

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15807

研究課題名（和文）EPFL2ペプチドによる新規パターン形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating a novel patterning mechanism regulated by EPFL2 peptide

研究代表者

為重 才覚（Tameshige, Toshiaki）

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：20725006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物の多様な発生パターンを決定するオーキシンの分布パターンは、そのほとんどが極性輸送によって形作られると考えられているが、極性輸送と直接関わらない機構によるパターン形成原理についてはあまり知見が無い。本研究では、広範な植物が持つペプチドの一種であるEPFL2による、オーキシンパターンの制御メカニズムの解明に挑んだ。EPFL2ペプチドの遺伝子を欠損すると、葉の鋸歯の数や、鋸歯の形成に先立って形成されるオーキシンの蓄積パターンの間隔に異常が出ることを見出した。加えて、そうした発生パターンの変化を説明する数理モデルの構築に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の形は古来より人の自然観や美意識を形作る上で重要であり続けてきた。植物の形を作る上で主要な働きをする植物ホルモンであるオーキシンは、局所に蓄積し、あるいは蓄積しないことで、濃淡を生み、特定の位置に凹凸などの形態を形成する。そうしたオーキシンのパターンを決める仕組みとして従来知られていなかったEPFL2ペプチドによるメカニズムについて研究を進めた。EPFL2の機能を、分子生物学実験およびコンピュータシミュレーションの観点から解析することで、葉の形態を決めるオーキシンパターンがどのように制御されているのか、新たなレイヤーでの制御があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Auxin have multifaceted function in determining developmental patterns of plants. Auxin patterns are thought to be mostly formed through auxin polar transport, while little is known about the patterning mechanisms not directly related to polar transport. In this study, I attempted to elucidate the mechanism of auxin pattern regulation by EPFL2, a peptide conserved in a wide range of plants. I found that loss of the EPFL2 gene function results in abnormalities in the number of serration. The auxin accumulation pattern formed prior to serration formation was also abnormal in terms of the interval length between the peaks. Computational approach revealed that such developmental changes caused by EPFL2 can be explained by a mathematical model.

研究分野：植物発生学

キーワード：植物発生学 形態形成 葉 オーキシン ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

植物の形態形成を多面的に制御する植物ホルモンのオーキシンは、植物体内で濃度の濃淡パターンを形成し、適切な位置で器官発生、組織成長、細胞分化を制御するためのシグナルとして働く。このとき、オーキシンのパターンが生じる仕組みとして、オーキシン排出を担う PIN タンパク質による極性を持った細胞間輸送に依るところが大きい。

この極性輸送の重要性は実験的にもコンピュータシミュレーションによっても様々な研究例から示されてきており、かなり深いレベルで理解が進んでいる。一方で極性輸送によらないオーキシンのパターン形成は、そのような機構の存在はある程度指摘されてきたが理解がほとんど進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究では、EPFL2 というペプチドがオーキシンパターンに関わることを、代表者の為重が発見したことに端を発している。EPFL2 ペプチドが若い葉でオーキシンを抑える機能を持つこと、葉の鋸歯のサイズ制御に関わることは当初分かっていたが、これがオーキシンパターン制御や葉の形態をどのような機構で制御しているのか、については未だ不明な点が多かった。またオーキシン極性輸送とは独立に EPFL2 が機能していることを示唆する観察データが得られていた。

以上の知見を総合的に考慮した時、極性輸送システムとペプチドの機能の双方が相互に影響しながら機能することで、オーキシンパターンと葉の形態をどのように決定付けるのか、を解明することでオーキシンパターン形成機構の新たな次元での理解につながることを期待された。本研究の目的はこれらの問いについて二つの観点で、即ち分子実体とシステムレベルでの理解の観点で、知見を積み上げることであった。

## 3. 研究の方法

本研究では EPFL2 ペプチドによる新たなオーキシンパターン形成の原理を解明するために、分子生物学実験によるアプローチと、数理モデルを用いたコンピュータシミュレーションによるアプローチを取った。当初の計画では、分子生物学実験として形質転換体を用いて EPFL2 を誘導的に過剰発現させた際の分子レベルでの変動を解明することも計画の一部であった。しかし、過剰発現させた際の影響に非常に大きな個体差・系統間差が見られ、致命的になる場合もあることがわかったため、発現量をモニタリング・制御することや活性を評価するための精密な実験系が必要となった。

そこで本研究で必要な実験系を実現するため、技術開発を進めた。まず EPFL2 の発現量を生きたままモニタリングするためのベクターを開発した。また EPFL2 は気孔密度を下げる生理活性があることから気孔密度を少労力での計測する顕微鏡システムも開発した。一方で、実験的に EPFL2 及び関連する遺伝子を葉において操作的に発現させ、その影響を解析しようとした時、植物体全体で発現させると生育への影響が非常に大きく精度の良い実験が難しいと考えられた。局所のみにおいて遺伝子発現操作できる技術が必要であったが、そのような操作技術は既存の技術で高精度のものが無かったため、研究協力者を得てそのような技術も開発した。

上述の通り分子生物学実験的な知見を得るための実験系構築に大きな労力を割くことになったため EPFL2 ペプチドがどのようにオーキシンを抑えるのかについては具体的な分子・遺伝子の同定とそれらの数理モデルへの組み込みまで至らなかった。そのため分子的詳細がある程度不明であっても議論できる理論的な観点を数理モデルから解明することを目指した。極性輸送によるオーキシンパターン形成システムと EPFL2 ペプチドがオーキシンを抑制するシステムとを模した数理モデルを構築し、双方あるいは一方のみを機能させた時のダイナミクスをシミュレーションし、野生型や *epfl2* 変異体の表現型との類似点を調べた。

## 4. 研究成果

本研究では EPFL2 だけでなく、よく似たホモログ遺伝子の機能も合わせて解明するためそれらの変異体解析も行った。EPFL2 が属するファミリーのペプチドの中でもその遺伝子ごとに欠損時の表現型が異なる、つまり機能分化が見られることがわかった。

また、EPFL2 の機能の詳細を解明するため、定量的発現操作の難しいペプチドを、蛍光を利用して発現量を定量化するためのベクターを開発した。また局所的に遺伝子発現操作をするために顕微鏡と赤外線レーザーを利用して単一細胞レベルでヒートショック応答を誘発し遺伝子発現操作する実験技術を開発した (Tomoi, Tameshige et al., 2023)。加えて EPFL2 ペプチドおよび関連遺伝子の生理活性評価のために有用な顕微鏡システムを開発した (Toda, Tameshige et al., 2021)。さらに、オーキシンの極性輸送と、EPFL2 とオーキシンとの抑制的関係を数理モデル化してコンピュータシミュレーションを行った結果、EPFL2 が働いた時にオーキシン蓄積の間隔が変化すると予想され、実際にコンピュータ上での結果と類似した変化が EPFL2 を欠損した変異体と野生型株との違いとして観察された。つまり EPFL2 は、極性輸送によって生じるオ

オーキシンパターンを変化させる機能があることが数理モデルからも観察事実からも支持された。これらの成果はオーキシンパターンや葉の形態がどのように制御されているかについて理解を大幅に深めるものであり、植物発生学上の重要な知見となった。また副産物的ではあるが上述の通り発生学研究一般に役立つ新規技術も複数開発した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Toda Yosuke, Tameshige Toshiaki, Tomiyama Masakazu, Kinoshita Toshinori, Shimizu Kentaro K.	4. 巻 12
2. 論文標題 An Affordable Image-Analysis Platform to Accelerate Stomatal Phenotyping During Microscopic Observation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.715309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujihara Rina, Uchida Naoyuki, Tameshige Toshiaki, Kawamoto Nozomi, Hotokezaka Yugo, Higaki Takumi, Simon Rudiger, Torii Keiko U, Tasaka Masao, Aida Mitsuhiro	4. 巻 38
2. 論文標題 The boundary-expressed <i>EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE</i> gene encoding a signaling peptide promotes cotyledon growth during <i>Arabidopsis thaliana</i> embryogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0508a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomoi Takumi, Tameshige Toshiaki, Betsuyaku Eriko, Hamada Saki, Sakamoto Joe, Uchida Naoyuki, Torii Keiko U., Shimizu Kentaro K., Tamada Yosuke, Urawa Hiroko, Okada Kiyotaka, Fukuda Hiroo, Tatematsu Kiyoshi, Kamei Yasuhiro, Betsuyaku Shigeyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Targeted single-cell gene induction by optimizing the dually regulated CRE/loxP system by a newly defined heat-shock promoter and the steroid hormone in <i>Arabidopsis thaliana</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2023.1171531	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 為重 才覚
2. 発表標題 気孔のハイスループット計測システムの開発とコムギ気孔形質
3. 学会等名 超分野植物科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 為重才覚、戸田陽介、富山将和、木下俊則、清水健太郎
2. 発表標題 コムギの気孔形質の計測を自動化する顕微鏡カメラシステムの開発
3. 学会等名 第16回 ムギ類研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	University of Zurich		
米国	University of Texas at Austin		