

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24114007

研究課題名(和文)細胞骨格の制御を介した細胞外情報処理機構の解明

研究課題名(英文)Study of extracellular information-processing mechanism via cytoskeletal regulation

研究代表者

馳澤 盛一郎(HASEZAWA, Seiichiro)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40172902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 46,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)分裂中期の細胞表層におけるアクチン繊維の分布を薬理的に攪乱させることで紡錘体・フラグモプラスト・細胞板のいずれもが赤道面に対して傾斜し、異常な細胞分裂面を形成することを見出した。(2)シロイヌナズナ子葉表皮組織をセルラーゼ処理することで、セルロース量が低減した細胞壁の湾曲を人為的に制御し、画像解析技術により定量的に評価した。(3)葉表皮細胞の湾曲形成を理解するための力学モデルおよび界面方程式モデルを検討した。(4)膜輸送因子PATROL1は孔辺細胞と副細胞の間で水とイオンのシャトル輸送を調節することで、気孔開閉を制御することを実証した。

研究成果の概要(英文)：(1) By the pharmacologically perturbing the distribution of actin microfilaments in the cell surface, both spindle, phragmoplast, and cell plate were inclined with respect to the equatorial plane to form abnormal cell plates. (2) Cellulase treatment of Arabidopsis cotyledon epidermal tissue artificially controlled the cell wall curvature where the cellulose content was reduced, and quantitatively evaluated by image analysis technique. (3) Dynamical model and interfacial equation model to understand curvature formation of leaf epidermal cells were examined. (4) Membrane transport factor PATROL1 was found to regulate stomata opening and closing by regulating the shuttle transport of water and ions between guard cells and accessory cells.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：細胞壁 細胞骨格 イメージング 画像定量解析

1. 研究開始当初の背景

「植物細胞壁機能の情報処理システム(植物細胞壁機能)新学術」研究領域内での本計画研究「細胞骨格の制御を介した細胞外情報処理機構の解明」は細胞骨格の制御を介した植物細胞壁の機能発現機構を可視化とモデル化によって理解することであった。本課題は我々が得手とするイメージング技術およびシミュレーション解析を活かした細胞壁機能の理解を深める課題と位置づけられた。

2. 研究の目的

本計画研究では表層微小管をはじめとする細胞骨格に着目し、細胞壁の構造変化との関係について定量的な観点から検証を進めることで、細胞壁形成に対する細胞骨格の機能を解明することを目的とした。第一に、細胞レベルの解析として、モデル細胞系であるタバコ培養細胞 BY-2 を用いて、細胞質分裂期における細胞板の形成・拡大における細胞骨格系の寄与を解明する。特に、細胞板および細胞膜への細胞壁空間構築に関わる物質の輸送に着目し、細胞壁機能発現との関わりを明らかにする。第二に、組織レベルの解析として、細胞壁の劇的な湾入が認められるシロイヌナズナ子葉表皮組織を材料に、葉表皮細胞の湾曲の亢進あるいは抑制を人為的に制御するとともに、種々の条件における細胞形状と細胞連結様式を組織レベルで可視化し、画像解析・シミュレーションソフトウェアを駆使した細胞形態解析を実施する。また、細胞連結様式をグラフ構造として記述し、細胞間信号伝達シミュレーションを実施する。一連の解析により、複雑な形状の細胞が入り組んだ表皮組織を細胞ネットワークとして表現すれば、細胞壁が規定する細胞形状が細胞間信号伝達に及ぼす影響を定量的に推定することができると思われる。さらに、表皮組織においても細胞骨格系の観察を実施することで表皮細胞の湾曲形成における細

胞骨格系の役割を検討するとともに、数理モデル解析により細胞壁が湾入する機構を統合的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

細胞板の形成・拡大における微小管動態の解析：細胞レベルの解析として、タバコ BY-2 を材料に細胞内構造をラベルした細胞（可視化細胞）やイメージング・画像定量解析の手法を独自に開発して、細胞骨格等の動態や細胞形態形成の画像情報処理による解析を行ってきた経験を基に、本研究計画では、情報処理空間としての細胞壁が劇的に変化する時期である、細胞板の形成・拡大における細胞骨格の動態をイメージングによる解明を試みた。これと同時に、輸送小胞などの膜系細胞内構造についてもイメージングを実施して、細胞骨格が制御する植物細胞壁の機能発現機構を多角的に検討した。具体的には、細胞板の形成・拡大における微小管および関連タンパク質の局在変化および分子機能に関して顕微鏡技術を駆使して可視的・定量的に評価した。本研究で確立した顕微鏡画像解析ソフトウェアは領域内で共有するとともに、班員の研究推進に資するよう研究目的に応じた改良を加えた。

葉表皮細胞壁の人為的変形と細胞形態解析・細胞間信号伝達シミュレーション解析：組織レベルの解析としては、細胞壁の劇的な湾入が認められるシロイヌナズナ実生の子葉表皮組織を材料に、細胞壁の物性変化が制御する細胞形状の機能を細胞間信号伝達の観点から検証すべく、葉表皮細胞の湾曲の亢進あるいは抑制を人為的な制御を試みた。種々の条件における細胞形状と細胞連結様式を組織レベルで可視化し、顕微鏡画像解析・シミュレーションソフトウェアを駆使した細胞形態計測を実施した。また、細胞連結様式をネットワーク構造として記述し、細胞間信号伝達を模擬するシミュレーション解

析を実施した。一連の解析により、複雑な形状の細胞が入り組んだ表皮組織をより単純な細胞ネットワークとして表現し、細胞壁が制御する細胞形状が細胞間信号伝達に及ぼす影響について定量的に推定を行った。また、表皮組織においても細胞骨格系のイメージング解析を実施し、表皮細胞の湾曲形成における細胞骨格系の役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞板の形成・拡大における微小管動態の解析：分裂中期の細胞表層におけるアクチン繊維の分布を薬理的に攪乱させることで紡錘体・フラグモプラスト・細胞板のいずれもが赤道面に対して傾斜し、異常な細胞分裂面を形成することを見出した(Kojo et al. 2013)。また、本研究を遂行する上で我々が確立した γ -tubulin-GFPおよびEB1-GFPコンストラクトにより、フラグモプラストの拡大に伴う高解像度の微小管動態を捉えることに成功した(Murata et al. 2013)。さらに、連続光学切片像から表層微小管を効率的に抽出するとともに細胞空間密度を測定する独自の画像処理法を開発し、橋本(A01)との共同研究において、高浸透圧ストレスによるチューブリンの脱重合に対するチューブリンリン酸化酵素PHS1の重要性の実証に貢献した(Fujita et al. 2013)。

(2) 葉表皮細胞壁の人為的変形と細胞形態解析・細胞間信号伝達シミュレーション解析：申請当初は人為的に葉表皮細胞を変形させるためにオーキシンの利用を計画して予備実験を進めていたが、細胞壁に対して直接的に摂動を加える処理方法を複数検討する過程で、セルラーゼ処理により表皮細胞形状を効率的に変化させ得ることを見出した。オーキシンは細胞膜プロトンポンプの活性化による細胞壁の酸性化や細胞壁関連遺伝子の発現制御など、その作用機構は複雑かつ重層的であり、オーキシン処理が細胞壁の物性

変化に至る過程の推定は困難であった。一方、セルラーゼ処理の場合は単純な作用機序を介して効果的に細胞壁の変形を引き起こすことが可能であり、当計画研究により相応しい実験系と考えられた。そこで申請当時の計画を修正して、セルラーゼを処理した葉表皮組織の統計解析に向けた複数データの取得を実施した。一連の解析から、(1)セルラーゼ処理により播種後4日目までは子葉面積拡大が抑制されるものの、7日目になると葉面積は補償されること、(2)主に播種後4日目以降に子葉上部で起こる表皮細胞の湾曲形成がセルラーゼ処理で抑制されて複雑な形状の細胞が減少し、本来は子葉の基部で観察される平滑に伸長成長した表皮細胞が子葉上部にも出現することを新たに見出した。そこで、セルラーゼ処理および*kor1/rsw2*変異体を用いてセルロース量が低減した細胞壁の湾曲を人為的に制御し、画像解析技術により定量的に評価した。また、GFP-tubulin発現株を用いてシロイヌナズナ子葉表皮組織における表層微小管を撮像し、垂層方向の表層微小管の密度を定量評価した(Higaki et al. 2016)。

(3) 細胞壁湾曲の数理モデル解析：九州大学の三浦教授・今村助教との共同研究として、元々は本計画研究とは独立して遂行していた数理モデル解析に関して著しい進捗があり、本計画研究との関連がより深まった。そこで、両氏を平成26年度より本計画研究の連携研究者として招聘した。細胞壁湾曲のモデルとして、(1)界面方程式モデルと(2)力学モデルの二種類のモデルを検討し、葉表皮細胞の湾曲形成を理解するための力学モデルおよび界面方程式モデルを検討した(Higaki et al. 2016, 2017)。

(4) 膜輸送因子PATROL1の機能解析：本計画研究と併行して九州大学の射場教授と協働して機能解析を進めていた膜輸送因子に関して、解析を進める過程でPATROL1は

孔辺細胞と副細胞の細胞間イオン輸送を介して気孔開閉を制御することが明らかとなった (Hashimoto-Sugimoto et al. 2013 , Higaki et al. 2014) さらに興味深いことに、PATROL1 は細胞板にも局在すること、GFP-PATROL1 の細胞膜近傍でのドット状構造が微小管阻害剤処理によって消失することを見出し、微小管との関連を二重標識による解析を行った。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 20 件)

Takahashi, S., Monda, K., Higaki, T., Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Hasezawa, S. and Iba, K. (2017) Differential Effects of Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) and 3-Kinase (PI3K) Inhibitors on Stomatal Responses to Environmental Signals. *Front. Plant Sci.* 査読有 8, 677. doi: 10.3389/fpls.2017.00677

Higaki, T., Tagigawa-Imamura, H., Akita, K., Kutsuna, N., Kobayashi, R., Hasezawa, S. and Miura, T. (2017) Exogenous cellulase switches cell interdigitation to cell elongation in a RIC1-dependent manner in *Arabidopsis thaliana* cotyledon pavement cells. *Plant Cell Physiol.* 査読有 58:106-119. doi: 10.1093/pcp/pcw183

Akita, K., Kobayashi, M., Sato, M., Kutsuna, N., Ueda, T., Toyooka, K., Nagata, N., Hasezawa, S. and Higaki, T. (2017) Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a trans-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated *Arabidopsis* leaf epidermal cells. *Protoplasma* 査読有 254: 367-377. doi: 10.1007/s00709-016-0955-1

Kimata, Y., Higaki, T., Kawashima, T., Kurihara, D., Sato, Y., Yamada, T., Hasezawa, S., Berger, F., Higashiyama, T. and Ueda, M. (2016) Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in *Arabidopsis* zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読有 113: 14157-14162. doi:10.1073/pnas.1613979113

Inada, N., Higaki, T. and Hasezawa, S. (2016) Nuclear function of subclass I actin depolymerizing factor contributes to susceptibility in *Arabidopsis* to an adapted powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 査読有 170, 1420-1434. doi: 10.1104/pp.15.01265

Inada, N., Higaki, T. and Hasezawa, S. (2016) Quantitative analyses on dynamic changes in the organization of host *Arabidopsis thaliana* actin microfilaments surrounding the infection organ of the powdery mildew fungus *Golovinomyces orontii*. *J. Plant Res.* 査読有 129:103-110. doi: 10.1007/s10265-015-0769-9

Hirakawa, Y., Hasezawa, S. and Higaki, T. (2015) Vacuole structure analysis during cell death subsequent to application of *Erwinia carotovora* culture filtrates to cell cultures of *Nicotiana tabacum* *Bio Protoc.* 査読有 5:e1629. doi:10.21769/BioProtoc.1629

Akita, K., Higaki, T., Kutsuna, N. and Hasezawa, S. (2015) Quantitative analysis of microtubule orientation in interdigitated leaf pavement cells. *Plant Signal. Behav.* 査読有 e1024396. doi:10.1080/15592324.2015.1024396

Higaki, T., Kutsuna, N., Akita, K., Sato, M., Sawaki, F., Kobayashi, M., Nagata, N., Toyooka, K. and Hasezawa, S. (2015) Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Sci. Rep.* 査読有 5,7794. doi:10.1038/srep07794

Hirakawa, Y., Nomura, T., Hasezawa, S. and Higaki, T. (2015) Simplification of vacuole structure during plant cell death triggered by culture filtrates of *Erwinia carotovora*. *J. Integr. Plant Biol.* 査読有 57, 127-135. doi:10.1111/jipb.12304

Higaki, T., Kato, A., Myouga, F., Kutsuna, N., Hasezawa, S. and Nagata, N. (2014) Automatic classification of chloroplast ultrastructure mutants with transmission electron microscopy. *Bioimages* 査読有 22, 1-7.

Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N. and Matsuoka, K. (2014) Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 査読有 55, 1544-1555. doi:10.1093/pcp/pcu084

Higaki, T., Kutsuna, N. and Hasezawa, S. (2014) CARTA-based semi-automatic detection of stomatal regions on an *Arabidopsis* cotyledon surface. *Plant Morphology* 査読有 26, 9-12. doi:10.5685/plmorphol.26.9

Kojo, K.H., Yasuhara, H. and Hasezawa, S. (2014) Time-sequential observation of spindle and phragmoplast orientation in BY-2 cells with altered cortical actin

microfilament patterning. *Plant Signal. Behav.* 査読有 18, 9. doi:10.4161/psb.29579

Higaki, T., Hashimoto-Sugimoto, M., Akita, K., Iba, K. and Hasezawa, S. (2014) Dynamics and Environmental Responses of PATROL1 in Arabidopsis Subsidiary Cells. *Plant Cell Physiol.* 査読有 55, 773-80. doi:10.1093/pcp/pct151

Akita, K., Hasezawa, S. and Higaki, T. (2013) Breaking of the plant stomatal one-cell-spacing rule by sugar solution immersion. *PLoS ONE* 査読有 8, e72456. doi:10.1371/journal.pone.0072456

Kojo, K.H., Higaki, T., Kutsuna, N., Yoshida, Y., Yasuhara, H. and Hasezawa, S. (2013) Roles of Cortical Actin Microfilament Patterning in Division Plane Orientation in Plants. *Plant Cell Physiol.* 査読有 54, 1491-1503. doi:10.1093/pcp/pct093

Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, N., Irie, M., Fujimi, M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasezawa, S. and Iba, K. (2013) A Munc13-like protein in Arabidopsis mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Commun.* 査読有 4, 2215. doi:10.1038/ncomms3215

Higaki, T., Kutsuna, N. and Hasezawa, S. (2013) LIPS database with LIPService: a microscopic image database of intracellular structures in Arabidopsis guard cells. *BMC Plant Biol.* 査読有 13, 81. doi:10.1186/1471-2229-13-81

Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y. and Hasebe, M. (2013) Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Commun.* 査読有 4, 1967. doi:10.1038/ncomms2967

〔学会発表〕(計 20 件)

桧垣 匠, 今村 寿子, 秋田 佳恵, 朽名 夏麿, 三浦 岳, 馳澤 盛一郎 子葉表皮細胞壁の湾曲における微小管結合タンパク質 RIC1 の役割: 細胞形態計測と力学モデルによる解析 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日 鹿児島大学郡元キャンパス

九鬼 寛明, 桧垣 匠, 横山 隆亮, 馳澤 盛一郎, 西谷和彦 プロトプラスト細胞壁再生系: 細胞壁構築プロセスの可視化・定量化のためのツール 第 58 回日本植物生理学会 2017 年 3 月 16 日 鹿児島大学郡元キャンパス

秋田 佳恵, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 スクロース水浸処理により誘導される気孔クラスターの細胞形態学的解析 日本植物学会第 80 回 2016 年 9 月 16 日 沖縄コンベンシ

ョンセンター

稲田 のりこ, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 病原応答における植物アクチン脱重合因子の機能解析 日本植物学会第 80 回 2016 年 9 月 16 日 沖縄コンベンションセンター

秋田 佳恵, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 スクロース水浸処理により誘導される気孔クラスターは孔辺細胞に特徴的な細胞内構造を有していた 第 57 回植物生理学会年会 2016 年 3 月 19 日 岩手大学上田キャンパス

桧垣 匠, 朽名 夏麿, 秋田 佳恵, 今村 寿子, 吉村 賢二, 馳澤 盛一郎, 三村 岳 葉表皮細胞における細胞壁湾曲のモデル 第 57 回植物生理学会第 2016 年 3 月 18 日 岩手大学上田キャンパス

朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎 顕微鏡画像群の網羅的解析のためのクラスタリング法の開発 日本植物学会第 79 回 2015 年 9 月 6 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

桧垣 匠, 今村 寿子, 秋田 佳恵, 朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎, 三浦 岳 シロイヌナズナ葉表皮細胞における細胞壁湾曲機構の解析 日本植物学会第 79 回 2015 年 9 月 8 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

秋田 佳恵, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 スクロース水溶液水浸処理によりクラスター化した孔辺細胞における細胞内構造の検討 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 17 日 東京農業大学世田谷キャンパス

今村 寿子, 朽名 夏麿, 桧垣 匠, 秋田 佳恵, 三浦 岳 葉表皮細胞のジグソーパズル構造形成の数理モデル 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日 東京農業大学世田谷キャンパス

桧垣 匠, 橋本(杉本) 美海, 秋田 佳恵, 射場 厚, 馳澤 盛一郎 気孔複合体における膜交通制御因子 PATROL1 の動態解析 日本植物学会第 78 回 2014 年 9 月 13 日 明治大学生田キャンパス

秋田 佳恵, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 スクロース水溶液水浸処理により形成される気孔クラスターの解析 日本植物学会第 78 回 2014 年 9 月 13 日 明治大学生田キャンパス

湖城 恵, 桧垣 匠, 朽名 夏麿, 安原 裕紀, 馳澤 盛一郎 細胞分裂における表層アクチン繊維および細胞分裂面形成の経時観察 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 18 日 富山大学五福キャンパス

桧垣 匠, 秋田 佳恵, 朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎 シロイヌナズナ子葉の表皮組織形成に対するセルラーゼ処理の影響 第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 20 日 富山大学五福キャンパス

朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎 能動学習を用いた画像分類法による細胞周期推定 日本植物学会第 77 回 2013 年 9 月 13 日 北海道大学札幌キャンパス

桧垣 匠, 朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎 電顕画像における注目構造の自動検索法の開発 日本植物学会第 77 回 2013 年 9 月 14 日 北

北海道大学札幌キャンパス

村田 隆, 佐野 敏夫, 笹部 美和子, 野中 茂紀, 東山 哲也, 馳澤 盛一郎, 長谷部 光泰
細胞質分裂の進行機構の解明 日本植物学会第 77 回 2013 年 9 月 14 日 北海道大学札幌キャンパス

湖城 恵, 桧垣 匠, 朽名 夏麿, 馳澤 盛一郎
BY-YTRF1 細胞を用いた細胞骨格再伸長の解析 第 54 回植物生理学会年会 2013 年 3 月 21 日 岡山大学津島キャンパス

橋本(杉本) 美海, 桧垣 匠, 八丈野 孝, 永見 綾子, 入江 真理, 藤見 美穂, 宮本 愛, 秋田 佳恵, 祢宜 淳太郎, 白須 賢, 馳澤 盛二郎, 射場 厚 シロイヌナズナの Munc13 オルソログ PATROL1 は H⁺-ATPase の細胞膜への輸送を媒介することにより気孔開孔を促進する第 54 回植物生理学会年会 2013 年 3 月 23 日 岡山大学津島キャンパス

朽名 夏麿, 桧垣 匠, 馳澤 盛一郎 生物画像の分類と定量的ためのソフトウェア開発 日本植物学会第 76 回 2012 年 9 月 15 日 兵庫県立大学 姫路書写キャンパス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/zp/hlab>

6. 研究組織

(1)研究代表者

馳澤 盛一郎 (Hasezawa, Seiichiro)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40172902

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

朽名 夏麿 (Kutsuna Natsumaro)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：70578559

桧垣 匠 (Higaki Takumi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：90578486

三浦 岳 (Miura Takashi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10324617

今村寿子 (Imamura Hisako)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30523790

(4)研究協力者

()