

表皮細胞の大きさと核内倍加のサイコロゲーム

川出 健介^{1,2,3}

¹生命創成探究センター 植物発生生理研究グループ

²基礎生物学研究所 植物発生生理研究室

³総合研究大学院大学 生命科学研究科 基礎生物学専攻

〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

Kensuke Kawade^{1,2,3}

Rolling dice of endoreduplication during cell size specification

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, cell size, endoreduplication, leaf development, ploidy

¹Plant Development and Physiology Research Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS)

²Laboratory of Plant Development and Physiology, National Institute for Basic Biology

³Department of Basic Biology, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies Higashiyama 5-1, Myodaiji, Okazaki, 444-8787 Aichi, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a3.00150

1. はじめに：細胞サイズの多様性と均一性

細胞の大きさはでたらめに決まるのではない。求められる機能を十分に発揮できるよう、成熟したときの大きさが組織ごとに決められている。その一方で、ひとつ、もしくはごく少数の細胞に由来するクローン的な集団であっても、細胞の大きさが実に多様な場合もある。興味深いことに、この場合の細胞の大きさを測定して集団レベルで捉えると、大きさの分布を示すヒストグラムはいつも同じ形になる。つまり、細胞の大きさを決めるプロセスには、集団に均一性をもたらす頑健な仕組みの他に、多様性を再現性良くみ出す仕組みが存在すると考えられる。これまで、個々の細胞の大きさの制御機構については盛んに研究されているが、このような集団における細胞のサイズ分布については十分に調べられていない。本総説では著者らの近年の成果(Kawade and Tsukaya, 2017)を中心に据え、植物細胞の大きさと関連性がよく取り上げられる核内倍加の起こる仕組みや、それに応じて細胞が大きくなる仕組みをまとめる。特に、それらの理論的・定量的な側面に焦点を当てることで、細胞が確率論的なふるまいを組み込んで最終的な大きさへ到達する姿を紹介したい。

2. 植物細胞の大きさと核内倍加

細胞は分裂と成長を繰り返して増殖し、その後、増殖活性を失って分化肥大を起こす。増殖細胞の大きさが一定に保たれる仕組みは分化肥大を起こしている細胞のサイズ制御を考えるうえで重要だが(Tsukaya, *in press*)、本総説では考察する対象を明確にするため、分化肥大を終えて成熟した細胞の大きさについて着目する。

シロイヌナズナの葉の表皮組織と、隣接して内部にある柵状組織は、茎頂分裂組織の異なる細

胞群に由来する別々のクローン的な集団である (Poethig, 1989; Szymkowiak and Sussex, 1996)。完全に展開した葉において、気孔やトライコーム以外の表皮細胞 (pavement cell) は投影面積で $1,000 \mu\text{m}^2$ から $10,000 \mu\text{m}^2$ と様々な大きさになる。全体としては、 $3,000 \mu\text{m}^2$ を中央値として大きい方へ長く伸びる裾の重いサイズ分布を示す。ところが、柵状組織の細胞では $1,500 \mu\text{m}^2$ ほどを平均値とし、標準偏差が $300 \mu\text{m}^2$ ほどの正規分布に近いサイズ分布となる (図 1)。これまでの研究から、表皮組織における細胞では、核内倍加による核相の増加と分化肥大の促進に正の相関があると報告されている (Elsner et al. 2012; Melaragno et al. 1993)。核内倍加とは染色体の複製により核内 DNA 量が倍加したにも関わらず、その後に細胞分裂が起こらないため核相が増加するという、細胞周期を改変して起こる現象である。核内倍加が繰り返されることで、シロイヌナズナの場合は核相が従来の 2C から 4C, 8C, 16C … と増加する。核内倍加と細胞の大きさの関係は葉だけでなく、暗所栽培で伸びる芽生え胚軸 (もやし) の表皮でも報告されている (Gendreau et al. 1998)。これらのような目を引く例があったことも背景となり、細胞サイズ制御の視点から核内倍加についての分子機構が精力的に調べられてきた (Breuer et al. 2010; Kalve et al. 2014)。そして、蓄積してきた知見をもとに、細胞周期と細胞成長を組み合わせる細胞サイズを考察するシンプルな機能モデルから、細胞周期に関わる分子の相互作用を網羅的に微分方程式で記述した数理モデルなどが報告されている (Apri et al. 2014; Beemster et al. 2006; Dissmeyer et al. 2009; Roodbarkelari et al. 2010)。現時点で、細胞分裂が停止した後に核内倍加が繰り返し起こるまでの動態を再現することができているので、核内倍加が起こる基本的な分子機構については一定の理解を得ていると言える。

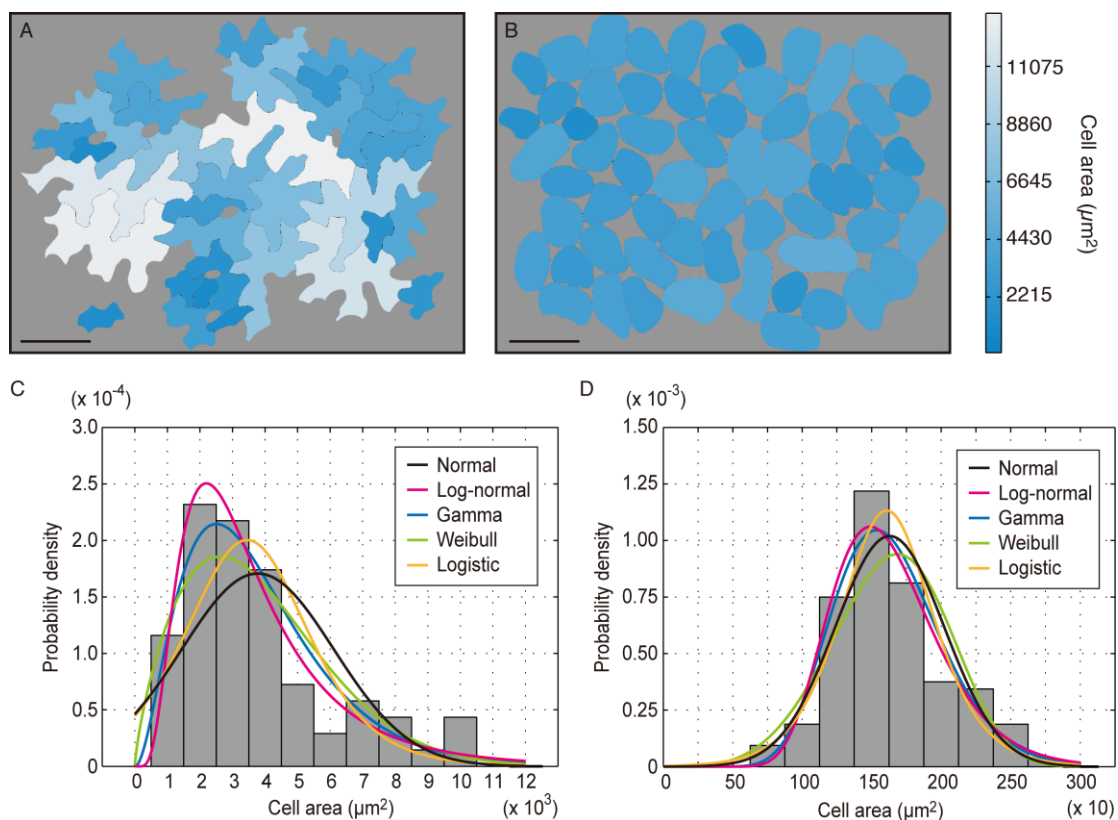


図 1. シロイヌナズナの成熟した第 1 葉における細胞のサイズ分布。(A, B) 表皮組織 (A) および柵状組織 (B) の細胞を大きさによって色分けした図。(C, D) 表皮組織 (C) および柵状組織 (D) における、細胞サイズの相対的な分布 (ヒストグラム) と、それをもとに推定した様々な確率密度分布 (実線)。表皮細胞のサイズ分布は裾が重く、対数正規分布 (Log-normal) などで比較的良く表現できる。スケールバー = $100 \mu\text{m}$ 。

3. 核内倍加の発生ダイナミクス

前章において、表皮細胞の大きさと核相に関連性があると述べたことから分かるように、表皮組織では個々の細胞において核内倍加が起きる頻度が同じではない。完全に展開した第一葉では核内倍加を1回も起こしていない2Cの細胞から、核内倍加を4回起こした32Cの細胞まで観察される。核内倍加が繰り返し起こることは、細胞周期の分子機構をもとにした考え方だけで再現できるが、集団内にばらつきが生じることは説明できない。そこで考慮すべき要素として提唱されているのが、核内倍加の発生動態における確率論的なふるまいである。その先駆けとして、細胞が一定時間あたりに核内倍加を起こす確率 r を核相ごとに設定し、集団における核相プロファイルの時間発展を微分方程式で表現した研究が知られている (Schweitzer et al. 1995)。この数理モデルは、例えば2Cの細胞が核内倍加を起こして4Cになる確率を r_{2C-4C} とし、同様に4Cの細胞が核内倍加を起こす確率を r_{4C-8C} といったふうに、核相の数だけパラメータを設定するものである。こうして構築された数理モデルを用いて、トウモロコシの胚乳で測定される核相プロファイルの時間発展を再現するようパラメータを調整したところ、 r は時間とともに線形的に減少する性質があると推定された。この数理モデルは、トウモロコシの胚乳のように活発に核内倍加が起こる組織(10日間で最大5回)では核内倍加の動態をよく表現できたのだが、ユリの花器官のように緩やかに核内倍加が起こる組織(40日で最大3回)には適用できなかった。そこで、核内倍加を起こす確率 r を、シグモイド関数に従って一定時間後に急激に低下させる改変モデルが発表された (Lee et al. 2004)。この改変モデルの妥当性は、 r を線形的に減少させる場合よりはるかに実測値に合った動態を示すことや (Lee et al. 2004)、低温によるユリ花器官の成長抑制を摂動として核内倍加を調べた実験でも確認されている (Lee et al. 2007)。その後も数理モデルの検討がなされ、現在では細胞周期の長さや、時間の進行に伴う分裂能の低下など増殖に関連するパラメータも組み込むことで、細胞増殖から核内倍加の動態までを集団レベルで十分につなぐ数理モデルが提案されている (Bertin et al. 2007)。また近年、シロイヌナズナのがく片に見られる巨大細胞に着目し、増殖している細胞が確率論的に核内倍加を起こすと、その後は成熟するまで核内倍加を起こし続けるという仮定を設けることで、集団内における特殊な細胞の形成にも対応するモデルが発表されてもいる (Roeder et al. 2010)。

このように、確率論的なふるまいで細胞集団に核相プロファイルの多様性をもたらす重要なパラメータとして、一定時間あたりに核内倍加を起こす確率 r が挙げられる。しかし現在、現実的な状況をなるべく反映させるため、数理モデルに組み込まれるパラメータの数は増える傾向にある。これでは、核相プロファイルの実測値を再現できたとしても、得られる結果の解釈が難しくなるのは避けられない。そこで著者らは、シロイヌナズナの葉の表皮組織における核相プロファイルを解析し、数理モデルの改良を目指した。そして、核内倍加は核相を問わずランダムに起こるポアソン過程だと仮定できることを見つけた。これにより、葉の表皮組織では、一定時間あたりに核内倍加を起こす確率を

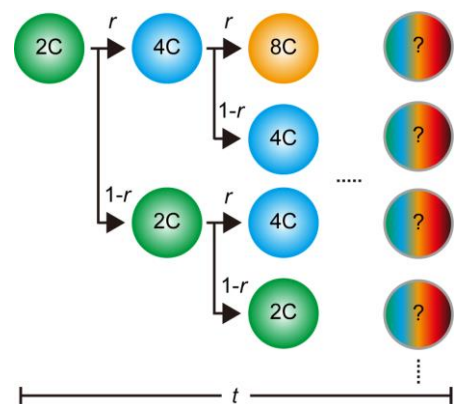


図 2. 核内倍加の動態モデル. 限られた時間 t において、確率 r で起こる核内倍加が何回起こるかで、各細胞の核相が決まる。

全ての時間において単一の r とすることができ、成熟までの時間 t との 2 つのパラメータのみで核相プロファイルを再現することに成功した (図 2)。この数理モデルは解析的に解くことができ、また、従来のモデルを単純化して整理できる点から、葉の表皮組織を題材として核内倍加の発生動態を理解する重要な一歩になると考えている。

4. 核内倍加と細胞サイズの定量的な関連付け

ここまで紹介してきたように、核内倍加の動態については実験および理論的なアプローチでよく研究されている。しかし、核相プロファイルから細胞の大きさの多様性を定量的に調べている研究は意外にも限られている。その原因のひとつとして、核相プロファイルは組織から単離した細胞をフローサイトメーターでひとまとめに分析している場合が多く、個々の細胞の核相と大きさを対応付けられていなかった点が挙げられる。ところが近年、組織の透明化技術の発展や、定量イメージング解析の精度が向上し、顕微鏡を用いて核の大きさから個々の細胞の核相を見積りつつ、対応する細胞の大きさを測定することが可能となっている (Katagiri et al. 2016)。著者らはシロイヌナズナの葉において対応が付いている細胞の核相と大きさを解析し、核内倍加が 1 回起きると表皮細胞は投影面積でおよそ 1.5 倍、2 回起きるとさらに 1.5 倍、と指数関数的に大きくなることを見いだした (ploidy effect, PE)。これは、細胞を球として単純化して考えた場合、体積が 2 倍になると投影面積は 1.5874 倍になることから、妥当な値だと考えられる (図 3)。そこで、前章で述べた核内倍加の動態を確率論的なふるまいで表現する数理モデルで核相プロファイルを推定し、それに PE を反映させて細胞集団のサイズ分布を計算した。そうすると、表皮組織で見られる特徴的な裾の重い分布を十分に再現することに成功した。さらに、核内倍加の発生に異常を

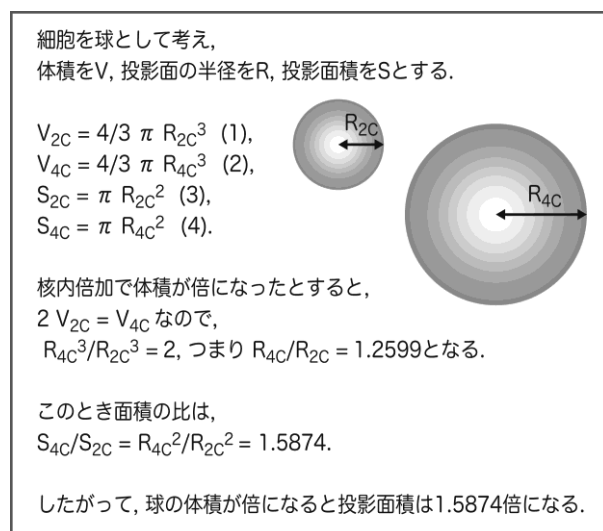


図 3. 体積と投影面積の関係.

興味深いことに、この細胞サイズ決定モデルは、核内倍加による PE の効果を外すだけで、柵状組織の細胞サイズ分布を再現することもできる。したがって、表皮組織における多様な細胞の大きさは、柵状組織における細胞サイズの基本制御プログラムに PE を組み込むのみで達成される、という実に分かりやすい関係性も考察することができる。これは、柵状組織の細胞に表皮のアイデンティティーを分子遺伝学的手法で付与すると、柵状組織であっても PE が顕在化し始めるという実験結果とも矛盾しない (Katagiri et al. 2016)。

5. さいごに：確率論的なふるまいがうみ出す多様性

著者らの研究から、葉の表皮組織で細胞の大きさの多様性を再現性良くうみ出す仕組みは、確率論的な核内倍加の動態と、それに応じた指数関数的な分化肥大の促進だということが分かってきた。ここから、確率論的なふるまいが指数関数的なプロセスを経て多様性をうみ出すという、生命システムのひとつの戦略が伺える。同じような例として、タンパク質の発現レベルが知られている。大腸菌におけるタンパク質のコピー数を1分子計測と統計的な解析により調べた研究から、mRNAの転写は確率論的に起こること、そして、タンパク質への翻訳は指数関数的な分布にそった頻度で群発すること、が示されている (Cai et al. 2006; Taniguchi et al. 2010; Yu et al. 2006)。大雑把ではあるが、このような比較から生命システムの基本原理が見いだされる可能性もあるはずである。

そこで、シロイヌナズナの葉の表皮組織において、核内倍加がどのように確率論的に起こっているのか、また、核相に応じてどのように指数関数的に細胞が大きくなるのか、というのは解くべき重要な課題である。前者については、表皮のアイデンティティを發揮させる転写因子をコードする *AtML1* という遺伝子の発現揺らぎが、がく片組織の巨大細胞で核内倍加が確率論的に起こる鍵だと報告されている (Meyer et al. 2017)。また、別のアプローチとして、確率論的な要素を組み込んで核内倍加の発生動態を再現する理論モデルと、核内倍加の周期に関わる分子や核内倍加を起こす細胞のライブイメージング解析を組み合わせることで、どの制御機構に揺らぎが潜んでいるのか調べられるはずである。また、後者については、まずは細胞の大きさと核相の関係をより適切に理解することから始める必要があると考えられる。シロイヌナズナ表皮組織では、核内倍加により指数関数的に細胞が大きくなっていると考えたと実測値とよく合うが、その関係性は柵状組織では見られないことがこれまでの研究で明らかにされている (Tsukaya, 2013)。また、エンドウの子葉やトマトの果皮では、核相と細胞の大きさには線形的な関係があると報告されている (Cheniclet et al. 2005; Lemontey et al. 2000)。さらに、核内 DNA 量と核の大きさには線形的な関係が見られる一方で、核の大きさと細胞の大きさには必ずしも相関関係がある訳では無い点にも注意が必要である (Robinson et al. 2018)。したがって、細胞のサイズ制御と核内倍加については、両者の関係を定量的に関連づけて様々な情報を整理することが、これからの重要な第一歩になると考えられる。それを踏まえ、なぜ核相からシロイヌナズナ表皮細胞の大きさが推定できるのか、その詳細な仕組みを明らかにしたいところである。

このように立ち戻って考える際、細胞の生理的な側面を考察に組み込むことも興味深い点である。例えば、核内倍加の発生動態に関する理論モデルにおいて、各パラメータと生理的意義を対応付けることで、育種戦略を提案しようとする試みが存在する (Apri et al. 2014)。核内倍加についての分子機構がよく理解されている現在だからこそ、このような再考察に取り組むことで、独自の研究へとつながるネタを見つけられるかもしれない。

本総説の最初に、「細胞の大きさはでたらめに決まるのではない」と表現した。これは自明ではなく、でたらめの語源を考えるとサイコロゲームにつながる。確率論的なふるまいを直感的に認識するのは難しいが、定量的に解析することで浮かび上がってくる面白い性質である。

6. 謝辞

まずは、本総説を執筆する機会を下さった日本植物学会・電子出版物編集委員の方々に深く感謝します。

また、東京大学の塚谷 裕一 博士からは、本総説の中心となる研究を遂行するにあたり、数多くのご助言を頂きました。東京理科大学の松永 幸大 博士からは、本総説の中心となる研究を遂行するために必要な公刊済みの実験データを、快く迅速に共有して頂きました。基礎生物学研究所の藤田 浩徳 博士には、核内倍加の発生動態に関する数理モデルについて大変参考になるご意見を頂きました。主として取りあげた筆者らに近年の研究成果 (Kawade and Tsukaya, 2017) は、住友財団 基礎科学研究助成 (150238) や日本学術振興会 科学研究費 若手研究 (B) (17K15147) の援助で進められました。この場を借りてお礼を申し上げます。

最後になってしまいますが、自然科学研究機構 生命創成探究センター (Exploratory Research Center on Life and Living Systems, ExCELLS) の BIO-NEXT プロジェクトからは、研究活動の全てにおいてご支援頂いております。本当に有り難うございます。

7. 引用文献

- Apri, M., Kromdijk, J., de Visser, P.H.B., de Gee, M., & Molenaar, J. 2014. Modelling cell division and endoreduplication in tomato fruit pericarp. *J. Theor. Biol.* 349: 32-43.
- Beemster, G.T.S., Vercruyse, S., De Veylder, L., Kuiper, M., & Inzé, D. 2006. The *Arabidopsis* leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *J. Plant Res.* 119: 43-50.
- Bertin, N., Lecomte, A., Brunel, B., Fishman, S., & Génard, M. 2007. A model describing cell polyploidization in tissues of growing fruit as related to cessation of cell proliferation. *J. Exp. Bot.* 58(7): 1903-1913.
- Breuer, C., Ishida, T., & Sugimoto, K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 654-660.
- Cai, L., Friedman, N., & Xie, X.S. 2006. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature.* 440: 358-362.
- Cheniclet, C., Rong, W.Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J.P., & Renaudin, J.P. 2005. Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* 139: 1984-1994.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Pusch, S., De Schutter, K., Alvim Kamei, C.L., Nowack, M.K., Novak, B., Duan, G.L., Zhu, Y.G., De Veylder, L., & Schnittger, A. 2009. Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell.* 21: 3641-3654.
- Elsner, J., Michalski, M., & Kwiatkowska, D. 2012. Spatiotemporal variation of leaf epidermal cell growth: a quantitative analysis of *Arabidopsis thaliana* wild-type and triple *cyclinD3* mutant plants. *Ann. Bot.* 109: 897-910.
- Gendreau, E., Höfte, H., Grandjean, O., Brown, S., & Traas, J. 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyls. *Plant J.* 13(2): 221-230.

- Kalve, S., De Vos, D., & Beemster, G.T.S. 2014. Leaf development: a cellular perspective. *Front. Plant Sci.* 5: 362.
- Katagiri, Y., Hasegawa, J., Fujikura, U., Hoshino, R., Matsunaga, S., & Tsukaya, H. 2016. The coordination of ploidy and cell size differs between cell layers in leaves. *Development.* 143: 1120-1125.
- Kawade, K., & Tsukaya, H. 2017. Probing the stochastic property of endoreduplication in cell size determination of *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal tissue. *PLoS ONE.* 12(9): e0185050.
- Lee, H.C., Chiou, D.W., Chen, W.H., Markhart, A.H., Chen, Y.H., & Lin, T.Y. 2004. Dynamics of cell growth and endoreduplication during orchid flower development. *Plant Sci.* 166: 659-667.
- Lee, H.C., Chen, Y.J., Markhart, A.H., & Lin, T.Y. 2007. Temperature effects on systemic endoreduplication in orchid during floral development. *Plant Sci.* 172: 588-595.
- Lemontey, C., Mousset-Déclas, C., Munier-Jolain, N., & Boutin, J.P. 2000. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J. Exp. Bot.* 51: 167-175.
- Melaragno, J.E., Mehrotra, B., & Coleman, A.W. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 5: 1661-1668.
- Meyer, H.M., Teles, J., Formosa-Jordan, P., Refahi, Y., San-Bento, R., Ingram, G., Jönsson, H., Locke, J.C., & Roeder, A.H.K. 2017. Fluctuations of the transcription factor ATML1 generate the pattern of giant cells in the *Arabidopsis* sepal. *eLife.* 6: e19131.
- Poethig, S. 1989. Genetic mosaics and cell lineage analysis in plants. *Trends Genet.* 5: 273-277.
- Robinson, D.O., Coate, J.E., Singh, A., Hong, L., Bush, M., Doyle, J.J., Roeder, A.H.K. 2018. Ploidy and size at multiple scales in the *Arabidopsis* sepal. *Plant Cell.* doi: 10.1105/tpc.18.00344.
- Roeder, A.H.K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B.S., & Meyerowitz, E.M. 2010. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* 8(5): e1000367.
- Roodbarkelari, F., Bramsiepe, J., Weindl, C., Marquardt, S., Novák, B., Jakoby, M.J., Lechner, E., Genschik, P., & Schnittger, A. 2010. Cullin 4-ring finger-ligase plays a key role in the control of endoreduplication cycles in *Arabidopsis* trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 15275-15280.
- Schweizer, L., Yerk-Davis, G.L., Phillips, R.L., Srien, F., & Jones, R.J. 1995. Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7070-7074.
- Szymkowiak, E.J., & Sussex, I.M. 1996. What chimeras can tell us about plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 351-376.
- Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., & Xie, X.S. 2010. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science.* 329: 533-538.
- Tsukaya, H. 2013. Does ploidy level directly control cell size? Counterevidence from *Arabidopsis* genetics. *PLoS One.* 8(12): e83729.
- Tsukaya, H. in press. Has the impact of endoreduplication on cell size been overestimated? *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.15781.

Yu, J., Xiao, J., Ren, X., Lao, K., & Xie, X.S. 2006. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science*. 311: 1600-1603.