

がく片器官の形の頑健性：細胞成長揺らぎの時空間平均化の仕組み

津川 暁

理化学研究所 理論生物学研究室
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Satoru Tsugawa

Shape Robustness in Sepal: Mechanism of Spatio-temporal Averaging of Cell Growth Variability

Keywords: cell growth variability, organ shape robustness, spatio-temporal averaging

Theoretical Biology Laboratory, Riken, Wako, Saitama 351-0198 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10a4.00151

1. はじめに

植物器官は個体の違いに依らず正確な形状を獲得する頑健性を持つが、ミクロな細胞成長はしばしば確率的に振る舞う。このマクロな器官の頑健性とミクロな細胞の多様性という一見相反した性質が矛盾なく説明されるような原理はどのようなものであろうか？我々はミクロとマクロをつなぐ生物物理学的な仕組みが存在すると期待して、植物がく片の成長過程を理論・データの両輪で分析し、植物器官の成長原理を解明することを目指している。本稿では、器官が頑健な形状を獲得する仕組みのひとつの可能性として「細胞成長揺らぎの時空間平均化」の概念を紹介したい (Hong et al., 2016)。

本稿は以下のように構成されている。まず正確な形状に至る野生型と比較するために、形状がばらつく“形状頑健性欠損”変異体について紹介する。次に野生型と変異体それぞれのがく片の細胞情報（表面積や成長など）の抽出方法をソフトウェア MorphoGraphX の簡単な使い方を紹介しながら説明する。MorphoGraphX により得られる細胞情報から細胞成長揺らぎを解析した結果、驚くべきことに頑健な形状に至る野生型の方が空間的な細胞成長揺らぎが高いことが明らかになった。これはミクロな細胞成長揺らぎがマクロな器官形状の安定性につながり得ることを意味している。最後にこの性質を表現する数理モデルを構築し、細胞成長揺らぎが時空間的に緩和される場合にマクロな器官形状の頑健性が決定されることを示す。

2. 器官レベルの頑健性と細胞レベルの多様性

植物は茎、根、葉、花弁など様々な器官で構成されているが、特に花弁やがく片は種が同じであれば個体に依らずほぼ同じサイズや形状に至ることが知られている (図 1A, Hong et al., 2016; Hong et al., 2018)。この性質は器官が内外の擾乱に拮抗して形を健全に保つ、という意味で形の頑健性と言うこともあれば、器官が個体の違いに依らず再現性高く同じ形に至る、

S. Tsugawa – 1

という意味で形の再現性とも言う。この器官レベルの頑健性・再現性について分子生物学の中心原理（セントラルドグマ）を基準に考えれば，器官の発生段階において細胞レベルで遺伝子発現による転写・翻訳・タンパク質合成が完全に制御され，適切な細胞成長の位置，大きさ，タイミングが決定論的に制御されていることに依る，と考えることができるかもしれない。しかしながら，近年の顕微鏡観察による細胞レベルの振る舞いはむしろ確率論的に振る舞うことが明らかになってきた。例えば，シロイヌナズナのがく片の細胞ではサイズが縦方向に異常に長くなる巨大細胞が空間的にランダムに点在することが明らかになっており（図 1B, Roeder et al., 2010, Meyer et al., 2017），葉の細胞では形が楕円型やジグソーパズル型など多様なかたちに分化的に成長していくことがわかってきた（図 1C, Sampathkumar et al., 2014, Sapala et al., 2018）。細胞の種類も様々で，器官は孔辺細胞や毛状突起など異なる機能を持つ細胞種によって構成されている（図 1C-D, Nedeau et al., 2002, Hervieux et al., 2017）。すなわち，器官レベルの頑健性・再現性の仕組みを理解するには遺伝学的・決定論的な制御のみを考えるだけでは不十分で，細胞レベルの確率論的な制御（成長・サイズ・かたち・種類）を考慮する必要性が浮かび上がってきた(Meyer et al., 2014, Hong et al., 2018)。

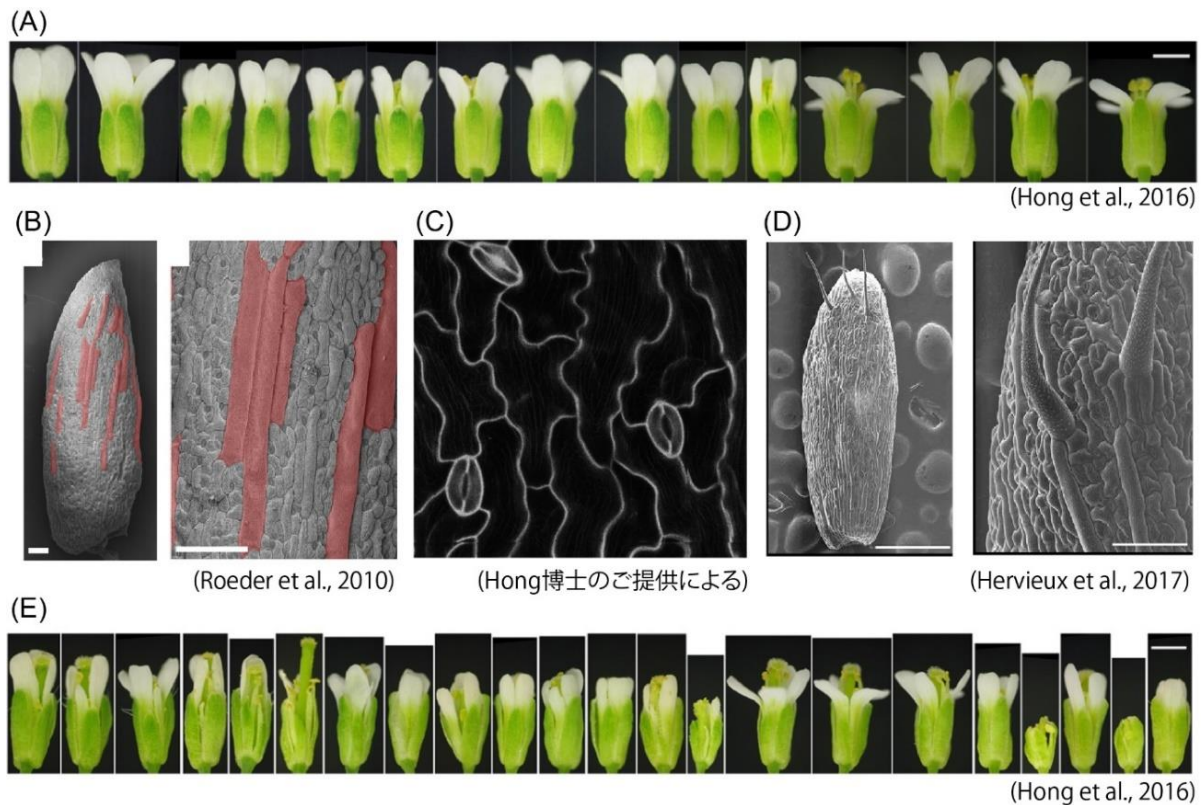


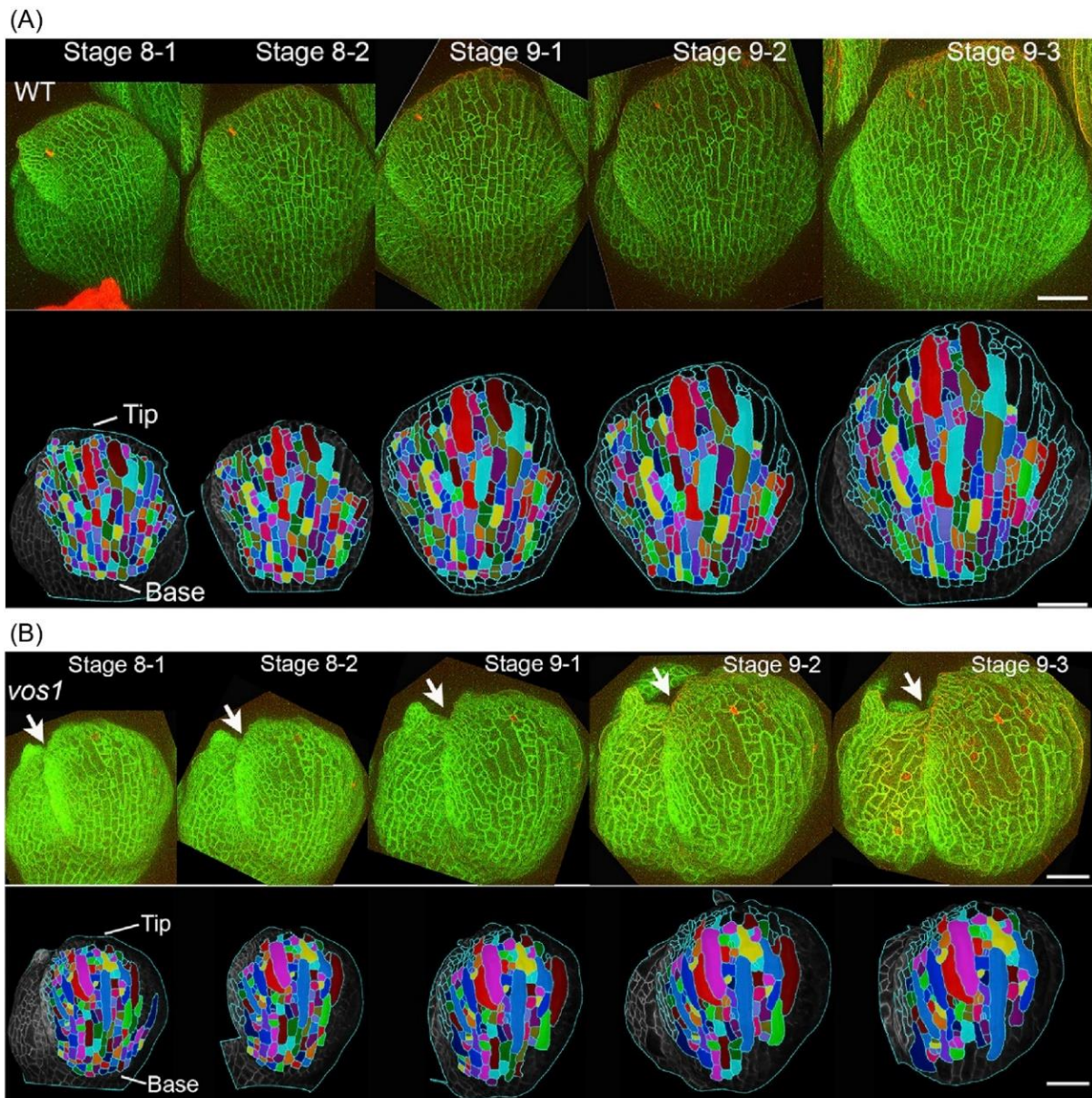
図 1. (A) 器官形状の頑健性。シロイヌナズナの野生型がく片は個体の違いに依らずほとんど同じ形状に成長する。(B) 細胞サイズの確率的なばらつき。縦方向に異常に長く伸長する巨大細胞（赤）がランダムな位置に点在する。(C) 細胞形状の確率的なばらつき。細胞はジグソーパズル型や楕円型などのさまざまなかたちに分化する。(D) がく片中の毛細胞。(E) 形状頑健性欠損変異体。がく片形状の頑健性が失われ，大小さまざまな形状に成長する。

3. “形状頑健性欠損”変異体の単離

植物生理学の強力な遺伝学的アプローチとして、特徴的な表現型（本研究の場合、形状の頑健性）に欠損を持つ変異体を単離するという遺伝学的スクリーニング手法がある。共同研究者であるコーネル大学 Adrienne Roeder 教授と研究員の Lilan Hong 博士は、数年に及ぶスクリーニング過程によって、がく片形状の頑健性に欠陥を持つ変異体（“形状頑健性欠損”変異体）、つまり最終形状が大小さまざまに変化する変異体を単離した（図 1E, Hong et al., 2016）。この変異体では AAA-ATPase 活性及びメタロプロテアーゼ活性を持つ FtsH4 遺伝子が欠損しているため、がく片形状がばらつき、形の頑健性に欠陥を引き起こすと考えられている（Hong et al., 2016）。またこの変異体では器官形状がばらつくことに加え、器官サイズもばらつくため、厳密には“形状・サイズ頑健性欠損”変異体（variable organ size/shape1; vos1 変異体）と呼ばれている。コーネル大学のグループは野生型と変異体で異なる発現をしている分子を探索したところ、成長停止を促す活性酸素（Reactive Oxygen Species）の分泌タイミングが変異体の方が野生型に比べて早期であることがわかった（Hong et al., 2016）。しかしながら、なぜ大小さまざまに変化していくのかについての分子生物学的な詳細な仕組みは未だ明らかでない。我々は形状が頑健である野生型と形状が変化する変異体の細胞レベルの動態を詳細に比較することにより、がく片器官の形の頑健性の仕組みを理解できると考えた。そこで細胞レベルの振舞いとして各時刻のがく片細胞の相対的成長率に着目し、細胞情報の抽出ソフトウェアである MorphoGraphX によって細胞成長を定量化することを試みた。

4. 細胞情報の抽出ソフトウェア MorphoGraphX

共焦点レーザー顕微鏡で得られる 3 次元蛍光データから細胞情報を抽出・定量化することができるオープンソースのソフトウェア MorphoGraphX は共同研究者であるマックスプランク植物育種学研究所の Richard Smith 教授のグループによって開発・改良が進められている（<https://www.mpipz.mpg.de/MorphoGraphX>）。MorphoGraphX によって、例えば細胞膜を標識した GFP 蛍光データから 3 次元的な物体形状（表面積、体積、曲率など）を定量化することが可能である。蛍光データのライブイメージング（時系列タイムラプス）があれば細胞の成長率や成長方向を計算することができる（deReuille et al., 2015）。つまり、本研究で定量化したいミクロな細胞の成長揺らぎとマクロな器官形状の両方のスケールの情報を同時に計測できる。細胞情報の抽出方法は(1) メッシュ構成過程、(2) 細胞セグメンテーション過程、(3) 細胞系譜追跡過程を通して行われ（付録をご参照）、図 2 に示すように上段の蛍光画像から下段の細胞の異なる色によるラベル付け（A：野生型、B：変異体）が可能になる。筆者の私見では MorphoGraphX は既存の画像処理ソフトでは扱いにくいメッシュ（小三角形の集合体）を自在に操作できるという特徴があり、植物の 3 次元的な形状を分析するうえで、非常に有用なデータ解析方法である。入門として MorphoGraphX による細胞の表面積成長の計算方法についてマニュアルとの対応付けを付録にまとめた（deReuille et al., 2015 supplement）。



(Hong et al., 2016)

図2. ライブイメージングによる3次元蛍光データとMorphoGraphXによる細胞情報の抽出。上段は共焦点顕微鏡による蛍光画像。下段はMorphoGraphXによる細胞抽出結果。異なる色は異なる細胞のラベルを表し、時間経過とともに同じ細胞系譜に同じラベルを割り当てることができる。(A) 野生型。(B) 変異体。

5. 細胞成長揺らぎのデータ解析

我々は当初、マクロな頑健性を獲得する野生型の方が変異体に比べてミクロな細胞レベルの成長の変動量（成長揺らぎ）が低いことを予想していた（以下、「揺らぎ」という言葉を単に変動量という意味で用いる）。つまり、マクロな頑健性を失う変異体の方がミクロな細胞レベルの成長揺らぎが高いと考えていた。この予想を検証するために、ミクロな細胞レベルでの細胞成長が時間的に（空間的に）どのように変動しているかを定量化することを試みた。

S. Tsugawa-4

まず細胞成長の時間的な揺らぎは、注目する細胞の表面積成長率の時間変化（時間方向の成長率の差）で定義される。図 3A に、各時刻の時間的な成長揺らぎを全細胞で平均した結果を示す。細胞成長の時間的な揺らぎは野生型が若干高い値であるものの、値が振動する時間領域などもあり、変異体と明確な違いがあるとはいえない。一方、細胞成長の空間的な揺らぎは、注目する細胞の表面積成長率の空間変化（隣接細胞との成長率の差の平均値）で定義され、図 3B に各時刻の成長の空間的な揺らぎを全細胞で平均した結果を示す。時間的な成長揺らぎとは異なり、空間的な成長揺らぎについては、野生型の方が変異体に比べて明確に高い値になることが明らかになった。つまり、当初の予想に反しマクロでは頑健な形状に至る野生型の方がミクロな細胞の空間的な成長揺らぎが高いことがわかった。そこで、次節で紹介するような作業仮説で器官形状の頑健性を説明できるのではないかと考えた。

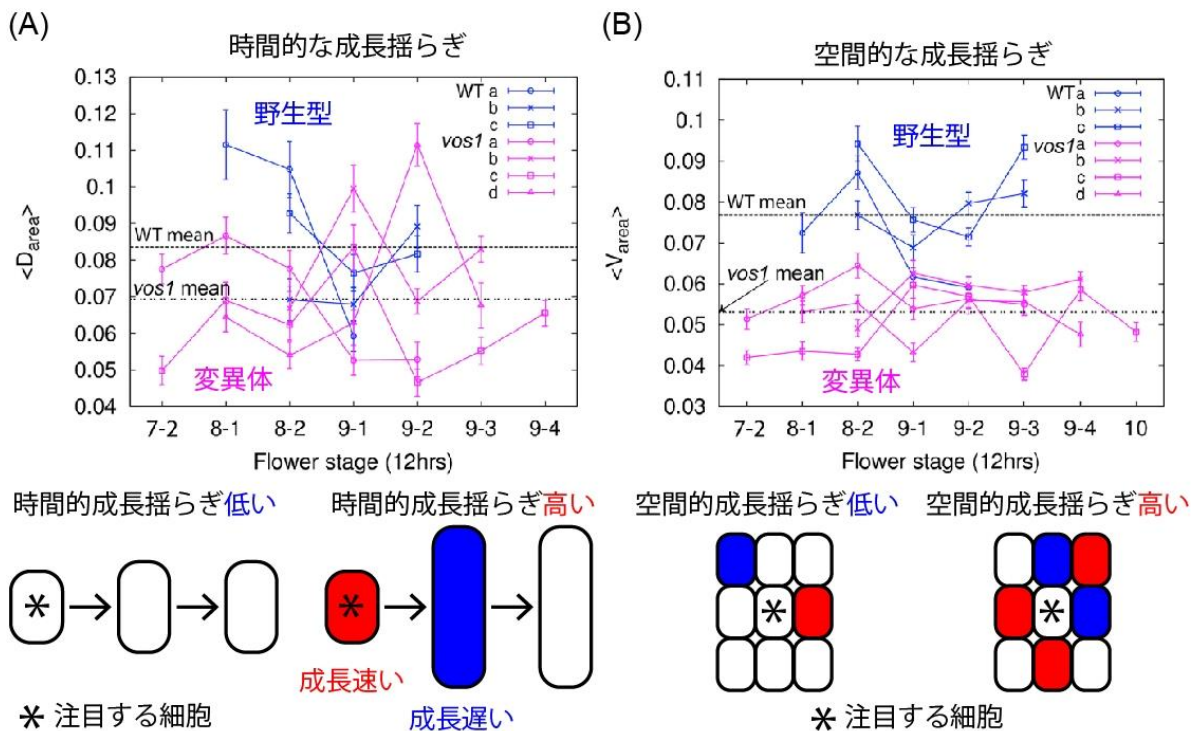


図 3. (A) 細胞の時間的な成長揺らぎの野生型と変異体の比較データ。(B) 細胞の空間的な成長揺らぎの野生型と変異体の比較データ。a-d は同じ遺伝型の異なるがく片を表す。

6. 作業仮説：細胞成長揺らぎが器官の“均一性”を導く

ミクロな細胞の成長揺らぎのデータ解析結果を基礎に、細胞の空間的な成長揺らぎと時間的な成長揺らぎを考慮に入れることを考えた。つまり、図 4 上段のように、成長が速い細胞や遅い細胞が空間的にランダムに分布している場合に、時間的にも細胞成長がランダムになり、それぞれの細胞の異常な変形が緩和されて最終的には形状が均一になる、という状況が野生型で起こっている、と考えた。一方の変異体では図 4 下段のように、成長が速い細胞や遅い細胞が空間的に局所的な部分にしか存在しないものの、時間的に細胞成長がランダムにはならないために、同じ局所部分ばかりが異常に変形し、マクロな最終形状がばらつく、と

考えられる。そこで、がく片の形の頑健性を次の作業仮説で説明することを考えた。

作業仮説「細胞の空間的成長揺らぎを時間とともに平均化することで頑健な形状を獲得する」

我々はこのような仕組みを「細胞成長揺らぎの時空間平均化」と名付け、器官の最終形状の頑健性を説明する中心的な概念である、と考えている。

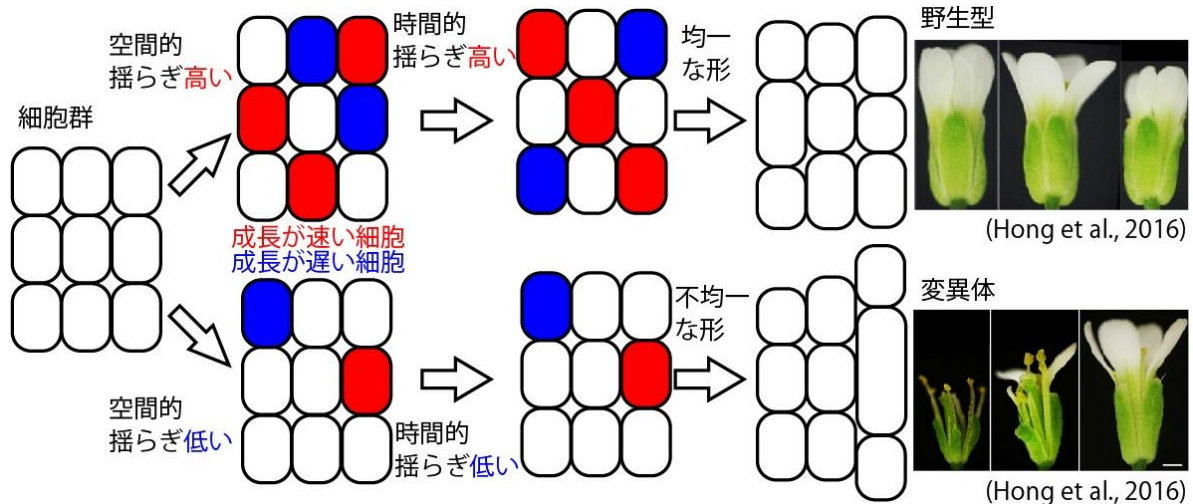


図4. 作業仮説の概念図。上段は、空間的成長揺らぎが高い場合に時間的にもランダムに成長して異常変形を緩和することで、最終的には均一な形を形成する野生型の場合を示している。下段は、空間的成長揺らぎが低く時間的成長揺らぎも低いと、局所的な異常変形が増幅されて、最終的には不均一形を形成する変異体の場合を示している。

7. 数理モデルによる作業仮説の検証

では実際に作業仮説によってほんとうに器官形状の頑健性を説明できるのだろうか？共同研究者である ENS リヨンの Arezki Boudaoud 教授と研究員の Mathilde Dumond 博士は有限要素法を用いた弾性体モデルで時空間的な成長揺らぎを考慮した数理モデルを考案した (Hong et al., 2016)。数理モデルはがく片器官を弾性ばねで構成される小三角形の集合体とみなし、茎から吸い上げる水分による膨圧によって“水風船”のように膨らみ成長する弾性体モデルを考えている (図 5A)。ただし、実際の植物はセルロースを主成分とする細胞壁を作り上げるため、完全な弾性体ではなく弾性変形と塑性変形の両方を示すような弾塑性体の成長を仮定する。つまり、成長後には弾性ばねによる残留応力が存在するが、細胞壁の補強により残留応力が一部緩和されることを仮定している。このがく片を模倣した弾性体の各ステップの形は局所的な弾性 (ヤング率) により決まり、硬い領域では成長が遅く、柔らかい領域では成長が速い (図 5B)。

この設定の下、“空間揺らぎパラメータ”は局所的な弾性の空間的なばらつきとして与え、パラメータが大きい場合にはヤング率の空間分布のばらつきを大きくし、パラメータが小さい場合にはヤング率の空間分布のばらつきを小さくする (図 5B)。一方、“時間揺らぎパラメータ”は局所的な弾性を時間的な変化として導入し、パラメータが大きい場合にはヤング率を刻一刻シャッフルし、パラメータが小さい場合にはヤング率をシャッフルせず前時刻のヤ

ング率と一致させる (図 5C)。このとき、形の頑健性は異なる初期状態 (異なるランダムネスの種によるヤング率の空間分布) から始めてあるステップまで計算し、最終形状がばらつくかによって考察することができる。図 5D は異なる 7 つの初期状態から弾性体を成長させて、100 ステップ後のそれぞれの最終形状を 7 色の線で示している。

結果を極端な 3 つの例に分類して示す。まず図 5D のパラメータ (i) では、初期分布の空間的成長揺らぎが高くこのまま成長していくと異常に変形していくが、時間的な成長揺らぎが高く弾性が刻一刻シャッフルされるため、異常変形を起こす力学的な弱点が緩和されて、最終的にはほとんど同じ形に成長する (図 5E 上段)。これは野生型の変形状況に相当する。図 5D のパラメータ (ii) では、初期分布の空間的成長揺らぎが高い場合に時間的な成長揺らぎが低く同じ局所部分ばかり異常変形が起き、最終的な器官形状がばらつく (図 5E 中段)。これは変異体の変形状況に相当する。図 5D のパラメータ (iii) では、初期分布の空間的成長

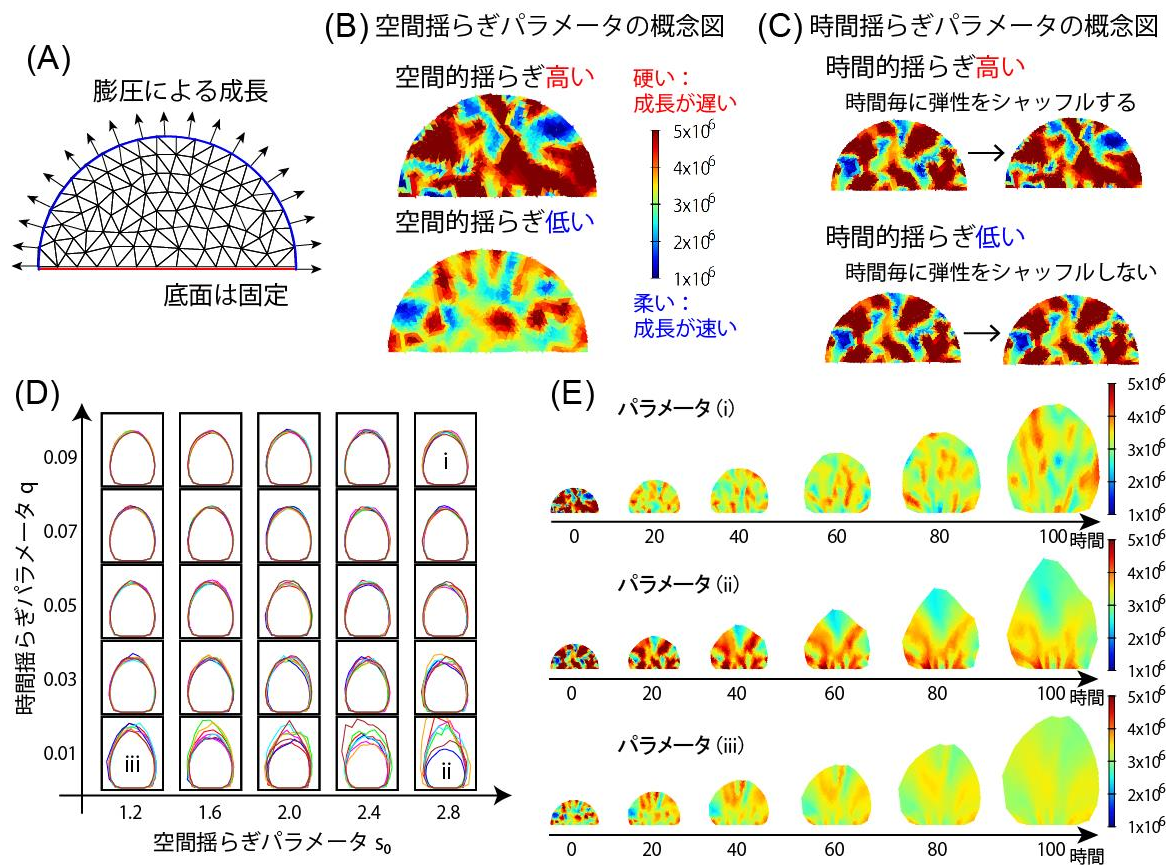


図 5. (A) 有限要素法を用いた弾性体モデル。茎から吸い上げる水分による膨圧によって“水風船”のように膨らむ状況をモデル化している (底面は固定)。(B) 空間揺らぎパラメータの概念図。色は局所的弾性 (ヤング率) を表し、赤い部分では硬い性質により成長が遅く、青い部分では柔らかいため成長が速い。(C) 時間揺らぎパラメータの概念図。(D) 器官形状の空間揺らぎパラメータ及び時間揺らぎパラメータによる依存性。(E) パラメータ (i), (ii), (iii) における各時刻の器官形状と弾性 (ヤング率) のカラープロット。

揺らぎが低い場合には時間的な成長揺らぎが低くても異常変形を増幅する効果が弱く、最終的には同じような形状を保つことができる (図 5E 下段)。これはパラメータ(i)とはまた別の理由で形の頑健性を示す変形状況を表している。つまり、数理モデルにより、局所的成長の時間的な揺らぎが強い場合にかく片形状は頑健性を獲得する、という作業仮説に整合する結果が得られた (パラメータ (i))。また、その仕組みと独立して、局所的成長の空間的な揺らぎが弱い場合にも頑健性を獲得し得る、という数理モデルにおける新しい側面も明らかになってきた (パラメータ (iii))。

8. まとめと展望

本稿では、植物がかく片器官が頑健な形状を獲得する仕組みの可能性のひとつとして、「細胞成長揺らぎの時空間平均化」という概念を概観した。研究を始めた当初、マクロな頑健性を保つ野生型の方が、頑健性を失う変異体に比べてミクロな細胞レベルの成長多様性が低いことを予想していたが、細胞レベルの成長の時空間揺らぎを解析した結果、マクロに頑健な形状をもつ野生型の方が変異体に比べて細胞レベルの揺らぎが大きい、というデータ結果を得た。そこで、作業仮説として「細胞の空間的な成長揺らぎが器官の“均一性”を導く」という仮説を考え、器官にとって細胞レベルの確率性・揺らぎは“必要なもの”と捉えて器官形状の頑健性が説明されるのではないかと考えた。この作業仮説を、有限要素法による弾性体モデルによって理論解析をした結果、「器官形状の頑健性は局所的成長の時空間的な揺らぎの絶妙なバランスにより局所的な力学的弱点が緩和されることで達成される」という器官の形の頑健性を説明する新しい器官成長の仕組みを提案している。

展望としては、これらの数理モデルによる定性的な説明を、実際のにかく片細胞の成長データと照らし合わせて定量的に検証していく必要があると考えている。実験から理論へ展開するアプローチとしては、細胞成長揺らぎパラメータに対応する遺伝子変異体を単離できれば野生型に対する本研究の成長モデルの実験的検証が可能かもしれない。一方で、理論から実験へ展開するアプローチとしては、例えば実際のデータと数理モデルを同じ座標をもつ図 5D のような形の空間（「形態空間」と呼んでいる）で比較することで、理論側が具体的に新しい実験検証方法を提案できるような研究体制を確立していくことが望ましい。これらの展望を実現していくためには、上記で紹介したような生理学・コンピュータ科学・データ科学・数理物理学などの異なる研究分野を横断するような新しい科学のスタイルで、共通言語（形態空間）や共通の議論の場を作っていく必要がある。

付録. “MorphoGraphX”による細胞の表面積成長の計算方法

MorphoGraphX のマニュアル (deReuille et al., 2015 supplement) に沿いながら、細胞の表面積成長の計算方法を概説する。計算方法は、(1) メッシュ構成過程、(2) 細胞セグメンテーション過程、(3) 細胞系譜追跡過程を通して行われる。

(1) メッシュ構成過程

まず 3 次元のボクセル (2 次元ではピクセル) に蛍光強度が付与されている画像をソフト

ウェア上に取り込み (マニュアルの項目 3. Loading samples), 蛍光群の中心から見て最も外側にある蛍光点 (器官表面に相当) を特定する。この特定された蛍光点群 (器官表面) を覆うようにメッシュと呼ばれる小さな三角形の集合体を構成する (マニュアルの項目 4. Extract the biological object shape)。

(2) 細胞セグメンテーション過程

得られた三角形の集合体と元の細胞膜蛍光情報を同画面に表示・照合することにより, 基本的には人間の目で細胞境界を判断しながら三角形に細胞・細胞境界のラベルづけを行っていく (7. Segment the cells)。最近の改良手法では, 細胞境界の高強度の蛍光情報を利用してセグメンテーション過程を自動的に適用するツールも導入されつつあるが (watershed algorithm), 計算誤差を含む場合があるためやはり最終的には人間の目で細胞境界を判断する必要がある。このようにして得られた三角形とラベル情報により, それぞれの細胞の表面積が計算できる (マニュアルの項目 9. Quantify Cell Area)。3次元蛍光として2層目3層目まで詳細に得られている場合は細胞体積の計算などが可能である (Bassel et al., 2014, マニュアルの項目 14.3D segmentation)。

(3) 細胞系譜追跡過程

次に, 細胞の成長率を計算するためには, 異なる時刻の同じがく片の細胞の系譜, つまり異なる時刻の細胞ラベルの対応付けを行う必要がある。細胞ラベルの対応付けをするには, ある時刻のがく片細胞境界と次の時刻のがく片細胞境界を同画面に表示し (Mesh1 と Mesh2 にそれぞれ別のメッシュデータを取り込む), 一方のがく片をソフトウェア上で仮想的に拡大・縮小することで, 同形状の細胞を (人間の目で) 判断して親細胞と子細胞の対応付けを行う (マニュアルの項目 11. Parent labeling)。細胞がイメージング間隔の間に2つ3つに分裂している場合には, 分裂した子細胞一つ一つに親細胞との対応付けを行う。この細胞系譜データと(2)で得られた細胞面積データを利用して, 細胞表面積の相対的成長率が計算される。

謝辞

本研究はヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラムの研究課題「細胞の確率的振る舞いから再現的な形状へ：形態形成に潜む協調原理」(2014年度～2017年度)の支援により進められました。コーネル大学 Adrienne H. K. Roeder 教授, Lilan Hong 博士, Mingyuan Zhu 研究員には植物生理学の基礎知識や蛍光データの解析方法などを教えて頂きました。マックスプランク植物育種学研究所の Richard S. Smith 教授, Anne-Lise Routier-Kierzkowska 博士, Aleksandra Sapala 研究員には, MorphoGraphX を用いた解析方法や細胞表面上の力学について学ばせて頂きました。ENS リヨン高等師範学校の Arezki Boudaoud 教授, Olivier Hamant 教授, Nathan Hervieux 研究員, Mathilde Dumond 研究員には有限要素法による理論解析を教えてくださいました。北海道大学電子科学研究所の小松崎民樹教授, スtockホルム大学の Chun-Biu Li 准教授には, 活発で有益な研究の議論をさせて頂きました。理化学研究所の新海創也博士, 基礎生物学研究所の藤田浩徳助教, 大阪大学の藤本仰一教授にはご多忙の中, 本稿をお読み頂き適切なコメントを頂戴いたしました。これらの支援に心から感謝申し上げます。

S. Tsugawa-9

引用文献

- Bassel, G.W., Stamm, P., Mosca, G., de Reuille, P.B., Gibbs, D.J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M.J., and Smith, R.S. 2014. Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the *Arabidopsis* embryo. *PNAS*, 111: 8685-8690.
- de Reuille P.B., Routier-Kierzkowska, A.-L., Kierzkowski, D., Bassel, G.W., Schüpbach, T., Tauriello, G., Bajpai, N., Strauss, S., Weber, A., Kiss, A., Burian, A., Hofhuis, H., Sapala, A., Lipowczan, M., Heimlicher, M.B., Robinson, S., Bayer, E.M., Basler, K., Koumoutsakos, P., Roeder, A.H.K., Aegerter-Wilmsen, T., Nakayama, N., Tsiantis, M., Hay, A., Kwiatkowska, D., Xenarios, I., Kuhlemeier, C., & Smith, R.S. 2015. MorphoGraphX: a platform for quantifying morphogenesis in 4D. *elife* 4: e05864.
- Hervieux, N., Tsugawa, S., Fruleux, A., Dumond, M., Routier-Kierzkowska, A.-L., Komatsuzaki, T., Boudaoud, A., Larkin, J.C., Smith, R.S., Li, C.-B., Hamant, O. 2017. Mechanical Shielding of Rapidly Growing Cells Buffers Growth Heterogeneity and Contributes to Organ Shape Reproducibility. *Curr. Biol.*, 27: 3468-3479.
- Hong, L., Dumond, M., Tsugawa, S., Sapala, A., Routier-Kierzkowska, A.-L., Zhou, Y., Chen, C., Kiss, A., Zhu, M., Hamant, O., Smith, R.S., Komatsuzaki, T., Li, C.-B., Boudaoud, A., Roeder, A.H.K. 2016. Variable Cell Growth Yields Reproducible Organ Development through Spatiotemporal Averaging. *Dev. Cell*, 38: 15-32.
- Hong, L., Dumond, M., Zhu, M., Tsugawa, S., Li, C.-B., Boudaoud, A., Hamant, O., Roeder, A.H.K. 2018. Heterogeneity and Robustness in Plant Morphogenesis: From Cells to Organs, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 69: 469-495.
- Meyer, H.M., Roeder, A.H.K. 2014. Stochasticity in plant cellular growth and patterning. *Front. Plant Sci.* 5: 420.
- Meyer, H.M., Teles, J., Formosa-Jordan, P., Refahi, Y., San-Bento, R., Ingram, G., Jönsson, H., Locke, J.C.W., Roeder, A.H.K. 2017. Fluctuations of the transcription factor ATML1 generate the pattern of giant cells in the *Arabidopsis* sepal. *eLife*, 6: e19131.
- Nedea, J.A., Sack, F.D. 2002. Control of Stomatal Distribution on the *Arabidopsis* Leaf Surface. *Science*, 296: 1697-1700.
- 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: e1000367.
- Sampathkumar, A., Krupinski, P., Wightman, R., Milani, P., Berquand, A., Boudaoud, A., Hamant, O., Jönsson, H., Meyerowitz, E.M. 2014. Subcellular and supracellular mechanical stress prescribes cytoskeleton behavior in *Arabidopsis* cotyledon pavement cells. *eLife* 3: e01967.
- Sapala, A., Runions, A., Routier-Kierzkowska, A.-L., Gupta, M.D., Hong, L., Hofhuis, H., Verger, S., Mosca, G., Li, C.-B., Hay, A., Hamant, O., Roeder, A.H.K., Tsiantis, M., Prusinkiewicz P., Smith R.S. 2018. Why plants make puzzle cells, and how their shape emerges. *eLife* 7: e32794.