

植物の葉をギザギザにする 物質 EPFL2 の発見

横浜市立大学 木原生物学研究所

爲重 才覚

名古屋大学

トランスフォーマティブ生命分子研究所

打田 直行

名古屋大学

トランスフォーマティブ生命分子研究所

ワシントン大学生物学部

ハワードヒューズ医学研究所

鳥居 啓子

1. EPF/EPFL ペプチド発見の経緯

植物の成長や生理状態を調節する物質としては、オーキシンが特に古くから知られている。他にもサイトカイニンやジベレリンなどの低分子性の代謝化合物が植物の成長を制御する物質として古くから知られ、植物ホルモンと総称されてきた。それに加えて、近年多くのペプチド性分子が植物の様々な側面を制御している物質として次々と同定されており、植物ホルモンとして認知されてきている。

植物ホルモンの発見の経緯としてオーキシンの例を述べると、植物の芽生えが光に向かって曲がるという生理現象を引き起こす分子を探索する中で、インドール酢酸がオーキシンの実体として同定されるに至った。他の多くの低分子性の植物ホルモンも、特定の生理現象を引き起こす分子実体を探索することで発見されてきた。それに対して、近年見つけてきたペプチド性の植物ホルモンは、生体内に存在するらしい分子をまずゲノム情報から予測し、その生理活性を調べることで分子機能が解明されるという、低分子性のホルモンとは逆の手順で発見されたものが多い。その背景としては、21世紀に入って爆発的に進歩したゲノム科学や生命情報科学によって、機能は未解明だが生体内で合成されているようなペプチドのアミノ酸配列が次々とデータベースに記載されていったこ

とが挙げられる。この動きはさらに加速度的に進んでいるため、今後も新たな植物の調節物質としてペプチド性分子が発見されると期待される。

私たちの研究グループでは、こうしたペプチドの1グループであり、EPIDERMAL PATTERNING FACTOR/EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE(略してEPF/EPFL)と呼称される、互いに比較的高い類似性を持つ分子群の生理機能の解析を進めてきた。このペプチドは広範な陸上植物種が持っていることはわかっている(Takataら2013)が、機能がわかっているのは主にシロイヌナズナのEPF/EPFLの一部である。EPF/EPFLのうち最初に機能が解明されたのはシロイヌナズナのEPF1というペプチドで、EPF1は葉の気孔の数を減らす活性を持っていた(Haraら2007)。シロイヌナズナにはEPF/EPFLグループのペプチドが11個存在するが、この中でEPF1の他にEPF2とEPFL9(STOMAGENという名前でも知られる)も、気孔の数を調節する活性があることが明らかとなった(Haraら2009; Suganoら2010; Kondoら2010)。また、EPFL4とEPFL6には茎の丈を伸ばす役割があることもわかった(Uchidaら2012)。しかしシロイヌナズナの残りのEPF/EPFLと、他の植物のEPF/EPFLについては詳しい機能がわかっていなかったのだが、それらのうちの1つEPFL2について、最近私たちはその役割を明らかにすることに成功したので(Tameshigeら2016)、本稿

ではその内容を概説しつつ関連分野の知見も合わせて紹介する。本稿を通じて、EPF/EPFLペプチドの研究とともに、葉を例にして植物の形態の研究の魅力も伝えることができれば幸いである。

2. EPFL2 ペプチドと受容体 Erf による葉のギザギザ(鋸歯)の発生制御

現在、シロイヌナズナについては様々な遺伝子が破壊された変異体が収集され、国際リソースセンターに保管されており、それらの種子を自由に研究に利用できる。EPFL2をコードする遺伝子が破壊された変異体(*epfl2*変異体)もリソースセンターに存在していたため、私たちはその種子を取り寄せて野生株と比較することでEPFL2の機能を調べることにした。その結果、植物体全体の成長速度や稔性に大きな変化は見られなかったが、葉の形態に顕著な違いが見られた。野生型のシロイヌナズナ標準系統(Columbia)では葉の周縁部に鋸歯と呼ばれるギザギザ形態が見られるが、*epfl2*変異体の成熟した葉には明確な鋸歯が見られず、葉の周縁部は滑らかであった(図-1)。一方で、*epfl2*変異体の葉を、その発達が始まったばかりの非常に小さい時期に観察すると、その周縁には小さなギザギザが見られた(図-2)ため、鋸歯の形成の初期過程(ギザギザの誕生)は正常に進むものの、その後鋸歯が大きく成長するにはEPFL2ペプチドが必要となると考

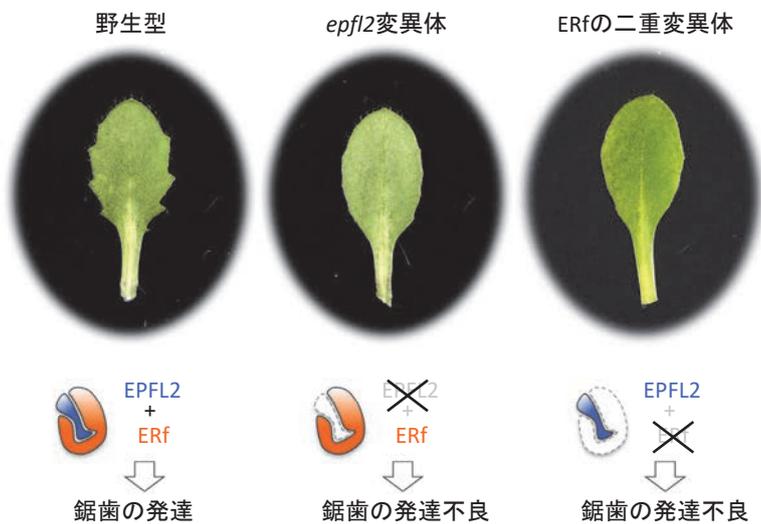


図-1 シロイヌナズナ野生型と *epfl2* 変異体, ERF の二重変異体の成熟葉

えられた。

EPF/EPFL ペプチド群は細胞外に分泌されて働くため、標的となる細胞の表面にある受容体分子と結合してその細胞に特定の生理応答を引き起こすと予想される。実際に EPF1 などの既に機能解析が進んでいた複数の EPF/EPFL ペプチド群については、いずれも ERECTA family 受容体キナーゼ (ERF) と呼ばれる細胞膜上のタンパク質群がそれらの受容体として働くことが知られていた (Lee ら 2012, Lee ら 2015)。ERF に属する受容体タンパク質をコードする遺伝子はシロイヌナズナに 3 個あり、EPF/EPFL の種類によってはある程度選択的に特定の ERF に受容されることがわかってきたため (Lee ら 2012, Lee ら 2015), EPFL2 もいずれかの ERF によって受容されて鋸歯の成長を促すのではないかと予想された。これを検証するため ERF の遺伝子が破壊されたそれぞれの変異体を観察したところ、ERF のうち 1 個のみを欠いた変異体では野生型のように鋸歯のある葉を形成した。しかし、2 個以上の遺伝子を欠いた多重変異体ではどれもが *epfl2* 変異体のように鋸歯のない葉の形態を示した (図-1)。このことから、3 つの

ERF タンパク質の全てが冗長的に EPFL2 の受容に関わるが、1 つを欠いただけではまだ EPFL2 を受容できると考えられた。

この 3 つの ERF のどれもが EPFL2 を受容し得るか確かめるため、ERF のタンパク質と EPFL2 ペプチドの物理的な結合の有無を調べたところ、実際に ERF の全てと EPFL2 が結合することがわかった。以上の結果から、3 つの ERF が EPFL2 ペプチドの受容体として働き、鋸歯の成長を促すという仕組みが明らかとなった。ホルモンと受容体の関係を知る上で、分子の立体構造の情報是有用だが、ごく最近になって、EPFL2 とは異なる一部の EPF/EPFL ペプチドと ERF が結合した分子複合体の立体構造が報告された (Lin ら 2017)。EPFL2 自体が ERF とどのように結合するのか、その立体構造はまだ解明されていないが、解明された近縁ペプチドの構造を参照することで、EPFL2 が ERF とどのように結合してシグナルを伝達しているのかの予測も可能となるだろう。

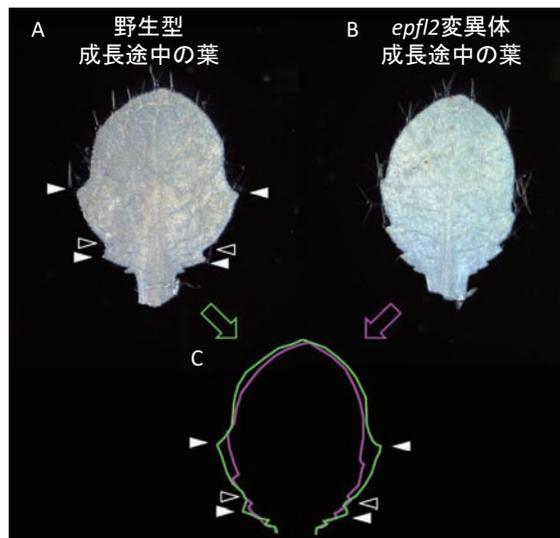


図-2 A. 野生型の成長途中の葉。全長約 2mm。脱色しているため白い。
B. *epfl2* 変異体の成長途中の葉。全長約 2mm。脱色しているため白い。
C. 野生型 (緑) と *epfl2* 変異体 (ピンク) の輪郭線の重ね書き。野生型の鋸歯の間の谷間 (黒矢じり) が *epfl2* 変異体の輪郭とほぼ同じ位置にあるが、野生型の鋸歯先端 (白矢じり) が *epfl2* 変異体の輪郭よりも外側に出っ張っている。

3. 葉のギザギザを生み出す細胞の働き

葉に限らず植物の形の調節には、細胞の増殖の調節が重要である。鋸歯のギザギザの形態を作る上でも、細胞増殖の大きさが重要であることが知られている。葉の成長過程のごく初期の、茎頂分裂組織から生じたばかりの未熟な葉は、楕円形に近い形態ではっきりした鋸歯は見られない。さらに成長が進み、葉の長さが数百マイクロメートル程度に達する時期に、周縁部に小さな突起 (鋸歯原基) が複数生じ、その個々の突起がさらに突き出るように成長することにより、成熟した葉のギザギザした形態が完成する。この時、突き出るように成長すべき場所 (図-2A 白矢じり) と、むしろ突き出ないように成長が制限される場所 (図-2A 黒矢じり) がそれぞれの成長量を適切に保つことで、鋸歯の突起と谷間

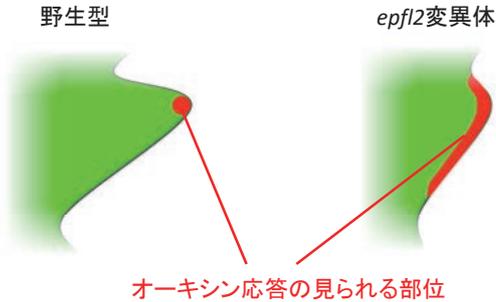


図-3 野生型と *epfl2* 変異体の成長途中の鋸歯における、オーキシン応答の見られる部位の模式図

部分が生じる。実際に、形成され始めた小さな鋸歯と鋸歯の間の谷間部分の細胞でのみ増殖を抑えるような遺伝子操作をすると、通常の葉よりも深く切れ込んだ葉になるという研究例もある (Malinowski ら 2011)。一方で葉が成長途中の時期に、葉の全体で細胞増殖が活性化すると鋸歯はむしろ発達しないという報告もあり (Kuwabara ら 2011)、葉の中での場所ごとの増殖活性の大小のパターンが鋸歯の発達の程度を決めるために重要であると考えられる。

そこで、EPFL2 がどの細胞の増殖を調節して鋸歯の成長を促しているのかについてのヒントを得るため、野生型と *epfl2* 変異体の葉の輪郭線を重ねて比べてみたところ (図-2)、野生型の鋸歯は変異体よりも外に出っ張っており、鋸歯と鋸歯の谷間の位置は野生型と変異体でほとんど同じ位置になることがわかった。このことは、EPFL2 が谷間部分の細胞の増殖を抑えるよりも、むしろ先端付近の細胞を積極的に増殖させることで鋸歯の成長を促していることを示唆する。ただし EPFL2 が直接的に細胞増殖に関わる因子を制御しているのかに関してはまだ未解明である。次節で述べるように、EPFL2 はオーキシンの働きを調節する機能を持つので、EPFL2 による細胞増殖の調節はオーキシンの働きを介している可能性もある。

4. 葉のギザギザを制御するホルモン

葉の形に影響を与えるホルモンは EPFL2 だけではない。従来から知られる低分子性の植物ホルモンの中でもオーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、ブラシノステロイドは、葉の鋸歯や切れ込みの形に関わるという知見があり、中でもオーキシンの研究が特に進んでいる。葉が非常に若く鋸歯原基が葉の周縁部に生じる直前の時期には、葉の中でオーキシンが偏った方向に輸送され、オーキシン濃度の高い場所と低い場所が生じる。この時、オーキシン濃度が高い場所の細胞は鋸歯となる性質を獲得して、鋸歯原基の突起を形成する (Hay ら 2006)。鋸歯になる場所だけにオーキシンが蓄積する過程に関する研究は進んでおり、その様子をコンピュータによるシミュレーションで再現した研究例もある (Bilsborough ら 2011)。このオーキシンの蓄積は、鋸歯原基が形成された後も成長途中の鋸歯の先端で維持され続け、鋸歯の先端以外ではオーキシン濃度は低いレベルに抑えられることもわかっている (図-3 左)。しかし、葉の成長を通じてオーキシンの蓄積位置が鋸歯の先端に維持され続ける仕組みは未解明であった。

先に述べたように、EPFL2 は鋸歯が大きく成長する過程で働くので、EPFL2 がこのオーキシンの蓄積を鋸歯先端に維持し続ける仕組みに関わる

可能性を想定し、次にその検証を行った。*epfl2* の変異体で鋸歯原基が形成された少し後の時期の葉を観察したところ、鋸歯の先端部だけでなくその周辺の広範囲でオーキシンに対する応答を起こしている細胞が見られた (図-3 右)。この観察結果は、鋸歯の原基が形成された後の成長過程において、オーキシンの蓄積を鋸歯先端に限定させるには EPFL2 が必要であることを示している。このオーキシンの蓄積に対する作用が、EPFL2 が鋸歯の成長を促すことに直接的につながっているのかもしれないが、前節で少し触れたように、EPFL2 のオーキシンを介さない作用の有無はまだ明らかではないので、この観点に関しても引き続き調べる必要がある。

5. 葉の鋸歯の機能

鋸歯は葉の周縁部の突起に過ぎず、その発生に関わる物質を知ることや形態を制御することに何の意味があるのかと、疑問に思われる読者もおられるかも知れない。しかし、これらの研究には十分に意味があると私たちは考えている。

例えば、鋸歯の機能の1つとして寒冷な気候への適応が示唆されている。その根拠としては、同種の樹木でも寒冷地と暖地に植えた場合では寒冷地に植えた方が葉の鋸歯が発達するという知見 (Royer ら 2009) や、化石の葉の形態を調べるとその地質年代が寒い時代であるほど鋸歯の発達し

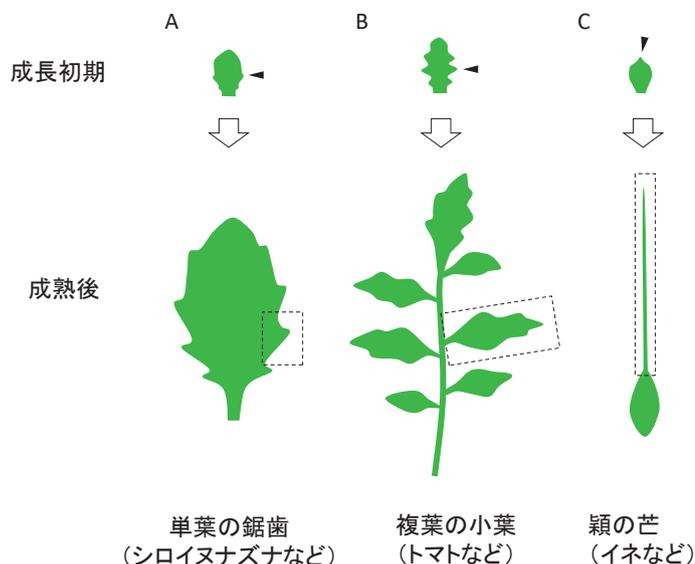


図-4 A. 単葉の鋸歯の形成過程。矢じり：形成初期の鋸歯
 B. 複葉の小葉の形成過程。矢じり：形成初期の小葉
 C. 穎の芒の形成過程。矢じり：形成初期の芒

過程は、より複雑な形をした葉で見られる大きな切れ込みや複葉で生まれる小葉の発生に相似した現象と見なせるからである(図 4A, B)。実際に、単葉の鋸

歯の形成に EPFL2 に似た EPF/EPFL ペプチドが関与することが最近報告された (Bessho-Uehara ら 2016; 図-4C)。双子葉植物の葉の鋸歯と単子葉植物の穎の芒という異なる突起の間での類似性はこれまで議論されてこなかったが、この芒の研究例はこれら二つの突起の意外な類似性を示唆している。EPF/EPFL ペプチドは陸上植物に広く存在していることを踏まえると、様々な植物種の EPF/EPFL ペプチドがそれぞれの種に特有の葉や花の形作りに関わっているかもしれない。今後 EPFL2 と鋸歯の研究を進めることで、葉だけにとどまらず、花に代表される葉の相同器官までも含めて、植物の形態の多様性に隠された共通性が明らかになるのではないかと期待される。

引用文献

- Barkoulas, M. *et al.* 2008. A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*. *Nat Genet.* 40, 1136-1141.
- Ben-Gera, H. *et al.* 2012. ENTIRE and GOBLET promote leaflet development in tomato by modulating auxin response. *Plant J.* 70, 903-915.
- Bessho-Uehara, K. *et al.* 2016. Loss of function at *RAE2*, a previously unidentified EPFL, is required for awnlessness in cultivated Asian rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 8969-8974.
- Bilborough, G.D. *et al.* 2011. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 3424-3429.
- Hara, K. *et al.* 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev.* 21, 1720-

た葉が見られるという知見 (Little ら 2010) が挙げられる。なぜ鋸歯の発達したギザギザした葉の方が寒冷な気候に適しているのかという問題に対しては、研究例はあるものの一般的な答えは未だ得られていない。EPF/EPFL ペプチドはペプチド性の因子とはいえ比較的短いペプチド鎖から成る物質であるため、他の低分子ホルモンと同様に人工的に合成した物質として投与することが可能である。EPFL2 や他のホルモンを投与することで葉の形態を狙い通りに操作できれば、この寒冷適応や寒冷耐性の付与といった方向性の研究も進んでいく期待があり、その先には農業的な技術開発につながる可能性も考えられる。

6. 葉の鋸歯研究の展望

鋸歯の発生を理解する研究は、鋸歯だけにとどまらず葉の形作り全体の理解につながるという大きな魅力もある。というのは、葉の発生学的な観点から見ると、シロイヌナズナのようなシンプルな形の単葉での鋸歯の発生

歯を作り出す仕組みとより複雑な形の葉を作り出す仕組みは分子レベルでは共通した因子が関わる例も多く知られている。例えば、鋸歯原基ができる時と小葉の原基ができる時とは、どちらも PIN1 というタンパク質によるオーキシンの輸送によって一部の細胞群にオーキシンが蓄積し、その細胞群が突起を形成する (Hay ら 2006; Barkoulas ら 2008)。また CUC という転写因子がオーキシン蓄積箇所と隣のオーキシン蓄積箇所との間で働き、そこではオーキシンの蓄積が起こらないよう抑制しているという点も鋸歯の形成と小葉の形成に見られる共通点である (Bilborough ら 2011; Ben-Gera ら 2012)。このような観点を踏まえ、鋸歯の研究を多様な植物種での様々な葉の形作りに発展させていくことも興味深い。

また、発生様式が類似する器官という視点では、発生学的に葉の相同器官と考えられている花器官の形態に EPFL2 が関わる可能性も考えられる。例えば、イネの花の穎の先端にある芒 (ノギまたはノゲ) と呼ばれる長い突

- 1725.
- Hara, K. *et al.* 2009. Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell Physiol.* 50, 1019-1031.
- Hay, A. *et al.* 2006. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development* 133, 3955-3961.
- Kondo, T. *et al.* 2010. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant Cell Physiol.* 51, 1-8.
- Kuwabara, A. *et al.* 2011. A shift toward smaller cell size via manipulation of cell cycle gene expression acts to smoothen Arabidopsis leaf shape. *Plant Physiol.* 156, 2196-2206.
- Lee, J.S. *et al.* 2012. Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev.* 26, 126-136.
- Lee, J.S. *et al.* 2015. Competitive binding of antagonistic peptides fine-tunes stomatal patterning. *Nature* 522, 439-443.
- Lin, G. *et al.* 2017. A receptor-like protein acts as a specificity switch for the regulation of stomatal development. *Genes Dev.* 31, 927-938.
- Little, S.A. *et al.* 2010. Paleotemperature proxies from leaf fossils reinterpreted in light of evolutionary history. *PLoS One* 5, e15161.
- Malinowski, R. *et al.* 2011. Targeted manipulation of leaf form via local growth repression. *Plant J.* 66, 941-952.
- Royer, D.L. *et al.* 2009. Phenotypic plasticity of leaf shape along a temperature gradient in *Acer rubrum*. *PLoS One* 4, e7653.
- Sugano, S.S. *et al.* 2010. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature* 463, 241-244.
- Takata, N. *et al.* 2013. Evolutionary Relationship and Structural Characterization of the *EPF/EPFL* Gene Family. *Plos One* 8, e65183.
- Uchida, N. *et al.* 2012. Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 6337-6342.

田畑の草種

丸葉縷紅・丸葉縷紅草・留紅朝顔（マルバルコウ）

（公財）日本植物調節剤研究協会
兵庫試験地 須藤 健一

ヒルガオ科サツマイモ属の一年生蔓性草本。左巻きでその莖は3mにもなり、他の植物や垣、放置してある農機具にまで、あらゆるものに絡みつく。夏に直径2cmほどの、上から見ると五角形の朱紅色の花を多数つける。

同属近縁種に「縷紅草」がある。「縷」とは、細々と繋がる糸筋のことをいい、縷紅草の葉が細いものが繋がった魚の骨格標本のようなことから名づけられたとされるが、そうすると丸く先端の尖ったハート型の葉である「丸葉縷紅草」が当てはまらない。では「縷」は3mにもなる絡み合う蔓のことかとも思うが、そうなると今度は、同属他種の「アサガオ」にも「縷」が欲しいところである。

縷紅草は江戸時代初期の寛永年間に、マルバルコウは江戸末期の嘉永年間に持ち込まれたという。持ち込まれて今までの間に、縷紅草は園芸種として家々の垣やグリーンカーテンとして栽培されるようになり、マルバルコウは大豆やトウモロコシに

縦横無尽に絡みつき、覆い被さるまでになった。

縷紅草はその葉の妙で園芸種となった。盛夏に青々とした細やかな葉は涼しげであるし、その中に浮かぶ赤や白の星型の花も、暑さを忘れさせてくれる。そんな縷紅草は夏の季語でもあり、多くの俳人が吟じている。松山の俳人、石田波郷の療養中の句。

病人の汗は流れず縷紅草
看護婦と茶飲咄や縷紅草

一方の、マルバルコウはありきたりの葉の故にか雑草化した。珍品とされ土手や法面に蔓を伸ばしている間は五角形の花も可愛い、大豆畑へ入り込むと憎くもなってくる。

縷紅草とマルバルコウ、その葉の形状だけで園芸種か雑草種かの道が決まったのであろうか。因みに、マルバルコウの花言葉は「紙一重」である。