

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18549

研究課題名(和文)葉原基にみられるタンパク質拡散動態の非一様性

研究課題名(英文)Biased distribution of protein diffusivity in leaf primordia

研究代表者

川出 健介(KAWADE, Kensuke)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号：90612086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：葉における細胞増殖活性の時空間分布を規定するAN3シグナル勾配の形成原理について、実験および理論的に研究を進め、定量的に精度の高いモデルの構築に成功した。これにより、細胞サイズの偏りがシグナル勾配の形成に大きな影響をもつという、発生現象全般を考えるうえで重要な視点を初めて提示することに成功した。この成果は、日本植物形態学会および日本植物学会でポスター発表するとともに、国際誌に原著論文として投稿中である(Kawade et al., submitted)。

研究成果の概要(英文)：We experimentally and theoretically studied how AN3 signaling gradient is formed along leaf proximal-to-distal axis, and how this gradient regulates the spatiotemporal dynamics of cell proliferation in leaves. We succeeded in establishing a quantitative model, which well summarize the AN3 gradient formation in a realistic spatial field. This model predicted that differential distribution of cell size has impact to determine the signaling gradient. Based on this finding, we proposed that biased distribution of tissue-scale diffusivity is a core mechanism to achieve the AN3 signaling gradient; hence cell proliferation dynamics in leaves. We reported these results in The Japanese Society of Plant Morphology and The Botanical Society of Japan. Now, we are submitting this to an international journal for publication (Kawade et al., submitted).

研究分野：植物発生生理学

キーワード：葉の発生 シロイヌナズナ 発現勾配 理論モデル 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の秩序だった発生現象は、細胞間シグナル因子が器官原基内に特徴的な発現分布を形成することで導かれる。したがって、細胞間シグナル因子が組織レベルで正確に発現分布を形成する仕組みの理解は、発生学における主要な挑戦のひとつである。近年では、動物を使った実験から細胞間シグナル因子の振舞いを定量解析する重要性が広く認識され始めていた (Kicheva et al., 2012; Müller et al., 2013)。植物の発生過程でも、これまで細胞間シグナル因子は多数同定されてきた (Jackson et al., 1994; Nakajima et al., 2001)。申請者も、シロイヌナズナの葉原基で細胞間の増殖活性を協調させる細胞間シグナル因子 ANGUSTIFOLIA3 (AN3) を同定している (Kawade et al., 2013)。このような進展がありながらも、未だに植物の細胞間シグナル因子の拡散動態を定量的に理解する試みは極めて稀であった。この点を申請者は総説で取り上げ、細胞間シグナル因子の動態と多細胞レベルで起こる発生現象を定量情報から有機的に関連づける必要性を指摘してきた (Kawade and Tanimoto, 2015)。

そこで、AN3 の拡散動態を Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP, 光褪色後蛍光回復法) などの定量イメージング技術で解析し始めている状況であった (川出, 2013 植物学会シンポジウム)。その際、葉原基のタンパク質拡散動態に関する情報が不十分だったので、AN3 と同等の分子量である Green Fluorescent Protein (GFP) を用いてまずは FRAP を行った。そうすると、葉肉組織内の同じ細胞種であるにも関わらず、細胞増殖の活発な葉原基の基部ではタンパク質拡散性が低く、細胞増殖を停止し始めている先端部では高いことに気付いていた (Kawade, 2014 植物生理学会シンポジウム)。このようなタンパク質拡散動態の非一様性は細胞間シグナル因子の分布に影響を与えることが理論的な研究により示されていたが (Bollenbach et al., 2008) 器官原基内で見いだされた例は動植物を問わずこれまでになかった。

2. 研究の目的

本研究では、葉原基におけるタンパク質拡散動態の非一様性を、FRAP を中心とした定量イメージング解析で定量的に記述することを最初の目的とする。さらに、細胞増殖活性に加えて、細胞の大きさや形などの細胞レベルでの形質を詳細に評価し、拡散の非一様性を起こす '場' の性質を明らかにすることも重要である。なぜなら、これらの形質は発生現象と密接に関わるので、着目している拡散の非一様性という現象と発生現象を関連づける貴重なヒントになるからである。

このように拡散性に関する基本情報を取得したのには、非一様な場を通して細胞間シグナル因子がいかにして正確に発現分布

を形成するのか明らかにすることを目指す。そのために、実験的および数理的アプローチにより、非一様な拡散性とシグナル因子の発現分布の関係性について明らかにする。ここでは、研究代表者がこれまで研究してきた細胞増殖を活性化させるシグナル因子 ANGUSTIFOLIA3 (AN3) に着目して研究を展開する。最終的には、タンパク質拡散動態の非一様性が、AN3 の発現分布制御を介してどのように細胞増殖活性の時空間分布を決めているのかを解明するという、非常に挑戦的な課題解決も目的とする。

そして、上記の研究結果に基づき、非一様な拡散動態が生み出すシグナル因子の発現分布と、それによる発生制御という新しい考え方を提示した学術論文を発表する。

3. 研究の方法

GFP を構成的に発現するシロイヌナズナ系統 (35S::GFP, Minamisawa et al., 2011) の活発に増殖している細胞を含む葉原基を用いて、基部、中央部、先端部で Square FRAP を行う。ここでは、Square FRAP を 3 カ所で行うことから、各部位でおよそ 50 細胞を含む $65 \mu\text{m} \times 65 \mu\text{m}$ の領域を光褪色させる。時間軸に沿って撮像した後、光褪色させた領域の蛍光回復を解析する。その際に、これまで観察された拡散動態の非一様性をよく表現できる解析手法を検討する必要がある。そして、この非一様性を定量的に記述する。

また、一細胞レベルに着目した Single-cell FRAP も行い、蛍光回復を同様に解析する。その際に、蛍光回復がどのような数理モデルで表すことができるのか明らかにし、着目している現象が純粋な拡散現象なのか、それとも別の要素も組み込んで検討すべきかを判断する。ここから得られた拡散動態に関するパラメータを一次元の数理モデルに組み込み、上記 Square FRAP の結果を再現できるか検討する。本研究では、最もシンプルな一次元の数理モデルから解析に着手するが、その後の実験的観察などから二次元や三次元に展開する必要があるれば、それらの点についても考慮する。加えて、細胞レベルでの形質を顕微鏡観察により評価し、上記の数理モデルに反映させると、square FRAP の結果の再現性がより良くなるのかどうか調べる。

さらに、細胞間を移動できないタイプの AN3 タンパク質の分布を発生軸に沿って定量解析して、組織の成長が AN3 タンパク質の分布に与える影響を数値化する。この際に、組織成長による物質移動は power-law gradient model で解析できることが知られているので、この枠組みに特に着目して解析を進める。この情報と、異なる空間スケールの FRAP 解析から得られた情報を統合して、細胞間を移動できるタイプの AN3 の発現分布が再現できるのか数理モデルを用いて調べる。具体的な AN3 タンパク質の発現分布は、顕微鏡観察に

より実測したデータを用いる。

さらに、AN3 の正確な発現分布形成が細胞増殖活性の時空間分布にどのように寄与しているのか明らかにするため、移動できるタイプの AN3 を発現している葉原基と、移動できないタイプを発現している葉原基の、細胞増殖活性の時空間分布を比較する。この移動能に対する摂動実験で細胞増殖活性の時空間分布に変化が見られた場合は、その変化が AN3 の発現分布変化と一致するものなのかどうかを調べる。

4. 研究成果

Square FRAP の結果、タンパク質拡散動態の非一様性は葉原基の基部でのみ観察される現象であることが分かった。この非一様性を定量的に解析した結果、先端部から基部に向かった拡散動態の方が、逆方向よりおよそ3倍程度大きいことが明らかになった。また、基部でも同じ領域で先端部から基部方向の拡散動態と、その逆方向の動態を比較したところ、差は認められなかった。これは、観察した非一様な動態が積極的なタンパク質の流れなどで形成されているものではないことを意味する。さらに、蛍光褪色させた中心部を解析して、今回の観察時間スケールでは蛍光の回復は観察されなかった。このことから、新たな GFP タンパク質合成により蛍光の増加は起こらないということが確認できた。

Single-cell FRAP を行い、着目している現象は原形質連絡を介した純粋な拡散で定義できることが明らかになった。ただ、この拡散動態について、葉原基の基部と先端部では差が見られなかった。これは、組織レベルでの拡散動態の非一様性が、細胞レベルでの拡散動態のみでは説明できないことを意味する。

FRAP に用いた葉原基の細胞レベルでの形質を丁寧に評価し、基部から先端部へ向かい細胞サイズが増大している点を明らかにした。細胞増殖活性の変化や細胞の形なども踏まえて考えると、この細胞サイズの増大は細胞増殖活性の勾配をもった変化によるものであると結論付けた。

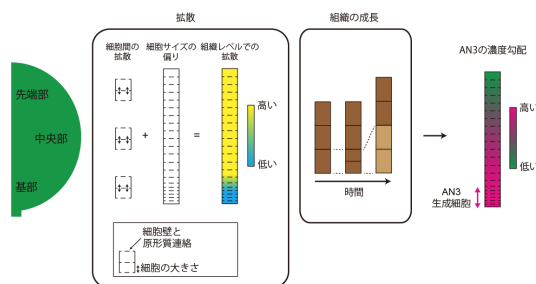
異なる空間スケールの FRAP の結果を数理モデルに組み込んで解析し、(1) GFP は原形質連絡を拡散していること、(2) 原形質連絡は組織レベルでの拡散性を考える際にボトルネックになっていること、(3) 活発な細胞分裂が細胞サイズの偏った分布を引き起こすこと、(4) 細胞サイズの偏った分布は組織レベルでの拡散を説明するのに必須であることを明らかにした。

移動できないタイプの AN3 を解析することで、組織成長による AN3 の移動を定量的に記述することができた。この AN3 の分布を power-law gradient model でフィットさせるときれいに一致した。これにより、AN3 タンパク質を生成している細胞数や、AN3 が発現分布を形成する際に起こる細胞分裂の回数

も見積もることができた。

また、移動できるタイプの AN3 と移動できないタイプの AN3 の発現分布を比較解析することで、(5) AN3 の発現勾配が、成長組織内における純粋な拡散のみで説明できることを明らかにした。興味深いことに、分裂活性の時空間分布は AN3 の分布と一致することを見出すことに成功した。これは、細胞増殖活性の時空間分布が AN3 の発現分布で制御されていることを強く示唆する。さらに、細胞増殖活性は細胞サイズの大きさ、さらにそれはタンパク質拡散動態に影響を与えることから、これらはフィードバック的な関係にあると考えられる。

以上をまとめると、葉における細胞増殖活性の時空間分布を規定する AN3 シグナル勾配の形成原理について、実験および理論的に研究を進め、定量的に精度の高いモデルの構築に成功した。また、その機能的意義については AN3 タンパク質の移動能への摂動実験で示すことに成功した。これにより、活発な細胞増殖活性が引き起こす細胞サイズの偏りが、シグナル勾配の形成に大きな影響をもつという、発生現象全般を考えるうえで重要な視点を初めて提示することに成功した。その概要を以下の図にまとめる。この成果は、日本植物形態学会および日本植物学会でポスター発表するとともに、国際誌に原著論文として投稿中である (Kawade et al., submitted)。



AN3 の発現勾配形成モデル

<引用>

Kicheva, A., Pantazis, P., Bollenbach, T., Kalaidzidis, Y., Bittig, T., Julicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. 2007. Kinetics of morphogen gradient formation. *Science*. 315:521-525.

Müller, P., Rogers, K.W., Jordan, B.M., Lee, J.S., Robson, D., Ramanathan, S., and Schier, A.F. 2012. Differential diffusivity of Nodal and Lefty underlies a reaction-diffusion patterning system. *Science*. 336:721-724.

Jackson, D., Veit, B., Hake, S. 1994. Expression of maize KNOTTED1 related

homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development*, 120:405-413.

Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., Benfey, P.N. 2001 Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*. 413:307-311.

Kawade, K., Horiguchi, G., Usami, T., Hirai, M.Y., and Tsukaya, H. 2013. ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves. *Curr. Biol.* 23:788-792.

Kawade, K., and Tanimoto, H. 2015. Mobility of signaling molecules: the key to deciphering plant organogenesis. *J. Plant Res.* 128:17-25.

川出健介. 2013.葉原基における AN3 の発現勾配と細胞増殖活性の時空間分布.日本植物学会シンポジウム.

Kawade, K.2014. Cell-to-cell variability of protein trafficking dynamics in leaf primordia. 日本植物生理学会シンポジウム.

Bollenbach, T., Pantazis, P., Kicheva, A., Bökel, C., González-Gaitán, M., Jülicher, F. 2008. Precision of the Dpp gradient.*Development*. 135:1137-1146.

Minamisawa, N., Sato, M., Cho, K.H., Ueno, H., Takechi, K., Kajikawa, M., Yamato, K.T., Ohyama, K., Toyooka, K., Kim, G.T., Horiguchi, G., Takano, H., Ueda, T., Tsukaya, H. 2011. *Plant J.* 68:788-799.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

川出健介、堀口悟朗、藤田知道、塚谷裕一 ヒメツリガネゴケの茎葉体の成長を促す遺伝的な仕組み 日本植物生理学会 2017年3月16日~18日 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)

川出健介、谷本博一、堀口吾朗、塚谷裕一 組織レベルでの偏った拡散性が葉原基における AN3 の発現勾配を形づくる 日本植物学会 2016年9月16日~19日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

川出健介、谷本博一、堀口吾朗、塚谷裕一 組織レベルでの偏った拡散性が葉原基における AN3 の発現勾配を形づくる 日本植物形態学会 2016年9月15日 琉球大学 (沖縄県中頭群)

〔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://www.oib.orion.ac.jp/metabolo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川出 健介 (KAWADE, Kensuke)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号：90612086

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()