



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of complex morphodynamics at the organ- and cellular-level by 4D imaging of rice [an abstract of entire text]
Author(s)	徳山, 芳樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/95079
Type	doctoral thesis
File Information	TOKUYAMA_Yoshiki_summary.pdf



博士論文の要約

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）

第1章 序論

植物の形態形成機構は細胞から器官レベルまで様々なスケールで調査されてきた。遺伝子が直接的に制御するのは細胞レベルの成長パターンであるため、組織および器官レベルの変形に対する正確な遺伝的寄与を理解するためには、各スケールのモデルを接続し、マルチスケールのモデルを構築することが求められる。正確な形態の制御機構を調査するために、計算モデリングとライブイメージング解析の組み合わせは効果的なアプローチであるが、現状として、理論的なモデルの検証に必要なライブイメージング法が未確立な植物組織も多い。

そこで本研究は、異なるスケールで4次元（3次元の空間+1次元の時間）イメージング解析と計算モデリングを組み合わせることにより、組織および器官レベルの表現型への遺伝的な寄与を調査するための第一歩を提案することを目的とする。第2章と第3章はそれぞれ独立に器官および細胞レベルの動態に焦点を当てているが、将来的に第3章のライブイメージング法を第2章で取り扱う器官動態に適用することにより、2つの研究が関連していくことが考えられる。

第2章 時系列3次元表現型解析による、*Oryza rufipogon* の分げつの頂端-基部軸回転に対する重力応答の寄与の解明

第2章においては、複雑なアジアイネ野生種 *Oryza rufipogon* の側枝（分げつと呼ぶ）が示す器

官レベルの運動を、3次元イメージング法のひとつであるフォトグラメトリ技術とモデリングを通して、その構成要素となる運動学的要素へと分解した。予備的な観察により、*O. rufipogon* では一次分げつが出現後、自身の頂端-基部軸周りに回転することが示唆された。そこで、分げつの複雑な3次元運動を捉えるために長期的なフォトグラメトリ解析を実施した。

本研究では、まずフォトグラメトリ解析における3次元画像構築の精度を確認したのち、*Oryza rufipogon* 系統 W107 およびアジアイネ栽培種 *O. sativa* 系統の日本晴および A58 の植物個体を栄養成長期2ヶ月間にわたって毎日あるいは2日おきに3次元画像構築し、その草姿変化を追跡した。3次元画像からは主稈および一次分げつについて3種類の角度（仰角・方位角・頂端-基部軸周りの回転角）を計測した。仰角および方位角については、W107 でのみ次第に主稈が倒れていく等、先行研究で得られた草姿変化データと一致する結果が得られた一方、本研究で初めて計測された回転角の時系列データからは、*O. sativa* 系統では分げつにおいて90度ほどの回転が見られたのに対し、W107 では分げつが裏返るような180度ほどの回転が検出された。

分げつの回転メカニズムとして、分げつを囲う主稈由来の葉や葉様の構造であるプロフィールによる物理的な干渉によって、初めは分げつの葉鞘が捻れており、成長と共にその捻れが解消されていくという仮説を立てた。その検証のため、複数時点で採取した W107 の一次分げつをマイクロ CT による X 線スキャンに供試した。その結果、分げつの出現直後では基部と頂端部の間に捻れが観察された一方、より後の時点では捻れが見られなかった。このことから、分げつの回転角変化には葉鞘の捻れ解消が少なくとも部分的に関わっていることが示唆された。

分げつの捻れ解消によって分げつの裏返りを説明できるかを確かめるために、計算モデルを構築し、3次元画像から計測した回転角の時系列データを再現できるようなパラメータ値を探索した。その結果、野生イネのように主稈が傾く場合において、分げつが出現後に主稈から離れる開張運動のみでは回転運動データを再現できるパラメータ値を見つけることはできず、一方で分げつ自身に働く重力屈性をモデルに導入した場合には、仰角・方位角・回転角の3種類の時系列データを再現できるパラメータ値を見つけることができた。このことから、野生イネの一次分げつにおいて、葉鞘の捻れ解消と分げつ自身にかかる重力屈性反応が組み合わさることで回転角が変化していくことが推測された。

重力屈性による分げつの頂端-基部軸周りの回転への寄与を確かめるため、*O. sativa* のシュートにおける重力屈性変異体系統 A75 を用いて、時系列フォトグラメトリ解析を実施した。その際、W107 のように倒れた主稈から分岐する分げつの動態を観察するため、人為的に主稈を傾ける操作実験として行った。その結果、A75 では W107 ほどの回転角変化が見られなかったことから、重力屈性によってイネの分げつの回転運動が促進されていることが示唆された。

第2章で示された重力屈性を介した回転運動の促進機構は、一次分げつから出現する二次分げつの方向を直接的に制御するものであることから、イネ個体に存在する多くの稈が違いに干渉することを避けるようにそれらを最適に配置するような仕組みである可能性が考えられる。

第3章 イネ葉原基の細胞成長動態のライブイメージング解析

第3章では、ライブイメージング法を用いて、イネ葉原基の成長パターンを1細胞単位の解像度で解析した。これは、計算モデルによる先行研究の成長パターンの予測の検証を可能にするものであると考えられる。これまで双子葉植物では葉原基のライブイメージングが行われてきたが、イネ科植物においては、筒状の葉が多重の層を形成するシュートの構造により、葉原基が古い葉に包まれて隠されており、これまでライブイメージングの成功例の報告がなかった。そこで、本研究では、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により、4次元イメージング解析ソフトウェア MorphoGraphX を用いたライブイメージング解析系の構築に成功した。

まずは、第3葉の葉原基をサンプルとして用い、発芽した種子からピンセットを用いて慎重に葉原基を覆う組織を取り除いた。P1あるいはP2ステージにある葉原基をPI染色液によって蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡でZスタックスキャンを行った。本手法では、3次元スタック画像から（主にレンズに近い背軸側組織の）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。ここでは、2時点の画像を比較することによって、細胞面積の拡大率、細胞分裂頻度、細胞の成長異方性、そして最大の成長方向における伸長率を定量した。

イネ科葉原基にはオーキシン輸出キャリア PIN-FORMED1 の細胞内局在として表れる、共通して先端へと向かう遠位-近位極性があることが示唆されているため、本研究では各細胞に遠-近および中央-側方方向の2種類の直交した軸を設定し、極性によって方向づけられる成長を解析した。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、MorphoGraphXによる解析ができていなかった。そこで、同じサンプルの器官全体で解析が可能になるように手法を改善し、3次元画像の精度を向上させることに成功した。

改良後の手法を用いることで、向軸側・背軸側およびその境界に当たる葉縁部のライブイメージング解析が可能になったため、元の手法と同様に細胞の成長動態を解析した。遠-近および中央-側方どちらの方向でも成長率が高い部位が検出された一方、葉縁では遠-近方向の成長率が低かった。シュート頂分裂組織を覆う葉原基のフード型の形成が見られたことから、葉の向背軸側の

2 面間で異なる成長率が検出されると予想していたが、本研究の解析では向背軸側の間で成長率の差を見出すことはできなかった。

第3章で構築されたライブイメージング系は、コムギやオオムギ、トウモロコシなど他のイネ科植物種にも適用できるものである。これらの植物で広く成長解析を行い、その結果を統合することによって、イネ科植物に広く保存された一般的な成長の法則を見出すことができるだろう。

第4章 総合考察

本研究では、正確な表現型を記述できるイメージング法が存在することで、理論生物学と遺伝学をつなげることができることを示した。表現型を遺伝的に制御していくためには、各スケールでのライブイメージングとモデリングを組み合わせた成長動態の解析を行い、スケール間のモデルを接続し、最後に遺伝子制御ネットワークに成長率・細胞極性・細胞のアイデンティティ等の成長の構成要素を統合していくことが求められるであろう。このようなマルチスケールのアプローチによって、細胞の成長解析とより大きなスケールの農業形質を橋渡しすることができ、細胞成長への遺伝的な寄与がどのようにより大きなスケールの表現型を構成するのかを理解することができると思われる。

例えば、第2章で取り扱った器官レベルのモデルに細胞レベルの解析を適用することで、モデルの各パラメータへの遺伝的な効果を特定することができるだろう。また、第3章で取り扱った葉原基の成長がどのような成熟した葉の表現型へと結びつくのか、成熟した葉の形態に関する遺伝子の変異体のライブイメージング解析等を行うことで、理解することができるだろう。このように、本研究は、器官および細胞レベルのライブイメージング解析法によって、そのようなマルチスケールのアプローチによるイネの形態学的動態の研究の第一歩を提案するものである。