

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14536

研究課題名(和文) 葉表皮細胞の人為的変形系を用いた細胞形態および細胞間信号伝達シミュレーション解析

研究課題名(英文) Study of cell morphology and intercellular-signaling simulation using the artificial control systems in leaf epidermal-cell morphogenesis

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な形態をとるシロイヌナズナ葉表皮細胞の形態形成過程や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て解析した。特に、細胞壁の主成分であるセルロースを分解するセルラーゼを葉に処理すると葉の表皮細胞がジグソーパズルのように複雑に入り組んだ形から単純にまっすぐ伸びた形へと変化することに着目した。また、葉の細胞のジグソーパズル型の形づくりに重要な役割を果たすことが知られていたRIC1という微小管結合タンパク質に注目し、RIC1のセルラーゼ応答における役割を解析した。その結果、RIC1を欠損する変異体ではセルラーゼを処理してもジグソーパズル型の細胞形状に顕著な変化が認められないことを見出した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed morphogenetic process of Arabidopsis thaliana leaf epidermal cells with complex morphology, and visualized cell shape and cell connection mode at the tissue level. In particular, when cellulase (digesting cellulose in the cell wall), was treated on leaves of plants, the leaf epidermal cells change from a complicated intricate configuration like a jigsaw puzzle to a straight extension. We focused on microtubule-associated protein called RIC1, which was known to play an important role in the formation of jigsaw puzzle type of leaf cells, and analyzed the role of RIC1 in the cellulase response. As a result, we found that no significant change was observed in the cell shape of the jigsaw puzzle even when the cellulase was treated with the mutant lacking RIC1.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：成長生理 細胞形態形成 植物ホルモン シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

細胞運動能を有しない植物細胞では、細胞壁成分の変化により引き起こされる細胞壁の物性変化が細胞形態形成を一義的に規定する。細胞壁により規定される細胞形状は個別の細胞機能に加えて、湾曲による細胞間連結面積の増加等の幾何学的要因により細胞間信号伝達に影響を及ぼすと考えられる。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り理解する本申請課題を着想した。画像解析とモデル化は、我々がこれまでに細胞生物学的な現象を理解するために取り組んできた課題で、2014年時点でも多くの成果を上梓しており(*Nature Comm.* 2012, 2013ab, *Curr. Biol.* 2012, *Sci. Rep.* 2012, *Plos One* 2012, 2013, 2014等)、本研究でも独自性を発揮できると考えた。

本研究では表層微小管をはじめとする細胞骨格に着目し、細胞壁の構造変化との関係を定量的な観点から検証を進めるべく、まず第一に、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を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、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、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推定することを目的とした。さらに、表皮組織においても細胞骨格系の蛍光観察を実施することで表皮細胞の湾曲形成における細胞骨格系の役割を検討することを考えた。

このように本研究には新規のオリジナルなアイデアと解析手法の開発が含まれているため、定量的で明快な解析結果はもとより、開発した画像解析・シミュレーションソフトウェア、数理モデル解析法や形質転換植物は他の研究においても有用なツールになると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、植物葉表皮細胞などに観られる凹凸の著しい複雑な植物細胞形態がなぜ生じるかについて定量的・数理的な解析を行うことで、従来の定性的な解析では成し得なかった細胞形態形成機構の明確な解明を目的とした。まず、葉表皮細胞の形状をオーキシン(NAA)およびセルラーゼにより制御し、細胞形状とともに組織構造を可視化した後に、本研究室作成の画像解析ソフトウェアにより、顕微鏡画像から細胞形状を評価するための尺度(細胞面積、細胞周長、細胞複雑度など)を測定し、オーキシンおよびセルラーゼ濃度との関連を明らかにしようと考えた。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る。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各オーキシンおよびセルラーゼ濃度に応じてシミュレートする。これにより、細胞形状に依存した細胞連結様式が細胞間信号伝達に影響する可能性の検証を目指した。このシミュレーション解析にあたっては、想定される信号伝達物質の種類に応じて前提条件を変更して比較検討を行い、同時に、細胞壁を介し細胞形状を制御する表層微小管をはじめとする細胞骨格についてイメージング解析を実施し、細胞形状との関連を定量的に把握しようとした。また、細胞骨格阻害剤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し、さらに、表皮細胞壁の湾曲形

成機構の研究に数理モデルによる解析を導入するという新規の解析手法により、細胞壁湾入機構に関する統合的な理解を目指した。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ葉表皮細胞の形状をオーキシンおよびセルラーゼにより制御し、細胞形状とともに組織構造の可視化を実施した。本研究室の画像解析ソフトウェアにより、顕微鏡画像から細胞形状を評価するための尺度（細胞面積、細胞周長、細胞複雑度など）を測定し、オーキシンおよびセルラーゼ濃度との関連を解析した。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した。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各処理条件に応じてシミュレートを行った。これにより、細胞形状に依存した細胞連結様式が細胞間信号伝達に影響する可能性を検証した。このシミュレーション解析にあたっては、想定される信号伝達物質の種類に応じてシミュレーションの条件を変更して比較検討を行い、同時に、細胞壁を介し細胞形状を制御する表層微小管をはじめとする細胞骨格についてイメージング解析を実施し、細胞形状との関連を定量的に把握することを試みた。

4. 研究成果

申請当初は Xu らの報告(2010)に基づき、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た。オーキシンは細胞膜プロトンポンプの活性化による細胞壁の酸性化や細胞壁関連遺伝子の発現制御など、その作用機構は複雑かつ重層的であり、オーキシン処理が細胞壁の物性変化に至る過程の

推定は困難であった。一方、セルラーゼ処理の場合は単純な作用機序を介して効果的に細胞壁の変形を引き起こすことが可能であり、当計画研究により相応しい実験系と考えられた。そこで、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。これまでに 0, 0.1%, 1.0% セルラーゼを添加した 1/2 MS 水耕培地に播種した 2, 4, 7 日目の独立した 5 つの実生由来の子葉背軸側の表皮組織について、GFP-PIP2a で標識された細胞膜の顕微鏡画像を取得した。なお、申請時には細胞膜の可視化の用途には蛍光色素 FM4-64 を使用する予定であったが、染色ムラのために撮影効率の著しい低下が認められたため、GFP-PIP2a 株を利用することにした。細胞形状計測のため、表皮細胞の二値化画像を画像処理により得た。画像処理方法は、本研究室で確立した (1)周波数フィルタによるノイズ低減と細胞膜構造強調、(2)閾値による 2 値化、(3)視認と手動による後処理、のスキームに従った。これまでに全 45 枚の子葉表皮から全 388,662 細胞の子葉表皮細胞の形状情報を得ることができた。この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。また、特徴間の関係を検討したところ、細胞面積・アスペクト比・稠密度が表皮細胞の成長様式を効率的に評価できる指標セットと考え、これらに基づくクラスタリング解析を実施した。一連の解析から、(1)セルラーゼ処理により播種後 4 日目までは子葉面積拡大が抑制されるものの、7 日目になると葉面積は補償されること、(2)主に播種後 4 日目以降に子葉上部で起こる表皮細胞の湾曲形成がセルラーゼ処理で抑制されて複雑な形状の細胞が減少し、本来は子葉の基部で観察される平滑に伸長成長した表皮細胞が子葉上部にも出現す

ることを新たに見出した。即ち、セルラーゼを植物の葉に処理すると葉の表面をつくる細胞がジグソーパズルのように複雑に入り組んだ形から単純にまっすぐ伸びた形へと変化することを明確に示した。そこで、葉の細胞のジグソーパズル型の形づくりに重要な役割を果たすことが知られていた RIC1 という微小管結合タンパク質に注目し、RIC1 のセルラーゼ応答における役割を解析した。その結果、RIC1 を欠損する変異体ではセルラーゼを処理してもジグソーパズル型の細胞形状に顕著な変化が認められないことを見出した。この観察結果を受けて、九州大学大学院医学研究院の今村寿子助教、三浦岳教授らのグループと協働して、植物細胞壁の力学シミュレーション解析を行った。その結果、RIC1 を欠損する変異体ではセルラーゼ処理に応答して細胞壁が過剰に合成され、結果として圧縮力によるひずみが細胞壁に生じてジグソーパズル型に変形する可能性が示された。本研究によって、植物細胞壁の外部刺激応答機構において RIC1 タンパク質が主要な役割を果たすことが明らかになったと考えられる。

一方、細胞壁の変形が及ぼす生理学的意義を推定するため、細胞輪郭の顕微鏡画像から細胞ネットワークを可視化し、細胞間信号伝達をシミュレーションする実験系を確立した。また、本実験系を利用して前述の全 45 枚の子葉表皮細胞連結様式をすべてグラフ構造として評価し、可視化を実施した。今後、各々のセルラーゼ濃度を代表する典型的なグラフ構造を選定し、信号伝達シミュレーションを実施した。また、葉表皮細胞における表層微小管動態に関して、細胞壁の湾曲が高頻度で起こることが判明した 1/2 MS 液体培地播種後 4 日目の実生を用いて、基部から先端部へ順に視野を移動させて高解像度の連続光学切片像を取得した。微小管分布に関しては湾入部に密に存在する表層微小管構造

が観察されたが、突出部における表層微小管の分布も確認されたため、微小管の密度と細胞形状との関係を定量的に評価する必要があると考えられた。また、微小管阻害剤プロピザミド処理により表皮細胞の湾曲が抑制されることを確認した。さらに、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。

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)

Higaki, T., Takigawa-Imamura, H., Akita, K., Kutsuna, N., Kobayashi, R., Hasezawa, S. and 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.* 査読有 58, 106-119. doi: 10.1093/pcp/pcw183

Takahashi, S., Monda, K., Higaki, T., Negi, J., Hashimoto-Sugimoto, M., Hasezawa, S. and Iba, K. (2017) Differential Effects of Phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) and 3-Kinase (PI3K) Inhibitors on Stomatal Responses to Environmental Signals. *Front. Plant Sci.* 査読有 8:677. doi: 10.3389/fpls.2017.00677

Fujiwara, T., Kawachi, M., Sato, Y., Mori, H., Kutsuna, N., Hasezawa, S., and Maeshima, M. (2015) A high molecular weight zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* 査読有 282:1965-1979. doi: 10.1111/febs.1325

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

[学会発表](計 8 件)

"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" 桧垣匠, 今村寿子, 秋田佳恵, 朽名夏麿, 三浦岳, 馳澤盛一郎, 第 58 回日本植物生理学会年会 (鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)) 2017 年 3 月 16 日

"高 CO₂ 処理が孔辺細胞の分布および表皮細胞の形態に及ぼす影響の解析" 秋田佳恵, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 第 58 回日本植物生理学会年会 (鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市)) 2017 年 3 月 18 日

"スクロース水浸処理により誘導される気孔クラスターの細胞形態学的解析" 秋田佳恵, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 第 80 回 日本植物学会 (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

"PI4K インヒビター (Phenylarsine oxide) による気孔開閉阻害に対して低感受性を示すシロイヌナズナ変異体の単離" 高橋將, 門田慧奈, 桧垣匠, 馳澤盛一郎, 橋本 (杉本) 美海, 祢宜淳太郎, 射場厚, 第 80 回 日本植物学会 (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

"BY-2 細胞における表層微小管配向再形成過程の画像定量解析", 佐野行巳, 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, 日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)) 2015 年 9 月 8 日

"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", 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, 日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)) 2015 年 9 月 6 日

"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", 桧垣匠, 今村寿子, 秋田佳恵, 朽名夏麿, 馳澤盛一郎, 三浦岳, 日本植物学会第 79 回大会 (朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)) 2015 年 9 月 8 日

"植物細胞におけるゴルジ体形成維持機構の解析", 伊藤容子, 植村知博, 湖城恵, 馳澤盛一郎, 上田貴志, 中野明彦, 第 57 回日本植物生理学会年会 (岩手大学上田キャンパス (岩手県盛岡市)) 2016 年 3 月 20 日

〔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://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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

三浦 岳 (Miura Takashi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)教授

研究者番号：10324617

朽名 夏磨 (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

(4)研究協力者

()