

論文内容の要旨

論文題目 **Kinematic studies on the cellular basis of root growth in *Arabidopsis thaliana***

(シロイヌナズナの根端成長に関する細胞動力学的研究)

氏名 岩元 明敏

植物の先端成長は最先端部の分裂域における活発な細胞増殖と、それに続く伸長域における細胞体積の急激な増大(=体積成長)とを特徴とする。遺伝的要因や環境的要因による先端成長様式の違いは、この2つの側面の差として捉えることができるが、それらは独立ではなく互いに関係し合っていると考えられる。先端成長を支える細胞増殖、体積成長の各側面とその構成要素を相互の複合的な関係の中で把握することは、先端成長の制御のあり方、さらに遺伝・環境的要因による成長の変化の本質を理解する上で極めて重要である。しかし、従来の先端成長に関する動力学的研究は細胞増殖と細胞伸長の定量的な記述に留まっており、両者の関係に踏み込んでいない。そこで本研究では、先端成長の細胞動力学的解析に数理モデルを組み入れて、細胞増殖と体積成長の複合的な関係を解体し、先端成長の基本要素を明らかにすることを目指した。シロイヌナズナの根端皮層細胞列の成長を先端成長のモデルとして、遺伝・環境的要因が成長に与える影響を解析し、成長特性の分析を行った。また、タバコ BY-2 細胞の同調培養系を用いて、細胞増殖と体積成長の関係の生理学的な背景についても検討を加えた。

【方法】

<根端成長の動力学的解析の方法論>

シロイヌナズナの根端にグラファイト粉をつけその動きを測定することで、各地点における伸長速度を決定した。次に根端の各地点における皮層細胞の長さとおよび内径および外径を測定した。ここで皮層を回転体と見なし、距離・長さから体積へのデータ変換を行った。これによって、様々な体積 V の皮層細胞列における体積増大速度 dV/dt と細胞体積 dV/dN を得た。局所的な細胞密度 dN/dV は細胞体積の逆数として計算し、細胞数 N は dN/dV を V に関して積分することで求めた。また、 dV/dt を V で微分して相対成長率 (REGR) を、 dN/dt を V で微分して局所的細胞生産率 (LCPR) をそれぞれ求めた。さらに根端の定常的な成長を前提として、細胞増殖率 dN/dt を式 (1) によって算出した。

$$\frac{dN}{dt} = \frac{dN}{dV} \times \frac{dV}{dt} \quad (1)$$

<根端成長への数理モデルの適用>

根端成長の要素の分析は、杉山と佐藤 (1999) によって提案された数理モデルを利用して行った。この数理モデルは以下の3つの仮定に基づく。(1) 器官の成長活動の総量は、そこに含まれる細胞数によって規定される。(2) 器官の成長活動は、「細胞増殖」、「体積成長」、「器官維持」という3つの側面からなる。(3) 器官の維持には、その体積に応じた成長活動量の割り当てを必要とする。これらの仮定は、 N を細胞数、 V を器官の体積、 C_1 を細胞増殖のコスト、 C_2 を体積成長のコスト、 C_3 を器官維持のコスト、 α を細胞当たりの成長活動量として、次の微分方程式で表される。

$$\alpha N = C_1 \frac{dN}{dt} + C_2 \frac{dV}{dt} + C_3 V \quad (2)$$

始原細胞を含む皮層細胞列は、細胞の出入りがほとんどなくほぼ閉じていることから、ここでは器官に相当するとして扱った。皮層細胞列の細胞数等の実測データを数理モデルにあてはめ、比コスト係数 C_1/α 、 C_2/α 、 C_3/α を以下の方法で求めた。これらの係数はそ

それぞれ、細胞増殖率、体積成長速度、体積を1単位増加させるのに必要な細胞数を示す。

静止中心から十分離れた位置においては細胞増殖率、体積成長速度が一定になることから、式(2)をVで微分して、

$$\lim_{V \rightarrow \infty} \alpha \frac{dN}{dV} = C_3 \quad (3)$$

式(3)により、最終細胞密度から C_3/α を決定した。 C_1/α と C_2/α は、式(1)を変形した次式(4)にこの C_3/α を用い、多重回帰分析によって決定した。

$$N - \frac{C_3}{\alpha} V = \frac{C_1}{\alpha} \frac{dN}{dt} + \frac{C_2}{\alpha} \frac{dV}{dt} \quad (4)$$

【結果と考察】

<シロイヌナズナの根端成長における細胞増殖と体積成長の空間パターン>

シロイヌナズナの Columbia (Col^P)、Landsberg *erecta* (Ler)、Wassilewskija (WS)、C24、4倍体の Columbia (Col^F) について、根端成長の動学的解析を行い、得られたデータを皮層細胞列の体積に対してプロットした (Fig. 1)。体積が大きい皮層細胞列ほどその遠位端が静止中心から遠いので、このグラフは累積的成長データの空間パターンを体積に基づいて示したものである。

Fig. 2 は Fig. 1a, d から算出した REGR と LCPR のグラフであり、細胞増殖と体積成長の空間パターンを表す。これまでの動学的研究でも示されていたように、いずれの系統においても静止中心から離れるに従って細胞増殖が低下し、それと呼応するように体積成長が活発になっていた。また、C24 のように増殖域の狭い系統では、体積成長の領域がより先端に近くかつ狭い傾向が見られた。これにより、根端成長において、体積成長が細胞増殖に依存しつつ背反するような関係が示唆された。細胞密度を横軸に、REGR を縦軸にプロットした Fig. 3 からは、静止中心から十分に遠く細胞増殖が見られない領域において、細胞密度と REGR との間に直線的な関係があることが分かった。

これらの関係性が今回用いた数理モデルに組み込まれていることは、以下のように確認した。式(2)をVで微分すると、

$$\alpha \frac{dN}{dV} = C_1 \frac{d(\frac{dN}{dt})}{dV} + C_2 \frac{d(\frac{dV}{dt})}{dV} + C_3 \quad (5)$$

式(5)の左辺は細胞密度、右辺は LCPR と REGR の和であり、LCPR と REGR が背反的關係にあることと対応した。また、細胞増殖の停止した場所を想定して LCPR=0 とおくことで式(6)が得られ、REGR と細胞密度との直線関係も示せた。

$$\alpha \frac{dN}{dV} = C_2 \frac{d(\frac{dV}{dt})}{dV} + C_3 \quad (6)$$

さらに細胞密度が LCPR に依存することを考慮すれば、これらの式は LCPR に対する REGR の間接的依存も含意していると言え、根端成長に見られた体積成長と細胞増殖、細胞密度の關係性を数理モデルから一通り導くことができた。

<根端成長の系統間差の解析>

シロイヌナズナ各系統の根端成長の測定データを数理モデルによって解析し、求めた比コスト係数を Table 1 (dataset #1) にまとめた。これらの比コスト係数をモデル式に代入して予測した細胞数 (N_{est}) と実測の細胞数 (N) を系統毎に比較した (Fig. 4)。その結果、静止中心から少し離れた場所では (特に Ler と WS において) ずれが見られるものの、全体的には予測細胞数は実測細胞数と概ね一致しており、数理モデルにある程度の妥当性が認められた。なお、Col^F と Col^P に関しては、10本の根端を用いた成長解析を繰り返したが、比コスト係数の値は安定しており、解析の再現性が確認された (Table 1 の dataset #1 と #2、combined dataset は2組を合わせた20本分の解析結果)。

2倍体の4系統間で比コスト係数を比較してみると、それぞれに成長パターンと対応づけられる特徴が見られた。特に際立っていたのは成長速度が著しく低かった C24 で、 C_1/α 、 C_3/α とともに最も大きな値を示した (Table 1)。この結果から、C24 の根端は細胞増殖効率の低さから細胞数、ひいては成長活動量を十分に増やせない上に、器官の維持にも他の系統より多くの成長活動を割く必要があり、体積成長に投資できなくなって早期に成長を停止する、と解釈できる (Fig. 2e)。

Col の2倍体と4倍体の比較では、倍数化に伴う成長変化に関して、興味深い結果が得られた。Col^F の C_2/α 、 C_3/α はともに Col^P に比べて65%程度に減少している一方、 C_1/α は Col^F の方が高く Col^P の1.2倍程度であった (Table 1、combined dataset)。倍数化によって細胞当たりの成長活動量が1.5倍に増大したと考えると、 C_2/α と C_3/α の変化は α の変化から説明できる。この場合、Col^F の C_1 は Col^P の C_1 の約1.8倍と見積もられる。このことは、ゲノム量が倍加すると、細胞増殖のコストもほぼ倍増することを示唆する。

<根端成長に対する温度の影響の解析>

先端成長の環境要因の一つとして温度を取り上げ、生育温度が根端成長に及ぼす影響について動学的的方法と数理モデルによる解析を行った。実験材料には G2/M 期マーカー遺伝子の *CYCBI;lp::CYCBI;l:GUS* をもつ Columbia 形質転換株 (Col/pCDG) を用い、28°C、22°C、16°C の3条件で育成したときの根端成長を比較した。

22°Cと28°Cでは成長の空間パターン、比コスト係数ともに顕著な違いは見られなかった (Fig. 5, Table 2)。22°C、28°Cの場合と比べて16°Cでは、細胞増殖率と体積増大速度が著しく低くなっており (Fig. 5a, c)、細胞増殖域と成長域の狭小化、LCPRとREGRのピーク値の低下が認められた (Fig. 6)。また、比コスト係数は C_I/α が約2倍、 C_I/α が3~4倍と大きく上昇していた (Table 2)。これらの結果は、低温条件下での根端成長の抑制が体積成長および細胞増殖の効率の低下に起因することを示唆している。なお、16°Cでの細胞増殖活性の低下は、GUS発現細胞の数からも裏付けられた (Fig. 6、差し込み図)。

<タバコ BY-2 培養細胞における細胞周期と成長の関係>

根端成長で見られたような細胞増殖と体積成長のトレードオフは、細胞周期と成長との基本的な関係から生じている可能性も考えられる。そこで、この点に関し、タバコ BY-2 培養細胞を用いて検討を加えた。まず、指数増殖期の BY-2 細胞に様々な阻害剤を与えて、培養液容積当たりの生重量を指標に体積成長の変化を追跡したところ、DNA合成阻害剤アフィディコリン (APC) の投与時のみ一過的な成長促進が観察された。次に APC 処理により細胞周期を同調させた BY-2 細胞の体積成長を調べた (Fig. 7)。APC 存在下では細胞は通常より肥大するため、細胞周期の再開後は体積成長率が低いが、その影響がなくなった細胞周期2周目においては、G1期細胞の比率と体積成長率との間に相関が見られた (Fig. 7、19-31 h)。この結果から、細胞周期と体積成長率が関連が示唆された。

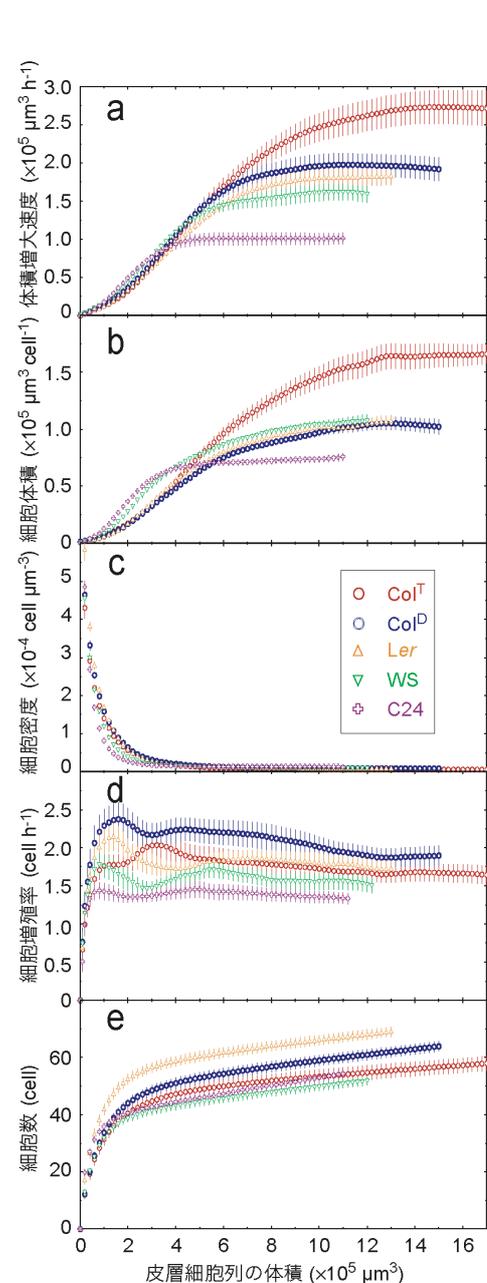


Figure 1. シロイヌナズナ各系統の根端成長の空間パターン

a; 体積増大速度、b; 細胞体積、c; 細胞密度、d; 細胞増殖率、e; 細胞数。n = 10、エラーバーは標準誤差。

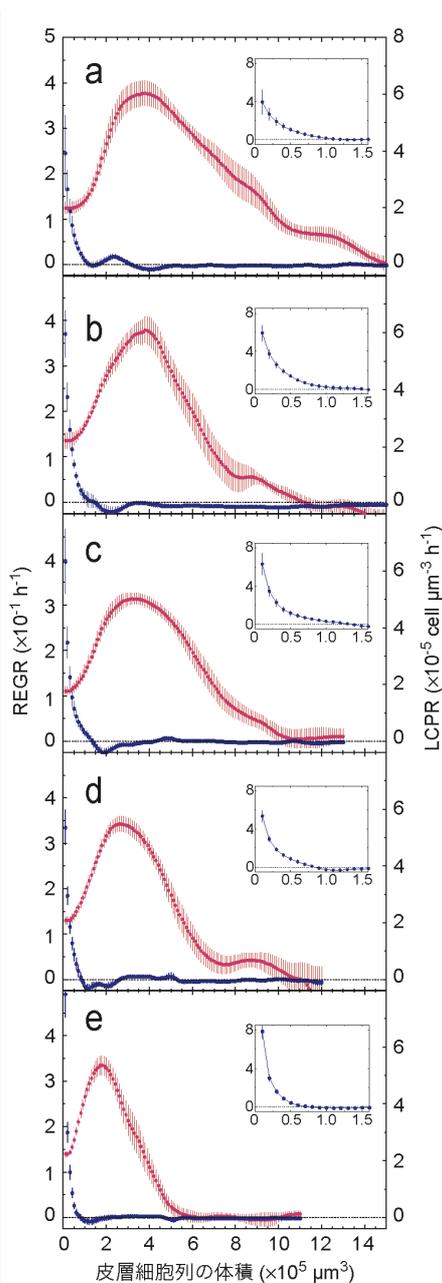


Figure 2. シロイヌナズナ各系統の根端成長におけるREGRとLCPR

赤丸はREGR、青丸はLCPR。差し込み図は最先端領域におけるLCPRを示し、軸の単位は外側のグラフと同じ。a; Col^T、b; Col^D、c; Ler、d; WS、e; C24。n = 10、エラーバーは標準誤差。

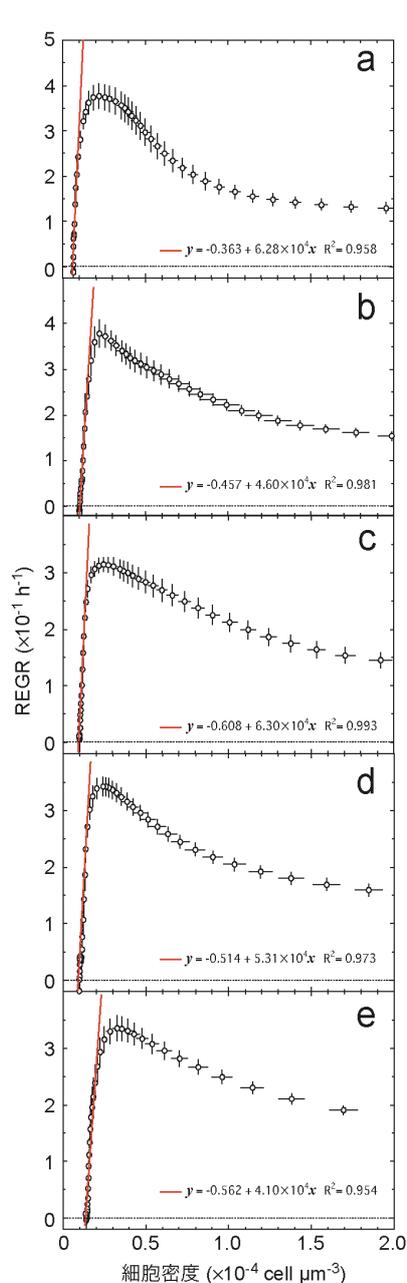


Figure 3. シロイヌナズナ各系統の根端成長におけるREGRと細胞密度の関係

a; Col^T、b; Col^D、c; Ler、d; WS、e; C24。n = 10、エラーバーは標準誤差。

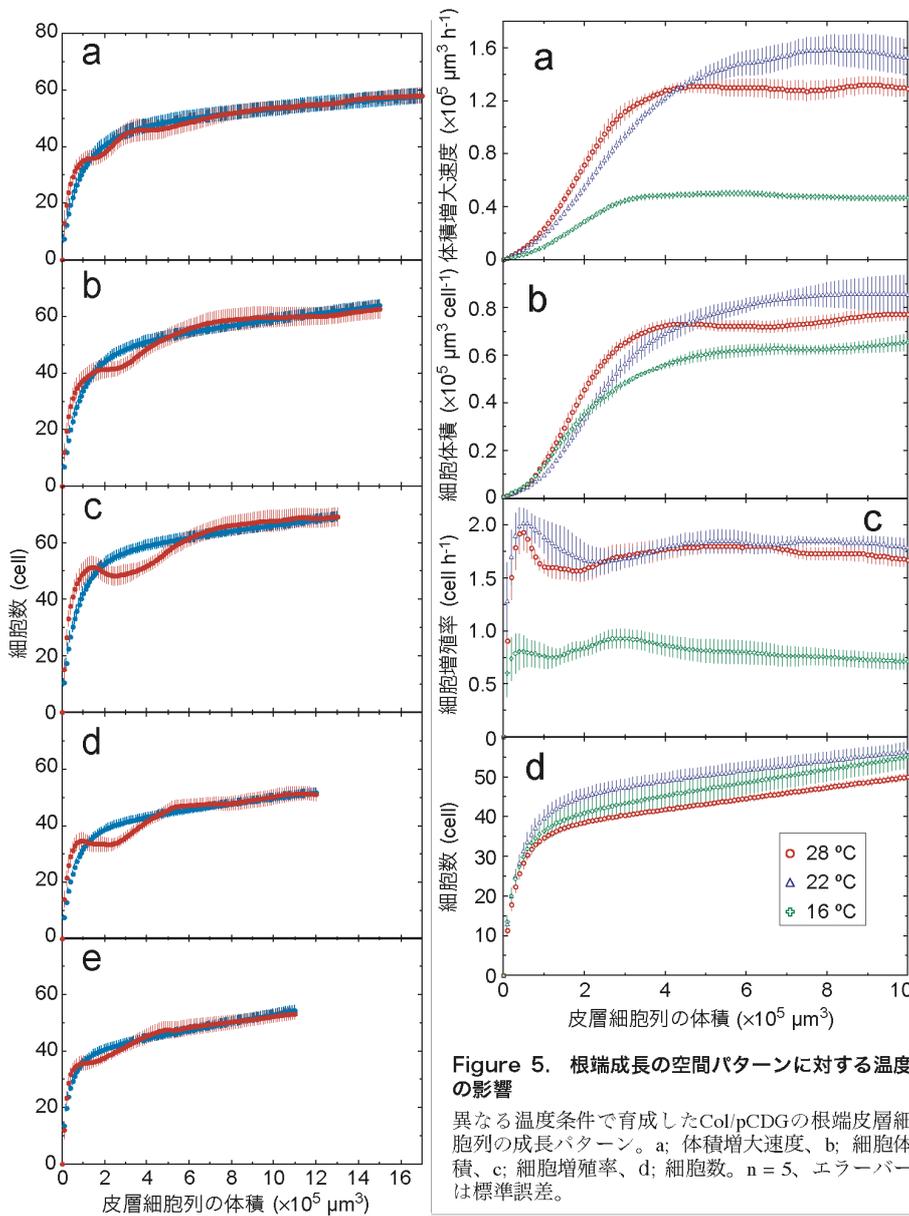


Figure 5. 根端成長の空間パターンに対する温度の影響

異なる温度条件で育成したCol/pCDGの根端皮層細胞列の成長パターン。a: 体積増大速度、b: 細胞体積、c: 細胞増殖率、d: 細胞数。n = 5、エラーバーは標準誤差。

Figure 4. 数理モデルによる予測細胞数と実測細胞数の比較

シロイヌナズナ各系統における根端皮層細胞列の細胞数の数理モデルによる予測値 (N_{est} ; 赤点) と実測値 (N ; 青点)。a: Col^T、b: Col^D、c: Ler、d: WS、e: C24。n = 10、エラーバーは標準誤差。

Table 1. シロイヌナズナ各系統の比コスト係数

	C_1/α (h)	C_2/α ($10^5 \text{ cell h } \mu\text{m}^{-3}$)	C_3/α ($10^6 \text{ cell } \mu\text{m}^{-3}$)	$R^{2(a)}$
<u>dataset #1^(b)</u>				
Col ^T	19.1	5.95	6.06	0.966
Col ^D	15.4	9.71	9.85	0.942
Ler	22.4	9.88	9.52	0.869
WS	18.6	7.27	9.68	0.879
C24	23.2	7.07	13.8	0.966
<u>dataset #2</u>				
Col ^T	17.5	7.04	6.56	0.903
Col ^D	16.3	9.42	10.1	0.875
<u>combined dataset</u>				
Col ^T	18.4	6.40	6.44	0.946
Col ^D	16.0	9.41	9.99	0.924

^(a) $R^2 = 1 - \{ \sum (N - N_{est})^2 / \sum (N - N_{mean})^2 \}$

これは多重回帰分析における決定係数 R^2 を求める式と同じであるが、 N_{est} は単純な多重回帰によって求めているため、厳密にはここで示した R^2 は決定係数ではない。しかし、 N_{est} が N にどれだけ近いを示す指標として使うことはできる。 R^2 が大きいほど N_{est} は N とよく合致しており、最大値は1である。

^(b)dataset #1はFigs. 1-4の解析に使用したデータ。

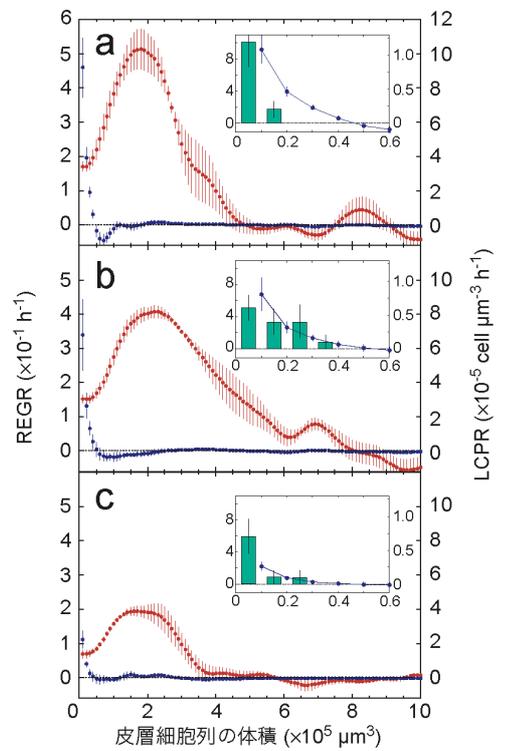


Figure 6. REGRとLCPRに対する温度の影響

異なる温度条件で育成したCol/pCDGのREGR (赤丸) とLCPR (青丸)。差し込み図は各温度条件での最先端領域におけるLCPRとGUSの発現が観察された皮層細胞の数 (柱状グラフ) で、左縦軸はLCPR、右縦軸は皮層細胞1列あたりのGUS発現細胞 (cell)、横軸は皮層細胞列の体積を示す。LCPRと皮層細胞列の体積の単位は外側のグラフと同じ。a: 28 °C、b: 22 °C、c: 16 °C。n = 5、エラーバーは標準誤差。

Table 2. 温度条件による比コスト係数の違い

	C_1/α (h)	C_2/α ($10^5 \text{ cell h } \mu\text{m}^{-3}$)	C_3/α ($10^6 \text{ cell } \mu\text{m}^{-3}$)	$R^{2(a)}$
28 °C	17.3	5.10	13.5	0.880
22 °C	19.3	6.80	11.7	0.836
16 °C	36.0	20.3	15.8	0.886

^(a) $R^2 = 1 - \{ \sum (N - N_{est})^2 / \sum (N - N_{mean})^2 \}$

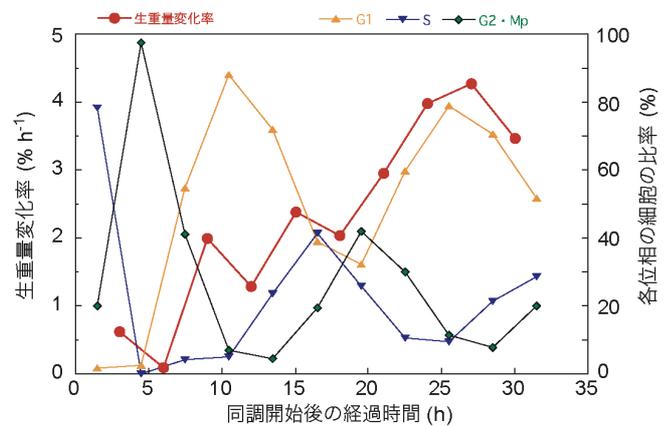


Figure 7. タバコBY-2培養細胞の同調培養における生重量変化と細胞周期

培養液5 ml中の細胞の生重量変化率と細胞周期の各位相の比率。各位相の比率はフローサイトメトリーの結果より算出。G1; G1期細胞の比率、S; S期細胞の比率、G2+Mp; G2期及びM期前期細胞の比率。