

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14548

研究課題名(和文) 伸長中の根の細胞動態を経時的にイメージングする技術の開発

研究課題名(英文) Development of a microscope system that enables time-lapse imaging of cellular behavior in growing roots

研究代表者

中島 敬二 (Nakajima, Keiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80273853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：伸長途上の根の先端における細胞の振舞いや遺伝子発現をイメージングすることは、根や植物の成長の理解に必須である。しかし伸長中の根の先端を顕微鏡の視野内に維持することが技術的に難しいため、長時間にわたる高倍率のイメージングは困難であった。本研究課題では、垂直に配置した電動ステージを装備した顕微鏡を用い、伸長中の根の先端を数日間にわたって自動的に追尾する観察システムを開発した。このシステムを用いることで、シロイヌナズナの根冠組織から細胞層が剥離する過程を詳細に捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Continuous observation of cell behavior and gene expression dynamics at the tip of growing roots is essential to investigate the regulation of root and plant growth. It had been, however, very challenging, as the tip of extending roots easily go out of a microscopic field. Using a microscope with a vertically oriented, motor-driven sample stage, we developed a system that can track the tip of growing roots for several days. Using this system, we could successfully follow an entire process of cell detachment in the Arabidopsis root cap.

研究分野：植物発生生物学

キーワード：植物 根 顕微鏡 タイムラプス

### 1. 研究開始当初の背景

植物の根は、水や栄養分の吸収や植物体の支持といった個体の生存に必須の役割を担っている。根が持つこれらの機能は、分化した細胞群が高度に秩序だったパターンに配置されることで発揮される。根の組織は比較的観察が容易であり、特にシロイヌナズナの根は植物組織形成のモデル実験系として多用され、これまでに多くの重要な発見がなされている。研究代表者は、根の組織パターン形成における細胞間シグナル伝達の重要性に着目し、転写因子やマイクロRNAの細胞間移行を介したパターン形成の制御機構を明らかにしてきた。また独自のアクティベーションタギング法を開発し、細胞分化を調節する新規な制御因子を同定している。

根の組織パターン形成に関するこれまでの研究は、転写ネットワークや細胞間情報伝達で説明される内的発生プログラムの解明に重点が置かれてきた。実験に用いる植物は、一定の培地条件や生育環境下におかれ、根は寒天培地の表面を伸長させている(図1)。このような研究により、組織形成の基本原則が明らかにされたものの、様々な外的因子にตอบสนองしながら伸長する根の動的な成長を、各細胞の遺伝子発現や形態変化、あるいはオルガネラ動態のレベルで捉える研究は行われてこなかった。これは成長中の根の細胞を高倍率で継続的に観察することに、大きな技術的障壁があることによる。



図1 寒天培地上を生育するシロイヌナズナの実生  
通常の実験条件では、根は摩擦の少ない寒天培地の表面を生育する

研究代表者の研究室では、根冠細胞の動的性質を研究している。根冠細胞は根の先端を覆う組織で、土壌からの刺激や微生物にさらされており、その遺伝子発現や細胞形態はこれらの外的因子との相互作用にตอบสนองして変化している。また根冠で知覚された重力などの刺激は、細胞の偏差伸長を通じて根の伸長方向を制御する(図2)。

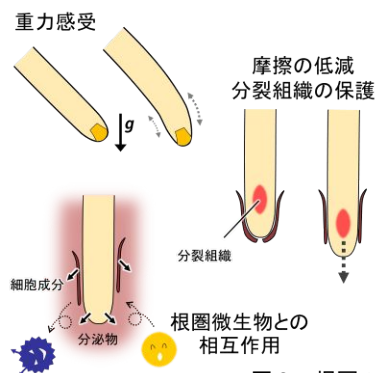


図2 根冠の生理機能

根冠がもつこれらの特異的な機能は、根冠を構成する細胞のユニークな性質に依存している。根冠は数層の細胞層からなるが、最も内側に幹細胞層があり、これが一定の間隔で分裂することで、新たな細胞を供給している。生じた娘細胞のうち、近位(根の基部側)の細胞は幹細胞として維持されるが、遠位(根端側)の細胞は根冠細胞へと分化する。幹細胞の分裂が繰り返されることにより、根冠を構成する細胞は根冠の外側へと押し出されてゆく。最外層に達した細胞は、プログラム細胞死と、生きた細胞の自律的な剥離により根端から脱落し、土壌中に分散する(図3)。このような作用により、根冠はその形態を保ちながら、構成する細胞を常にターンオーバーさせている。また土壌中に脱落した根冠細胞は、根圏の生物学的・非生物学的な環境維持に機能していると考えられている。

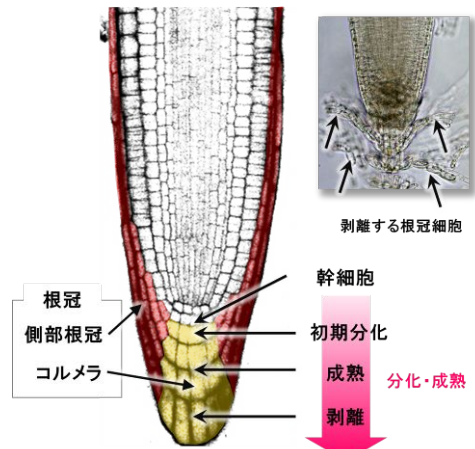


図3 根冠細胞の分化と動態

### 2. 研究の目的

根の組織パターンは、根端部に存在する幹細胞の正確な分裂により維持されている。したがって一つの細胞列を根端から基部側へ観察すれば、時間軸に沿った分化を解釈できるとされてきた。しかしこの方法で観察できるのは、細胞壁の肥厚など分化の「結果」であり、細胞形態の微妙な変化やオルガネラの動き、機能タンパク質の局在変化など、分化中の細胞内イベントや細胞の動きそのものを見ることは出来ない。本研究課題では、近年目覚ましく進歩した画像解析技術と顕微鏡技術を融合させ、これまで不可能であった伸長中の根における細胞の動態や遺伝子発現の変化を、高倍率で長時間にわたって観察できる顕微鏡システムの開発を行った。

成長中のシロイヌナズナの根を低倍率で経時的にイメージングした例は、これまでいくつか報告がある。またルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を用いて、ホルモンや内性リズムにตอบสนองした遺伝子発現を低倍率で観察した例もある。これに対し、本研究課題で目指したのは、細胞レベルの遺伝子発現やオルガネラ動態を、高倍率で経時的に観察できる系である。これを可能にするためには、

伸長する根の先端を高倍率の顕微鏡視野に捉え続ける追尾システムが必要となる。これは一般的に想像されるよりもはるかにチャレンジングである。まず植物の根は決して直進的に成長するわけではなく、回旋運動や波状運動をしながら成長する。そのため顕微鏡視野の XY 軸方向のみならず、奥行方向 (Z 軸) に対しても追尾する必要がある。さらに光や温度、障害物といった外的環境により根の成長速度そのものが変動する。

研究代表者らは、以前からシロイヌナズナの根の高倍率かつ経時的な観察に取り組み、顕微鏡メーカーの協力を得て試行実験を重ねた。その結果、倒立顕微鏡を横倒しにすることで試料ステージを垂直に保持し、そこに固定したチャンバースライド内で根を重力方向に伸長させることで、長時間の観察が可能であることが分かった。そこで本研究課題では、さらに電動ステージを用いて根端を自動的に視野の中心に保持するための追尾システムを導入し、根端を数日間にわたって経時的に観察するシステムの構築を目指すことにした。

この方法が確立されれば、制御因子の機能解析で終わりがちな根の細胞分化研究を、細胞内でおこるイベント自体を解析する真の分化研究へと深化させることができる。さらに根が土壌中の障害物を回避する方法や、土壌との摩擦に抗して根が伸長できる仕組みなど、植物の生存戦略や環境応答の観点から、根の発生制御を明らかにする新たな研究分野の展開が期待される。

### 3. 研究の方法

作成した顕微鏡システムの概要を図 4 に示す。

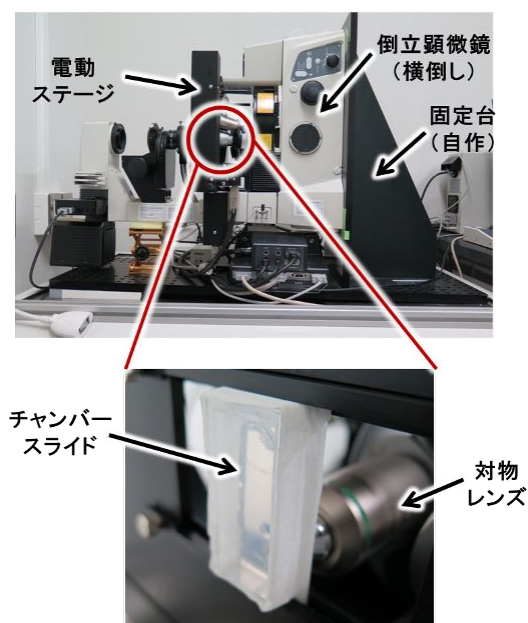


図 4 根端を自動的に追尾する顕微鏡システム

まず、市販の倒立型顕微鏡 (ニコン社製 Eclipse Ti-E) を横倒しに固定した。スチール製のラックを作成し、顕微鏡の底部をボルトで固定した。これに加え、照明灯を支える支柱を市販のラボジャッキで下から支持した。これにより、試料ステージが垂直方向に固定されるようにした。

根端を追尾するために、電動ステージを装着した。下に述べるチャンバースライドをマウントするための器具を作製し、ステージに固定した。

植物サンプルは、通常の寒天培地で発芽させた実生を、底部がカバーガラスで出来たチャンバースライド内に移し、根の部分に寒天培地のブロックをかぶせて固定した。これを上記のマウントを介して、電動ステージにセットした。

蛍光イメージは落射蛍光像を高感度 CMOS カメラにより撮影した。根端を追尾するために明視野画像を撮影し、このデータをもとにニコン社製 NIS-element ソフトウェアの keep object in view プラグインを用いて、電動ステージを制御した。

数日間にわたる観察においては、植物の生育を維持するために光照射が必要である。植物体生育用に LED 光源をコンデンサー部に設置し、カメラと連動して画像取得時に照明が消灯するシステムを導入した。

観察する植物としては、野生型シロイヌナズナ、および根冠分化の制御因子である BRN 転写因子をコードする 2 つの遺伝子 *BRN1*, *BRN2* の二重変異体 (*brn1 brn2*) 背景に、細胞膜を赤色蛍光で可視化するコンストラクト SPR1pro-tdTomato-LTI6b を導入した植物を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 顕微鏡システムの開発

根は重力方向に従って下方に伸長するため、通常の顕微鏡に付属する水平な観察ステージで伸長させると、根が迷走して追尾できない。この問題を解決するため、市販の倒立顕微鏡を横倒しに固定して観察ステージが垂直に立つようにした。これにより顕微鏡の光軸は水平となる。電動ステージを導入し、制御コンピューターからの信号により XY 軸方向に精密に動作するようにシステムを構築した。根の明視野像を記憶させ、この形状が常に視野の中央に位置するようにステージを動作させるプログラムを設定した。蛍光像の取得のために暗所下で観察した場合には、根の成長が途中で停止した。そのため、植物体生育用に新たに LED 照明をコンデンサー部に設置し、CMOS カメラからの TTL 信号により、画像取得中は消灯し、それ以外のタイミングでは植物体を照明するシステムを導入した。これにより最長で 8 日間にわたって根端部を観察し続けることができるシステムの構築に成功した。

(2) 根冠細胞の剥離過程の観察

細胞膜を蛍光タンパク質で可視化したシロイヌナズナ植物を用いて根冠の剥離過程を観察した。野生型背景においては、まず側部根冠最外層の基部側にある細胞が根から外れ、外側へ湾曲することで剥離が開始された。その後、最外層全体が根から遊離し、層構造を保ったまま根端から脱落した。剥離の開始が発芽誘導後の比較的一定したタイミングで起こるのに対し、剥離開始から脱離までの時間は一定していなかった。さらに1つ内側の根冠層も同様の過程を経て剥離・脱落したが、剥離開始の時間は比較的一定していた(図5)。

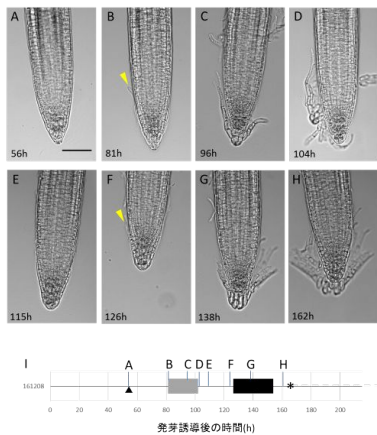


図5 野生型植物の根冠剥離のイメージング。A-Hはタイムラプス画像から抽出したスチルイメージ。Iは2層の根冠層の剥離のタイミングを示すダイアグラム。剥離の開始から終了までを長方形で示した。

根冠分化の制御因子である *BRN1* と *BRN2* を欠損した変異体でも、野生型と同様に根冠の剥離が開始されたが、根からの脱離は起こらなかった。しかし最外層の脱離がないまま内側の細胞層が剥離を開始し、そのタイミングは野生型と同等であった(図6)。

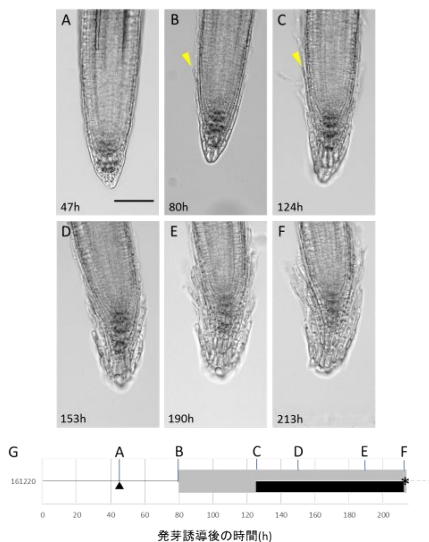


図6 *brn1 brn2* 二重変異体の根冠剥離のイメージング。A-Fはタイムラプス画像から抽出したスチルイメージ。Gは2層の根冠層の剥離のタイミングを示すダイアグラム。

以上の観察結果から、根冠の剥離は根の内生リズムに依存して開始されるのに対し、最終的な脱離は、偶発的な機械刺激によって起こることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

郷達明、上野皓輝、小園紗希、神谷雅子、金鍾明、遠藤高帆、宮島俊介、中島敬二  
「シロイヌナズナ根冠細胞の分化と剥離の動態解析」

第58回日本植物生理学会年会 2017年3月16日 鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

Keiji Nakajima

“Mechanisms regulating root cap differentiation and functions”

Japan-Taiwan Bilateral Minisymposium  
2016年9月9日 Taipei (Taiwan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 敬二 (NAKAJIMA, Keiji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号: 80273853

(2) 連携研究者

宮島 俊介 (MIYASHIMA, Shunsuke)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 20727169

郷 達明 (GOH Tatsuaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 80511419

古田 かおり (FURUTA, Kaori)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号: 10746655