

令和 3 年 4 月 12 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960265

氏名

浅岡真理子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： リヨン （国名： フランス ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
花茎に生じる亀裂の機械的実態から解く花茎器官の整合性の分子基盤
3. 派遣期間： 令和 元 年 12 月 1 日 ~ 令和 3 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： École normale supérieure de Lyon (ENS de Lyon)
部局名： Laboratoire Reproduction et développement des plantes (RDP)

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究の実地状況

シロイヌナズナの *clavata3 de-etiolated3 (clv3 det3)* 二重変異体ではほぼ 100% の確率で茎に亀裂が生じることが発見されている (Maeda et al., 2014、申請当時所属の東京学芸大学の研究室を中心とした研究、図 1)。*clv3* では過度な細胞増殖が引き起こされる一方で、*det3* では細胞伸長活性が低下する。また、組織学的解析では、亀裂の発生箇所に向かった髓細胞の異様な伸長が見出されている(図 2、Asaoka et al., 2021 より改変)。これらから、茎という限られた空間内における細胞増殖と細胞伸長の不均衡により、茎の内部組織の成長に伴って外向きに発生する異常な圧力の存在が示唆される。そもそも、機械刺激は細胞壁を介した隣接細胞との結合により恒常的に生じている。そのため、茎における亀裂というのは、本来茎が備え持つ、これらの圧力を筒状の空間内で緩衝できる仕組みの破綻によって発生していることが疑われる。組織の強度や整合性保持といった力学的特徴に着目した植物におけるバイオメカニクスの研究分野は理論解析が主流であったが、近年は測定法の進歩より生物の様々な組織のもつ力量を細胞レベルで実際に測定することが可能となっており、派遣先研究機関は植物を用いたバイオメカニカルな解析について、世界でトップクラスの研究実績を挙げている。茎に生じる亀裂の組織学的観察に加え機械的特徴を明確にすることで、亀裂発生の主要因を突き止めると共に、茎を構成する個々の組織の役割と、茎器官の整合性を保持する機構の一端を解明することが本研究課題の目的とした。

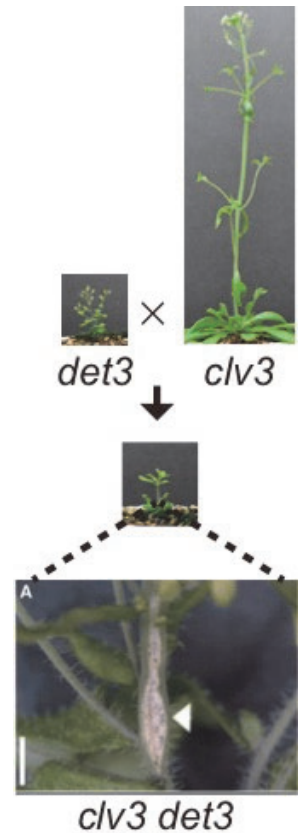


図 1. シロイヌナズナ *clv3 det3* の茎の亀裂 (Maeda et al., 2014 より改変)

1. 新規系統の作製

当研究課題では以下の 3 種類の観点からのシロイヌナズナの新規形質転換系統及び新規多重変異体を作製した。新規系統を得るためには複数世代を経る必要があるため、これらの系統の作製準備は渡航前より開始した。

A- 表皮組織特異的の相補系統: 表皮細胞のふるまいはその組織全体の形態決定に影響することが知られている。そのため、表皮のみで細胞伸長を相補することは組織全体の伸張性を改善し、*clv3 det3* の茎内外に生じる力学的不均衡を緩衝、さらには亀裂の発生を抑制することができるのではと予想された。本研究では *PDF1* プロモーター(Kawade et al., 2013)の制御下に置いた *DET3* 遺伝子を *clv3 det3* 変異体において表皮細胞で特異的に発現する系統を作成した (*pPDF1:DET3 clv3 det3*)。 *clv3 det3* は矮性であるためか、一般的な Floral dip 法による形質転換株の取得が困難であったため、まず野生型 (WT) に目的遺伝子を導入した系統を作製し、掛け合わせにより *clv3 det3* 変異体背景の目的系統を得た。

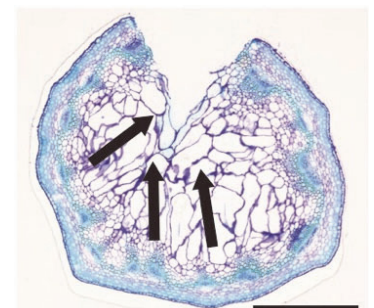


図 2. *clv3 det3* の花茎内部形態。播種後 40 日。Bar = 300 μ m。矢印: 細胞の伸長方向。

B - リグニン蓄積と亀裂の関係性の検証: *clv3 det3* の茎の髓細胞には WT ではみられないリグニンの異所的な蓄積が生じる。リグニン合成は茎の強度維持に必須である一方、髓細胞におけるリグニンの異所的な蓄積は茎組織の柔軟性を低下させ、亀裂の発生の一因となっていることが考えられる。リグニンと亀裂の関連性を確認するために、リグニンの合成量が低下する *ccr1*、または維管束間繊維組織が形成されない *nst1 nst3* と *clv3 det3* との多重変異体を作製した。用いた変異体は申請時計画していたものとは異なるが、研究の過程でこれらの系統のほうが表現型が明瞭であり、より意図に沿った解析ができると判断したため用いることとした。

C- 亀裂の再現: 茎の亀裂は *det3* または *clv3* それぞれの単独変異体では発生しない。そこで *det3* と似た表現型を示す変異体と *clv3* との変異体では、亀裂発生が再現できるのではと考えた。*det3* は極端に矮性で、茎内部の髄細胞に異所的なリグニンの蓄積がみられる。これらと近い特徴をもち、ストックセンターの在庫も確認できた変異体 *ixr1-1* (*CESA3* の変異体)、*cesa6* または *ctl1* (*pom1*) 変異体と *clv3* との二重変異体を作製した。

2. 新規系統の生育特徴と亀裂の発生頻度の解析

得られた全ての系統に関して、茎の亀裂の発生頻度を測定した。表皮組織特異的相補系統では *clv3 det3* よりも植物体の生育の全体的な回復がみられ、亀裂の発生頻度も 20-40%にまで減少し、個々の亀裂も小さい傾向があった。一方で、亀裂の再現を意図して作製した系統では亀裂の発生はみられなかった。*clv3 det3 nst1 nst3* では亀裂の発生頻度はほぼ 100%のまま、*clv3 det3* の亀裂よりも大きな亀裂の発生が観察された。

3. 形態学的観察

茎の横断切片と縦断切片を作製し、各組織の細胞数や細胞サイズを測定することで内部形態の定量的解析を行なった。表皮組織特異的相補系統では茎の横断面積の増大、表皮細胞数の増加がみられ、髄細胞の形態異常も緩和されていた。一方で髄細胞の長さは *clv3 det3* と *pPDF1:DET3 clv3 det3* と *clv3 det3 nst1 nst3* では顕著な変化はみられなかった。走査型電子顕微鏡により表皮組織形態の解析も行なったところ、表皮細胞形態も両系統において同様の形態であった。*clv3 det3 nst1 nst3* では維管束繊維組織におけるリグニン形成は抑制されており、茎の横断面積は *clv3 det3* よりも増大傾向にあった。亀裂の再現を試みた系統の中でも *ctl1 clv3* は髄の細胞形態異常及びリグニンの異所的な蓄積もみられ、*clv3 det3* と類似した内部形態を示した。

4. 機械的特徴の定量化

clv3 det3 に加え、新規に作製した各種植物体の遺伝的背景が茎強度に及ぼす影響の詳細な解析を試みた。まず、AFM (Atomic Force Microscopy 原子間力顕微鏡)を用いて、茎の表皮細胞の細胞壁の堅さの測定を試みたが、非常にコストがかかる方針を採用しないと信頼性があるデータを得られないことが判明した。本研究課題は複数の変異体について測定を行なう必要があり、茎表面の微細構造が AFM を用いた解析に不向きであると判断し、茎を用いた解析には Nano-indenter を用いる方針をとった。Nano-indenter は AFM よりも大きいサイズのチップを用いるため、サンプルに対する圧入面積は大きく AFM よりも広範囲を対象とした解析となるが、細胞壁強度の解析の測定原理はどちらも同じである (図 3)。Nano-indenter を用いた解析では、本研究課題で新たに用意した中から系統を絞って解析を行なった。また、新鮮な茎のサンプルと低濃度エタノールで保存したサンプルの比較や、同一茎内における茎頂付近と基部付近における比較、浸透圧ストレスの影響の解析も行なった。茎よりも表面が滑らかである若い胚軸に関しては、AFM を用いた解析を続けた。現在得られたデータの解析をすすめているが、それぞれの変異体について、当初想定していた茎に関してだけでなく、胚軸に関しても細胞壁強度の定量化に取り組むことで、遺伝的背景と機械的特徴、細胞形態に関してより深い考察ができることが期待される。

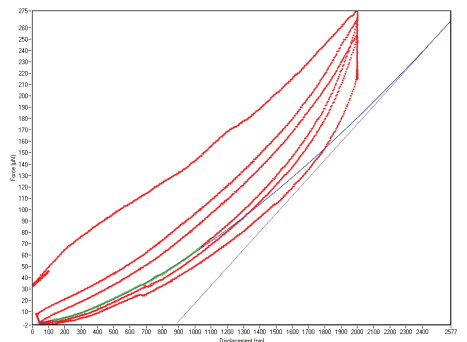


図 3. Nano-indenter によって取得した Force-displacement curve の一例。このカーブから細胞壁の堅さとして Young's modulus を算出する。

続いて、細胞壁強度の解析といった細胞レベルの解析に加え、茎の器官としての強度についても情報を得るために、3-point bending test を行なった。本来、茎を構成する材料の力学的な性質に違いがない場合、茎が太くなるほど折り曲げるために必要な力はより大きくなる。本研究では複数の変異体に関して測定を行なったところ、横断面積 (茎の太さ) と力学的性質の相関がみられない結果も得られ、細胞レベルの力学的特徴の解析とは一部異なる結果となった。ある変異体では茎の形態が円柱状でなく、複雑な形をしていることがこれらの結果に影響していることが考えられたため、茎の横断面形態の定量化をすすめている。

続いて、細胞壁強度の解析といった細胞レベルの解析に加え、茎の器官としての強度についても情報を得るために、3-point bending test を行なった。本来、茎を構成する材料の力学的な性質に違いがない場合、茎が太くなるほど折り曲げるために必要な力はより大きくなる。本研究では複数の変異体に関して測定を行なったところ、横断面積 (茎の太さ) と力学的性質の相関がみられない結果も得られ、細胞レベルの力学的特徴の解析とは一部異なる結果となった。ある変異体では茎の形態が円柱状でなく、複雑な形をしていることがこれらの結果に影響していることが考えられたため、茎の横断面形態の定量化をすすめている。

5. 一部成果に関する論文作製

2020年3月中旬より約2ヶ月間フランス全土はロックダウンし、5月の規制解除後も ENS de Lyon の厳格な衛生ルールにより、一部の実験しかすすめることのできない状況が6月末まで続いた。当研究課題の申請時には予定していた実験が終了した際に研究全体を論文としてまとめることを想定していたが、研究の一部（主に表皮細胞特異的相補系統について）を、前所属における研究と合わせて論文にまとめることとし、これらの期間はデータの再解析とともに論文執筆をすすめた（図4）。論文は発生生物学的研究の専門誌である *Development* での出版が決まり、Cover picture（図5）、Research highlight (<https://dev.biologists.org/content/148/4/e0401>) にも選ばれ、Faculty Opinions にも推薦された (<https://facultyopinions.com/prime/739631018>)。

また同期間中に、派遣先のチームで分担して、本研究課題にも深く関連している植物の形態形成とバイオメカニクスに関する総説を執筆し、その総説は2021年に発表された（Trinh et al., 2021）。

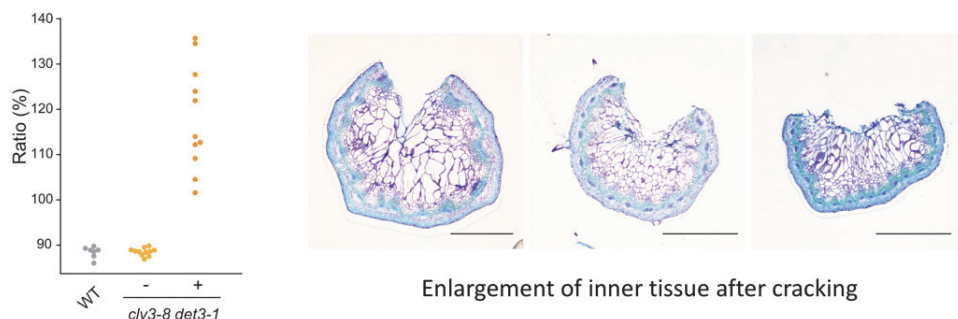


図5. *Development* 誌カバーピクチャー
<https://dev.biologists.org/content/148/4.cover-expansion>

図4. 投稿中の論文 (Asaoka et al.)から抜粋。再解析を行ったデータの一つ。

6. 今後の研究について

現在は、機械的な特徴の解析に関して得られたデータの解析をすすめている。データの解析が完了し次第、今後これらのデータを総合的に論文としてまとめ、投稿することを予定している。また、培地条件の検討により、*clv3 det3* の亀裂の発生を *in vitro* で再現できる系を構築できている。本研究課題で新たに用意した系統に関しても、この新規条件下ではどのような表現型を示すのか解析をすすめており、この結果に応じて機械的特徴の解析を行なうことも検討している。本研究課題において達成したことを基盤に、今後もこれらの系統に関する研究を発展させていきたい。

発表論文

1. Trinh D.C., Alonso-Serra, J., Asaoka, M., Colin, L., Cortes, M., Malivert, A., Takatani, S., Zhao, F., Traas, J., Trehin, C., Hamant, O. (2021).
“How mechanical forces shape plant organs”. *Current Biology* **31**:143–159.
2. Asaoka, M., Ooe, M., Gunji, S., Milani, P., Runel, G., Horiguchi, G., Hamant, O., Sawa, S., Tsukaya, H., Ferjani, A. (2021).
“Stem integrity in *Arabidopsis thaliana* requires a load-bearing epidermis.”
Development **148**: dev198028.