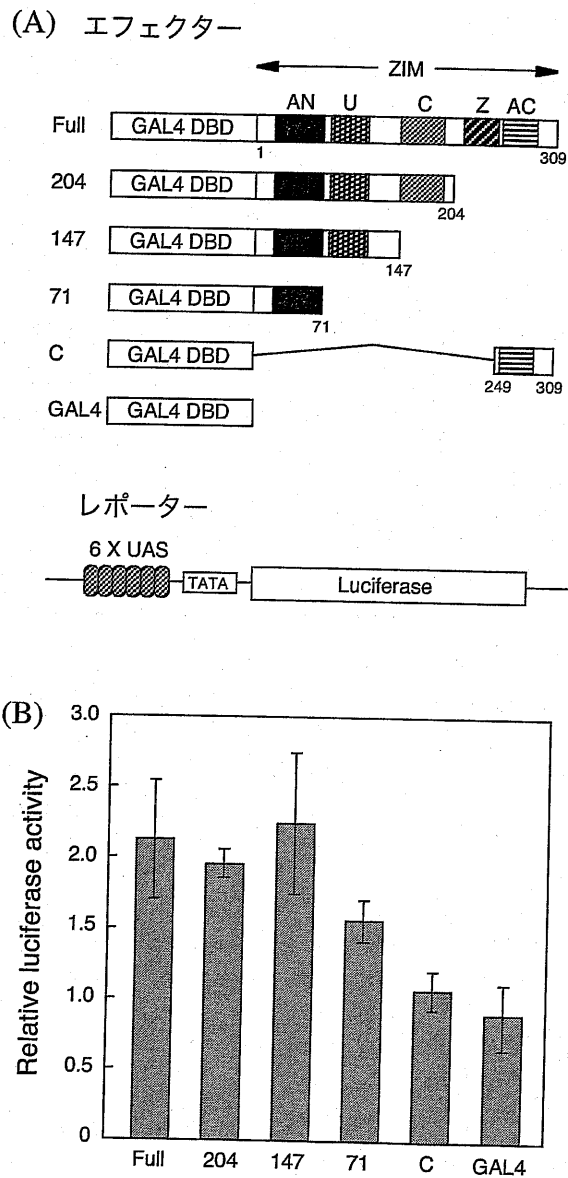


図10. ZIMの転写活性化能

(A) 転写活性化能の解析に用いたエフェクターコンストラクトおよびレポーターコンストラクト AN, N末端側酸性領域 (アミノ酸22-71) ; U, 機能未知領域 (83-112) ; C, CCTドメイン (146-190) ; Z, ジンクフィンガー (214-248) ; AC, C末端側酸性領域 (253-290) 。数字はZIMの開始コドンからのアミノ酸の位置。

(B) 各コンストラクトのルシフェラーゼ活性 下に示したエフェクターと、レポーター、内部標準プラスミドをタバコ培養細胞BY2に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性はRLUCの活性で標準化した。データは3回のアッセイの平均±標準誤差を示した。

考察

GAL4 の DNA 結合領域と ZIM との融合タンパク質と、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた転写活性化能の解析より、ZIM の N 末端側の酸性領域が転写活性化領域として働くことが示された (図 10B)。一般に酸性アミノ酸に富む領域は転写活性化に働くと考えられており、N 末端側の 22-71 アミノ酸の領域中の酸性アミノ酸の割合は 22.0%であった。C 末端側にも 23.7%が酸性アミノ酸の領域が見られたが、C 末端側の領域は転写活性化領域としては働かないことが示された。転写活性化領域は他の因子に作用する領域であると考えられているため、立体構造に折りたたまれた際にタンパク質表面に表れる必要があるなど、酸性アミノ酸の割合だけで転写活性化能が決まっているわけではないというこれまでの報告と一致した (Triezenberg, 1995)。ZIM の N 末端側は酸性アミノ酸に富む領域であったが、他の植物の ZIM-like タンパク質も、N 末端側の領域は酸性アミノ酸に富む領域であった (図 7)。特に単子葉のトウモロコシ(TGI No. TC181526)、オオムギ(TC71761)、コムギ(TC73736)、イネ(TC117187)では酸性アミノ酸が約 50%を占めており、双子葉であるダイズ(TC148453)の 27.5%やシロイヌナズナ(ZIM、ZML1、ZML2)の 22.0~29.6%に比べて高い割合であった。

機能未知領域を含む 72-147 アミノ酸の領域を欠失させると、転写活性化能は低下したが、完全に消失しなかった。この領域は 9 残基中 4 残基がグルタミン残基である領域も含んでおり、一般にグルタミンに富む領域は転写活性化に働くことが知られている。72-147 アミノ酸領域が ZIM の転写活性化能に必要なかどうかは詳細な解析を行う必要があるが、グルタミンに富む領域に関しては、ZIM と相同性を示す ZML1、ZML2 ではこの 4 残基のグルタミンのうち 1 残基しか保存されていない。また他の植物の ZIM-like タンパク質においてもグルタミン残基は保存されていない。ZIM ファミリーがタンパク質として同等の働きを持つとすれば、ZIM タンパク質におけるこの領域は、グルタミンに富む領域として転写活性化の機能を持っているわけではないと考えられる。72-147 アミノ酸の領域を欠失させるとルシフェラーゼ活性が低下した他の原因として、この領域が転写活性化の機能の修飾や安定化などに働いている可能性が考えられる。72-147 アミノ酸中の 83-112 アミノ酸の領域に見られる機能未知の領域は、ZIM ファミリーや他のシロイヌナズナのタンパク質において保存されている (図 5B、7)。この機能未知領域の役割を探ることが求められる。

GAL4-DBD との融合タンパク質、ルシフェラーゼ遺伝子と、ホストとしてタバコ培養細胞 BY-2 を用いて測定した ZIM の転写活性化能は、ZIM 全長を用いた場合でも GAL4-DBD の 2 倍程度のものではあった。これは有意な差ではあるが、転写活性化能としては弱いものではあった。同じ実験系を用いた転写活性化能の解析の例として、ユリ(*Lilium longiflorum*)の GRAS ファミリータンパク質 LISCL があるが、

この場合 GAL4-DBD の 10 倍以上の活性が示されている(Morohashi et al., 2003)。ZIM の転写活性化能はそれほど高くなく、この程度で十分機能するものなのかもしれない。あるいは本来は LISCL のように高い活性化能を持っているが、今回の実験系で検出できなかったことも考えられる。そのひとつの可能性として、融合タンパク質の構造の問題がある。ZIM は N 末端側に転写活性化領域、C 末端側に DNA 結合領域を持つ構造をとっている。GAL4-DBD との融合タンパク質となったとき、GAL4-DBD が N 末端側に来ることから、本来の ZIM の構造と異なるものになる。転写因子はモジュール構造をとっており、各領域は独立して働くことが知られているが、立体構造がうまく形成されなければ働かないと考えられる。GAL4-DBD を ZIM の C 末端側に連結させるなどして検証する必要がある。

ZIM の転写活性化能が弱い理由として、リン酸化などの修飾を受ける、あるいは単独で働くのではなく複合体を形成して、高い活性の転写活性化能を得るという可能性も考えられる。複合体を形成するという仮説を支持するものとして、マウスの GATA 因子である GATA-1 の例がある。GATA-1 は転写活性化因子として GATA 配列に結合し、赤血球分化に関わる遺伝子の転写を活性化する。また、Sp1 や EKLF は Krüppel ファミリーの転写因子であり、C₂H₂ タイプのジンクフィンガーと転写活性化領域であるグルタミンに富む領域を持つ。赤血球分化に関わる遺伝子のプロモーターには GATA-1 の認識配列と Sp1 または EKLF の認識配列が含まれており、それぞれ単独でも転写活性化能を持つが、GATA-1 と Sp1 または EKLF が相互作用することによって、相乗的な転写活性化の効果を示すことが知られている。GATA-2 や GATA-3 も Sp1 と相互作用を示したことから、GATA 因子一般的な現象だと考えられる。なお、相互作用はそれぞれのジンクフィンガー領域を介したものであり、DNA 結合能とは独立した相互作用であることが確かめられている(Merika and Orkin, 1995)。マウスの GATA-1 や Sp1 と相同性を示すタンパク質はシロイヌナズナには存在しないが、類似したジンクフィンガーモチーフを持つ ZIM も、他の因子と相互作用することにより高い転写活性化能を示す可能性が考えられる。ZIM においてもジンクフィンガーを介した相互作用が考えられるが、さらに ZIM はタンパク質-タンパク質相互作用に働くと考えられている CCT ドメインを持っている。CCT ドメインは CO、COL、TOC1 などに見られるドメインであり(Robson et al., 2001)、CO と AIP1 (TOC1/APRR1 と同一)の CCT ドメインが ABI3 と相互作用することが two-hybrid 法により確かめられている(Kurup et al., 2000)。今回転写活性化能の解析に用いたホストは酵母や昆虫細胞ではなく、よりシロイヌナズナに近い系であるタバコの培養細胞を用いている。そのため ZIM と相互作用する因子がタバコ細胞内に含まれている可能性もあるが、ZIM と協調して高い転写活性化能を与えるような相互作用因子が組織や時期特異的に発現するようなものであれば、タバコ培養細胞に存在する可能性は低い。今後 ZIM と相互作用する因子を探索することにより ZIM の転写制御の機構が明らかになるであろう。

第3章 ZIM 過剰発現体の解析

序論

遺伝子の機能解析を行うにおいて、逆遺伝学的手法により遺伝子から機能を解析する場合や、変異体の原因遺伝子を同定した場合、塩基配列やアミノ酸配列から様々な情報を得ることができる。現在では多様な生物種のゲノムプロジェクトや EST 解析の進行により、配列からの相同性で機能を予測することが可能になってきている。分類学的に離れた種であっても類似した機構を備えているものが多いことが示されてきていることから、配列情報をもとに解析が進むことが多い。ZIM においても第 1 章で示したように、相同性検索により新規の GATA タイプジンクフィンガーモチーフや CCT ドメインを持つことが明らかになり、植物に特異的な転写因子であることが予測された。第 2 章では、一般的に酸性領域が転写活性化領域として働くというこれまでの知見を利用し、ZIM の転写活性化因子としての同定に至った。このように配列から機能予測を行い解析を進めていくことが可能な一方で、データベースに含まれる遺伝子は機能未知のもの、あるいは推定上の機能のものが多いため、配列からの機能予測には限界があるのも事実である。ZIM の場合も転写因子であることは予測できたが、生体内での機能は配列の情報だけでは予測は困難である。

生体内での働きを知るためには T-DNA の挿入による機能欠損や、アンチセンス RNA、RNAi によって遺伝子発現が抑制されている形質転換体を用いて、その表現型から機能を推測するといった逆遺伝学的解析が非常に有効である。しかしながら、これらは変異体を原点とする順遺伝学と基本的に変わらないことから、解析を行うことができる遺伝子には限界がある。例えば機能重複遺伝子が存在する場合には、目的の遺伝子のみを破壊してもこれらが相補して働くため、表現型として表れないことがしばしば見られる。また、機能欠失による形態変化が微小の場合、観察で見落とすことが考えられる。さらに、致死遺伝子の場合は何らかの戦略を立てない限り変異体の生育すら困難である。このように、機能欠失変異体による解析には限界があり、そのためアクチベーションタギングラインや過剰発現体など、機能獲得変異体を用いた解析が現実的に行われている。

機能欠失変異体を用いた解析における機能重複遺伝子の問題は、特に遺伝子重複の多い植物では大きな障壁になると考えられる。シロイヌナズナ的全遺伝子の中で単一のものは 35.0%であり、37.4%が 5 以上のメンバーを持つファミリーを形成している。これはショウジョウバエの 12.1%、線虫の 24.0%に比べても高い割合になっており(The Arabidopsis Genome Initiative, 2000)、植物での機能欠失変異体による解析の困難さを表す。転写因子においても、植物の転写制御の重要性ゆえに機能重

複が見られる。例えば MADS タンパク質をコードする *APETALA1* (*API*)、*CAULIFLOWER* (*CAL*)、*FRUITFULL* (*FUL*)は茎頂分裂組織の属性の決定に働く遺伝子群であり、重複した機能を持つことが変異体を用いた解析から明らかになった (Ferrándiz et al., 2000)。また、*SEPALLATA1* (*SEP1*)、*SEP2*、*SEP3* のファミリーは、次世代を残すための花器官形成に働くものであるが、これらも重複した機能を持っている。*SEP3* の単独の変異体はその機能の重複性ゆえに野生型と表現型にわずかな違いしか表れないが、*sep1 sep2 sep3* 三重変異体では顕著な表現型を示す (Pelaz et al., 2000)。こういった場合、CaMV 35S プロモータなどを用いた過剰発現体による解析が有効である (Riechmann and Ratcliffe, 2000)。事実、*SEP3* の過剰発現体は単独でも多面的な表現型を示し、機能解明の手がかりとなっている (Honma and Goto, 2001)。

第 1 章において、植物特異的新規 GATA タイプ転写因子をコードする *ZIM* と相同性を示す遺伝子が、シロイヌナズナに 2 つ存在することが明らかになった。これら *ZIM-like* 遺伝子の空間的発現パターンは *ZIM* のものと類似しており (図 8)、*ZIM* と重複した機能を持つと予測される。そのため、*ZIM* の機能欠失変異体では、*ZML1* および *ZML2* が相補して働くことが考えられる。事実、現在までに *ZIM* の T-DNA タグラインやアンチセンス導入植物体は野生型と表現型に顕著な差が見られていない (西井, 2000)。そこで、遺伝子の機能解明における有効なもうひとつの手段である、過剰発現体を用いた解析を行った。転写因子は生長の様々な段階で働いていることが明らかになってきている。光のような外的要因や植物ホルモンのような内的要因によっても、遺伝子発現は複雑に制御されていると考えられる。*ZIM* を過剰発現させることで植物体にどのような影響を与えるかを解析し、そして野生型において *ZIM* が植物体内でどのように働いているかを推測した。

ZIM は転写活性化因子であることが第 2 章で示された。*ZIM* の標的遺伝子を同定することは *ZIM* の機能を推測する上で大きな手がかりとなる。マイクロアレイ技術の発達により、異なる植物体間の発現の違いを網羅的に解析することが可能となっている。本章ではさらにマイクロアレイを用いて、*ZIM* 過剰発現体と野生型における遺伝子発現パターンを比較することにより、*ZIM* の標的遺伝子群の同定および *ZIM* 過剰発現体の表現型を引き起こしている因子の探索を行った。

材料と方法

植物材料

シロイヌナズナ(Columbia)を用いた。明期 16 時間／暗期 8 時間の長日条件または明期 8 時間／暗期 16 時間の短日条件の 22°C の人工気象器で生育させた。

ZIM 過剰発現体は西井により作出された(西井, 1997)。この形質転換体は、pBI121 (Jefferson et al., 1987) の *Bam*HI-*Sac*I 部位に ZIM cDNA を挿入することでベクターの β -glucuronidase 遺伝子を ZIM と置換したコンストラクトを、シロイヌナズナ野生型 (Col) に *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R を用いて減圧湿潤法(Bechtold et al., 1993)により導入したものである。T₁ 種子をカナマイシン選抜することにより形質転換体を得た。T-DNA が 1 コピーホモに挿入されたラインを確立し、T₃ または T₄ 世代の植物体を実験に用いた。

胚軸長の測定

滅菌した種子をスクロースを含まない GM に播種し、4°C で 3 日間低温処理した。2 時間白色光に当てることで発芽を誘導させ、さらに暗所で 1 日静置した。その後プレートを白色光(160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、赤色光(660 nm, 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、遠赤色光(730 nm, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、青色光(470 nm, 6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)の連続光または暗所で 5 日間生育させた。白色光は白色蛍光灯(Toshiba, Tokyo, Japan)、赤色と遠赤色は LED ランプ(Sanyo, Osaka, Japan)を用い、青色光は白色蛍光灯の光に青色のフィルター(Tuffcal, Nakagawa Chemical, Tokyo, Japan)を通すことにより得た。胚軸の長さは Image-Ana LITE (Omron, Kyoto, Japan)を用いて測定した。

葉柄長の測定

スクロースを含まない GM で 8 日間、長日条件で生育させた芽生えを、0~0.1 μM の、Brz220 (Sekimata et al., 2002)または paclobutrazol (Wako, Osaka, Japan)を含む GM (スクロース含む) に植え継ぎ、さらに 8 日間長日条件で生育させた。第 3 葉および第 4 葉の葉柄の長さを測定した。Brz220 は理化学研究所の浅見博士より供与いただいた。

マイクロアレイ解析

当研究室の安藤によって作製されたシロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリー由来マイクロアレイ (安藤, 2001) を用いた解析では、発芽後 20 日目の茎頂と葉より RNeasy を用いて total RNA をそれぞれ調製し、リチウム沈殿により精製したものをを用いた。30 μg の total RNA を Cy3 または Cy5 標識した dUTP (Amersham Biosciences)存在下で Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写を行った後、PCR Purification Kit (Qiagen)により精製した。これに 25

μg の poly(A)⁺RNA (Roche, Mannheim, Germany)を加え、hybridization solution (4 X SSC, 10 X Denhardt's solution, 0.25 % SDS)で 25 μl にメスアップした。この混合液を、prehybridization solution (4 X SSC, 1 % BSA, 0.25 % SDS)中で 37°Cで 1 時間、前処理したマイクロアレイに添加し、カバーガラス(45 X 24 mm, Matsunami, Osaka, Japan)で覆った。これを 65°Cで 16 時間静置した後、1 X SSC (0.2% SDS)、0.2 X SSC (0.2% SDS)を用いて各 55°Cで洗浄し、さらに 0.2 X SSC を用いて室温で洗浄した。洗浄後スライドを 240 g で 10 分遠心することにより乾燥させた。蛍光強度は ScanArray 4000XL (GSI Lumonics, Oxnard, CA, USA)を用いて測定し、QuantArray (GSI Lumonics)を用いて解析した。ACT2 と ACT8 を内部標準遺伝子として蛍光強度を補正した (松田, 2002)。

シロイヌナズナオリゴヌクレオチドマイクロアレイ(Agilent Arabidopsis 1 Microarray, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いた解析では、発芽後 20 日目の葉から RNeasy を用いて調製した total RNA 20 μg を用いた。プローブの調製、ハイブリダイゼーション、洗浄は、Agilent のプロトコールに従い行った。

ハイブリダイゼーションは各マイクロアレイにつき 1 回ずつ行った。

ノザンプロット解析

長日条件発芽後 20 日目の植物体の茎頂より total RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて、また、葉より Sepasol-RNA I (Nacalai Tesque)を用いて、それぞれ total RNA を調製した。1.0%アガロース／ホルムアルデヒドゲルで泳動し、ナイロンメンブレン(Hybond-N, Amersham Biosciences)にブロッティングした。プローブ断片は XTH33 には XTH33-F (5'-AGAGATGATTGGACGATCCAGACG)と XTH33-R (5'-GCAGGCATGACTTTGTATCTTGGC)、ACT8 には ACT8a (5'-ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA)と ACT8b (5'-TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC)の各プライマーの組み合わせで RT-PCR を行うことにより作製した。SEP3、NR2、ASN2 のプローブは安藤により作製された cDNA クローンを用いた。SEP3 のプローブは I ドメイン、C ドメイン、および 3'-UTR を含む断片である。Lhcb のプローブは京都大学理学研究科の望月博士から供与いただいた CAB3 のプローブを用いた。このプローブは CAB1、CAB2 もとらえるものである。各プローブはシークエンスでエラーがないことを確認し、Strip-EZ DNA (Ambion) を用いて ³²P 標識して使用した。ハイブリダイゼーションは常法に従った (Church and Gilbert, 1984)。

RT-PCR による発現解析

長日条件発芽後 20 日目の葉より total RNA を精製し、1 μg の RNA を ReverTra Ace- α - (Toyobo)を用いて oligo(dT)₂₀ プライマーにより逆転写を行った。生成した 1st strand DNA を鋳型に、以下に示す各遺伝子断片を増幅させるプライマーの組み合

わせた PCR を行った。PCR に用いたプライマーは、*XTH33* には *XTH33-F* (5'-AGAGATGATTGGACGATCCAGACG) と *XTH33-R* (5'-GCAGGCATGACTTTGTATCTTGGC)、*XTH15* には *XTH15-F* (5'-CGATATGCAGCTCAAACCTGTCTGC) と *XTH15-R* (5'-TGCCATAAGCATTGAGCTCGGTTG)、*XTH16* には *XTH16-F* (5'-ACA GCATTCTCCGGTAGCTTCAAC) と *XTH16-R* (5'-CCCTGAAGAAACAGTACAAGCT GC)、*XTH30* には *XTH30-F* (5'-AAGCTTCCCGCTGATTATACTGCC) と *XTH30-R* (5'-GTAGAGGCTCAGGATACCTAAGTG)、*UBQ5* には *UBI1* (5'-GGTGGTGCTAAGAAGAGGAA) と *UBI2* (5'-CTACAACAGATCAAGCTTCA) である。

結果

ZIM 過剰発現体の確立

ZIM は植物特異的新規 GATA タイプ転写因子であり、転写活性化能を持つことが、第 1 章および第 2 章でそれぞれ示された。ZIM が植物体内でどのような遺伝子の転写制御を行い、どのような生理現象に関わっているかを調べることは、植物特異的新規 GATA ファミリー全体の機能の解明につながると考えられる。そこで、ZIM を植物体内で過剰に発現させた場合の影響を調べることにより、ZIM の分子としての機能、および ZIM が植物体内でどのような現象に関与しているかを推測することにした。ZIM が CaMV 35S プロモーター制御下で発現するコンストラクトを導入した形質転換体を作成し、15 ラインが得られた。サザンハイブリダイゼーションにより、そのうち 3 ライン(S8、S11、S12)が 1 コピーの T-DNA が挿入されたものであることが確認された(松田、2002)。発芽後 16 日目の植物体の地上部を用いてノザンブロットによる発現解析を行ったところ、1 コピーの 3 ラインいずれも野生型に比べて大きく発現量が上昇していることが示された(図 11)。なお、ZIM-ox における ZIM の発現量が非常に高いことから、図 11 では X 線フィルムへの感光時間を短くしたが、感光時間を長くすると図 8 のように野生型における ZIM の発現が検出された。形質転換体はいずれも同様な以下に述べる表現型を示したことから、1 コピーの S11 ラインのホモ系統のものを主に用いて以後の解析を行った。

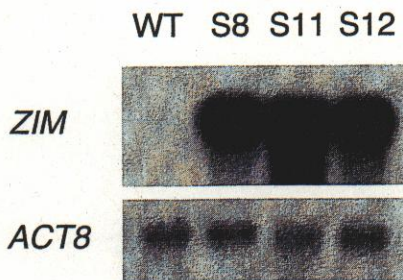


図11. ZIM過剰発現体の発現解析

長日条件下で生育させた発芽後16日目の植物体より total RNAを調製し、2 μ gを泳動してノザンブロット解析を行った。プローブはZIM全長cDNAを用いた。ACT8をコントロールとして示した。

ZIM-ox の胚軸と葉柄の伸長表現型

シロイヌナズナを明所下で生育させると胚軸の伸長は抑制されるが、ZIM 過剰発現体(ZIM-ox)は明所下においても野生型に比べて胚軸が伸長するという表現型を示した(図 12A)。走査型電子顕微鏡(S-3200N, Hitachi, Tokyo, Japan)による胚軸表皮細胞の観察より、ZIM-ox では野生型より細胞が伸長していることが明らかになった(図 12B, C)。胚軸の長さは ZIM-ox では野生型の約 2.5 倍の長さになっており、胚軸の細胞も約 2.5 倍であることから、伸長の要因は細胞数の増加ではなく、細胞の

伸長により説明することができると考えられた。また、*ZIM* 過剰発現体では胚軸に加えて葉柄も伸長するという表現型を示した (図 12D)。葉柄が伸長するのに対し、葉身は野生型より同じかやや小さい傾向にあった。短日条件で生育させた場合は葉身は野生型より明らかに小さくなった (図 12E, F)。

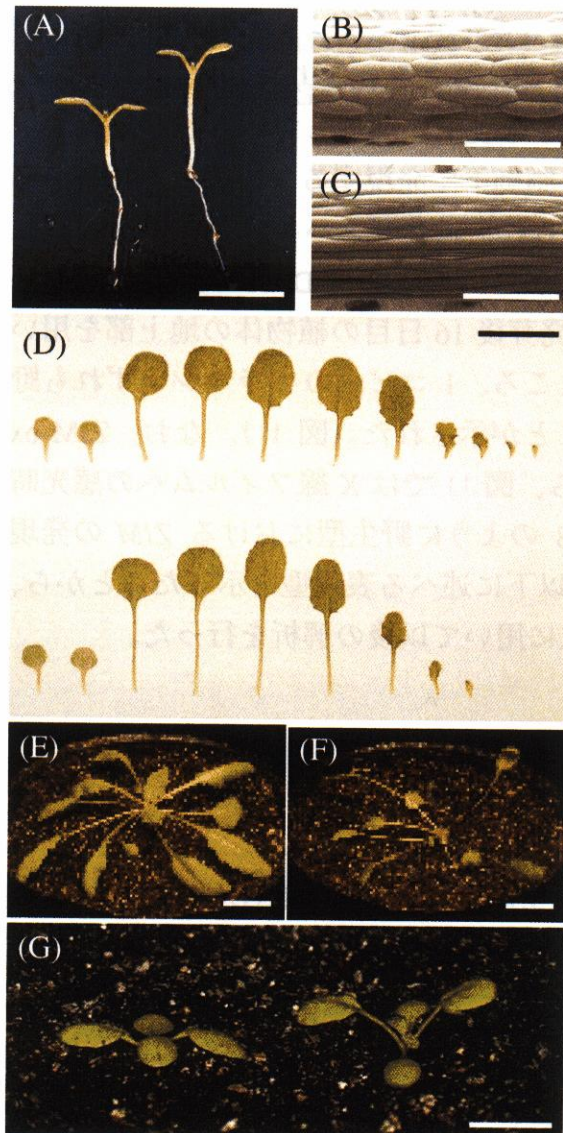


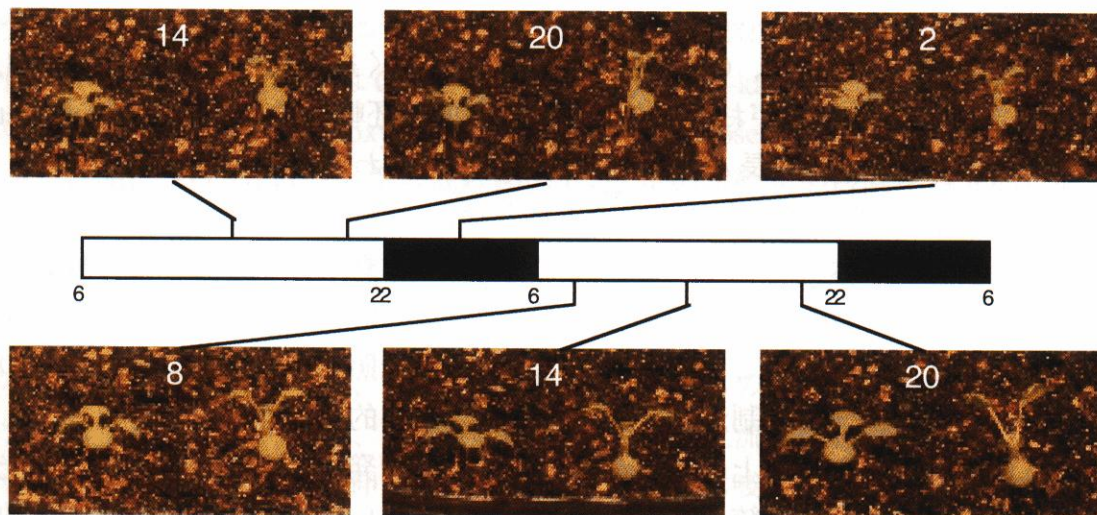
図12. *ZIM-ox*の表現型

(A) 長日条件発芽後5日目。左, WT; 右, *ZIM-ox*。(B, C) 長日条件発芽後5日目の胚軸表皮細胞の電子顕微鏡写真。B, WT; C, *ZIM-ox*。(D) 長日条件発芽後17日目。上, WT; 下, *ZIM-ox*。(E, F) 短日条件で4週間生育させたWT (E)と*ZIM-ox* (F)。(G) 長日条件発芽後10日目。左, WT; 右, *ZIM-ox*。バーはそれぞれ1 mm (A)、200 μ m (B, C)、1 cm (D, E, F)、5 mm (G)。

また、*ZIM-ox* は水平面に対する本葉の角度が上昇するという表現型も示した (図 12G)。シロイヌナズナは昼に葉を展開し夜には葉を立てるという就眠運動をすることが知られており、これは概日時計に制御されている (Barak et al., 2000)。*ZIM-ox* の葉の角度が上昇しているのは、暗期の応答をしているためではないかと考えられたため、葉の動きの日周運動を調べた。しかしながら、*ZIM-ox* においても野生型のように夜には葉の角度がより上昇するという日周運動を示し (図 13)、概日時計

は正常に機能していることが示された。*ZIM* が過剰発現することにより、葉柄の背軸側が向軸側より伸長することにより葉の角度が上昇するというような機構が働いていると考えられる。

(A)



(B)

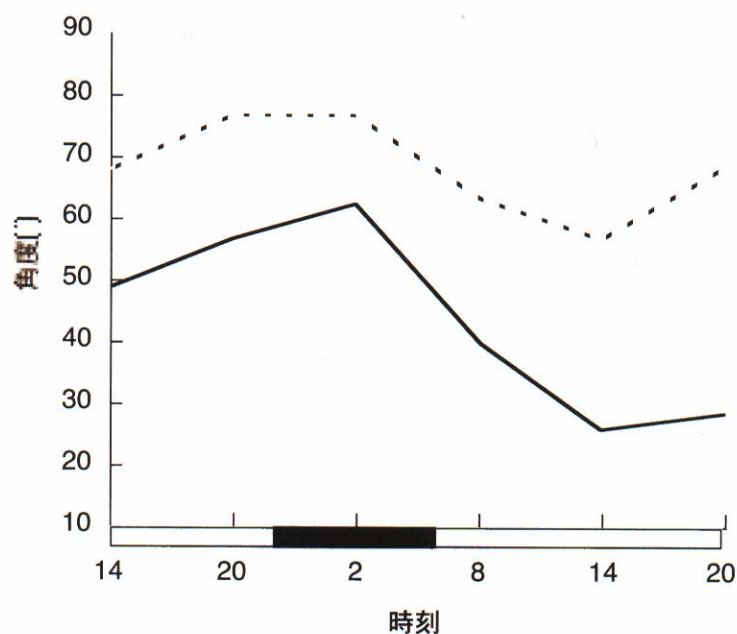


図13. 葉の動き

(A) 長日条件で生育させた植物体を発芽後9日目から6時間ごとに撮影した。数字は時刻を表す。光は6時に照射が開始される。中央の四角は明暗を模式的に示した。白抜きが明期、黒が暗期を表す。各写真の左がWT、右が*ZIM-ox*。(B) (A)の結果をグラフに表した。角度は水平を基準とした。実線がWT、点線が*ZIM-ox*。

胚軸伸長と光

胚軸は暗所で伸長し明所で伸長が抑制されるが、この伸長抑制は光形態形成のひとつであり、光受容体からのシグナリングの働きである。シロイヌナズナにおいては、赤色/遠赤色光を受容するフィトクロム、青色光を受容するクリプトクロムやフォトトロピンといった光受容体が存在する。*phyA*、*phyB*、*cry1* のような光受容体の変異体はそれぞれ遠赤色、赤色、青色光での胚軸伸長抑制に欠損を示す(Reed et al., 1993; Nagatani et al., 1993; Park and Quail, 1993; Ahmad and Cashmore, 1993)。各光受容体からのシグナル経路は、COP1 や HY5 などが働く経路に統合される (Quail, 2002)。そのため *HY5* に変異がおこると光質非依存的な胚軸伸長を示す(Koornneef et al., 1980)。ZIM-ox の胚軸伸長と光シグナリングとの関わりを調べるため、白色、赤色、遠赤色、青色の連続光および暗所で生育させたときの胚軸の長さを測定した。その結果、光照射下ではいずれの光質でも ZIM-ox では野生型よりも胚軸の伸長が認められた (図 14)。暗所では ZIM-ox の胚軸の長さは野生型と変わらず、伸長する能力は野生型と同様に持つことが示された。また、光照射下の胚軸は暗所のものよりも短いことから、伸長抑制が働いており、光質特異的なシグナリングは機能していることが示唆された。以上の結果から、ZIM の過剰発現による胚軸伸長は、光質特異的な光シグナリングが統合された後の経路、あるいは光シグナリングとは独立した経路におよぼされた影響であると考えられた。

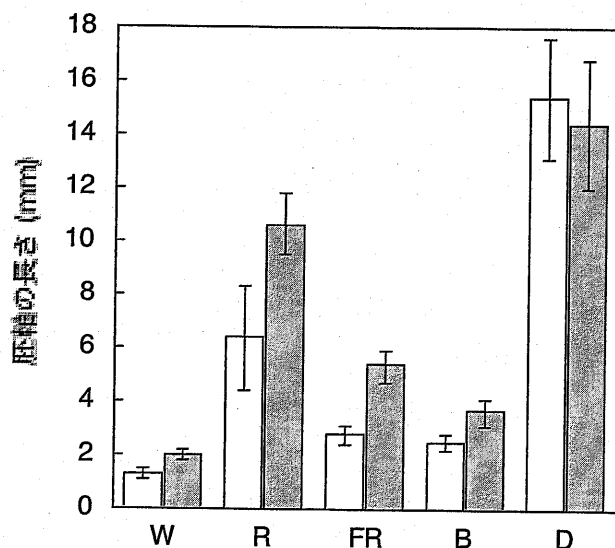


図14. 各光質で生育させた芽生えの胚軸の長さ

発芽を誘導した種子をそれぞれ白色光(W)、赤色光(R)、遠赤色光(FR)、青色光(B)の連続光、または暗所(D)で5日間生育させ、胚軸の長さを測定した。白抜きがWT、灰色がZIM-oxを表す。データは15~24個体の平均±標準偏差。

葉柄伸長と植物ホルモン

細胞伸長に働く植物ホルモンとして、ジベレリン(GA)とブラシノステロイド(BR)が知られている(Hooly, 1994; Clouse and Sasse, 1998)。ZIM-ox の伸長表現型の原因として、GA や BR のシグナリングが正に制御されていることが考えられる。この場合、GA や BR の生合成が阻害された場合においても、シグナリングが正に働くことにより恒常的な GA および BR 応答が見られると考えられる。そこで、GA と BR の生合成阻害剤としてパクロブトラゾール(PAC)と Brz220 をそれぞれ用いて、葉柄の伸長阻害を調べた。PAC は GA 生合成経路のうち *ent*-kaurene から *ent*-kaurenoic acid への酸化を触媒する mono-oxygenase を阻害する(Jacobsen and Olszewski, 1993; Reed et al., 1996)。Brz220 は BR 生合成経路の C-22 位の水酸化の段階を特異的に阻害する(Sekimata et al., 2002; Asami and Yoshida, 1999)。PAC、Brz220 それぞれの阻害剤存在下で生育させた結果、ZIM-ox の葉柄の伸長はいずれも阻害された(図 15)。このことから、ZIM-ox では GA や BR のシグナリングが恒常的に上昇しているのではないと考えられた。また、伸長が抑制されているものの葉柄の長さは野生型のものよりも長かった。これは、阻害剤が働く段階より上流の生合成経路が活性化されていることで、量依存的に伸長が見られた可能性を示唆する。その場合、GA と BR 両方の生合成を活性化する必要がある、そのような機構は考えにくい。別の仮説として、ZIM-ox の細胞伸長は GA や BR とは独立した機構によるものであるとも考えられる。

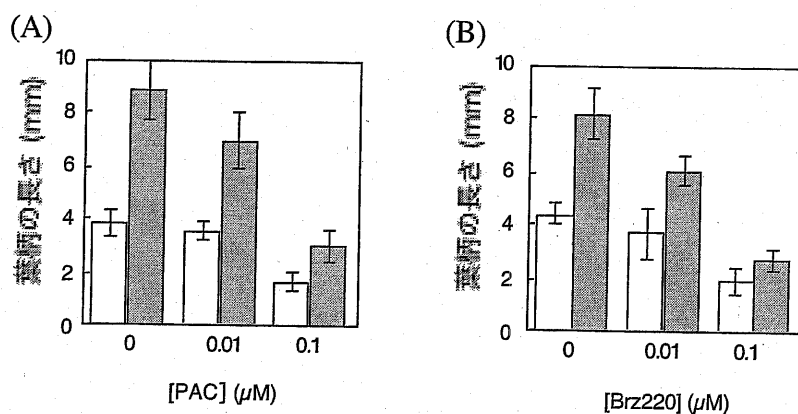


図15. 葉柄伸長の生合成阻害剤による影響

発芽後8日目の植物体をPACまたはBrz220を含む培地に植え継ぎ、8日後に第3葉と第4葉の葉柄の長さを測定した。白抜きがWT、灰色がZIM-oxを表す。データは3個体(葉6枚)の平均±標準誤差。

表 2. ZIM-ox の花成時期

	植物体	日数 (日) ^a	葉の枚数 (枚) ^b
長日条件			
実験 1	Wild type	17.7 ± 0.5	10.9 ± 0.5
	ZIM-ox	18.1 ± 0.3	10.2 ± 0.6
実験 2	Wild type	19.4 ± 0.6	12.5 ± 0.5
	ZIM-ox	18.0 ± 0.8	11.6 ± 0.8
短日条件			
実験 1	Wild type	48.6 ± 5.9	32.5 ± 9.4
	ZIM-ox	62.6 ± 6.0	44.1 ± 7.5
実験 2	Wild type	45.0 ± 7.0	36.3 ± 10.6
	ZIM-ox	59.0 ± 7.2	48.4 ± 13.2

^a 花芽が確認できた時期を花成時期とした。

^b ロゼット葉と茎生葉を合わせた数を葉の枚数とした。

データは 9~15 個体の平均 ± 標準誤差。2 回の実験結果を示した。

ZIM-ox の花成時期

シロイヌナズナは長日植物であるが、花成に対して光が絶対的な要因というわけではなく、促進効果を持つ。そのため、短日条件下においても最終的に花成がおこる。近年花成に関わる遺伝子が数多く単離、同定されてきており、長日条件で働く長日経路、短日条件で働く GA 経路、自律的に花成にむかう経路などの花成経路が提唱されている。これらの花成経路は統合され、茎頂の属性が栄養生長分裂組織から花序分裂組織に転換することで花成がおこる。このときに茎頂で働くのが *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*、*LEAFY (LFY)*、*APETALA 1 (API)* などである (Piñeiro and Coupland, 1998)。ZIM は茎頂で発現が高いことが第 1 章で示された (図 8)。また、生長相の転換がおこると考えられる時期に、ZIM の発現が上昇するような現象も見られた (図 9)。ZIM が花成時期の決定に関わっているのかを調べるため、長日、短日それぞれの条件で ZIM-ox を生育させ、花成時期を調べた。ZIM-ox の花成時期は長日条件では野生型と変わらなかったが、短日条件で花成時期が遅れるという表現型を示した (表 2)。これまでに知られている花成時期変異体のうち短日条件でのみ花成遅延がおこるものは、短日条件での主な花成経路である GA 経路に欠損がある (Mouradov et al., 2002)。GA 生合成変異体やシグナリングの変異体がこれにあたる。しかしながら、ZIM-ox では GA 生合成変異体のような矮性にはならず、逆に胚軸や葉柄が伸長するという表現型を示した。また、ZIM-ox に外生的に GA を与えるとさらに胚軸が伸長することから、シグナリングの欠損でもないことが示されている (松田, 2002)。以上のことから、ZIM-ox の花成遅延は GA とは独立した現象であることが推測された。

ZIM-ox において発現上昇が見られる遺伝子群

ZIM は転写活性化能を持つ転写因子であることが第 2 章で示された。転写因子は遺伝子発現を調節する役割を持つため、ZIM の標的遺伝子群を知ることは ZIM が植物体内でどのような役割を果たしているかを知る有力な手がかりとなる。そこで、マイクロアレイを用いて野生型と ZIM-ox の遺伝子発現パターンを調べることにより、ZIM の標的遺伝子群のスクリーニングを行った。また、これにより、ZIM-ox の伸長表現型を引き起こす要因となっている遺伝子の推測も行うことができると考えられた。マイクロアレイには、当研究室の安藤によって作製されたシロイヌナズナ均一化 cDNA ライブラリー由来のマイクロアレイ (以下 cDNA アレイ、約 6,400 クローン、約 4,600 遺伝子) (安藤, 2001; Ando et al., in press) と、アジレントテクノロジー社のシロイヌナズナオリゴヌクレオチドマイクロアレイ (以下オリゴヌクレオチドアレイ、約 14,000 遺伝子) を用いた。ZIM は葉と茎頂で発現量が異なるため (図 8)、葉と茎頂の両者を解析した。野生型に対する ZIM-ox の発現量の比が 2.0 以上または 0.5 以下のものを発現に差があったものとして選抜したが、ZIM は転写活性化因子であることが示されたことから (第 2 章)、ZIM-ox において発現上昇していたものについて注目した。

cDNA アレイについては、松田(2002)が行ったものを再解析した。cDNA アレイでは、ZIM-ox において発現上昇していたものが 42 遺伝子、発現減少していたものが 76 遺伝子あった。茎頂と葉の両方で発現上昇していたものは 1 遺伝子であり、ほとんどは茎頂または葉特異的な発現上昇であった (表 3)。機能未知のものが多く含まれていたが、茎頂で発現が上昇したものに *SEPALLATA 3 (SEP3)/AGL9* があった。*SEP3* は花の第 2~4 ウォールで発現する遺伝子であり、花弁、雄ずい、心皮の器官形成に働くことが知られている (Mandel and Yanofsky, 1998; Pelaz et al., 2000)。葉で発現上昇が見られたものには、光によって発現が制御されることが知られている *NR2 (nitrate reductase 2)*、*Lhcb (light-harvesting chlorophyll a/b binding protein, CAB)*、*ASN2 (asparagine synthase 2)* が含まれていた (Cheng et al., 1991; Karlin-Neumann et al., 1988; Lam et al., 1998)。cDNA アレイにおいて野生型と ZIM-ox で発現に差が見られたものの中には、ZIM-ox の伸長表現型を説明できるようなアノテーションが付けられている遺伝子は含まれていなかった。

オリゴヌクレオチドアレイでは、葉の RNA を用いて解析を行った。野生型に対する ZIM-ox の発現量の比が 2.0 以上、0.5 以下のものはそれぞれ 666、805 あった。666 の上昇遺伝子のうち、ZIM-ox で 5.0 倍以上発現が上昇していたものが 27 あった (表 4)。この 27 遺伝子のうち cDNA アレイの約 4,600 遺伝子に含まれていたものは At3g55840 と At2g34930 の 2 つのみであり、オリゴヌクレオチドアレイ解析を行うことにより、より多くの ZIM 標的候補遺伝子群をスクリーニングすることができたと考えられる。最も発現量の比が高かったものは、野生型の 30 倍の *XTH33* であった。*XTH* はファミリーを構成しており、シロイヌナズナには 33 遺伝子ある

表 3. cDNA アレイにおいて ZIM-ox で発現上昇が見られた遺伝子

組織	ID	遺伝子名	ZIM-ox (a)	Wild type (b)	a/b
Apices and leaves					
	At5g14840	putative protein	1324.0	640.6	2.1
Apices					
	At5g49120	putative protein	2894.6	472.8	6.1
	At3g55660	putative protein	699.8	276.6	2.5
	At1g24260	SEPALLATA3 (SEP3)	3403.8	1492.3	2.3
Leaves					
	At1g37130	nitrate reductase 2 (NR2)	1950.3	434.3	4.5
	At4g29780	unknown protein	1529.0	365.8	4.2
	At1g18740	unknown protein	3753.2	970.4	3.9
	At2g42840	protodermal factor 1 (PDF1)	1199.6	337.9	3.5
	At2g40140	putative CCCH-type zinc finger protein	5565.2	1737.7	3.2
	At4g09580	unknown protein	3161.1	1042.8	3.0
	At4g08950	putative phi-1-like phosphate-induced protein	1572.9	582.6	2.7
	At4g10340	chlorophyll a/b binding protein (Lhcb5)	168710.6	64957.1	2.6
	At1g27730	putative salt-tolerance zinc finger protein (STZ/ZAT10)	1095.1	423.2	2.6
	At1g23870	trehalose 6-phosphate synthase, putative	1992.9	770.5	2.6
	At2g05100	chlorophyll a/b binding protein (Lhcb2)	5828.9	2275.9	2.6
	At2g29980	omega-3 fatty acid desaturase (FAD3)	3523.6	1404.3	2.5
	At3g15210	ethylene responsive element binding factor 4 (ERF4)	5053.4	2022.9	2.5
	At4g39330	mannitol dehydrogenase, putative	1884.6	764.2	2.5
	At3g12120	omega-6 fatty acid desaturase (FAD2)	4919.2	2022.3	2.4
	At4g32020	unknown protein	8723.4	3619.7	2.4
	At3g46620	C3HC4-type RING finger protein family	768.0	319.3	2.4
	At5g65010	asparagine synthetase 2 (ASN2)	1733.6	727.0	2.4
	At5g59550	C3HC4-type RING finger protein family (CIP8)	1481.7	622.9	2.4
	At4g15790	unknown protein	743.1	313.6	2.4
	At1g22190	AP2 domain transcription factor, putative	1468.8	633.5	2.3
	At2g38470	WRKY family transcription factor (WRKY33)	2346.2	1015.9	2.3
	At3g16400	putative jasmonate inducible protein	2189.7	956.3	2.3
	At2g45470	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA8)	2753.9	1208.6	2.3
	At1g19180	unknown protein	2139.3	943.6	2.3
	At3g50960	putative protein	1704.7	758.6	2.2
	At4g39800	myo-inositol-1-phosphate synthase	728.9	324.6	2.2
	At1g64660	Cys/Met metabolism pyridoxal-phosphate-dependent enzyme family	1217.3	544.5	2.2
	At1g54100	aldehyde dehydrogenase, putative (ALDH)	1240.2	556.3	2.2
	At1g15820	chlorophyll a/b binding protein (Lhcb6)	16796.0	7603.1	2.2
	At5g45620	26S proteasome subunit-like protein	1053.6	483.9	2.2
	At4g17490	ethylene responsive element binding factor (ERF6)	804.4	369.7	2.2
	At2g27080	unknown protein	1137.5	523.7	2.2
	At2g05990	enoyl-ACP reductase (ENR1)	1838.5	853.1	2.2
	At2g43750	cysteine synthase (cpACS1)	1267.1	611.6	2.1
	At1g74470	geranylgeranyl reductase	26068.7	12668.7	2.1
	At3g57290	flavin-containing monooxygenase family	5978.7	2919.7	2.0
	At1g62570	nitrate reductase	1070.5	528.7	2.0

ZIM-ox/wild type (a/b)の値が 2.0 以上のものを示した。

表4. オリゴヌクレオチドアレイにおいてZIM-oxで発現上昇が見られた遺伝子

ID	遺伝子名	ZIM-ox (a)	Wild type	a/b
At1g10550	XTH33	3102.8	103.5	30.0
At1g01680	hypothetical protein	1281.5	83.2	15.4
At2g23680	similar to cold acclimation protein WCOR413	333.8	35.1	9.5
At1g15010	hypothetical protein	4167.5	452.8	9.2
At1g72240	hypothetical protein	653.0	83.0	7.9
At5g64750	putative protein	1763.7	239.4	7.4
At1g68690	protein kinase, putative	885.8	128.8	6.9
At1g75930	family II extracellular lipase 6 (EXL6)	398.4	58.3	6.8
At1g30900	putative vacuolar sorting receptor	505.7	74.1	6.8
At1g05340	unknown protein	325.5	49.5	6.6
At2g04450	putative muT domain protein	1153.0	177.9	6.5
At3g48520	cytochrome P450-like protein	1232.2	195.8	6.3
At3g55840	nematode resistance protein-like protein	275.3	44.1	6.2
At1g02340	HFR1/REP1	754.4	126.2	6.0
At1g24530	hypothetical protein	2047.7	343.1	6.0
At2g34930	putative disease resistance protein	6799.3	1154.6	5.9
At5g63230	glycosyl hydrolase family 17	1224.5	210.3	5.8
At3g57260	β -1,3-glucanase 2 (BG2)	4255.9	746.6	5.7
At2g45680	putative PCF2-like DNA binding protein	350.7	62.0	5.7
At2g41480	putative peroxidase	395.1	70.6	5.6
At1g30720	putative reticuline oxidase-like protein	1553.3	277.7	5.6
At1g76040	calcium-dependent protein kinase, putative (CPK29)	253.8	45.9	5.5
At3g45970	putative protein	4336.1	841.3	5.2
At2g27690	putative cytochrome P450	802.3	155.9	5.2
At4g14130	XTH15/XTR7	3508.0	683.5	5.1
At2g30540	putative glutaredoxin	1268.3	247.9	5.1
At2g15180	hypothetical protein	201.6	40.3	5.0

ZIM-ox/wild type (a/b)の値が5.0以上のものを示した。

ことが知られている。*XTH* はエンド型キシログルカン転移酵素／加水分解酵素 (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase) をコードしており、*EXGT* (endoxyloglucan transferase) や *XET* (xyloglucan endotransglycosylase) とも呼ばれている (Rose et al., 2002)。*XTH* のいくつかは細胞壁の再編、構築に働くことが示されており (Rose et al. 2002)、*ZIM-ox* の伸長表現型の要因であることが予測された。*ZIM-ox* では *XTH33* のほかの *XTH* として、*XTH15/XTR7*、*XTH16*、*XTH30/XTR4* の発現がそれぞれ 5.1 倍、3.0 倍、2.5 倍上昇していた。

XTH ファミリーのほかにも、オリゴヌクレオチドアレイではいくつかファミリーを構成する遺伝子群の発現上昇が見られた。*EXL6* (*At1g75930*) (Mayfield et al., 2001) が 6.8 倍の発現上昇を示したが、同じ GDS(L)モチーフを持つファミリー II リパーゼ (Arpigny and Jaeger, 1999) をコードする *At1g28570* (2.9 倍)、*At2g19060* (2.5 倍)、*At2g24560* (2.2 倍)、*At1g29670* (2.2 倍)、*At2g19010* (2.1 倍)、*At1g74460* (2.1 倍) の発現上昇が見られた。また、 β -1,3-グルカナーゼをコードする *BG2* (*At3g57260*、5.7 倍)、*BG3* (*At3g57240*、4.8 倍) (Dong et al. 1991) は、*At5g63230* (5.8 倍)、*At3g55430* (2.6 倍) と同じファミリーに属する。*EXL6* は葯で発現し、 β -1,3-グルカナーゼも葯や子房で発現するものが知られている (Mayfield et al., 2001; Hird et al., 1993; Delp and Palva, 1999)。*XTH33* もさやでの発現が高いことが知られている。さらに、葯や雌ずいで発現する extensin-like protein (Goldman et al., 1992; Wu et al., 1993; Stratford et al., 2001)、thaumatin (Walden et al., 1999) などの発現上昇も見られた。cDNA アレイで発現上昇が見られた *SEP3* は上述したように花器官形成に働く遺伝子である。オリゴヌクレオチドアレイでは葉の RNA を用いているものの、これらの遺伝子群は *ZIM* の花における遺伝子発現制御ネットワークを表しているのかもしれない。

***ZIM* 過剰発現により発現が変動する遺伝子の割合**

ZIM 過剰発現体と野生型を比較したマイクロアレイ解析において、cDNA アレイでは 4,600 遺伝子の約 2.6 %、オリゴヌクレオチドアレイでは 14,000 遺伝子の約 10 % の遺伝子の発現変動が見られた。cDNA アレイは発現量の異なる mRNA を均一化して作製されたものであり、低発現性の遺伝子が多く含まれる (Kohchi et al., 1995)。マイクロアレイ解析においてシグナル強度が弱いものはデータ処理によって棄却されやすく、低発現性遺伝子は発現に変動があってもとらえられないおそれがある。そのためオリゴヌクレオチドアレイにおける発現変動遺伝子の割合が多くなったのではないかと考えられる。

***ZIM* による *XTH* の発現制御**

XTH は細胞壁の再編、構築に働くことから、*ZIM-ox* における *XTH33*、*XTH15*、*XTH16*、*XTH30* の発現上昇は *ZIM-ox* の伸長表現型の要因であると考えられる。これら 4 遺伝子について、RT-PCR による発現解析を行ったところ、マイクロアレイ

の結果と同様、ZIM-ox の葉における発現上昇が確認された (図 16A)。XTH33 についてはさらに、ノザンブロットによる発現解析を茎頂と葉について行った。葉においてはマイクロアレイや RT-PCR の結果同様、ZIM-ox での発現上昇が検出されたが、茎頂では ZIM が過剰発現しているにもかかわらず、XTH33 の発現は野生型と差がなかった。このことは、組織特異的に発現する相互作用因子の存在などによる、組織特異的な発現制御が存在することを示している。

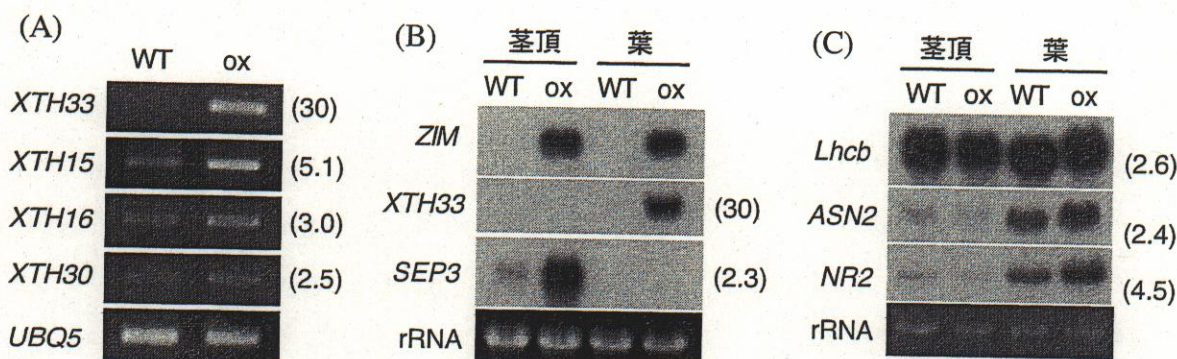


図16. マイクロアレイで変動が見られた遺伝子の発現解析

長日条件下で生育させた発芽後20日目の植物体の各組織よりtotal RNAを調製し、発現解析を行った。WT, 野生型, ox, ZIM-ox。右の括弧内の数字はマイクロアレイの値。(A) 葉より調製したtotal RNAを用いてRT-PCRを行った。コントロールとしてUBQ5を用いた。PCR反応はXTH15は30サイクル、他は20サイクルで行った。(B, C) 葉および茎頂より調製したtotal RNAを用いてノザン解析を行った。ZIMの検出には2μg、他の遺伝子の検出には10μgを用いてノザンブロット解析を行った。25S rRNAのEtBr染色をコントロールとして示した。(B) SEP3とXTH33の発現。(C) 光制御遺伝子の発現。

ZIM-ox は葉柄が伸長しているのに対し、葉身は野生型と変わらないかやや小さくなった (図 12D, E, F)。これが XTH33 の葉柄特異的な発現上昇によるものかどうかを調べるため、発芽後 20 日目の葉柄と葉身を用いたノザン解析を行った。その結果、ZIM の発現量も ZIM-ox において葉身と葉柄でやや差はあったが (葉身を 1 とすると葉柄は 1.15)、XTH33 はより葉柄での発現量が大きくなっていった (葉身を 1 とすると葉柄は 2.89) (図 17)。このことから、葉身と葉柄においても組織

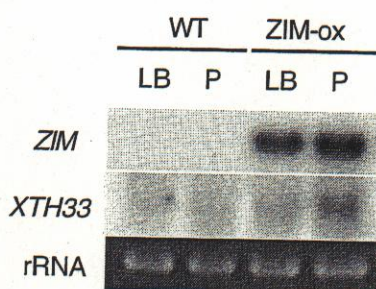


図17. 葉柄と葉身におけるXTH33の発現

長日条件下で生育させた発芽後20日目の植物体の葉身(LB)、葉柄(P)よりtotal RNAを調製し、ZIMの検出には2μg、XTH33の検出には10μgを用いてノザンブロット解析を行った。25S rRNAのEtBr染色をコントロールとして示した。

特異的な発現制御があることが示唆された。

ZIM-ox では *XTH33* の発現が上昇することが示されたが、野生型において ZIM が *XTH33* を制御しているかを検討するため、空間的な *XTH33* の発現パターンを ZIM の発現パターンと比較した。*XTH33* は根や花茎で発現量が高く、茎頂で低いという空間的発現様式を示し、ZIM と異なる発現パターンであった (図 18)。このことから、ZIM は本来は *XTH33* の発現制御には関与しておらず、ZIM 過剰発現による *XTH33* の発現上昇は間接的な影響によるものである可能性が示唆された。あるいは、ZIM が *XTH33* の発現制御に関わっているとしても、ZIM 単独では十分ではなく、他の因子による制御が大きいことも考えられた。

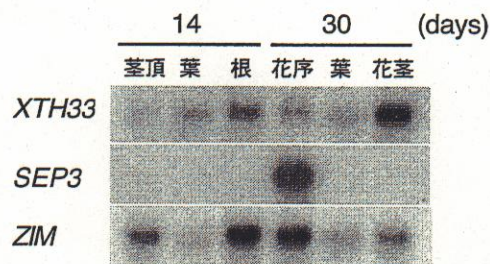


図18. *XTH33*と*SEP3*の空間的発現

図8のメンブレンを用いて、*XTH33*および *SEP3*をプローブにノザンブロット解析を行った。

ZIM による *SEP3* の発現制御

cDNA アレイにおいて、茎頂での変動が見られた *SEP3* について、ノザンブロット解析を行った。マイクロアレイの結果と同じく、茎頂では ZIM-ox における *SEP3* の発現上昇が確認された (図 16B)。*XTH33* は葉特異的な発現上昇が見られたが、それに対し *SEP3* は葉での発現が野生型と差がなく、茎頂特異的な発現上昇であった。このことから、*SEP3* においても組織特異的な発現制御が存在することが示された。

野生型における *SEP3* の発現は、花序特異的であることが示された (図 18)。花序は花と花芽を含むものであるが、*SEP3* は花芽で発現することが報告されている (Mandel and Yanofsky, 1998)。ZIM が *SEP3* の発現を制御している場合、花芽以外の組織で *SEP3* の発現が抑制されるような、組織特異的な発現制御が存在することが示唆された。ZIM-ox において、葉での *SEP3* の発現上昇が見られなかったことも、同様の発現制御によるものであると考えられた。

光制御遺伝子のノザン解析

cDNA アレイでは光制御遺伝子である *Lhcb*、*ASN2*、*NR2* の発現上昇が見られた。これらは光で発現が誘導される遺伝子である。ノザン解析で発現を確認したところ、*Lhcb* は野生型と大きな差は見られなかったが、*NR2*、*ASN2* は葉でやや発現量が ZIM-ox で多いことが確認された (図 16C)。

考察

ZIM を過剰発現させると、胚軸や葉柄が伸長する、葉の角度が上昇する、短日で花成時期が遅れる、という表現型が見られた。これらの表現型は ZIM の機能を推測する上で大きな手がかりとなる。一般的に過剰発現体を用いた解析は、遺伝子の機能を推測する上で非常に有効な逆遺伝学的な解析の手法である。過剰発現体を用いた解析の有効な点として、機能重複の問題を避けることができるということがある。機能が重複した遺伝子がある場合は、1 遺伝子の機能欠失変異体では重複遺伝子が機能を相補して表現型が表れないことがある。近年、遺伝子の転写を活性化させるアクチベーションタギングによる解析が盛んに行われているのも、機能欠失変異体による解析の限界がひとつの原因である。ZIM においても、これまでに T-DNA タグラインやアンチセンスを用いた解析が行われてきたが、明確な表現型が得られていない。2 つの ZIM-like 遺伝子が ZIM と発現パターンが類似していることから（図 8）、ZIM と ZIM-like 遺伝子の機能重複が考えられる。過剰発現による解析は非常に有効な手段である一方、注意が必要である。過剰発現体や異所的発現により得られる結果は、タンパク質の機能を示しているかもしれないが、必ずしも生物学的な機能を反映しているとは限らない。本来発現していない部位での表現型が変化した場合でも、それは野生型における機能を示しているとは言えない。そのため、他の解析結果と組み合わせて考察することが重要である。過剰発現体の表現型は、2 つのタイプに分類することができる。ひとつは、過剰発現により遺伝子の活性が高まることによって表れる、強調された表現型である(hypermorph, high form)。この場合は本来の遺伝子の機能を表している。もうひとつは過剰発現が他の無関係な遺伝子の機能に影響を及ぼすことにより、野生型には見られない新たな現象として表れる表現型である(neomorph, new form)。この場合の表現型は本来の遺伝子の機能を反映していない(Zhang, 2003)。異所的な発現により表現型が表れた場合は、本来発現していない部位での現象であることから注意が必要である。ZIM mRNA が調べた全ての組織で検出されたことから、野生型において ZIM が単独で働いているならば、ZIM-ox の表現型は本来の ZIM の機能が增強されたことによるものだと考えられる。しかしながら、タンパク質間相互作用に働くと考えられる CCT ドメインの存在、低い転写活性化能、および ZIM-ox を用いたマイクロアレイの結果から、ZIM は他の因子と相互作用して働くことが示唆された。そのため、ZIM-ox の表現型は、ZIM の過剰発現によって引き起こされた新たな現象である可能性もあり、注意する必要がある。

ZIM-ox の胚軸や葉柄の伸長や水平面に対する葉の角度の上昇という表現型は、暗所における野生型の応答に類似していた（図 12）。このことから、光シグナリングが負に制御されていることが予測された。しかしながら、ZIM-ox の胚軸は光照射下では伸長するが、暗所ほどは伸長せずに伸長抑制が見られ（図 14）、胚軸伸長

を抑制する光シグナリングが働いていることが示された。また、マイクロアレイの結果から、ZIM 過剰発現体では *Lhcb* や *ASN2*、*NR2* のような光制御遺伝子の発現が葉において上昇していることが明らかになった(図 16C)。野生型におけるこれらの遺伝子は明所で発現が誘導され、暗所では発現量が減少する。つまり、ZIM-ox では光シグナリングが正に働いていることを示す。このことから、ZIM-ox は野生型と同様、正常に光を感知しており、光シグナリングも機能していることが示唆された。したがって ZIM-ox の伸長や葉の角度上昇の表現型は、光シグナリングの負の制御によるものではなく、光シグナルの下流または独立した経路で働く伸長制御の変化によるものであると考えられた。

一般的に、細胞伸長には GA や BR などの植物ホルモンが働くことが知られている。GA や BR を植物に投与すると、胚軸や葉柄、上胚軸、花柄などが伸長がする(Hooley, 1994; Clouse and Sasse, 1998)。逆に GA や BR の生合成変異体は矮性になる。GA シグナリングが常に活性化されている変異体である *spy* は胚軸や葉柄が伸長する(Jacobsen and Olszewski, 1993)。BR の生合成遺伝子の過剰発現体や BR シグナリングが常に活性化されている変異体でも同様である(Choe et al., 2001; Wang et al., 2001; Wang et al., 2002)。葉の角度が上昇するという現象も、機構は不明であるが GA や BR が関わっているという報告がある(Jacobsen and Olszewski, 1993; Gocal et al., 2001; Arteca and Arteca, 2001)。これらの知見から、ZIM-ox の表現型と GA や BR との関与が考えられた。しかしながら、ZIM-ox は GA および BR の生合成阻害剤に感受性を示し、またこれらの存在下でも葉柄は野生型よりも伸長した(図 15)。さらに、マイクロアレイの結果からも、これまでに同定されている GA や BR の生合成やシグナリングに関わる遺伝子の発現変動は見られなかった。以上のことから、ZIM-ox の伸長は、GA や BR の生合成やシグナリングが正に働いたことによるものではなく、GA や BR とは独立した機構によるものであると考えられた。ZIM-ox の花成時期が遅延したことも(表 2)、これを支持するものである。なぜなら、GA は花成に促進的に働くこと(Jacobsen and Olszewski, 1993; Jacobsen et al., 1996; Wilson et al., 1992)、BR の生合成変異体は花成時期が遅延することから(Takahashi et al., 1995; Choe et al., 1999; Chory et al., 1991)、ZIM-ox の伸長表現型が GA や BR によるものであると仮定すると、花成時期は早くなると考えられるためである。ZIM-ox において花成時期が遅延する機構については、今後さらに調べていく必要がある。

ZIM-ox の伸長が GA や BR とは独立した機構によるものだという仮説は、発現上昇した *XTH* の種類によっても支持される。ZIM-ox では *XTH15*、*XTH16*、*XTH30*、*XTH33* の発現上昇が見られた(表 4、図 16A, B)。*XTH* はエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素をコードしている(Rose et al., 2002)。ZIM-ox で上昇していた 4 つの *XTH* がコードするタンパク質がこの酵素活性を持つかどうかは確かめられていないが、*XTH* は細胞伸長に働く遺伝子群であることから、ZIM-ox の伸長表現型の要因ではないかと期待される。植物細胞は細胞壁が存在するため、細胞が伸

長するためには細胞壁の再編を行う必要がある。細胞壁はセルロース微繊維が架橋性多糖やペクチン性多糖類などを介した網状構造をとっている。シロイヌナズナではキシログルカンが架橋性多糖であり、細胞が伸長するためにはこのキシログルカンの架橋を切断、繋ぎ替える必要がある。この働きを行うのが XTH である。また、細胞伸長の方向はセルロース微繊維の配向によって制御され、この配向は細胞膜直下に存在する表層微小管による制御を受ける。上述の GA や BR は伸長軸に対し表層微小管を垂直方向に配列させることにより縦方向の細胞伸長を促進する。さらに GA や BR は XTH の発現制御も行っている。例えば、XTH3、XTH4、XTH5、XTH17、XTH22、XTH23 は BR により発現が上昇する(Xu et al., 1995; Yokoyama and Nishitani, 2001; Goda et al., 2002; Yin et al., 2002)。GA により XTH23 の発現の上昇と XTH26 の発現の抑制が見られる(Yokoyama and Nishitani, 2001)。また、オーキシンによっては XTH3、XTH17、XTH19、XTH22、XTH23 が発現上昇し、XTH21 が発現抑制される(Yokoyama and Nishitani, 2001)。33 個のファミリーからなる XTH は、その構造から機能的に 3 グループに分類されるが、発現部位は様々であり、同じ特性を持つメンバーが発現器官特異性やホルモン応答性などの点で、明確な役割分担をしていると考えられている(Yokoyama and Nishitani, 2001)。ZIM-ox で発現上昇が見られた 4 つの XTH は、上に挙げた植物ホルモンによって制御を受ける XTH 群とは異なるものであった。XTH15/XTR7 と XTH30/XTR4 については生理学的な解析が行われており、BR 処理による発現変動はなく、いずれも暗所で発現が上昇する遺伝子であることが確かめられている(Xu et al., 1996)。また、植物ホルモンによって制御を受ける XTH 群のうち、オリゴマイクロアレイに含まれていたのは XTH5 と XTH22、XTH26 の 3 遺伝子であったが、これらの遺伝子は ZIM-ox では発現変動が見られなかった。このことから、ZIM による伸長制御は植物ホルモンを介さない、独立した経路によるものであることが支持された。

植物ホルモンを介さない伸長制御の例として、ACAULIS (ACL) 遺伝子群がある。節間伸長に欠損のある *acl* 変異体は、GA や BR 生合成の欠損変異体のように矮性になるが、ジベレリン、ブラシノステロイド、オーキシン処理によっても表現型は回復しない(Tsukaya et al., 1993; Tsukaya et al., 1995; Hanzawa et al., 1997)。*acl* 変異体についてはいくつかの XTH の発現解析も行われており、XTH25/XTR3、XTH9/EXGT-A6 の発現が野生型に比べて減少していることが示されている(Akamatsu et al., 1999; Hyodo et al., 2003)。XTH25、XTH9 も植物ホルモンによる変動が確認されていない XTH 群である。さらに、XTH9 は茎頂で高発現する遺伝子であるが、その発現は伸長と密接な関係があることが *acl* 変異体を用いた解析から明らかになった(Hyodo et al., 2003)。このように、植物ホルモンを介さない伸長制御機構が存在し、ZIM はそのような経路で働いていることが示唆された。

以上のように、植物体内で ZIM を過剰発現させると XTH の発現が上昇し、伸長表現型を引き起こすと考えられる。しかしながら、野生型における XTH33 の発現

は、茎頂や花序で低く、花茎で高いものであり、茎頂や花序、根で発現が高い *ZIM* とは発現様式が異なっている (図 18)。野生型において *ZIM* が *XTH33* の発現制御に関与している場合、茎頂、根、花序で *XTH33* の発現を抑制する、あるいは葉や花茎で *XTH33* の発現を誘導するような、組織特異的な機構が存在すると考えられる。図 16B においても、*ZIM* 過剰発現による下流遺伝子の発現変動の影響は、組織特異的であることが示された。*ZIM-ox* で観察された細胞伸長は *ZIM* を過剰発現させた場合の影響であることを注意し、野生型において *ZIM* が細胞伸長に関わっているかどうかを今後解析する必要がある。

野生型における *ZIM* の発現は、葉では低く、茎頂で高いという空間的発現制御が存在していた (図 8)。*ZIM-ox* において、葉では伸長表現型が観察されたが、茎頂での形態的な変化は見出されなかった。遺伝子発現の観点からは、*ZIM-ox* の茎頂では *SEP3* の発現が上昇していることが示された。*SEP3* を過剰発現させた植物体(35S::*SEP3*)では、矮性、葉が巻く、花成時期が早くなる、有限花序になる、という多面的な表現型を示す(Honma and Goto, 2001)。*ZIM-ox* ではこのような表現型は示さなかった。これは、35S::*SEP3* では *SEP3* が植物体全体で発現しているのに対し、*ZIM-ox* においては *SEP3* が組織特異的な発現上昇をしているためではないかと考えられる (図 16B)。*ZIM* が組織特異的に *SEP3* を制御していることを支持するものとして、*ZIM* の転写活性化能を上昇させるために作出した 35S::*ZIM-VP16* 植物体がある。これは *ZIM* と強力な転写活性化能を持つウィルスの転写因子 *VP16* の転写活性化領域とを連結させた融合遺伝子を、植物体内で過剰発現させたものである。35S::*ZIM-VP16* 植物体は、*VP16* による強力な転写活性化能のため、*ZIM* による転写活性化の組織特異性が排除されていると考えられる。現在解析が進行中であるが、35S::*ZIM-VP16* 植物体は、矮性、葉が巻く、花成時期が早くなる、有限花序になるという表現型が観察されている。これは 35S::*SEP3* と同様な表現型である。このことは、35S::*ZIM-VP16* では、35S::*SEP3* のように植物体全体で *SEP3* の発現上昇がおこっていることを示唆している。*VP16* の連結により *SEP3* の発現の組織特異性が欠失しているようである。以上のことから、*ZIM* は *SEP3* の発現を制御する因子であるが、*SEP3* の発現制御には他の因子も関与していることが示唆された。

このように、*ZIM* が制御している遺伝子は組織特異的な発現制御を受けていることが示唆された。*ZIM-ox* を用いた cDNA アレイで変動が見られた他の遺伝子も、葉特異的または茎頂特異的に変動したものがほとんどであった。さらに *ZIM-ox* の葉においては、葉身と葉柄で *XTH33* の発現量が異なっており、組織特異的な制御が見られた (図 17)。葉柄と葉身では異なる伸長制御があることは、遺伝学的または生理学的な解析から示唆されている(Gocal et al., 2001; Tsukaya et al., 2002)。こういった組織特異的な制御はどのような機構によるものであろうか。ひとつの可能性として、発現を抑制する因子の存在があげられる (図 19A)。図 19 には DNA に結合した *ZIM* と相互作用して抑制しているモデルを示したが、相互作用することに

よって DNA への結合を阻害することや、抑制因子が ZIM と競合的に DNA に結合するようなモデルも考えられる。このような抑制因子の例として、CURLY LEAF (CLF) による制御がある。CLF は MADS タンパク質をコードする *AGAMOUS* (AG) や *APETALA3* (AP3) の葉での発現を抑制する (Goodrich et al. 1997)。SEP3 は AG と同じ MADS ファミリーに属しており、同様に CLF によって葉での発現が抑制されているのかもしれない。

組織特異的発現制御を説明するもうひとつの仮説として、ZIM と相互作用することにより転写活性化を促す因子が、組織特異的に発現することによるものが考えられる (図 19B)。第 2 章においても、ZIM は転写活性化能を持つものの、その活性は低く、ZIM と相互作用し活性を高める因子の存在が推測された。今後、ZIM と相互作用する因子の探索は ZIM の機能を解明する上で非常に重要な手がかりになるであろう。また、ZIM が直接的に組織特異的発現制御に関わっているのではなく、ZIM の標的遺伝子の下流で同様の機構が働いていることも考えられる。

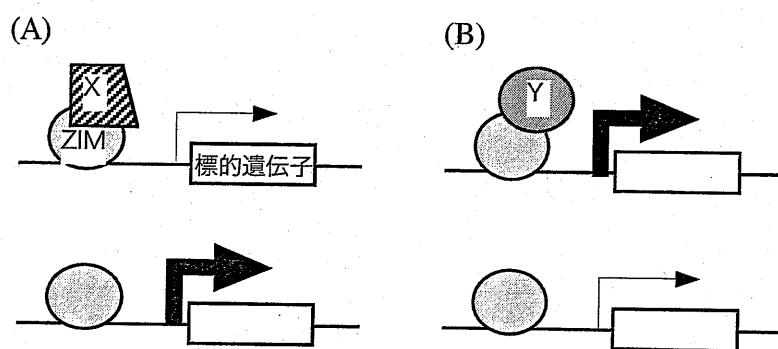


図19. 組織特異的発現制御のモデル

X、Yは組織特異的に発現する因子。標的遺伝子の発現量を矢印の太さで表している。

(A)組織特異的に発現する因子Xが抑制因子の場合。

(B)組織特異的に発現する因子Yが活性化因子の場合。

C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つ新規 GATA 因子 ZIM が、C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C モチーフの GATA 因子と同一の塩基配列である(A/T)GATA(A/G)を認識するかどうか不明である。しかしながら、マイクロアレイ解析から、GATA 配列をシス配列に持つ光制御遺伝子の発現上昇が ZIM-ox において確認された (図 16C)。光制御遺伝子の GATA 配列に、植物の GATA 因子が結合して制御しているかどうかは明らかにされていないが、*in vitro* ではいくつかのシロイヌナズナの GATA 因子が GATA 配列に結合することが確かめられている (Teakle et al., 2002; Jeong and Shih, 2003)。

これは ZIM が GATA 配列に結合することにより光制御遺伝子の発現制御を行った可能性を示唆する。しかしながら、現解析方法では ZIM を恒常的に発現させているため、マイクロアレイにおいて発現変動が見られた遺伝子群は、ZIM の直接の標的遺伝子ではないものも含まれている。そのため、光制御遺伝子の発現上昇は ZIM 過剰発現の間接的な影響であることも考えられ、ZIM が GATA 配列に結合するとは断定できない。マイクロアレイ解析において発現変動のあった遺伝子のプロモーター領域にコンセンサス配列は見出されず、ZIM の認識配列の同定には至らなかったが、直接の標的遺伝子ではなかったためかもしれない。直接の標的遺伝子のみを発現上昇を検出することで、ZIM の認識配列を含めた ZIM の機能がより明らかになると考えられる。そのために、機能誘導型 ZIM を用いた実験系が有効であると考えられる(Sablowski and Meyerowitz, 1998; Samach et al., 2000)。手法としては例えば、グルココルチコイド受容体と ZIM の融合遺伝子のコンストラクトを導入した植物体を用いる。これにデキサメタゾン処理を行うと、抑制されていた融合タンパク質の機能が誘導され、標的遺伝子の転写が活性化される。タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを用いれば、新たなタンパク質は合成されず、ZIM の直接の標的遺伝子のみがとらえられる。今後このような手法を用い、ZIM の直接の標的遺伝子を同定することが必要である。

本研究では、過剰発現体を用いた ZIM の機能解析を行った。ZIM-ox の伸長表現型と 4 つの XTH の発現上昇より、ZIM は XTH の発現制御を行うことにより、GA や BR とは異なる機構で細胞伸長を引き起こすのではないかと示唆された。また、ZIM は茎頂では SEP3 の発現制御を行っているが、他の因子による発現制御も存在することが明らかになった。得られた表現型は ZIM の過剰発現による影響であり、ZIM の本来の機能を知るためには他の解析を組み合わせる検証することが重要である。ZIM の機能欠失変異体ではこれまで野生型と表現型に差が見られないが、重複した機能を持つと考えられる ZML1 および ZML2 との二重変異体、三重変異体では手がかりとなる表現型が得られるかもしれない。今後こういった変異体を解析することにより、シロイヌナズナの ZIM の機能だけでなく、植物特異的新規 GATA ファミリーの植物体内における役割が解明できると期待される。

結論

新規 GATA タイプジンクフィンガーモチーフを持つタンパク質をコードするシロイヌナズナの ZIM の機能解析を行うため、アミノ酸配列からの検証、発現解析、転写活性化能の解析、過剰発現体を用いた解析を行った。ZIM のジンクフィンガーはこれまで知られていた C-X₂-C-X₁₇₋₁₉-C-X₂-C モチーフの GATA タイプとは異なる C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフであったが、アミノ酸の保存性の高さから DNA に結合することが推測された。C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフは植物に特徴的なジンクフィンガーモチーフであった。このモチーフを持つタンパク質の多くは、ジンクフィンガー、CCT ドメイン、機能未知ドメインの 3 つの領域が特に高度に保存されており、さらに N 末端側に酸性領域を持ち、ZIM と全体的に相同性を示すものであった。これらは植物界に広く保存されたタンパク質であり、植物の発生、分化に基本的な機能を持っているのではないかと予測された。ノザンブロット解析から ZIM は植物体全体で一生を通じて発現していることが示唆され、また空間的には茎頂や花序、根で発現量が高く、葉では低いという発現パターンを示した。シロイヌナズナには ZIM と相同性を示す ZML1、ZML2 が存在し、これらも同様の発現パターンを示した。このことから ZIM-like 遺伝子が ZIM と重複した機能を持つと予測された。

GAL4 の DNA 結合領域と ZIM との融合タンパク質と、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた解析から、ZIM は転写活性化能を持ち、N 末端側の酸性領域が転写活性化領域であることが示された。このことから、ZIM は転写因子として働きうることが示された。また、他のタンパク質と相互作用して働く可能性も示唆された。

ZIM をシロイヌナズナにおいて過剰発現させると、胚軸や葉柄が伸長するという表現型を示した。ZIM-ox と野生型の遺伝子発現パターンをマイクロアレイにより比較したところ、細胞壁の再編に関わると考えられる XTH ファミリー遺伝子の発現が ZIM-ox において上昇していることが示された。これが ZIM-ox の伸長表現型の要因であると考えられた。発現上昇していた XTH の種類から、その伸長機構はブラシノステロイドやジベレリンとは独立したものであることが示唆された。しかしながら、ZIM 本来の機能が伸長に関与するかは今後詳細に解析する必要がある。茎頂においては SEP3 が ZIM-ox で発現上昇しており、表現型は見いだせなかったが ZIM の標的遺伝子の有力な候補であった。また、マイクロアレイで変動が見られた XTH33 と SEP3 の発現解析から、組織特異的な発現制御が存在することが示された。

このように、本研究により、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つシロイヌナズナの GATA タイプジンクフィンガータンパク質 ZIM が、転写因子として働き、おそ

らく他の因子と相互作用して標的遺伝子を制御していることが示唆された。ZIM の標的遺伝子は不明であるが、相互作用する相手を変えることにより様々な制御を行っていることが推測された。GATA タイプジンクフィンガーは脊椎動物や菌類での解析が進んでいるが、C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-C モチーフを持つ GATA タイプジンクフィンガーは初めての報告であり、植物の GATA タイプジンクフィンガーとしても植物体を用いた機能解析は初めてである。今後、ZIM と相互作用するタンパク質の探索や認識配列の同定など、転写制御の機構を解析することにより、植物特異的 GATA タイプジンクフィンガータンパク質遺伝子である ZIM の機能の解明につながるであろう。

謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、分化・形態形成学講座の横田明穂教授のもとで行われました。御指導、御鞭撻に深く御礼申し上げます。同講座の河内孝之助教授と竹村美保助手には直接の指導にあたっていただき、非常に感謝しております。また、実験材料を快く分与していただきました、横浜国立大学大学院環境情報研究院の平塚和之教授、理化学研究所の浅見忠男博士、京都大学大学院理学研究科の望月伸悦助手、本学本研究科の植物代謝調節学講座の関根政実助手にも深く感謝いたします。基礎生物学研究所の塚谷裕一助教授には、貴重な時間を割いて議論していただき、感謝しております。共同研究者として、ZIMの単離、同定を行った先輩の西井晶子さん、GUSによるZIMの発現解析を行った先輩の藤田秀知さん、ZIM-oxの初期の解析を行った後輩の松田優子さん、現在 two-hybrid 法により ZIM と相互作用する因子の探索を行っている後輩の稲垣英明さんとは、より深い議論をすることができました。後輩の安藤候平さんにはマイクロアレイ解析で非常にお世話になりました。ありがとうございます。分化・形態形成学講座において共に過ごした先輩、同期、後輩の皆様にも、心より感謝いたします。会社を辞職して進んだ研究の道でしたが、選択は間違っていなかったと思います。大学院での経験を今後に生かし、研究成果を残すことで恩を返していきたいと思います。最後に、温かく見守ってくれた両親に感謝します。

参考文献

- Ahmad, M. and Cashmore, A.R. (1993) *HY4* gene for *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **366**, 162-166.
- Akamatsu, T., Hanzawa, Y., Ohtake, Y., Takahashi, T., Nishitani, K. and Komeda, Y. (1999) Expression of endoxylglucan transferase genes in *acaulis* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**, 715-721.
- Arpigny, J.L. and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343**, 177-183.
- Arteca, J.M. and Arteca, R.N. (2001) Brassinosteroid-induced exaggerated growth in hydroponically grown *Arabidopsis* plants. *Physiol. Plant.* **112**, 104-112.
- Asami, T. and Yoshida, S. (1999) Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends Plant Sci.* **4**, 348-353.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. and Macino, Giuseppe. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* **15**, 1650-1657.
- Barak, S., Tobin, E.M., Andronis, C., Sugano, S. and Green, R.M. (2000) All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends Plant Sci.* **5**, 517-522.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, **316**, 1194-1199.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A. and Marrienssen, R.A. (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, **408**, 967-971.
- Carrington, J.C. and Ambros, V. (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, **301**, 336-338.

- Choe, S., Dilkes, B.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E. and Feldmann, K.A.** (1999) The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**, 897-907.
- Cheng, C.L. Acedo, G.N., Dewdney, J. Goodman, H.M. and Conkling, M.A.** (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.* **96**, 275-279.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S. and Feldmann, K.A.** (2001) Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 573-582.
- Chory, J., Nagpal, P. and Peto, C.A.** (1991) Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **3**, 445-459.
- Church, G.M. and Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. USA.* **81**, 1991-1995.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M.** (1998) Brassinosteroids: essential regulator of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 427-451
- Courey, A.J. and Tjian, R.** (1988) Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*, **55**, 887-898.
- Daniel-Vedele, F. and Caboche, M.** (1993) A tobacco cDNA clone encoding a GATA-1 zinc finger protein homologous to regulators of nitrogen metabolism in fungi. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 365-373.
- Delp, G. and Palva, T.** (1999) A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant β -1,3-glucanase genes. *Plant Mol. Biol.* **39**, 565-575.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A. and Benfey, P.N.** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the

Arabidopsis root. *Cell*, **86**, 423-433.

Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K.R. and Ausubel, F.M. (1991) Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell*, **3**, 61-72.

Evans, T., Reitman, M. and Felsenfeld, G. (1988) An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulator sequence common to all chicken globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5976-5980.

Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M.F. (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, **127**, 725-734.

Gocal, G.F., Sheldon, C.C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D.J., MacMillan, C.P., Li, S.F., Parish, R.W., Dennis, E.S., Weigel, D. and King, R.W. (2001) GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 1682-1693.

Goda, H., Shimada, Y. Asami, T., Fujioka, S. and Yoshida, S. (2002) Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 1319-1334.

Goldman, M.H.S., Pezzotti, M., Seurinck, J. and Mariani, C. (1992) Development expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin-like proteins. *Plant Cell*, **4**, 1041-1051.

Goodrich, J., Puangsomlee, R., Martin, M., Long, D., Meyerowitz, E.M. and Coupland, G. (1997) A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*, **386**, 44-51.

Goto, K. and Meyerowitz, E.M. (1994) Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* **8**, 1548-1560.

Hanzawa, Y., Takahashi, T. and Komeda, Y. (1997) *ACL5*: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering. *Plant J.* **12**, 863-874.

Harrison, S.C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature*, **353**, 715-719.

- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T. and Benfey, P.N.** (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, **101**, 555-567.
- Hird, D.L., Worrall, D., Hodge, R., Smartt, S., Paul, W. and Scott, R.** (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to β -1,3-glucanases. *Plant J.* **4**, 1023-1033.
- Honma, T. and Goto, K.** (2001) Complex of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, **409**, 525-529.
- Hooly, R.** (1994) Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1529-1555.
- Hope, I.A. and Struhl, K.** (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Hyodo, H., Yamakawa, S., Takeda, Y., Tsuduki, M., Yokota, A., Nishitani, K. and Kohchi, T.** (2003) Active gene expression of a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene, *XTH9*, in inflorescence apices is related to cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **52**, 473-482.
- Jack, T., Brockman, L.L., and Meyerowitz, E.M.** (1992) The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, **68**, 683-697.
- Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E.** (1993) Mutants at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*, **5**, 887-896.
- Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A. and Olszewski, N.E.** (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9292-9296.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.

- Jeong, M.J. and Shih, M.C.** (2003) Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **300**, 555-562.
- Jones, L.** (2002) Revealing micro-RNAs in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 473-475.
- Karlin-Neumann, G.A., Sun, L. and Tobin, E.M.** (1988) Expression of light-harvesting chlorophyll a/b-protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **88**, 1323-1331.
- Kohchi, T., Fujishige, K. and Ohyama, K.** (1995) Construction of an equalized cDNA library from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**, 771-776.
- Koornneef, M., Rolff, E. and Spruit, J.P.** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Pflanzenphysiol.* **100**, 147-160.
- Kurup, S., Jones, H.D. and Holdsworth, J.** (2000) Interactions of the developmental regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds. *Plant J.* **21**, 143-155.
- Lam, H.M., Hsieh, M.H. and Coruzzi, G.** (1998) reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 345-353.
- Ledger, S., Strayer, C., Ashton, F., Kay, S.A. and Putterill, J.** (2001) Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS-LIKE* genes. *Plant J.* **26**, 15-22.
- Long, J.A., Moan, E.I. Medford, J.I. Barton, M.K.** (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, **379**, 66-69.
- Ma, J., Przibilla, E., Hu, J., Bogorad, L., and Ptashne, M.** (1988) Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature*, **334**, 631-633.
- Ma, J. and Ptashne, M.** (1987) Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*, **48**, 847-853

- Maier, R.M., Zeltz, P., Kossel, H., Bonnard, G., Gualberto, J.M. and Grienemberger, J.M.** (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol.* **32**, 343-365.
- Makino, S., Kiba, T, Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M, Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T.** (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 791-803.
- Mandel, M.A. and Yanofsky, M.F.** (1998) The *Arabidopsis* *AGL9* MADS box gene is expressed in young flower primordia. *Sex. Plant Reprod.* **11**, 22-28.
- Martin, D.I.K., Tsai, S.F. and Orkin, S.H.** (1989) Increased γ -globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor. *Nature*, **338**, 435-438.
- Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. and Mizuno, T.** (2000) Circadian waves of expression of the *APRR1/TOC1* family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1002-1012.
- Mayer, K.F.X., Scoof, H., Haecker, A. Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T.** (1998) Role of *WUSCHEL* in Regulating Stem Cell Fate in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Cell*, **95**, 805-815.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J. and Barton M.K.** (2001) Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoot. *Nature*, **411**, 709-703.
- Merika, M. and Orkin, S.H.** (1995) Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Krüppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2437-2447.
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly, T.J. and Tjian, R.** (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell*, **58**, 741-753.
- Mayfield, J.A., Fiebig, A., Johnstone, S.E. and Preuss, D.** (2001) Gene families from the

Arabidopsis thaliana pollen coat proteome. *Science*, **292**, 2482-2485.

Morohashi, K., Minami, M., Takase, H., Hotta, Y. and Hiratsuka, K. (2003) Isolation and characterization of a novel GRAS gene that regulates meiosis-associated gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 20865-20873.

Mouradov, A., Cremer, F. and Coupland, G. (2002) Control of flowering time: interacting pathway as a basis for diversity. *Plant Cell*, S111-S130.

Nagata, T., Okada, K., and Takebe, I. (1981) Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol. Gen. Genet.* **184**, 161-165.

Nagatani, A., Reed, J.W., and Chory, J. (1993) Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol.* **102**, 269-277

Nishii, A., Takemura, M., Fujita, H., Shikata, M., Yokota, A. and Kohchi, T. (2000) Characterization of a novel gene encoding a putative single zinc-finger protein, ZIM, expressed during the reproductive phase in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1402-9.

Omichinski, J.G., Clore, G.M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S.J. and Gronenborn, A.M. (1993) NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science*, **261**, 438-446.

Park, B.M. and Quail, P.H. (1993) *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*, **5**, 39-48

Papi, M., Sabatini, S., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P. and Vittoriso, P. (2000) Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev.* **14**, 28-33.

Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, **405**, 200-203.

Piñeiro, M. and Coupland, G. (1998) The control of flowering time and floral identity in

Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117, 1-8.

Ptashne, M. and Gann, A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, **386**, 569-577.

Quackenbush, J., Liang, F., Holt, I., Pertea, G. and Upton, J. (2000) The TIGR Gene Indices: reconstruction and representation of expressed gene sequences. *Nucleic Acids Res.* **28**, 141-145.

Quail, P.H. (2002) Phytochrome photosensory signaling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 85-92.

Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W. and Chory, J. (1996) Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **112**, 337-342.

Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. and Chory, J. (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, **5**, 147-157.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pinede, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-2110.

Riechmann, J.L. and Ratcliffe, O.J. (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Cur. Opin. Plant Biol.* **3**, 423-434.

Robson, F., Costa, M.M., Hepworth, S.R., Vizir, I., Piñeiro, M., Reeves, P.H., Putterill, J. and Coupland, G. (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.* **28**, 619-631.

Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K. (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspective and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1421-1435.

Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM*

is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, **92**, 93-103.

Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. and Ptashne, M. (1988) GAL4-VP16 is unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**, 563-564.

Samach, A., Onouchi, H., Gold, S.E., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. and Coupland, G. (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, **288**, 1613-1616.

Sawa, S., Watanabe, K., Goto, K., Kanaya, E., Morita, E.H. and 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.

Sekimata, K., Uzawa, J., Han, S.Y., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Yoshida, S. and Asami, T. (2002) Brz220 a novel brassinosteroid biosynthesis inhibitor: stereochemical structure-activity relationship. *Tetrahedron: Asymmetry*, **13**, 1875-1878.

Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Machida, C. and 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, K.R., Eshed, Y., Baum, S.F., Otsuga, D., Drews, G.N. and Bowman, J.L. (1999) Members of *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development*, **126**, 4117-4128.

Stratford, S., Barnes, W., Hohorst, D.L., Sagert, J.G., Cotter, R., Golubiewski, A., Showalter, A.M., McCormic, S. and Bedinger, P. (2001) A leucine-rich repeat region is conserved in pollen extensin-like (Pex) proteins in monocots and dicots. *Plant Mol. Biol.* **46**, 43-56.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, **289**, 768-771.

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland,

- G.** (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, **410**, 1116-1120.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T. and Tasaka, M.** (2001) The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, **128**, 1127-1135.
- Takahashi, T., Gasch, A., Nishizawa, N. and Chua N.H.** (1995) The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes Dev.* **9**, 97-107.
- Takatsuji, H.** (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 582-596.
- Takemura, M., Fujishige, K., Hyodo, H., Ohashi, Y., Kami, C., Nishii, A., Ohyama, K. and Kohchi, T.** (1999) Systematic isolation of genes expressed at low levels in inflorescence apices of *Arabidopsis thaliana*. *DNA res.* **6**, 275-282.
- Teakle, G.R. and Gilmartin, P.M.** (1998) Two forms of type IV zinc-finger motif and their kingdom-specific distribution between the flora, fauna and fungi. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 100-102.
- Teakle, G.R., Manfield, I.W., Graham, J.F. and Gilmartin, P.M.** (2002) *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol. Biol.* **50**, 43-57.
- Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R.** (1995) Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 445-474.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Triezenberg, S.J.** (1995) Structure and function of transcription activation domain. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 190-196.
- Tsukaya, H., Inaba-higano, K. and Komeda, Y.** (1995) Phenotypic characterization and molecular mapping of an *acaulis2* mutant of *Arabidopsis thaliana* with flower stalks of much reduced length. *Plant Cell Physiol.* **36**, 239-246.

- Tsukaya, H., Kozuka, T. and Kim, G.** (2002) Genetic control of petiole length in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1221-1228.
- Tsukaya, H., Naito, S., Rédei, G.P. and Komeda, Y.** (1993) A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves. *Development*, **118**, 751-764.
- Valvekens, D., Van Montagu, M. and Van Lusebettens, M.** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5536-5540.
- Walden, A.R., Walter, C. and Gardner, R.C.** (1999) Genes expressed in *Pinus radiata* male cones include homologs to anther specific and pathogenesis response genes. *Plant Physiol.* **121**, 1103-1016.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, H.** (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant setroids. *Nature*, **410**, 380-383.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshikda, S., Asami, T. and Chory, J.** (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell*, **2**, 503-513.
- Wilson, R.N., Heckman, J.W. and Somervill, C.R.** (1992) Giberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* **100**, 403-408.
- Wu, H.M., Zou, J., May, B., Gu, Q. and Cheung, A.Y.** (1993) A tobacco gene family for flower cell wall proteins with a proline-rich domain and a cysteine-rich domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6829-6833.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N.H.** (2000) *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* **14**, 3024-3036.
- Xu, W., Campbell, P., Vargheese, A.K. and Braam, J.** (1996) The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *Plant J.* **9**, 879-

Xu, W., Purugganan, M.M., Polisensky, D.H., Antosiewicz, D.M. and Fry, S.C. (1995) *Arabidopsis TCH4*, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell*, **7**, 1555-1567.

Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A. and Meyerowitz, E.M. (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, **346**, 35-39.

Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J. (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, **109**, 181-191.

Yokoyama, R. and Nishitani, K. (2001) A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1025-1033.

Zhang, J.Z. (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**, 430-440.

安藤候平 (2001) シロイヌナズナ標準化 cDNA ライブラリー由来 cDNA マイクロアレイ系の構築 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

西井晶子 (1997) 花芽特異的に発現するシロイヌナズナの Zinc finger protein 遺伝子の解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

西井晶子 (2000) シロイヌナズナの花芽特異的に発現するジンクフィンガータンパク質遺伝子 ZIM の解析 奈良先端科学技術大学院大学 博士論文

兵頭秀貴 (2001) シロイヌナズナの花序茎頂で高発現するエンド型キシログルカン転移酵素遺伝子の機能解析 奈良先端科学技術大学院大学 博士論文

藤田秀知 (1998) シロイヌナズナの花序特異的ジンクフィンガータンパク質遺伝子の発現様式の解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

松田優子 (2002) 過剰発現体を用いたシロイヌナズナのジンクフィンガータンパク
質遺伝子 *ZIM* の機能解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文

論文目録

Shikata, M., Takemura, M., Yokota, A. and Kohchi, T. (2003) *Arabidopsis ZIM*, a plant-specific GATA factor, can function as a transcriptional activator. *Biosci. Biotech. Biochem.* **67**, 2495-2497.

Shikata, M., Matsuda, Y., Ando, K., Nishii, A., Takemura, M., Yokota, A. and Kohchi, T. Characterization of *Arabidopsis ZIM*, a member of a novel plant-specific GATA factor gene family. *J. Exp. Bot.* (in press)