



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of complex morphodynamics at the organ- and cellular-level by 4D imaging of rice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	徳山, 芳樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16267号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95077
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TOKUYAMA_Yoshiki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 徳 山 芳 樹

学 位 論 文 題 名

Analysis of complex morphodynamics at the organ- and cellular-level by
4D imaging of rice

（イネの四次元イメージングを用いた器官および細胞レベルにおける複雑な形態学的動態の分析）

植物の形態変化は細胞から器官レベルまで様々なスケールで観察され、近年ではその時間変化を記述する数理モデルを用いてメカニズムの解析が行われてきている。しかし、遺伝子が直接的に制御しているのは細胞レベルの成長パターンであり、組織および器官レベルの変形に対する遺伝子の寄与を正確に理解するためには、各スケールで変形を生み出すモデルを研究し、異なるスケールのモデルを接続することが求められる。本論文では、アジアイネ野生種 W107 (*Oryza rufipogon* ; 以下、野生イネと呼ぶ) を実験材料として用い、器官レベルの動きや細胞レベルの成長動態を、非破壊的なライブイメージング解析により詳細に記述することで表現型の構成要素へと分解した。

第2章では、野生イネの側枝（分げつと呼ぶ）が出現してからの三次元的な動きを、フォトグラメトリ技術を用いた時系列三次元画像の取得を通して追跡し、分げつの頂端-基部軸周りの回転運動が起こるメカニズムを明らかにした。野生イネは直立型の草姿を持つ栽培イネ (*Oryza sativa*) と比較して、稈が倒れた匍匐型の草姿を示すことが知られており、さらに水平方向に分げつが放射状に散らばっている。本研究では、栄養成長期2ヶ月間にわたって毎日あるいは2日おきに植物個体の三次元画像を撮影し、野生イネおよび栽培イネの草姿変化を追跡した。三次元画像から主稈および全一次分げつ（主稈から分岐した分げつ）の座標（仰角及び方位角）及び頂端-基部軸周りの角度を計測した結果、野生イネと栽培イネの分げつは分岐後、それぞれおよそ180度と90度の軸周りの回転をすることがわかった。マイクロCTスキャンにより分げつの発達過程を観察した結果、共通して見られた90度ぶんの回転は、分岐後0~5日で生じる分げつの捻れが、発達過程で解消されていく動きに相当することがわかった。この分岐直後の捻れは、分げつを囲う主稈由来の葉による物理的な干渉から生じると考えられる。野生イネ特異的に見られた残り90度ぶんの回転の原因を探るために、分げつ動態を再現する数理モデルを構築し、様々なパラメータ値でシミュレーションを行った。その結果、分げつ自身に備わる重力屈性をモデルに導入した際にのみ、頂端-基部軸周りの180度の回転運動を再現することができたため、野生イネの分げつが示す大きな回転運動は、重力屈性反応によるものであるという仮説が立てられた。そこで、栽培イネのシュートにおける重力屈性変異体系統 A75 を用いた時系列三次元画像解析によって、イネの分げつは重力屈性によって回転運動が促進されていることが示された。一次分げつの頂端-基部軸周りの回転運動は、その後一次分げつから分岐する二次分げつの出現方向を直接的に制御するものであるため、本研究で示された重力屈性を介した回転運動の促進は、数多くの稈を互いに干渉が少なくなるように配置するために最適化されている可能性が考えられる。

第3章では、葉原基発生過程における変形がどのようなメカニズムで生じるのかを理解するために、野生イネの葉原基の発生過程を三次元ライブイメージングすることによって、1細胞レベルで成長パターンの解析を行った。イネ科植物のシュートは、筒状の葉が多重の層を形成するシュートの構造をしている。そのため葉原基は古い葉に包まれて隠されており、非破壊的な解析が難しいため、これまでライブイメージングを行った研究は存在していない。解剖によって露出させた葉原基を共焦点レーザー顕微鏡によって2時点で三次元スキャンを行うことで、ライブイメージング実験系の構築に成功した。まずは、P1あるいはP2ステージにある第3葉の葉原基をサンプルとして用い、PI染色液を用いる細胞壁の蛍光染色を行った。解析には四次元画像解析ソフトウェアであるMorphoGraphXを使用し、三次元スタック画像から表皮組織の表面を抽出したメッシュ画像上で各細胞の成長を定量した。先行研究により、イネ科葉原基には共通して先端へと向かう近位-遠位極性があることが示唆されているため、本研究ではそれに平行な方向（遠-近方向）および垂直な方向（中央-側方方向）の2方向について細胞の成長率を計算した。この方法では、ライブイメージング自体は成功したもの、葉原基の向軸側はそのフード型の形態によって隠されており、イメージングが高精度で行えず、解析ができなかった。しかし、フード型のような立体的な組織の変形を生み出すメカニズムが向背軸の偏差成長である可能性が考えられたため、向背軸の成長パターン比較を行う必要があった。そこで、手法の改善を試み、用いる葉を第3葉から第4葉へと変更した。これは、第4葉の出現時期の方が第3葉の出現時期よりもシュートが長く成長しており、葉原基が解剖によって生じる周囲の組織残渣に埋没してしまうことを防げると考えたためである。また、2時点目は本研究ではイメージングの最終時点であるため、これ以上成長させる必要がないことから、FAA固定および透明化ののちにカルコフロールホワイト染色液による細胞壁染色を行った。これらの変更により、向軸側を含めた葉原基全細胞のライブイメージングが可能になったため、元の手法と同様の解析法により、成長パターンを定量した。特に、遠-近・中央-側方どちらの方向でも近位側で成長率が高く、葉縁（向背軸の境界領域）では遠-近方向の成長率が低いことがわかった。さらに、側方領域においては近位側で高い遠-近方向の成長率が検出された。しかし、予想と異なり、向背軸で大きな成長率の差は検出することができなかった。そこで、シュート頂分裂組織を覆うフード型の形成は、内在的な偏差成長によってではなく、外側の葉による外因的な空間的制約である可能性を考えた。事前に解剖による外の葉の除去を行ったサンプルと行なっていないサンプルで葉原基の形を比較したところ、事前の解剖によって葉原基がより広がった形をしていたことから、葉原基のコンパクトな形状を生み出すのは外側にある葉による空間的制約であることが示唆された。本研究で構築された葉原基のライブイメージング系は、遺伝子による形態制御機構を詳細に明らかにするための基盤として利用することができるだろう。

本研究では、異なるスケールで時系列の三次元イメージングを通した表現型の解析を行った。第2章で解析した分けつの動きは葉の最も基部側の領域である葉枕の成長が司っていることが考えられるため、第3章で構築したライブイメージング解析を応用することで、細胞レベルと器官レベルのモデル接続を行うことができるかもしれない。遺伝子の細胞の成長パターン（成長率および成長方向）を明らかにし、その器官レベルの表現型への影響を予測することによって、より正確な形質の人為的制御を行っていくことにつながると期待する。