

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2010

課題番号：22870004

研究課題名（和文）顕微鏡画像の多量取得解析とシミュレーションによる孔辺細胞の力学的応答解析

研究課題名（英文）Mechanical simulation and imaging studies on stomatal movement

研究代表者

桧垣 匠 (HIGAKI TAKUMI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：90578486

研究成果の概要（和文）：本研究では、各種細胞内構造が蛍光標識されたシロイヌナズナ孔辺細胞の顕微鏡画像を多数取得し、細胞サイズの標準化と輝度の加算平均を介した顕微鏡画像解析を実施することで、気孔開口に伴って細胞連結部でアクチン繊維とエンドソームの量が増加すること、逆に小胞体は減少することを見出した。

研究成果の概要（英文）： I acquired microscopic images of GFP-labeled Arabidopsis guard cells, and performed automatic image analysis concerning statistical intracellular localization. I found that actin microfilaments and endosomes increased at connection region during stomatal opening, and endoplasmic reticulum decrease at the connection region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
年度			
総計	1,260,000	378,000	1,638,000

研究分野：植物分子生物・生理学

科研費の分科・細目：オルガネラ・細胞壁

キーワード：気孔, アクチン繊維, エンドソーム

1. 研究開始当初の背景

気孔開閉は高等植物のガス交換や水分調節に関与する重要な細胞運動です。気孔開閉運動に関して、光や植物ホルモンの受容体、シグナル伝達物質や膜輸送体を標的とした分子生物学的研究から極めて詳細な機構が明らかとなっけています。一方、気孔開閉運動における細胞生物学的な解析は、これらに比べて遅れているのが現状です。しかし、細胞骨格系の機能阻害により気孔開閉運動が抑制される (Higaki et al., 2010, Plant J) などの最近の知見が示すように、気孔開閉運動の全

貌解明にとって細胞生物学的な解析は重要なアプローチと考えられました。

これまで研究代表者は日周期依存的な気孔開閉運動における細胞内構造の動態を網羅的に明らかにするため、蛍光タンパク質により各種細胞内構造を可視化した形質転換体を用いて孔辺細胞の顕微鏡画像を多量取得し、独自に開発した細胞内構造動態に関する定量解析フレームワークを用いて解析を進めてきました。また、解析の過程で得られた画像をデータベース化し、Live Images of Plant Stomata (LIPS)として独自に構築・公

開してきました。LIPS データベースでは、計 28,836 枚の画像とこれらに対応する全 930 細胞対の形態計測情報を公開しています (<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/lips/>)。

2. 研究の目的

本研究では気孔開閉運動に伴う細胞内構造の動態を記述すること、また有限要素法による力学シミュレーションから気孔開閉運動における力学的負荷を可視化し、細胞内構造との関係性を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の方法

アクチン繊維・エンドソーム・小胞体に関して、共焦点レーザー顕微鏡による三次元情報により、細胞内分布を統計的・立体的に可視解析しました。同時に、有限要素法による孔辺細胞の力学シミュレーションを実施し、気孔開口時における細胞の力学的ストレスの予測と可視化を行いました。

4. 研究成果

アクチン繊維・エンドソーム・小胞体が蛍光標識されたシロイヌナズナ孔辺細胞の顕微鏡画像を多数取得し、細胞サイズの標準化と輝度の加算平均を介した顕微鏡画像解析を実施することで、気孔開口に伴って細胞連結部でアクチン繊維とエンドソームの量が増加すること、逆に小胞体は減少することを見出しました (図 1)。そのほかの細胞内構造 (細胞核、微小管、微小管プラス端、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシソーム、ゴルジ体、液胞膜) についても同様の手法で検討しましたが、細胞連結部に主な局在を示す構造は見出されませんでした。

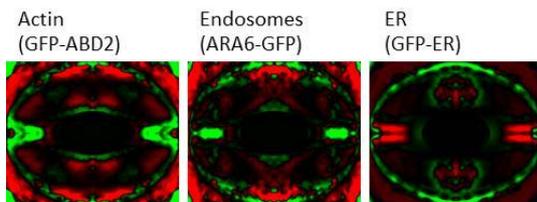


図 1. 気孔開閉における細胞内構造の動態. 赤色が閉鎖, 緑色が開口に特徴的な局在を示す. それぞれ 60 細胞の輝度平均に基づいて作成した.

また、GFP-PIP2a により細胞膜が可視化された形質転換株を用いて孔辺細胞の連結部における細胞膜構造を立体的に観察しました。その結果、気孔開口に伴って孔辺細胞間どうしの距離が短くなり、細胞連結部で力学的な負荷が生じている可能性が示唆されました (図 2)。

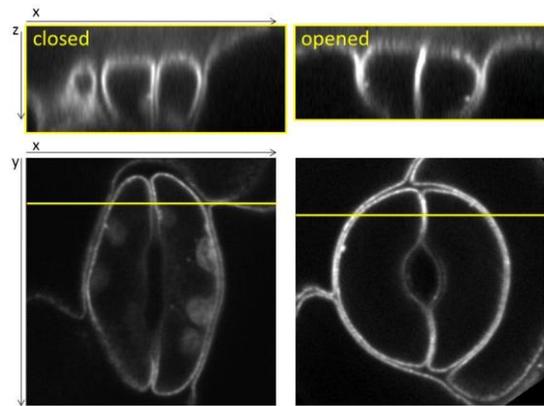


図 2. 気孔開閉における細胞膜の立体構造. 左に気孔閉鎖時の孔辺細胞、右に開口時の孔辺細胞の細胞膜構造を示す. また、上に XY 平面, 下に XZ 平面を示した.

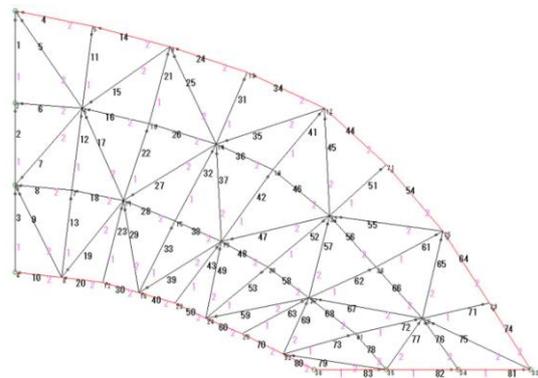
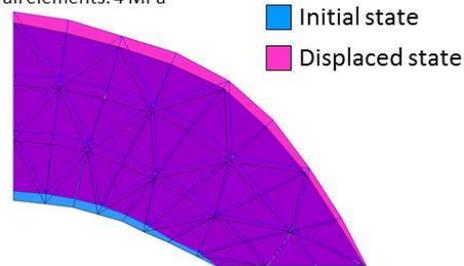


図 3. シロイヌナズナ成熟葉の孔辺細胞 (1860 細胞) に基づいた孔辺細胞のトラスモデル. このモデルに基づいて力学シミュレーションを実施した.

isotropic condition

all elements: 4 MPa



anisotropic condition

radial elements: 40 MPa, other elements: 4 MPa

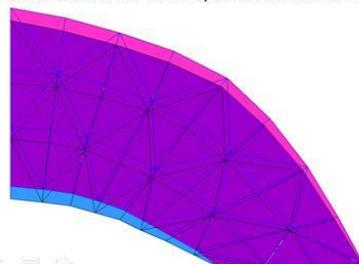


図 4. 有限要素法による気孔開口のシミュレーション.

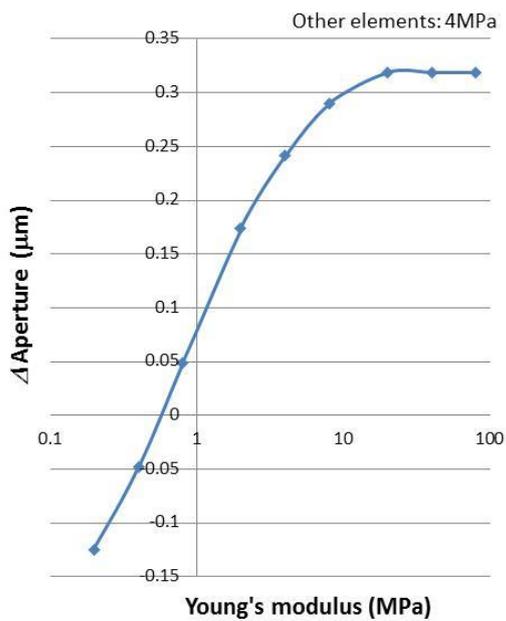


図 5. 孔辺細胞の伸長方向の制限と気孔開度の関係. 細胞短軸方向の部材のヤング率に対する気孔開度をプロットした.

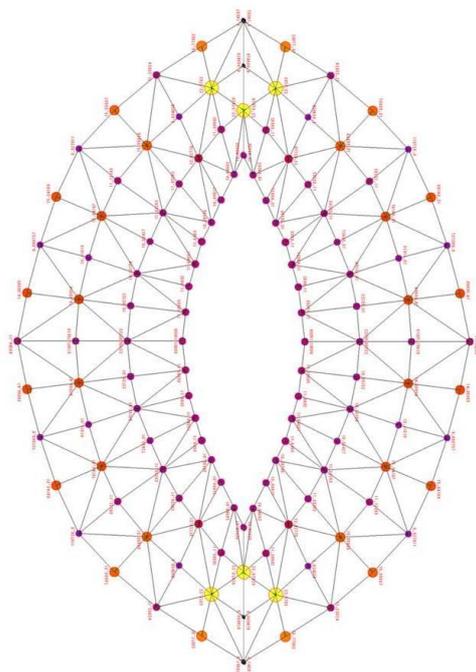


図 6. 有限要素法による気孔開口時の応力. 気孔開口に伴い, 細胞連結部において強い応力が生じることが示された.

そこで, 実測値に基づいたシロイヌナズナ孔辺細胞の二次元トラス構造モデルを設計し, 有限要素法による力学シミュレーションを実施しました(図 3). 孔辺細胞を構成する

部材の力学的パラメタおよび拘束箇所の条件を複数検討した結果(図 4), 実画像に基づいた細胞長軸方向に垂直な表層微小管により構築されると示唆される細胞伸長方向の制限を条件に加えることで気孔開度が高まること(図 5), 気孔開口を模す変位を示す条件において細胞連結部に強い応力が生じること(図 6), が明らかになりました. 以上の結果から 力学的負荷に応じて細胞内構造が同的に再編成される可能性が示唆されました.

さらに, 片方の孔辺細胞を欠失させた場合, 細胞連結部における応力の分布が孔側に変位したことから, 細胞連結部における応力には隣の孔辺細胞の存在が必要な要件であることが示唆された(図 7).

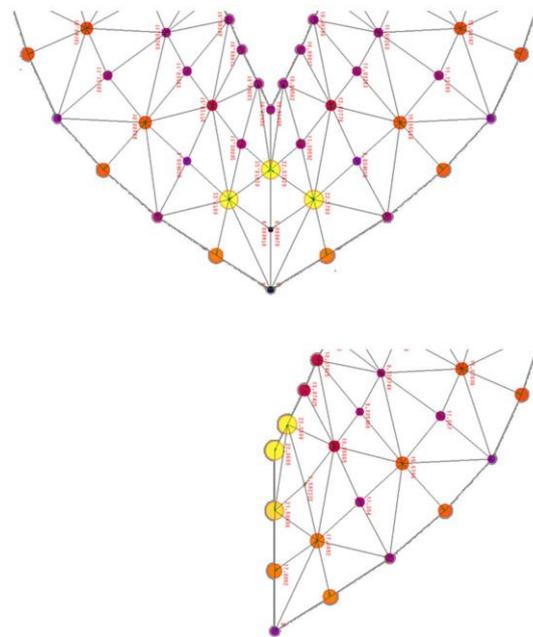


図 7. 片側の細胞を欠失させた場合の応力分布の変化. 上に一対の孔辺細胞, 下に単独の孔辺細胞に膨圧を生じさせた結果を示す.

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 4 件)

1. Higaki T, Kurusu T, Hasezawa S, Kuchitsu K (2011) Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research* 124:315-24 査読有

2. Okubo-Kurihara E, **Higaki T**, Kurihara Y, Kutsuna N, Yamaguchi J, Hasezawa S (2011) Sucrose transporter NtSUT4 from tobacco BY-2 involved in plant cell shape during miniprotoplast culture. *Journal of Plant Research* 124:395-403 査読有
3. **桧垣匠**、秋田佳恵、近藤矩朗、朽名夏磨、馳澤盛一郎気孔開閉運動の力学シミュレーションと細胞内構造の動態解析 (2011) 第52回日本植物生理学会年会要旨集 pp.167 査読無
4. Yoneda A, Ito T, **Higaki T**, Kutsuna N, Saito T, Ishimizu T, Osada H, Hasezawa S, Matsui M, Demura T (2010) Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. *The Plant Journal* 64:657-67 査読有

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧垣 匠 (HIGAKI TAKUMI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
特任研究員

研究者番号：90578486