

令和元年6月11日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19380

研究課題名(和文) ライブセルイメージング計測の大規模化による器官形態形成機構の解明

研究課題名(英文) Large-scale live cell imaging for elucidation of plant organogenesis

研究代表者

桧垣 匠 (Higaki, Takumi)

熊本大学・国際先端科学技術研究機構・准教授

研究者番号：90578486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では植物の子葉表皮組織を構成するほぼすべての細胞に対して成長過程における個々の細胞の位置と形態に加え、細胞形態を制御する細胞骨格系の構造を経時的に計測する技術開発に取り組んだ。光毒性を軽減する培養条件および撮影条件を検討するとともに、細胞形態および細胞骨格系の構造特徴を定量的に評価する画像解析フレームワークを開発した。本研究成果の一部は研究期間中に13報の原著論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞と器官の形態形成の制御機構の解析はこれまで細胞生物学分野と発生生物学分野においてそれぞれ独立して進められてきた。しかし、これらの分子的な知見は必ずしも一致しておらず、生物の多階層的な形態形成制御機構を統一的に理解するには至っていない。本研究で開発した技術は、このような階層間の乖離を解消するための基盤要素技術と位置付けられる。本技術の成熟により、器官の発生や形態形成に対する細胞レベルでの現象の寄与が検証できるようになり、その結果として得られる知見は多階層的な生物形態形成機構の統一的な理解に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Despite the considerable progress in recent biology, we still have a large gap in our knowledge between cell and developmental biology. To elucidate how cell morphogenesis contributes to organogenesis, large-scale live cell imaging system is required. However, in order to realize such an advanced live cell imaging technique, there are problems such as laser phototoxicity and time consuming to process a big data of microscopic images. To overcome these problems, we aimed to optimize the monitoring conditions for plant cotyledon growth and develop the image analysis framework to quantitatively evaluate cell morphology and cytoskeletal organization based on large-scale microscopic images. With the support of these techniques, we also aimed to understand the mechanisms of plant cotyledon organogenesis at a single cell resolution.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：ライブセルイメージング 生物画像解析 細胞形態 細胞骨格 定量評価 シロイヌナズナ

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

1. 研究開始当初の背景

本提案の背景にある問題意識は、形態形成機構に関する細胞・器官レベルの知見の乖離である。言うまでもなく器官は細胞の集合体のため、細胞の形態や配置の制御機構は器官の形態形成機構と無関係ではない。しかし、両者を統合的に理解するに足る分子的な知見は未だ十分ではない。この原因は、生物の形態形成の多階層的な制御機構の複雑性に加えて、細胞レベルと器官レベルの表現型を同時に評価する研究手法の欠如にあると考えられる。

昨今発展の目覚ましいライブセルイメージング計測技術は、細胞内で時々刻々と変化する構造を可視化、定量解析することにより細胞の形態形成制御機構の解明に貢献してきた。このようなライブセルイメージング計測技術を器官や組織を構成する全ての細胞にまで大規模化できれば、生物の形づくりの階層横断的な理解に向けて極めて有益な情報の取得が期待される。近年、試料の透明化技術の開発や計算機性能の向上などを背景に、脳や個体など固定サンプルを用いて1細胞の解像度を有するイメージング計測技術が注目されている (Susaki and Ueda (2016) *Cell Chem Biol*)。しかし、生体試料の経時的な大規模ライブセルイメージング計測を実現するには、生体試料への光毒性や動画像処理に係る計算機負荷などの課題が残されている。

そこで本研究では、研究代表者が強みを持つライブセルイメージングと画像解析の検討により、器官組織を構成する全ての細胞の位置、形態、細胞骨格構造の経時変化を計測する技術の確立を目指した。また、本手法に基づいて植物の子葉器官の形態形成機構の細胞生物学的な理解を深めることを目指した。具体的には、モデル植物のシロイヌナズナを材料にし、楕円型から団扇型へと形を変えながら成長する子葉器官を研究対象とした。子葉の形は葉肉組織や維管束組織を覆う表皮組織によって規定される。興味深いことに、表皮組織を構成する細胞は子葉発達の初期段階ではレンガ状の形をしているが、子葉の発達が進むにつれて互いに複雑に入り組み合いながら拡大成長し、ジグソーパズルのような形へと変化を遂げる。このジグソーパズル型への変形は主要な細胞骨格である微小管とアクチン繊維の相互排他的な機能発現によって担われていることが広く認められている (Xu et al. (2010) *Cell*)。その一方で、団扇型の器官形態とジグソーパズル型の細胞形態との関係や、組織における個々の細胞の位置に応じた細胞変形機構、などに関する理解は未だに十分ではない。本研究ではこれらの問題に取り組むべく、子葉の表皮組織を構成する全細胞の位置、形態、細胞骨格構造の特徴といった多次元情報を経時的に解析するイメージング計測技術を開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究では、植物の子葉表皮組織を構成する全ての細胞に対して、成長過程における個々の細胞の位置、形態、細胞骨格構造の変化を計測する技術の確立を目指した。本研究の背景として研究代表者が抱いた問題意識は、生物の形態形成機構に関する細胞レベルの知見と器官レベルの知見との乖離である。これまでの細胞生物学分野の成果から、子葉表皮細胞のレンガ型からジグソーパズル型への形態形成は、微小管とアクチン繊維が細胞表層に偏在して細胞の拡大成長を局所的に調節することによって実現することが広く認められている (Xu et al. (2010) *Cell*)。しかし、子葉器官における楕円型から団扇型への形態形成に異常を示す変異体の原因遺伝子は必ずしも微小管やアクチン繊維に直結したものではなく、これら変異体における細胞骨格の動態に関する知見は不十分である。このように、多階層的な形態形成機構の理解のために必要な分子的知見は未だに揃っておらず、その道筋すらついていない状況が続いていた。この状況を打破すべく、植物の子葉表皮をモデルに細胞形態と器官形態を同時に解析するイメージング計測技術を確立する本課題に取り組んだ。将来的には本手法を基盤技術として、動植物を問わず、細胞生物学の言葉で器官発生を理解するような研究の潮流を生み出すねらいもある。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、観察実験と画像解析の両面から大規模イメージング計測に向けた研究開発を実施した。すなわち、(1) 試料栽培条件の検討と顕微鏡画像データサンプリングの最適化により、子葉表皮組織全体における細胞形態と細胞骨格の大規模な経時観察系を確立するとともに、(2) 膨大な広視野時系列顕微鏡画像データから個々の細胞の位置、形態、細胞骨格構造といった多次元情報を自動計測する画像解析技術の確立を目指した。以下、項目別に詳述する。

(1) 子葉成長過程における表皮細胞形態および細胞骨格動態の大規模経時観察系の確立

研究開始当初の予備実験では数時間の撮影間隔で1週間ほど子葉を経時観察した場合、光毒性による成長遅延が生じてしまうことが判明した。そこで本研究では、光毒性を軽減するため、以下に記す(1-1) シロイヌナズナ実生の栽培条件の検討と、(1-2) 顕微鏡画像データサンプリング法の最適化、に取り組んだ。これらによって経時観察実験系の確立を目指した。

(1-1) 子葉サンプルの培養条件の検討

植物材料には蛍光タンパク質による細胞骨格系の可視化株が確立されているシロイヌナズナを用いた。細胞骨格の可視化マーカーとして、GFP-ABD α (アクチン繊維; Higaki et al. (2010) *Plant J*) あるいは GFP-tubulin (微小管; Abe and Hashimoto (2005) *Plant J*) を恒常的に発現する形質転換体を利用した。観察試料の調製には、吸水させた滅菌種子の種皮を実体顕微鏡下で剥いて得た実生をガラスベースディッシュ上に置き、Murashige-Skoog ゲル培地で覆う方法 (Peterson and Torii (2012) *J Vis Exp*) を踏襲した。研究開始当初の予備実験により、本手法によって表皮細胞

形態および細胞骨格の経時観察は十分に可能であるものの、1週間ほどの長期間に渡って数時間間隔のライブセルイメージングに供した試料では、撮影に供しなかった試料に比べて子葉の成長速度がおよそ4割低減するという問題が判明していた。そこで本研究では、後述する顕微鏡画像データサンプリング法の最適化と並行して、光毒性の影響を低減する培地組成の条件検討を実施した。具体的には、子葉面積の拡大速度を評価指標にし、ショ糖と培地支持体（ゲランガム）の濃度検討を行った。この条件検討は後述のデータサンプリング間隔の検討とは独立して実施した。すなわち、光毒性の影響が認められるほど十分に細かい時間間隔での顕微鏡撮影条件において、子葉成長への悪影響を最小限に留める条件を探索した。これにより、シロイヌナズナ子葉の表皮組織における細胞成長を効率的かつ安定的にモニタリングできる培養条件の最適化を狙った。

(1-2) 顕微鏡画像データサンプリング法の最適化

表皮細胞の撮影には、スピニングディスク式共焦点ユニットと高感度カメラによる顕微鏡システムを用いた。これによって子葉表皮組織を構成する全ての細胞を網羅しながらも細胞骨格1本1本を視認できる広域・高分解能の経時観察像を取得した。本観察実験系はおよそ1週間もの長期に渡るため、試料への光毒性が問題となる。この光毒性に対する、最も単純かつ効果的な対処策は、撮影回数を減らすことである。しかし当然ながら、高い時間分解能を保てなければ細胞形態や細胞骨格構造の追跡は困難になる。そこで、変化が盛んな時期には十分に細かい時間間隔で撮影し、逆に変化が緩やかな時期には撮影間隔を伸ばすといった撮影計画の最適化を実施した。これによって光毒性を最小限に留めつつ、細胞変形や細胞骨格構造の変化を効率的に追跡できると考えた。具体的には、まず光毒性をほとんど無視できる程度に十分に長い時間間隔で経時観察を行い、取得した経時観察像において追跡が困難になった細胞数の時間分布を定量評価することで、追加撮影すべき時期を特定する。追加撮影が必要な時期の時間間隔を密にして撮影し直す。この取得画像に対して、先と同じ評価を行う。この一連の作業を光毒性が認められる直前まで繰り返すことで、シロイヌナズナ子葉を用いた本実験系における撮影計画の最適化を図った。

(2) 細胞形態と細胞骨格の多次元的な構造特徴を定量的に評価する画像解析系の開発

(1)で述べた観察実験により取得した顕微鏡画像を活用し、(2-1)表皮細胞の領域分割（セグメンテーション）による細胞の位置と形態の計測、(2-2)細胞骨格構造の抽出と特徴の計測に取り組んだ。

(2-1) 表皮細胞の領域分割（セグメンテーション）と形態計測

本研究では、細胞体積の大半が液胞により占められる植物細胞の特徴を利用し、細胞骨格のマーカーである GFP-ABD2 および GFP-tubulin の細胞中央部の光学切片像から半自動的に細胞形状を領域分割する画像処理法の開発に取り組んだ。また、細胞の領域分割画像から組織における自身の位置に加えて、細胞変形を理解する上で重要な形態学的尺度（細胞面積、円形度、縦横比、稠密度など）の自動計測にも取り組んだ。

(2-2) 細胞骨格構造の抽出と特徴の計測

細胞骨格構造の抽出には、研究代表者の研究グループが確立したアクチン繊維の自動抽出法（Higaki et al. (2010) Plant J）を踏襲した。本手法を微小管にも適用するため、幅や曲率など繊維抽出に係るパラメタの最適化を実施した。また、この抽出画像から細胞骨格構造の特徴（密度、束化、配向、並行性、細胞長軸に対する細胞骨格の平均角度など）を多面的に自動計測する画像解析ワークフローの開発に取り組んだ。以上の計測技術の開発においては、膨大な画像データ群から即座に数値データを取得できるよう、高速性を重んじた画像処理技術の導入と実装を検討した。

4. 研究成果

前項(1)で述べた方法に従い培養条件および撮影条件に対応する子葉成長データを得た。これにより、子葉の成長に対する悪影響を最小限に留める実験条件を把握することができた。また前項(2)で述べた方法に従い、共焦点レーザー顕微鏡により三次元的に撮像した組織画像から表皮細胞を高精度かつ自動的に領域分割（セグメンテーション）するとともに細胞形態を多面的に定量評価する画像解析フレームワークを開発した。研究開始当初に予期していなかった展開として、画像解析による細胞骨格の束化の定量評価方法について顕著な進捗を得た。細胞骨格の束化を定量評価法として、研究代表者の研究グループが開発した繊維状構造を構成する画素群の輝度分布の歪度を利用する方法（Higaki et al. (2010) Plant J; Higaki (2017) Plant Morpho）が標準的な手法として国内外を問わず広く活用されている。ところが本研究を進める過程で、細胞骨格を構成する画素群の輝度分布の変動係数がより汎用的な束化の評価指標になりうる可能性を見出すことができた。本手法を含めた細胞骨格構造の画像解析に関しては、国内外の複数の研究グループとの共同研究によって様々な生物試料画像を用いた実証実験を実施することができた。本研究の解析対象とした葉表皮細胞（Dou et al. (2018) Plant Physiol）のみならず、根の細胞（Takatsuka et al. (2018) Plant Physiol.; Hirano et al. (2018) Nature Plants）や受精卵（Kimata et al. (2019) PNAS）、さらには動物の神経細胞（Tanka et al. (2019) Genes Cells）など様々な生物試料に対する本システムの有用性を確認することができた。なお、次項に示す通り、本研究期間中に13報の原著論文（すべて査読付き）を発表した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Akita K, Higaki T (2019) An induction system for clustered stomata by sugar solution immersion treatment in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Vis Exp* 144: e58951. <https://www.jove.com/video/58951/>
2. Tanaka M, Fujii Y, Hirano K, Higaki T, Nagasaki A, Ishikawa R, Okajima T, Katoh K (2019) Fascin in lamellipodia contributes to cell elasticity by controlling the orientation of filamentous actin. *Genes Cells* 24: 202–213. <https://doi.org/10.1111/gtc.12671>
3. 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 Biol Chem* 294: 2256–2266. <http://www.jbc.org/content/early/2018/12/28/jbc.RA118.005843>
4. Kimata Y, Kato T, Higaki T, Kurihara D, Yamada T, Segami S, Morita MT, 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 U S A* 116: 2338–2343. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814160116>
5. Miyoshi S, Kimura S, Ootsuki R, Higaki T, Nakamasu A (2019) Developmental analyses of divarications in leaves of an aquatic fern *Microsorium pteropus* and its varieties. *PLOS One* 14: e0210141. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210141>
6. Yi-Lun Tsai A, Higaki T, Nguyen CN, Perfus-Barbeoch L, Favery B, Sawa S (2018) Regulation of root-knot nematode behavior by seed coat mucilage-derived attractants. *Mol Plant* 12: 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.11.008>
7. Hirano T, Konno H, Takeda S, Dolan L, Kato M, Aoyama T, Higaki T, Takigawa-Imamura H, Sato MH (2018) PtdIns(3,5)P2 mediates root hair shank hardening in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 4: 888–897. <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0277-8>
8. Takatsuka H, Higaki T, Umeda M (2018) Actin reorganization triggers rapid cell elongation in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* 178: 1130–1141. <http://www.plantphysiol.org/content/early/2018/09/05/pp.18.00557>
9. 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: 289–293. <https://doi.org/10.1508/cytologia.83.289>
10. Akita K, Hasezawa S, Higaki T (2018) Cortical microtubules and fusicoccin response in clustered stomatal guard cells induced by sucrose solution immersion. *Plant Sig Behav* 13: 1454815. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1454815>
11. Dou L, He K, Higaki T, Wang X, Mao T (2018) Ethylene signaling modulates cortical microtubule reassembly in response to salt stress. *Plant Physiol* 176: 2071–2081. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01124>
12. 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* e00021. <https://doi.org/10.1002/pld3.21>
13. Takahashi S, Monda K, Higaki T, Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Hasezawa S, Iba K (2017) Differential effects of phosphatidylinositol 4-Kinase (PI4K) and 3-Kinase (PI3K) inhibitors on stomatal responses to environmental signals. *Front Plant Sci* 8: 677. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.00677>

[学会発表](計 25 件)

1. 植田美那子, 木全祐資, 田中小百合, 加藤壮英, 檜垣匠, 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
2. 加藤壮英, Jeh Haur Wong, 清水理愛, 木下寧々, 檜垣匠, 橋本隆「BPP1 ファミリー遺伝子の葉表皮細胞の形態形成への関与」第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年
3. 石田光南, 黒羽剛, 石崎公庸, 檜垣匠, 橋本悟史, 横山隆亮, 小竹敬久, 西谷和彦「ゼニゴケにおける Endoglucanase16 の機能解析」第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年
4. 檜垣匠「ジグソーパズル型葉表皮細胞の力学的最適化戦略を探る」第 60 回日本植物生理学会年会 2019 年
5. Takumi Higaki Bioimage clustering and classification. KAIST-KU Joint Symposium 2018, 2018
6. 酒井友希, 西浜竜一, 檜垣匠, 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
7. 木全祐資, 加藤壮英, 檜垣匠, 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」日本植物学会第 82 回大会 2018 年

8. 平野朋子, 紺野宏記, 武田征士, 加藤真理子, 青山真理子, 青山卓史, 檜垣匠, 今村寿子, 佐藤雅彦「イノシトールリン脂質が制御する根毛の形態形成」日本植物学会第 82 回大会 2018 年
9. 檜垣匠「植物細胞の形態形成機構の理解に向けたイメージングと画像解析」日本植物学会第 82 回大会 2018 年
10. 野村俊尚, 井藤賀操, 檜垣匠, 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
11. 笹部美知子, 檜垣匠, 西田結花, 森岡祉 門, 鈴木伶奈, 植村知博, 安原裕紀, 馳澤 盛一郎, 上田貴志, 町田泰則「細胞板形成における M 期キネシン NACK1 と細胞内輸送」第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年
12. 檜垣匠, 秋田佳恵, 馳澤盛一郎「細胞骨格の束化を定量評価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
13. 秋田佳恵, 檜垣匠, 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
14. 加藤壮英, Jeh Haur Wong, 長崎(竹内)菜穂子, 木下寧々, 清水理愛, 檜垣匠, 馳澤盛一郎, 橋本隆「葉表皮細胞の形態形成に必要な微小管結合タンパク質 BPP1 ファミリーの機能解析」第 59 回日本植物生理学会年会 2018 年
15. Takumi Higaki Quantification and classification of bioimages. The 2nd IROAST&IRCMS Joint Seminar - The 33rd IROAST Seminar, 2018
16. 檜垣匠「葉表皮細胞のジグソーパズル型形態形成」文部科学省委託事業 AIMaP 研究会「反応拡散系と実験の融合」2018 年
17. Takumi Higaki Mathematical modeling approaches to jigsaw-puzzle pattern formation by plant cells. The 1st IROAST Symposium "Plant Cell and Developmental Biology: Approaches to Multiscale Biosystems", 2017
18. 川口遼, 檜垣匠, 馳澤盛一郎「植物培養細胞 BY-2 における熱ストレス応答性の細胞死と細胞周期の関係」日本植物学会第 81 回大会 2017 年
19. 檜垣匠「定量的画像解析に基づく植物細胞骨格の研究」日本植物学会第 81 回大会 2017 年
20. 植田美那子, 木全祐資, 加藤壮英, 檜垣匠, 山田朋美, 栗原大輔, 森田(寺尾)美代, 馳澤盛一郎, 東山哲也, 田坂昌生「受精による細胞極性の破壊と再構成 ~ ライブイメージングで迫る受精前後の細胞内変化 ~」日本植物学会第 81 回大会 2017 年
21. 九鬼寛明, 檜垣匠, 篠原直貴, 横山隆亮, 黒羽剛, 三上慎吾, 馳澤盛一郎, 西谷和彦「細胞壁イメージングと新規の酵素機能の解析に基づく新しい細胞壁高次構造モデルの提案」日本植物学会第 81 回大会 2017 年
22. 平川由美, 檜垣匠, 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
23. 木全祐資, 檜垣匠, 河島友和, 栗原大輔, 佐藤良勝, 山田朋美, 馳澤盛一郎, Berger Frederic, 東山哲也, 植田美那子「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
24. 秋田佳恵, 馳澤盛一郎, 檜垣匠「気孔クラスターを形成する孔辺細胞における細胞内構造の定量解析」日本植物学会第 81 回大会 2017 年
25. Takumi Higaki A strange link between leaves and skulls? A theoretical model of jigsaw-puzzle pattern formation by plant leaf cells. International Symposium on Imaging Frontier 2017, 2017

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ <http://iroast.kumamoto-u.ac.jp/higaki/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

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。