

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04802

研究課題名(和文) 新規細胞株と画像解析を用いた植物細胞分裂・形態形成における細胞骨格機能の比較解析

研究課題名(英文) Comparative analysis of cytoskeletal function in plant cell division and morphogenesis using new standard cell lines and image processing

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：シダ植物およびコケ植物において細胞研究の多様な解析ニーズに適した実験細胞株(standard cell line: SCL)を新規に確立し、さらに独自のシングルセル比較定量解析システムを開発して、それらを用いた細胞分裂・形態形成様式の比較解析を行うことで、植物が進化の過程で獲得してきた増殖システムに迫ろうと試みた。その結果、シダのSCL候補の確立と理研バイオリソースへの委託、その実用的なプロトプラスト作成法の確立と論文発表、蛍光抗体染色やGFPによる細胞分裂装置の観察、新規画像解析システムの独自開発と論文発表についてそれぞれ相応の成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規開発のSCLと画像解析ツールのいずれについても波及効果は著しいと考えられる。今後、これらによる被子植物、シダ植物、コケ植物の細胞現象の比較解析により得られる成果が期待される一方で、本研究で開発されたシングルセル画像解析ツールは幅の広い目的に使用できるものが完成しており、他の研究分野への応用も大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：We have tried to newly establish standard cell lines (SCLs) suitable for various analysis needs of cell research in fern and moss plants. Further, we have also tried to develop new unique system for single-cell comparative quantitative analyses. The results are as follows. We established a fern SCL candidate and commissioned it to RIKEN BRC. Using this cell line, the practical protoplast preparation method was established, and the short report was published. The observations of the cell division apparatus by fluorescent antibody staining or GFP were performed. Also, we developed a new image analysis system and published the paper.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：植物細胞分裂・形態形成 細胞骨格 画像定量解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上にはコケ植物、シダ植物、裸子植物、被子植物など多様な形態と増殖様式を持った植物群が存在している。過去にはゲノム解読が終了したシロイヌナズナをはじめとする被子植物以外には遺伝子工学を用いた研究ができる実験材料が無く、形態形成や増殖に関する遺伝子の進化を調べることも困難であった。その後、コケ植物のヒメツリガネゴケやゼニゴケでは、ゲノム解析とともに遺伝子操作も可能な実験系などが多数確立されてきており、様々な遺伝子の研究も進んでいる。しかし、コケ植物と被子植物の間に位置するシダ植物は全般的にゲノムサイズが大きいこともあって、ゲノムプロジェクトからも敬遠されてきた。

一方、我々は過去にモデル細胞としてタバコ BY-2 細胞を確立したが、これは高等植物の培養細胞としては極めて高い増殖能を持つ細胞株で、動物の HeLa 細胞に比肩する植物の細胞生物学的研究の standard cell line (SCL) となっている。また、私の主催する研究室では各種培養細胞および植物体を実験材料とし、独自開発の細胞や手法を用いて、植物細胞の形態形成・環境応答における細胞骨格や液胞の可視化解析に取り組んできた。さらに、新たな画像解析ツールの考案、実装を独自に研究、開発を行ってきた。一方で、顕微鏡を駆使した生物画像処理分野の発展は著しく、顕微鏡技術の革新およびコンピューターの処理速度向上と併せ、単位時間あたりに撮像される画像のデータ量は膨大になっている。多量な実験画像から高速かつ客観的に知見を得るためには、画像処理ソフトウェアを用いた定量解析がますます必要とされつつある。

我々のスキルによる上記の問題の解決を視野に入れて、シダ植物などの SCL および画像解析ツールの開発を考案した。

2. 研究の目的

陸上には多様な形態・生理を持った植物群が生存しており、それらの成長・増殖に必須な細胞分裂・分化形態形成の様式もまた多様である。しかし、その研究ツールとして非常に有用な世界標準の実験細胞株 (standard cell line : SCL) は被子植物などのごく一部を除いては確立されておらず、細胞生理学・分子生物学的研究に適した細胞実験系は極めて限定されている。本研究では、シダ植物およびコケ植物において細胞研究の多様な解析ニーズに適した SCL を新規に確立し、それらを用いた細胞分裂・形態形成様式の比較解析を行うことで、植物が進化の過程で獲得してきた増殖システムに迫ろうとするものである。具体的には、シダ植物のリチャードミズワラビとコケ植物のゼニゴケに着目し、各植物種において新規の懸濁培養細胞を作成し、分裂増殖の解析に適した SCL の確立を目指した。次に、これらの細胞を用いて細胞骨格などをラベルした可視化細胞や分裂同調培養法などの実験観察系を整え、独自開発のイメージング画像定量解析を行い、タバコ BY-2 細胞などのデータと照合することで、被子植物、シダ植物、コケ植物の細胞分裂・形態形成様式の比較解析を行い、植物の成長・増殖様式の進化に迫ることを目的とした。一方で、このようなシングルセルの比較形態情報解析を定量的かつ容易に行うとともに、今後さらに膨張を続ける研究用画像に対応するために、高機能かつ必要十分な画像処理技術のみを平易なユーザインターフェイス (UI) で達成する画像ソフトウェアの開発も併せて目的とした。

3. 研究の方法

細胞分裂や細胞形態形成などの比較解析には細胞生理学、分子生物学および生化学的な手法を駆使して研究を進展させていくことが必要となる。そのためにはまず、対象とする各々の植物種で解析を行い得る実験系を確立することが重要である。懸濁培養細胞 (suspension culture) は利便性、安定性などから非常に有用な材料と考えられるが、そのためには均一で増殖の速い優秀な細胞株を作成する必要がある。そこで本研究では、シダ植物のリチャードミズワラビとコケ植物のゼニゴケから培養細胞株を誘導し、分裂頻度や観察の利便性などに優れた standard cell line (SCL) に育成すべく、様々な培養条件を検討した。使用に耐える cell line が確立した段階で、細胞核 (染色体) 微小管などを蛍光抗体染色や GFP でラベルし、細胞分裂・形態形成に伴う諸現象の観察と画像取得を進めた。(比較のため組織の細胞の画像取得も併せ行った。) 取得した画像群よりクラスタリング等の手法を用いた評価と画像定量解析を行

うべく、クリックベースの UI を有する新規の画像解析ソフトウェアの開発を行った。また、それを用いた細胞内構造の解析も試行した。なお、～の研究を進める上では、特に微小管より成る分裂装置と細胞核（染色体）をはじめとするオルガネラの形態形成に着目して、被子植物、シダ植物、コケ植物の細胞現象の比較解析を念頭において実行した。

4. 研究成果

本研究では、シダ植物およびコケ植物において細胞研究の多様な解析ニーズに適した実験細胞株（standard cell line：SCL）を新規に確立し、それらを用いた細胞分裂・形態形成様式の比較解析を行うことで、植物が進化の過程で獲得してきた増殖システムに迫ろうと試みた。具体的には、シダ植物のリチャードミズワラビとコケ植物のゼニゴケに着目し、各植物種において新規の懸濁培養細胞を作成し、分裂増殖の解析に適した SCL の確立を目指した。一方、これらの細胞を用いて細胞骨格などの比較解析を行い得るイメージング画像定量解析のツールを目指し、独自のシングルセル解析システムの開発を行った。最終的には、タバコ BY-2 細胞などの解析データと照合することで、被子植物、シダ植物、コケ植物の比較解析を目指している。

3 年間の成果としては、

1) 無菌的に成育したリチャードミズワラビおよびゼニゴケ植物体よりカルスを誘導し、生長のよいカルスをもとに懸濁培養細胞を作成した。植物ホルモンなど様々な条件の液体培地の入ったフラスコへの定期的な移植でシェーカーでの振盪培養が安定した時期を見計らって、移植毎にステンレスの金属フィルターに目の粗いものから順次通して、なるべく小さな細胞集団（fine cell culture）を選抜した。次に、これらの fine cell culture を暫定的な候補とし、増殖速度を早めるべく培養条件を再検討した。具体的には、植物ホルモン濃度（なるべく低濃度に慣らした）、振盪培養条件（培養温度、回転速度・半径、液体培地の量、シェーカーの機種を検討）、ミネラル組成（ベースは MS 培地でも追加のミネラルを検討）などである。これにより、リチャードミズワラビについて、増殖速度が早く、かなり fine cell culture である SCL 候補の cell line が得られたので、それを用いて、細胞分裂様式の観察や細胞形態形成のスタートツールとなる実用的なプロトプラストの作成と培養系の開発を行い、実用性の高い実験系を目指した。このリチャードミズワラビの培養細胞は、SCL として配布できるように簡便な培養条件についても再検討し、理研バイオリソースに Cr-AH 株として委託した（平成 30 年 12 月 17 日に委託したが、31 年 1 月末に「6 回程継代を行いました。問題なく増殖し、維持しています。」とのご報告を頂いている）。また、Cr-AH 株を用いた実用的なプロトプラストの作成と培養の実験系を確立し、短報として公表した（Hasezawa and Akita, 2018）。

2) 細胞分裂時の細胞核（染色体）、微小管などの可視化を目指し、ヒストンやチューブリンと GFP、RFP などの融合遺伝子の導入による可視化細胞の作成および蛍光抗体染色の 2 法により、分裂様式の分裂期を通じた経時観察を試みた。ゼニゴケに関しては既に可視化された植物体から培養細胞を誘導し、その細胞と植物体組織について分裂様式を精査し、不等分裂の際に特徴的な微小管構造に包まれた核が中央から辺縁部へと移動するという興味深い現象を見出し、この微小管構造の移動にアクチン細胞骨格が関与していることも明らかになった（Sakai et al. in preparation）。リチャードミズワラビについては未だアグロバクテリウムの感染条件など検討が必要であるが、蛍光抗体染色では実用に耐える染色像が得られ、その分裂様式について検討した（Akita et al. in preparation）。

3) 近年、画像解析技術や人工知能に関するアルゴリズムの発達により画像処理ソフトウェアの高機能化が達成されつつあるが、それら高度な技術を活用するためには、環境整備やパラメータチューニングなど様々な場面において、プログラミング言語を用いた操作が求められ、計算機の開発スキルに乏しい生命科学研究者にとっては、画像処理を行う上での大きな壁になっている。その問題を解決すべく、形態解析と自動分類の機能をもつクラウドベースの細胞画像解析システム IMACEL を開発した。IMACEL の特色は、目的に合わせた最適なアルゴリズムの組み合わせを対話的・半自動的に構築することである。そのためにまず、アップロードされた解析対象画像から複数の特徴量を算出する。その後、解析対象画像の特徴量と類似する学習済み画像データをシステム内で探索する。その結果に基づき、妥当と思われる画像処理過程を施した解析中間画像群をユーザーに示し、ユーザーの研究目的に適した画像処理過程を選択さ

せる。具体的な画像処理については、グレースケール化、白黒反転、二値化、穴埋め、輪郭抽出等が実装されている。また、パブリッククラウドである Microsoft Azure 上に実装したため、計算機リソースが乏しい研究環境であっても、高速で安全性の高い解析を行うことができる。これにより、研究室・研究者ごとに異なる多様な解析ニーズに対し、それぞれ適切な画像解析法を高速高精度に提供することが可能になった。このシステムの細胞分裂様式やオルガネラ形態解析への適用については、細胞の蛍光および明視野像などをもとにした解析が容易になり、論文として発表するとともに関連製品の開発も行った (Shimahara et al., 2018, 2019)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者および連携研究者に下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Shimahara Y, Sugawara K, Kojo KH, Kawai H, Yoshida Y, Hasezawa S, Kutsuna N (2019) A cloud-based bioimage analysis platform for morphological analysis and image classification. PLOS ONE 14(2): e0212619. DOI: 10.1371/journal.pone.0212619 査読有
2. Nagashima A, Higaki T, Koeduka T, Ishigami K, Hosokawa S, Watanabe H, Matsui K, Hasezawa S, Touhara K (2019) Transcriptional regulators involved in responses to volatile organic compounds in plants. J. Bio. Chem. 294, 2256-2266 DOI: 10.1074/jbc.RA118.005843 査読有
3. Kimata Y, Kato T, Higaki T, Kurihara D, Yamada T, Segami S, Terao-Morita M, Maeshima M, Hasezawa S, Higashiyama T, Tasaka M, Ueda M (2019) Polar vacuolar distribution is essential for accurate asymmetric division of Arabidopsis zygotes. Proc Natl Acad Sci USA 2019 116 (6) 2338-2343 DOI: 10.1073/pnas.1814160116 査読有
4. Shimahara Y, Kutsuna N, Hasezawa S, Kojo KH (2018) Quantitative evaluation of stomule frequency at hourly intervals in Arabidopsis stomatal guard cell chloroplasts. Cytologia 84(1) 31-35 DOI: 10.1508/cytologia.84.31 査読有
5. Akita K, Hasezawa S, Higaki T. (2018) Cortical microtubules and fusicoccin response in clustered stomatal guard cells induced by sucrose solution immersion. Plant Signaling & Behavior 13:4, e1454815, DOI: 10.1080/15592324.2018.1454815 査読有
6. Hirakawa Y, Hasezawa S, Higaki T (2018) Reactive oxygen species production and stimulated endocytosis in tobacco BY-2 cells treated with Erwinia carotovora culture filtrate. Cytologia 83(3): 289–293 DOI: 10.1508/cytologia.83.289 査読有
7. Hasezawa S, Akita K (2018) Isolation of Protoplasts from Suspension Culture of *Ceratopteris richardii*. Cytologia 83(1): 1–2 DOI: 10.1508/cytologia.83.1 査読有
8. Kuki H, Higaki T, Yokoyama R, Kuroha T, Shinohara N, Hasezawa S, Nishitani K (2017) Quantitative confocal imaging method for analyzing cellulose dynamics during cell wall regeneration in Arabidopsis mesophyll protoplasts. Plant Direct 1(6): e00021 DOI: 10.1002/pld3.21 査読有
9. Takahashi S, Monda K, Higaki T, Negi J, Hashimoto-Sugimoto M, Hasezawa S, Iba K (2017) Differential Effects of Phosphatidylinositol 4-Kinase (P14K) and 3-Kinase (P-13K) Inhibitors on Stomatal Responses to Environmental Signals. Front Plant Sci 8:677 DOI: 10.3389/fpls.2017.00677 査読有
10. Akita K, Kobayashi M, Sato M, Kutsuna N, Ueda T, Toyooka K, Nagata N, Hasezawa S, 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 254: 367-377 DOI: 10.1007/s00709-016-0955-1 査読有
11. Higaki T, Takigawa-Imamura H, Akita K, Kutsuna N, Kobayashi R, Hasezawa S, Miura T (2016) Exogenous cellulase switches cell interdigitation to cell elongation in a RIC1-dependent manner in Arabidopsis thaliana cotyledon pavement cells. Plant Cell Physiol 58:106-119 DOI: 10.1093/pcp/pcw183 査読有
12. Inada N, Betsuyaku S, Shimada TL, Ebine K, Ito E, Kutsuna N, Hasezawa S, Takano Y, Fukuda H, Nakano A, Ueda T (2016) Modified endosomal identity of the interface between

- plants and obligate biotrophic pathogens. *Plant Cell Physiol* 57: 1854-1864 DOI: 10.1104/pp.15.01265 査読有
13. Kimata Y, Higaki T, Kawashima T, Kurihara D, Sato Y, Yamada T, Hasezawa S, Berger F, Higashiyama T, Ueda M (2016) Cytoskeleton dynamics control the first asymmetric cell division in *Arabidopsis* zygote. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:14157-14162 DOI: 10.1073/pnas.1613979113 査読有
 14. Shimono M, Higaki T, Kaku H, Shibuya N, Hasezawa S, Day B (2016) Quantitative evaluation of stomatal cytoskeletal patterns during the activation of immune signaling in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 11: e0159291 DOI: 10.1371/journal.pone.0159291 査読有
 15. Hashimoto-Sugimoto, M. Negi J, Monda K, Higaki T, Isogai Y, Nakano T, Hasezawa S, Iba K (2016) Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt the stomatal responses to CO₂. *J Exp Bot* 67:3251-3261 DOI: 10.1093/jxb/erw134 査読有
 16. Inada N, Higaki T, 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* 129:103-110 DOI: 10.1007/s10265-015-0769-9 査読有
 17. Inada N, Higaki T, Hasezawa S (2016) Nuclear function of subclass I actin depolymerizing factor contributes to susceptibility in *Arabidopsis* to an adapted powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 170:1420-1434 DOI: 10.1104/pp.15.01265 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 植田美那子, 木全祐資, 田中小百合, 加藤壮英, 桧垣匠, 栗原大輔, 山田朋美, 安藤奈央恵, 森田(寺尾)美代, 瀬上紹嗣, 前島正義, 馳澤盛一郎, 桑田啓子, 佐藤綾人, 鈴木孝征, 東山哲也, 田坂昌生, "シロイヌナズナにおける初期胚のライブイメージング", 第60回日本植物生理学会年会 2019年3月13日(水)~15日(金)名古屋大学: 東山キャンパス(愛知県名古屋市)
2. 木全祐資, 加藤壮英, 桧垣匠, 栗原大輔, 山田朋美, 瀬上紹嗣, 森田(寺尾)美代, 前島正義, 馳澤盛一郎, 東山哲也, 田坂昌生, 植田美那子, "ライブイメージングによる受精卵の極性化における液胞の動態と役割の解明", 2018年9月14日(金)~9月16日(日)広島国際会議場(広島県広島市)
3. 酒井友希, 西浜竜一, 桧垣匠, 河内孝之, 馳澤盛一郎, "ゼニゴケの胞子発芽に伴う微小管の動態", 日本植物学会第82回大会 2018年9月14日(金)~9月16日(日)広島国際会議場(広島県広島市)
4. Takahashi S, Higaki T, Hasezawa S, Iba K, "Characterization of a mutant, *pist1*, that has increased stomatal response to CO₂ when *Arabidopsis* plant is treated with phosphatidylinositol 4-kinase inhibitor, PAO.", International Conference on Arabidopsis Research to be held from 25-29th June 2018 in Turku, Finland.
5. 秋田佳恵, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, "孔辺細胞の分布に高CO₂処理が及ぼす影響の解析", 第59回日本植物生理学会年会 2018年3月28日~30日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
6. 野村俊尚, 井藤賀操, 桧垣匠, 櫻井哲也, 馳澤盛一郎, 榊原均, "ホンモンジゴケにおける銅輸送体を介した銅耐性機構", 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月28日~30日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
7. 桧垣匠, 秋田佳恵, 馳澤盛一郎, "細胞骨格の束化を定量解析する画像解析手法の開発", 第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月28日~30日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
8. 木戸祐資, 桧垣匠, 河島友和, 栗原大輔, 佐藤良勝, 山田朋美, 馳澤盛一郎, "受精卵の不等分裂を制御する細胞骨格ダイナミクス", 日本植物学会第81回大会, 2017年9月8日~10日東京

理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）

9. 平川由美, 桧垣匠, 永田晋治, 馳澤盛一郎, "軟腐病細菌培養濾過液における細胞死誘導タンパク質の分離", 日本植物学会第 81 回大会, 2017 年 9 月 8 日 ~ 10 日 東京理科大学・野田キャンパス（千葉県野田市）
10. 木全祐資, 桧垣匠, 河島友和, 栗原大輔, 佐藤良勝, 山田朋美, 馳澤盛一郎, Frederic Berger, 東山哲也, 植田美那子, "ライブイメージングで探る受精卵の極性化過程における細胞骨格の動態", 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日 ~ 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）
11. 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年会, 2017 年 3 月 16 日 ~ 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）
12. 野村俊尚, 櫻井哲也, 刑部祐里子, 刑部隆史, 馳澤盛一郎, 榊原均, "ゲノム編集技術で紐解くホンモンジゴケの銅耐性機構", 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16 日 ~ 18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）
13. 木全祐資, 桧垣匠, 河島友和, 栗原大輔, 佐藤良勝, 山田朋美, 馳澤盛一郎, Frederic Berger, 東山哲也, 植田美那子, "植物受精卵のライブイメージング:細胞極性とは何か?", 第 80 回日本植物学会大会, 2016 年 9 月 16 日 ~ 9 月 19 日, 沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）
14. 大久保啓亮, 桧垣匠, 笹部美和子, 町田泰則, 馳澤盛一郎, "アクチン重合阻害剤を用いたフラグモプラスト微小管の形成過程の解析", 第 80 回日本植物学会大会, 2016 年 9 月 16 日 ~ 9 月 19 日, 沖縄コンベンションセンター（沖縄県宜野湾市）

〔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

(3) 連携研究者

長谷部 光泰（HASEBE, Mitsuyasu） 基礎生物学研究所・発生遺伝学研究部門・教授 研究者番号：40237996

河内 孝之（KOUCHI, Takayuki） 京都大学・生命科学研究科・教授 研究者番号：40202056

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。