

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25711017

研究課題名(和文)高CO₂による気孔分布パターン形成の解析研究課題名(英文)Plant stomata developmental regulation in response to elevated CO₂

研究代表者

桧垣 匠(Higaki, Takumi)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：90578486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：高CO₂と気孔発生の関連についてはWoodwardが博物館標本の調査結果を1987年にNatureに発表したことに端を発する。以来、当該研究領域において様々な研究が精力的に推進されたが不明瞭な結果も多く、未だ統一した見解は得られていない。本研究ではシロイヌナズナ子葉をモデル材料として気孔分布パターン形成に対する高CO₂の影響を多面的かつ定量的に検討した。その結果、高CO₂は気孔分化と表皮細胞の拡大成長の両方に影響を及ぼすため、両者のバランスによって最終的な表現型が決定される可能性が示唆された。本研究により高CO₂と気孔分化に関わる30年来の問題に統一した理解を得る道筋がつけられたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plants regulate guard cell differentiation in response to environmental cues including CO₂ levels. Some reports have shown that elevated CO₂ concentrations suppress stomatal development, but other studies could not reproduce the effect. To clarify this issue, quantitative imaging analysis of stomatal pattern formation was conducted with Arabidopsis cotyledons grown under ambient and elevated CO₂ conditions. Our microscopic image analysis revealed that elevated CO₂ did not affect stomatal density/index but perturbed the uniform distribution of stomata, with excess satellite stomata and meristemoids. We then used an overexpression line of a gene for a DNA replication licensing factor, CDC6, which was reported to positively regulate satellite meristemoid production. The overexpressor showed hypersensitivity to elevated CO₂-induced stomatal distribution changes, suggesting that elevated CO₂ positively regulates CDC6-mediated satellite stomata production, at least in Arabidopsis cotyledons.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：気孔 二酸化炭素 葉表皮細胞 バイオイメージング シロイヌナズナ 形態計測 画像クラスタリング 数理モデル

1. 研究開始当初の背景

気象庁による綾里、南鳥島及び与那国島の観測地点での測定によると、大気中CO₂濃度はノコギリの刃のような季節変化を繰り返しながら上昇し続けており、2012年2月には月平均値がはじめて400ppmに達した。また、大気CO₂濃度とほぼ同期して年間平均気温も上昇を続けている。大気CO₂濃度の季節変化は植物の光合成活動の影響によるものことから、植物のCO₂固定能が大気環境に及ぼす影響は明らかである。このような状況を踏まえて、植物が正常な光合成生産を営む上で鍵となる気孔の高CO₂応答の理解は植物科学における急務の重要課題と位置づけられた。

植物が高CO₂環境に晒されると短期的には、積極的にCO₂を取り込む必要がなくなるために気孔は閉じる。この気孔閉鎖運動の鍵因子として、HT1キナーゼ(Hashimoto et al. 2006)やアニオンチャネルSLAC1(Negi et al. 2008)などが同定されており、短期的高CO₂応答の分子的知見は着実に深まっていた。その一方、植物の長期的な高CO₂応答として気孔密度との関連が示唆されているものの、分子レベルでの解明には至っておらず、片手落ちの状態が続いていた。

Woodward(1987)は博物館に収蔵されている標本の調査からCO₂濃度がおよそ250ppmであった産業革命当時に比べ、それ以降に起きたおよそ100ppm以上のCO₂濃度の増加に伴い、各種植物の気孔密度が有意に低下することを報告している。また、実験環境下においても同様の気孔密度の減少を報告している(Woodward & Bazzaz 1988)。ところが、そのような気孔密度の低下は必ずしも追認されていない(Estiar et al. 1994, Ferris and Taylor 1994, Gay and Hauck 1994, Dixon et al. 1995, Bettarini et al. 1998)。この矛盾は実験条件や種による応答性の違いに帰する可能性がある一方で、従来の気孔密度測定において常識的に用いられてきた高倍率の顕微鏡観察では、気孔の分布パターンが変化した場合、気孔密度の測定結果にバイアスが生じる可能性も考えられた。

ペゴニア属などの一部の例外を除き、ほとんどの双子葉植物では、気孔の配置は一定の間隔を保った規則的なパターンを示す(Korn 1972, Sachs 1974, 1990)。このような気孔分布パターンの規則性と環境応答の関係についてはほとんど報告がなかった。本研究代表者はシロイヌナズナの子葉表皮組織全体を可視化した広域画像取得解析により、高CO₂条件で栽培した場合、気孔密度に大きな変化は認められないものの、気孔と気孔が対を成して近い位置に局在するように気孔の分布パターンの規則性が変化する可能性を見出していた。そこで、高CO₂条件により気孔分布パターンの規則性が変化する機構と意義を顕微鏡学的に解明する研究計画を着想するに至った。

2. 研究の目的

高CO₂は植物の(1)原表皮細胞からメリステモイド母細胞への分化速度、および(2)表皮細胞の形態形成に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、気孔系譜が特異的にGFPで標識されたエンハンサートラップライン(E1627, E1728, Gardner et al. 2008)、および蛍光色素FM4-64による生体染色により子葉表皮組織における気孔分化パターンと細胞形態を経時的に可視化するとともに、子葉表皮組織全体の広域顕微鏡画像解析法を用いて、高CO₂の影響を定量的かつ統計的に明らかにすることを目指した。また、高CO₂処理によってDNA複製ライセンシング因子CDC6の発現が上昇する可能性が示されていた。CDC6は原表皮細胞からメリステモイド母細胞への分化を正に制御することが報告されている(Castellano et al. 2004)。そこで、CDC6過剰発現が気孔分布パターンを変化させる可能性を広域顕微鏡画像の取得解析により検証した。さらに、ジグソーパズル型の形態を呈する表皮細胞の形態形成機構を数理モデル解析により検討し、細胞形態に対する高CO₂の影響についても考察した。

3. 研究の方法

本研究では1/2ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類を含むゲランガム培地上で栽培したシロイヌナズナの子葉を解析対象とした。CO₂濃度を制御するため、日本医科器械製作所製のCO₂濃度制御機能付きの卓上人工気象器LH-55-RDS-CO₂を使用した。植物材料としては、シロイヌナズナ野生株(Col-0, Col-7)に加えて、気孔系譜が特異的にGFPで標識されたエンハンサートラップライン(E1627, E1627, Gardner et al. 2008)、CDC6過剰発現体(Castellano et al. 2004)、葉表皮組織に異常を呈する変異体として*kor1*変異体(Nicol et al. 1998, Lane et al. 2001)、*ric1*変異体(Fu et al. 2005)、*ktn1*変異体(Nakamura et al. 2010)などを用いた。また、細胞膜の生体染色には蛍光色素FM4-64を利用した(Higaki et al. 2014)。顕微鏡画像撮影にはオリンパス製の共焦点レーザー顕微鏡FV300を主に用い、必要に応じて横河電機製の共焦点スキャンユニットCSU-X1に基づく顕微鏡システムも使用した。画像解析による形態特徴計測は主にImageJソフトウェア(Abramoff et al. 2004)を用いて実施した。

4. 研究成果

気孔の位置を正確かつ高効率に捉えるために孔辺細胞特異的にGFPを発現するシロイヌナズナ(Col-0)のエンハンサートラップラインE1627およびE1728(Gardner et al. 2009)を材料にし、発芽後3-8日目における背軸側の子葉表皮の連続光学切片像を取得した。取得画像群から子葉面積を測定したところ、高CO₂処理(1000ppm)により子葉面積の増加速度が亢進する傾向が認められ

た。また、気孔の密度と分布を評価した結果、高CO₂処理により気孔密度に目立った変化は検出されなかったが、最近傍にある気孔どうしの距離が狭まるなど、気孔の分布に関しては顕著な変化を見出した。気孔は原表皮細胞がメリステモイド母細胞へ分化し、さらにこれが不等分裂することで生じるメリステモイドに由来する。この不等分裂により生じるもうひとつの娘細胞 stomatal lineage ground cell は表皮細胞へ分化する場合と再度の不等分裂により気孔を形成する場合がある。後者の場合、気孔間の距離は狭まるため、高CO₂条件では原表皮細胞の気孔分化頻度が促進することで気孔の分布が変化する可能性が考えられた。この仮説は高CO₂によって気孔密度が低下したとする従来の報告と一見矛盾するように思われるが、少なくともシロイヌナズナ子葉の場合は高CO₂処理によって気孔分化が促進されても同時に葉面積拡大速度も促進されるため、結果として気孔密度に顕著な差が生じなかった可能性が考えられた。この仮説は、原表皮細胞からメリステモイド母細胞への分化を促進することが報告されている DNA 複製ライセンシング因子 CDC6 の遺伝子発現が高CO₂処理後の早い時期に亢進される結果からも支持された。そこで、CDC6 過剰発現体における気孔分布を確認したところ、380 ppm 条件下でも気孔分布が狭まることが確認できた。さらに、高CO₂応答性を検討したところ CDC6 過剰発現体では、高CO₂条件では気孔分布が過剰に狭まることがわかった。これらの結果から、DNA 合成に参与する CDC6 が高CO₂処理による気孔分布変化に参与する可能性が示唆された。

一方、高CO₂による葉面積拡大亢進が成熟した子葉における気孔密度に及ぼす影響を明らかにするため、380、1000 ppm CO₂条件で3週間栽培した子葉を用いて気孔密度の測定を実施した。その結果、高CO₂処理の場合に2割ほど気孔密度が低下することが判明した。この結果は上記の仮説と矛盾しない。また、高CO₂処理による葉面積拡大率増加の要因として、表皮細胞の細胞分裂もしくは細胞拡大の亢進が考えられた。そこで、両者の寄与を明らかにするため、蛍光色素 FM4-64 を用いて380、1000 ppm CO₂条件におけるE1728の子葉全域の細胞膜をそれぞれの条件で3葉ずつ撮影し、ほぼ全ての表皮細胞を半自動的に領域分割することで表皮細胞の計数を行った。その結果、CO₂濃度による表皮細胞密度に有意な差は認められず、高CO₂処理による葉面積拡大率の亢進の要因は細胞拡大の亢進である可能性が示唆された。この結果は細胞形態の定量解析結果からも支持された。

様々な植物種や栽培条件を用いた従来の研究では、高CO₂処理によって気孔密度が低下する場合や変化しない場合など様々な結果の報告がなされており、統一的な結果は得られていなかった。これは気孔分化頻度と葉面積拡大に対する高CO₂の効果のバランスが

植物種や栽培条件に応じて異なるためかもしれない。本研究によって高CO₂と気孔発生に関する30年来の問題に対して統一的な理解を得る道筋がつけられたと考えられる。

さらに、ジグゾーパズル型の表皮細胞形態の定量解析法を検討した。表皮細胞の形状を評価するためのデータセットとして、表皮細胞の形態に異常が認められる *kor1* 変異体 (Nicol et al. 1998, Lane et al. 2001), *ric1* 変異体 (Fu et al. 2005), *ktm1* 変異体 (Nakamura et al. 2010), セルラーゼ処理した野生株 (Higaki et al. 2016, 2017) の子葉表皮組織の共焦点画像を撮影し、細胞形態特徴に基づくクラスタリングを実施した。複数種類の特徴量を検討した結果、稠密度が表皮細胞に特徴的なジグゾーパズル型の形態形成を定量的に表現できる尺度と判断された。また、数理モデル解析の専門家である九州大学・三浦岳教授らのグループとの協働により、葉表皮細胞のジグゾーパズル型形態形成を理解するための数理モデルについての検討を実施した (Higaki et al. 2016, 2017)。表皮細胞の形態形成を説明するモデルを実験的に検討するため、細胞形態に異常が認められる *kor1* 変異体およびセルラーゼ処理区の細胞壁の微細構造観察を実施したところ、*kor1* 変異体およびセルラーゼ処理区における細胞壁の肥厚と湾曲の低減を理論的に説明することができた (Higaki et al. 2016)。

また本研究の実施に伴い、細胞形態特徴や細胞壁微細構造などを定量評価するための画像解析手法の開発など複数の技術的な進捗が得られた。これらの技術は本研究の主目的である植物のCO₂応答以外の研究にも適用され、研究開始時には予期していなかった展開が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

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. 査読有 doi: 10.1007/s00709-016-0955-1.

Takahashi M, Umetsu K, Oono Y, Higaki T, Blancaflor E, Rahman A (2017) SMALL ACIDIC PROTEIN 1 (SMAP1) and SCFTIR1 ubiquitin proteasome pathway act in concert to induce 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-mediated alteration of actin in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 89: 940-956. 査読有 doi: 10.1111/tpj.13433.

Higaki T, Takigawa-Imamura H, Akita K, Kutsuna N, Kobayashi R, Hasezawa S,

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* 58: 106-119. 査読有 doi: 10.1093/pcp/pcw183.

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 U S A* 113: 14157-14162. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1613979113

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. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0159291.

Higaki T, Kutsuna N, Akita K, Takigawa-Imamura H, Yoshimura K, Miura T (2016) A theoretical model of jigsaw-puzzle pattern formation by plant leaf epidermal cells. *PLOS Comput Biol* 12: e1004833. 査読有 doi: 10.1371/journal.pcbi.1004833.

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. 査読有 doi: 10.1093/jxb/erw134.

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. 査読有 doi: 10.1104/pp.15.01265.

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. 査読有 doi: 10.1007/s10265-015-0769-9.

Higaki T (2015) Real-time imaging of plant cell surface dynamics with variable-angle epifluorescence microscopy. *J Vis Exp* 106: e53437. 査読有 doi: 10.3791/53437.

Akita K, Higaki T, Kutsuna N, Hasezawa S (2015) Quantitative analysis of microtubule orientation in interdigitated leaf pavement cells. *Plant Signal Behav* 10: e1024396. 査読有 doi: 10.1080/15592324.2015.1024396.

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

Higaki T, Hashimoto-Sugimoto M, Akita K, Iba K, Hasezawa S (2014) Dynamics and environmental responses of PATROL1 in *Arabidopsis* subsidiary cells. *Plant Cell Physiol* 55: 773-780. 査読有 doi: 10.1093/pcp/pct151.

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

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

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

[学会発表](計12件)

桧垣 匠、今村 寿子、秋田 佳恵、朽名 夏磨、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年会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市) 2017 年 3 月 16 日

桧垣 匠 細胞動態を理解するための画像解析とモデル解析 日本植物学会第 80 回大会シンポジウム 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)2016 年 9 月 16 日

Takumi Higaki, Natsumaro Kutsuna, Kae Akita, Hisako Takigawa-Imamura, Kenji Yoshimura, Seiichiro Hasezawa, Takashi Miura A model jigsaw puzzle pattern formation by plant leaf epidermal cell wall The 57th Annual meeting of The Japanese Society of Plant Physiologists Iwate University (Iwate, Iwate) 18th March 2016

桧垣 匠 細胞生物学が数値解析に見る夢 京都大学数理解析研究所研究集会「現象解明に向けた数値解析学の新展開」京都大学(京都府京都市)2015 年 11 月 18 日

桧垣 匠 画像解析による生物微細構造の認識 第 6 回 植物電子顕微鏡若手ワーク

シヨップ 理化学研究所横浜キャンパス
(神奈川県横浜市) 2015年9月25日
桧垣 匠、今村 寿子、秋田 佳恵、朽名 夏
磨、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 回大会 朱鷺メ
ッセ(新潟県新潟市) 2015年9月6日
Takumi Higaki, Kae Akita, Seiichiro
Hasezawa Elevated CO2 promotes satellite
stomatal production via DNA replication in
Arabidopsis cotyledons 48th Annual Meeting
of the Japanese Society of Developmental
Biologists (Tsukuba, Ibaraki) 3rd Jun 2015
桧垣 匠, 橋本(杉本) 美海, 秋田 佳恵,
花俣 繁, 射場 厚, 馳澤 盛一郎 気孔開
口運動における表層微小管機能に関する
再検証: 膜交通因子 PATROL1 との関係
第 56 回日本植物生理学会年会 東京農業
大学(東京都世田谷区) 2015年3月16
日
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 回大会 明治大学(神
奈川県川崎市) 2014年9月12日
桧垣 匠、秋田 佳恵、朽名 夏磨、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 富山大学(富山
県富山市) 2014年3月18日
桧垣 匠、朽名 夏磨、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 回大会・認定 NPO
法人総合画像研究支援主催シンポジウム
「新世代の画像情報が切り開く世界」北
海道大学(北海道札幌市) 2013年9月
13日
三浦 岳、桧垣 匠 細胞壁と頭蓋骨:パタ
ーン形成ダイナミクスの数理モデルによ
る統合的理解 第 46 回日本発生物学会
年会 サテライトシンポジウム「植物の逆
襲」くにびきメッセ(島根県松江市)2013
年5月28日

〔その他〕

東京大学新領域創成科学研究科ニュース「植
物の細胞壁が外部刺激に応答する分子機構
の一端を解明」2016年12月23日
[http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entr
y46/](http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entry46/)

東京大学新領域創成科学研究科ニュース「葉
っぱと頭蓋骨の意外な関係? ~植物細胞
の変形を説明する新理論を確立~」2016年4
月7日
[http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entr
y36/](http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entr
y36/)

科学技術館 サイエンス友の会 実験教室
「葉っぱの赤ちゃんから大人まで」

2015年5月10日、24日
[https://manabi.jsf.or.jp/scienceclub/?func_
id=201515-J016-0](https://manabi.jsf.or.jp/scienceclub/?func_id=201515-J016-0)

東京大学新領域創成科学研究科ニュース「省
力・低コストで電子顕微鏡画像からオルガネ
ラを検出する方法を開発」2015年1月15日
[http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entr
y24/](http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entr
y24/)

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・
特任准教授

研究者番号: 90578486