



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_review.pdf, 審査の要旨



本論文第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ている。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 染色液をによる細胞壁の蛍光染色を行っている。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な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と考えられた。

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じた表現型の解析を行っている。第 2 章で解析した分げ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可能性が示唆された。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される。

よって、審査員一同は、徳山芳樹が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。