

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291056

研究課題名(和文) イメージング画像定量解析とシミュレーションによる植物細胞の分化形態形成機構の解明

研究課題名(英文) Study in the mechanism of differentiation and morphogenesis in plant cells by imaging quantitative analysis and simulation

研究代表者

馳澤 盛一郎 (HASEZAWA, Seiichiro)

東京大学・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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞内構造を標識した形質転換植物、およびイメージング・画像定量解析の手法を独自に開発して、細胞内構造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た。具体的には以下の4項目について実施した。(1)葉表皮細胞のイメージング・画像定量解析、(2)葉表皮細胞壁の人為的変形と細胞形態解析、(3)高CO₂やUV-B処理による植物細胞の形状変化の解析、(4)イメージング・画像定量解析手法の独自開発。結果として、各々について多数の重要な知見が得られ、また多くの論文として上梓した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the intracellular structure-labeled transformed plants and imaging-quantitative analysis techniques have been developed. The cell morphogenesis and dynamics of the intracellular structures were analyzed by the image processing. The following four items were performed. (1) imaging-quantitative analysis of leaf epidermal cells, (2) analysis of artificial deformation and cell morphology in leaf epidermal cell wall, (3) analysis of the change in plant cell morphogenesis by high CO₂ and UV-B treatments, (4) development of imaging-quantitative analysis techniques. Finally, a number of important knowledges, obtained for each item, have been published in many papers.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：オルガネラ 細胞骨格 細胞壁 イメージング 画像定量解析

1. 研究開始当初の背景

本研究では細胞内構造を標識した形質転換植物、およびイメージング・画像定量解析の手法を独自に開発して、細胞内構造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た。その背景としては、複雑に入組んだ葉表皮細胞の形態形成における表層微小管の動態をイメージングにより明らかにすると同時に、アクチン繊維、分泌小胞などについても可視化を実施し、これらが制御する細胞形態形成機構を多角的に研究する必要があった。細胞壁によって規定される細胞形状は個別の細胞機能に加えて、湾曲によって細胞間の連結面積を増すなどの幾何学的要因により細胞間信号伝達に影響を及ぼすものと考えていた。そこで、我々は双子葉植物の葉表皮細胞に特徴的なジグソーパズル形状の機能を可視化とモデル化によって理解する本研究を考案した。本研究では、葉表皮細胞に植物ホルモン・細胞壁分解酵素、ガス、紫外線などの処理を行うことで、細胞形状の変化を誘導する3種の実験系を採用した。具体的には、植物ホルモンや細胞壁分解酵素処理による湾曲の亢進・抑制および高CO₂環境やUV-B照射による細胞形態変化・面積の増減などの表皮細胞の形状変化の実験系を用いて、細胞形状や細胞間の連結状況を幾何学的特徴として計測すること、定量的な評価を行うこと、さらに、これまで我々が可視化解析を進めてきた細胞内構造、特に葉表皮細胞の形態形成に重要と考えられる表層微小管をメインにアクチン繊維、分泌小胞についてもイメージング画像定量解析を実施し、細胞形態との比較解析を行うことで、植物細胞の形態形成の各プロセスにおけるこれらの因子の重要度の定量化も可能となると考えられた。

2. 研究の目的

我々は、画像解析を駆使した植物細胞内構造

の可視化解析系およびシミュレーション解析系の開発を進めてきた。本研究の目的は、これまでの経験と技術を活かし、表層微小管をはじめとする細胞内構造に着目し、組織構築とこれらの関係について定量的な観点から検証を進めることにあった。はじめに、複雑な形態をとるシロイヌナズナ葉表皮細胞の形状を植物ホルモン・細胞壁分解酵素、ガス、紫外線により制御する実験系を用いて、植物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、イメージング技術によってこれら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する。次に、そこで取得された画像をもとに、独自開発の画像解析手法による細胞形態計測を実施する。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。これにより、複雑な形状の細胞が入り組んだ葉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を定量的に推定することが可能となると考えた。さらに、その変化の過程における表層微小管、アクチン繊維、分泌小胞を可視化・追跡して、画像定量解析を行い、細胞形状との関連を定量的に把握する。また、細胞骨格阻害剤等が細胞形状および細胞連結様式に及ぼす影響を検討し、細胞間信号伝達における役割についても考察する。これら一連の解析により、植物細胞の形態形成機構の要因を特定することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

植物細胞の形態形成機構を定量的に解析すべく、複雑な形態をとるシロイヌナズナ葉表皮細胞を材料として、細胞内構造を標識した形質転換植物体およびイメージング・画像定量解析の手法を独自に開発して、葉表皮細胞の形態形成過程における細胞骨格等の動態や細胞形態形成の画像情報処理

による解析を行った。実験系としては、葉表皮細胞の形状を植物ホルモンや細胞壁分解酵素処理により制御し、細胞壁により規定される細胞形状および組織構造を定量評価し、処理濃度との関連を検討した。並行して、個々の細胞の隣接細胞数および細胞間の連結面積を測定して表皮組織をグラフ構造として記述することで、細胞ネットワークとして表皮組織を捉えなおすを試みた。このグラフ構造に基づいて仮想的な信号伝達物質の挙動をシミュレートした。これにより、仮想的な細胞間信号が伝達される可能性を検証した。同時に、細胞表面部の細胞骨格等について可視化解析を実施し、細胞壁の物性変化との関連を定量的に把握し、併せて細胞骨格阻害剤が細胞形状に及ぼす影響を検討した。また、上記処理法による実験系とともに、高CO₂やUV-B処理による葉表皮細胞の形状変化の誘導系を用いて、類似の方法で解析を行った。

さらに、この過程で必要になる多様なニーズに対応できる汎用性の高い可視化解析技術の充実を図った。特に、当研究室で独自に開発している画像マイニングソフトウェア・シミュレーションソフトウェアについてフィードバックを反映させ、機能の追加やユーザーインターフェースの向上を図った。ソフトウェアはインターネットを通じて世界の研究者に向けて公開している。

4. 研究成果

(1) 葉表皮細胞のイメージング・画像定量解析：表皮細胞の形態形成における微小管の役割について、本研究ではこれまで定性的に評価されていた微小管配向について定量的解析を行うことで、表皮細胞における微小管の役割を明らかにすることを目的とした。まず微小管が可視化された GFP-tubulin β 発現株を共焦点レーザー顕微鏡により撮像し、画像処理技術を用いて微小管を線分抽出

すると共に、表皮細胞を領域分割して複雑度の測定および細胞中心軸の抽出を行い、細胞形状を評価した。その結果、複雑度3から6を示す成熟過程の表皮細胞において微小管は細胞伸長方向と並行に配向していた。この配向は、これまで提唱されていた拡散成長よりも、細胞の一部が伸長する先端成長における微小管配向と類似しており、表皮細胞の突出領域は局所的に先端成長様の伸長を行うことが示唆された(Akita et al. 2015)。一方、ゴルジ体トランス槽膜に局在する Sialyl Transferase (ST) に蛍光タンパク質 mRFP を融合したタンパク質 ST-mRFP を発現するシロイヌナズナの葉表皮組織において、ST-mRFP がゴルジ体のほかに、表皮細胞辺縁部および孔辺細胞端部においても局在することを見出した。mRFP は表皮組織のアポプラストに局在することが明らかとなり、mRFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法においてもアポプラスト局在が確認された。これらの結果から、表皮細胞の形態形成過程で2細胞間からなる湾曲部に標的された局所的なエキソサイトーシスが存在する可能性が示唆された(Akita et al. 2016)。

(2) 葉表皮細胞壁の人為的変形と細胞形態解析：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の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。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を定量的に検討した。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、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。表皮細胞画像セットから、細胞面積・細胞周長・細胞複雑度・アスペクト比・稠密度・隣接細胞数・連結面積などの特徴を測定し、栽培日数・セルラーゼ濃度・葉における細胞位置との関連を検討した。セルラーゼ処理により細胞形状が変化した条件における表層微小管構造についても十分な撮影例数を得た上で、当研究室で開発した画像解析プログラムを用いて微小管の密度を定量評価し、細胞形状との関係を検討した。セルラーゼ処理により細胞形状が変化した条件における表層微小管構造についても画像解析プログラムを用いて微小管の密度を定量評価し、細胞形状との関係を明らかにした(Higaki et al. revised)。

(3) 高 CO₂ や UV-B 処理による植物細胞の形状変化の解析：高 CO₂ 処理が気孔の密度と分布に及ぼす影響についての定量的解析についての可視化解析を実施した。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を材料とし、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共焦点レーザー顕微鏡により取得した。一連の取得画像群から葉面積を測定したところ、高 CO₂ 処理 (1000 ppm) により葉面積が増加する傾向が認められた。また、気孔の位置を自動抽出する独自の画像解析プログラムを用いて気孔の密度と分布を評価した。その結果、高 CO₂ 処理によって気孔密度は顕著な変化が認められなかったが、最近傍にある気孔どうしの距離が狭まることがわかった。一方、UV-B 照射による葉細胞の形態変化については影

響が分明ではなかったため、UV-B 照射時に起こる細胞レベルでのストレス応答機構を解析するために、タバコ培養細胞 BY-2 を用いた実験系を確立した。本実験系において BY-2 の増殖阻害が見られる低線量 UV-B の照射では死細胞比率の顕著な増加は認められなかった。一方、高線量 UV-B の照射では増殖阻害と同時に死細胞比率も増加した。UV-B 照射時に生成する、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) の修復において、主要な役割を持つ光回復酵素は、UV-A 照射により活性化されることが知られている。低線量 UV-B 照射後に UV-A 照射をおこなうことで、増殖阻害を緩和できた。高線量 UV-B 照射後の UV-A 照射では増殖阻害を緩和できなかったが、細胞死誘導が部分的に抑制された。低線量、高線量 UV-B 照射の両条件で UV-A 照射により CPD 量減少が見られたが、その残存量には差が見られた。このことから、BY-2 細胞では UV-B 照射時の CPD 生成が引き金となって DNA 複製阻害が起こり、増殖阻害として観察されている可能性が示唆された(Takahashi et al. 2015)。

(4) イメージング・画像定量解析手法の独自開発：詳細は省くが上記の研究の遂行に関連して非常に多くの研究手法の新規開発を行った (下記の発表論文、学会発表参照)。

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 17 件)(全て査読有)

1. Akita, K., Kobayashi, M., Sato, M., Kutsuna, N., Ueda, T., Toyooka, K., Nagata, N., Hasezawa, S. and Higaki, T.: Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a trans-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated Arabidopsis leaf epidermal cells. *Protoplasma* in press. (2016) DOI: 10.1007/s00709-016-0955-1
2. Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Monda, K., Higaki, T., Isogai, Y., Nakano, T., Hasezawa, S. and Iba, K.: Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt the stomatal

- responses to CO₂. *J Exp Bot* in press. (2016) DOI: 10.1093/jxb/erw134
3. Inada, N., Higaki, T. and Hasezawa, S.: Nuclear function of subclass I actin depolymerizing factor contributes to susceptibility in Arabidopsis to an adapted powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 170: 1420-1434. (2016) DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.01265>
 4. Inada, N., Higaki, T. and Hasezawa, S.: 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 (2016) DOI: 10.1007/s10265-015-0769-9
 5. Takahashi, S., Kojo, K.H., Kutsuna, N., Endo, M., Toki, S., Isoda, H. and Hasezawa, S.: Differential responses to high- and low-dose ultraviolet-B stress in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Front Plant Sci* 6, 254 (2015) DOI: 10.3389/fpls.2015.00254
 6. Akita, K., Higaki, T., Kutsuna, N. and Hasezawa, S.: Quantitative analysis of microtubule orientation in interdigitated leaf pavement cells. *Plant Signal. Behav* e1024396 (2015) DOI: 10.1080/15592324.2015.1024396
 7. Nomura, T., Itouga, M., Kojima, M., Kato, Y., Sakakibara, H. and Hasezawa, S.: Copper mediates auxin signalling to control cell differentiation in the copper moss *Scopelophila cataractae*. *J Exp Bot* 66,1205-1213 (2015) DOI: 10.1093/jxb/eru470
 8. Higaki, T., Kutsuna, N., Akita, K., Sato, M., Sawaki, F., Kobayashi, M., Nagata, N., Toyooka, K. and Hasezawa, S.: Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Sci Rep* 5,7794 (2015) DOI: 10.1038/srep07794
 9. Hirakawa, Y., Nomura, T., Hasezawa, S. and Higaki, T.: Simplification of vacuole structure during plant cell death triggered by culture filtrates of *Erwinia carotovora*. *J Integr Plant Biol* 57, 127-135 (2015) DOI: 10.1111/jipb.12304
 10. Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N. and Matsuoka, K.: 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* 55, 1544-1555 (2014) DOI: 10.1093/pcp/pcu084
 11. Higaki, T., Hashimoto-Sugimoto, M., Akita, K., Iba, K. and Hasezawa, S.: Dynamics and Environmental Responses of PATROL1 in Arabidopsis Subsidiary Cells. *Plant Cell Physiol* 55, 773-80 (2014) DOI: 10.1093/pcp/pct151
 12. Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T., Kato, T., Hamada, T., Akamatsu, R., Ishida, Y., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Nomura, Y., Nakagami, H. and Hashimoto, T.: An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in Arabidopsis. *Current Biol* 23, 1969-1978 (2013) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.006>
 13. Akita, K., Hasezawa, S. and Higaki, T.: Breaking of the plant stomatal one-cell-spacing rule by sugar solution immersion. *PLoS ONE* 8, e72456 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0072456
 14. Kojo, K.H., Higaki, T., Kutsuna, N., Yoshida, Y., Yasuhara, H. and Hasezawa, S.: Roles of Cortical Actin Microfilament Patterning in Division Plane Orientation in Plants. *Plant Cell Physiol* 54, 1491-1503 (2013) DOI: 10.1093/pcp/pct093
 15. 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.: A Munc13-like protein in Arabidopsis mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Commun.* 4, 2215 (2013) DOI: 10.1038/ncomms3215
 16. Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y. and Hasebe, M.: Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast, *Nature Commun.* 4, 1967 (2013) DOI: 10.1038/ncomms2967
 17. Higaki, T., Kutsuna, N. and Hasezawa, S.: LIPS database with LIPService: a microscopic image database of intracellular structures in Arabidopsis guard cells. *BMC Plant Biol.* 13, 81 (2013) DOI: 10.1186/1471-2229-13-81
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. 朽名夏磨, 馳澤盛一郎, "顕微鏡画像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 回大会, 2015 年 9 月 6 日~8 日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)
 2. 稲田のりこ, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, "糸状菌病原体うどんこ病菌の感染確立における宿主シロイヌナズナのアクチン脱重合因子 ADF4 の機能解析", 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月 6 日~8 日, 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンタ

- ー (新潟県新潟市)
3. 平川由美, 桧垣匠, 野村俊尚, 馳澤盛一郎, "Erwinia carotovora 培養濾過液により誘導される液胞単純化の解析", 日本植物学会第 79 回大会, 2015 年 9 月 6 日~8 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)
 4. 湖城恵, 伊藤容子, 中野明彦, 馳澤盛一郎, "画像処理技術を用いたゴルジ体由来輝点の数および面積の定量的評価", 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日~18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区)
 5. 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, "ランダム森を用いた顕微鏡画像からのフェノーム解析システムの開発", 第 56 回日本植物生理学会年会 2015 年 3 月 16 日~18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区)
 6. 桧垣匠, 橋本 (杉本) 美海, 秋田佳恵, 花俣繁, 的場厚, 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 2015 年 3 月 16 日~18 日、東京農業大学世田谷キャンパス (東京都世田谷区)
 7. 朽名夏麿, 川田亮太, 杉田 (小西) 左江子, 馳澤盛一郎, "イネの生長過程を定量化するための多角的撮影と画像解析法の開発", 第 78 回日本植物学会, 2014 年 9 月 12 日~14 日、明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)
 8. 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", 第 78 回日本植物学会, 2014 年 9 月 12 日~14 日、明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)
 9. 高橋真哉, 朽名夏麿, 竹内祐一, 馳澤盛一郎, "UV-B ストレスがタバコ BY-2 培養細胞の増殖と生存率に与える影響", 第 55 回日本植物生理学会, 2014 年 3 月 18 日~20 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)
 10. 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, 2014 年 3 月 18 日~20 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)
 11. 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, "バッチモード能動学習による顕微鏡画像の自動分類", 第 55 回日本植物生理学会, 2014 年 3 月 18 日~20 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)
 12. 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, 2014 年 3 月 18 日~20 日、富山大学五福キャンパス (富山県富山市)

13. 湖城恵, 桧垣匠, 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, "画像処理技術を用いた表層アクチン繊維の動態解析", 第 77 回日本植物学会, 2013 年 9 月 13 日~15 日、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)
14. 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", 第 77 回日本植物学会, 2013 年 9 月 13 日~15 日、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)
15. 秋田佳恵, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, "シロイヌナズナの水溶液による水浸処理はシロイヌナズナの葉における one-cell spacing rule を破綻させた", 第 77 回日本植物学会, 2013 年 9 月 13 日~15 日、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)
16. 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", 第 77 回日本植物学会, 2013 年 9 月 13 日~15 日、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)
17. 高橋真哉, 遠藤真咲, 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, "タバコ BY-2 培養細胞を用いた UV-B による細胞増殖阻害メカニズムの解析", 第 77 回日本植物学会, 2013 年 9 月 13 日~15 日、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市)

〔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

松永 幸大 (MATSUNAGA, Sachihiro)
東京理科大学・理工学部・教授
研究者番号: 40323448

玉置 雅紀 (TAMAOKI, Masanori)
国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員
研究者番号: 00311324

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

高橋 真哉 (TAKAHASHI, Shinya)
筑波大学・北アフリカ研究センター・副主任研究員
研究者番号: 80370419