

日本植物学会シンポジウム 「細胞・組織における凹凸が生まれる機構とその意義」

!

為重才覚¹・中田未友希²

¹名古屋大学 野依研究館(物質科学国際研究センター)

トランスフォーマティブ生命分子研究所 (WPI-ITbM)

〒464-8602 名古屋市千種区不老町

²立教大学 理学部 生命理学研究センター

〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1

Toshiaki Tameshige¹ & Miyuki Nakata²

¹Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8602 Aichi, Japan

²Research Center for Life Science, College of Science, Rikkyo University

Nishi-Ikebukuro 3-34-1, Toshima-ku, 171-8501 Tokyo, Japan

2014年9月13日日本植物学会第78回大会にてシンポジウム「細胞・組織における凹凸が生まれる機構とその意義」が開催された。ここでは組織、細胞などの表面構造、特に凹凸の形成などの研究に携わる研究者が集まって、研究発表と様々な議論が交わされた。

1. 凹凸をテーマとした理由

生物の形態は多様で複雑である。ヒト、カエル、ハエ、キノコ、サクラ、イネ、コケ、ノリ、それぞれに特徴的な形をしている。「生物の形態がどうやって生まれるのか」という疑問は、生物学者に限らず多くの人を魅了してきた。しかし「複雑な形態がどうやって生まれるのか」を調べることは技術的に難しい場合が多い。そこで、まずできるだけ単純化して考える必要があるだろう。生き物に限らずどんな形態もごく一部分に限ってみれば単純な凹凸であり、全体の形態も大小様々な凹凸の集まりとして理解することができる。全体の形態が生まれたり変化したりといったダイナミクスも、個々の小さな凹凸が生まれたり無くなったりすることで起きていると考えられる。このように考えると、部分の凹凸パターンやダイナミクスを詳細に調べることは、最終的に複雑な形態を生み出すしくみを理解するための基盤となるだろう。そこで、本シンポジウムでは凹凸を主なテーマとすることで、様々な形態を研究対象とする研究者たちがともに共通の話題で議論できる場となることを目指した。

2. 研究分野間の交流を目指した講演者の選定

生物学者は生物の体がどのようにできているのか知るため、詳細な観察を古くから行ってきた。特に顕微鏡の発明以来、生体内の組織や細胞、また微生物が、特徴的な形態、つまり凹凸を持つことが様々な生物で観察・記述されてきた。しかし、そうした凹凸を生み出すメカニズムを物理

T. Tameshige & M. Nakata-1

化学的観点から深く理解するには、詳細な観察だけでは限界があり、様々な学問領域の知識と技術を動員して研究を進める必要がある。たとえば、特定の生物の凹凸形成に関わる分子や遺伝子を同定・改変する分子生物学的手法、三次元的な試料の表面積や曲率・変形速度を測定する顕微鏡法と画像処理技術、微細な凹凸を操作するために同等サイズの凹凸を持つデバイスを作る微小工学技術、凹凸の形成過程を計算機シミュレーションで再現する数理的方法論などが挙げられる。複雑な形態を生み出すしくみを完全に理解するためには、これらの知識や技術を正しく理解し、適切に組み合わせる必要があるが、分子生物学、顕微鏡観察法といった実験観察に長けた研究者は、微小工学技術や数理的方法論に精通していない場合が多く、一方微小工学技術や数理的方法論に詳しい研究者は、その技術や理論を適用しうる実際の生物現象としてどのような現象があるのか、関連する分子実体がどれだけ同定され、どこまでの精度で凹凸を測定できるのか、といった実験観察的な知識に触れる機会が少ない。そこで本シンポジウムでは、こうした研究分野間での交流不足を解消して互いの研究に対する理解を深め、幅広い意見交換・議論の場とするため、実験観察系研究者と、工学技術を専門とする研究者や数理系研究者に講演していただいた。特に実験観察系研究の例として、伊藤先生らによるイネ表皮細胞の微細な凹凸による超撥水性の研究、小山先生によるシロイヌナズナ等の葉の概形の凹凸形態を制御する遺伝子の研究、西上先生による顕微鏡下でアメーバの凹凸の精密な測定を行った研究を紹介して頂いた。また微小工学技術の利用例としては、新田先生による花粉管誘導のアッセイ用マイクロデバイスと胚珠培養観察用マイクロデバイスの開発例を紹介頂いた。数理系研究の例としては、森下先生による動物枝芽の成長変形パターンのテンソル表現を利用した凹凸形成の研究、栄先生による反応拡散モデルの曲面上での振る舞いの数理解析研究を紹介して頂いた。

3. 凹凸の意義をテーマの一つとした理由

生物の形態について深く理解するためには、「複雑な形態がどうやって生まれるのか」を知るだけでなく、「その形態にどんな意義・性質があるのか」を知ることも重要である。たとえば、美しい花の形態がいったいなぜそんな形になっているのか知りたいなら、花が作られるときの細胞分裂パターンやホルモンの働きだけでなく、その花の形が特定の昆虫を誘引することを知ることによって深い理解につながるであろう。実際、さまざまな組織・細胞の凹凸構造がどのような生物学的意義を持っているのかという点が近年注目されて来ている。そこで本シンポジウムにおいても、凹凸や曲率が持つ意義・性質を議論することが重要であると考え、一部の講演者に凹凸パターンが化学反応系に与える影響（本総説集内、栄著『曲面上におけるパターンの運動』参照）、凹凸が持つ超撥水効果（本総説集内、相賀&伊藤著『イネの表皮における凹凸形成の生物学的意義 一葉の表面構造と撥水性との関わり一』参照）などについての研究例を紹介して頂いた。

以上の通り、このシンポジウムでは実験系、理論系を問わず様々なアプローチで「凹凸が生まれる機構とその意義」を研究する方々に集まって講演していただき、凹凸形成の現在の最新の知見、最先端の実験技術、関連する幾何学的理論などについて活発に議論していただいた。この総説集は、その講演内容の一部を文章として公開するものであり、専門外の方々にも広く凹凸研究の魅力と将来性を知って頂く機会となれば幸いである。

植物とMEMS

～マイクロデバイスで植物を理解～

新田 英之

科学技術振興機構 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

名古屋大学大学院理学研究科

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

現所属：ミリマン・インク・ジャパン

〒102-0082 東京都千代田区麴町

MEMS meet plant sciences

Key words: Pollen tube; Ovule; Plant reproduction; MEMS; MicroTAS

Hideyuki Arata

JST, ERATO Higashiyama Live-Holonics Project

Graduate School of Science, Nagoya University

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi, 464-8602 Japan

Present affiliation: Milliman Inc. Japan

Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0082 Japan

1. はじめに

デバイス（特定の機能をもった装置や道具）を小型化していくと、そのスケールに因って異なる特性を示す。我々が住むマクロのスケールは、古典的なニュートン力学が支配する世界である。一方で、ナノメートルスケールでは、量子力学の世界となる。ナノメートルスケールに届く手前のマイクロ（マイクロメートル）のスケールでは、マクロなスケールと同じく古典的なニュートン力学が支配する世界である。しかし、方程式中のどの項が支配的になるかはマクロとマイクロでは大きく異なる。例えば、質量はスケールの三乗に反比例するが、粘性抵抗は二乗に反比例する。従って、スケール則（寸法効果）により、マイクロの世界ではマクロの世界に比べ、摩擦力、表面張力など、体積よりも面積に依存する効果が支配的となる。そのため、マイクロの世界では、水はアリなど小動物にとってはねばねばしたものである。このマイクロスケール特有の物理現象を利用したマイクロの装置や人工システムでは、マクロの機器における時間的・空間的な精度や機能における限界を突破できる。

そのマイクロの装置やシステムの代表ともいえる MEMS（Micro-Electro-Mechanical Systems：メムス）は、半導体微細加工技術を応用して機械要素部品、センサ、アクチュエータ（駆動装置）、電子回路などの機能単位を一つの基板（主にシリコン基板）の上に集積化したデバイ

スであり、MEMS 技術によりマイクロメートル (10^{-6}m) スケールからサブマイクロメートルスケールの構造物を製作することが可能である (藤田 2003; Arata 2010)。微小化により高感度、高応答速度を実現できるため、MEMS 技術は微小センサ (Bogue 2007)、アクチュエータ (駆動装置) (Dao et al. 2010)、光スイッチ (Toshiyoshi and Fujita 1999) などに応用されてきた。例えば、車等に搭載されている小型加速度センサや、プロジェクターに用いられている極微小ミラーアレイは、MEMS 技術の、社会へのインパクトという面で最も成功した応用例といえよう。一方で、主に MEMS 技術を用いて複数の化学プロセスをチップ上で行うマイクロ TAS (Micro-Total Analysis Systems) では、極微量サンプルでの化学・生化学実験が可能である (Reyes et al. 2002; Auroux et al. 2002)。微小空間で微量の液体を扱う場合、マクロスケールでの実験系に比べ、拡散距離が短く、比表面積 (単位体積あたりの表面積) は大きく、熱容量は小さくなる。そのため、高感度、高応答速度での並列処理や複数プロセスの連続処理などを一つのチップ上で行うことが可能である。材料費と廃棄物量も抑えられ、これらの実験を行う需要のある生物系実験現場で「その場」分析が可能であるという実用的な利点も享受できる (Arata and Fujita 2009)。MEMS やマイクロ TAS では、デバイスの一括大量生産が可能であるため、実験チップの使い捨て利用が可能であり、小さなチップ上の微小空間に多数の機能単位を集積することができるため、ハイスループットでスマートな分析デバイスを実現できる (Whitesides 2006; Craighead 2006)。そのため、マイクロチップは組織 (Huh et al. 2012)、細胞 (El-Ali, et al. 2006)、分子 (Arata et al. 2005; Rondelez et al. 2006) に至る生体の各階層を対象とした、多種多様な分析実験に応用されてきた。しかしながら、これらのマイクロデバイスを専門的に扱うコミュニティーと植物科学関連領域との連携研究の事例は、2010 年を過ぎるまで皆無であった (新田 and 東山 2014)。そのため、植物科学分野においては、顕微鏡観察下で微小なサンプルを任意の位置、方向、角度に高精度で配向、操作し、又は外部からピンポイントで刺激を与えその応答を観察するなど、マイクロデバイスが最も得意とする技術領域に、大きなフロンティアが存在している。

そのような背景のもと、著者らは、MEMS 技術を基盤としたマイクロデバイスやマイクロ流体デバイスによる植物に関わる個体 (植物寄生性センチュウ、幼植物)、組織 (胚珠)、細胞 (花粉管)、分子 (タンパク質、ペプチド等)、各レベルでの様々なサンプルを生きたまま顕微鏡下でイメージングするためのマイクロシステムの開発と、これらの技術の植物科学分野への普及を目指した研究を行ってきた。本稿では、ポリジメチルシロキサン (PDMS: poly-dimethylsiloxane) を用いたマイクロデバイスによる、雄組織である花粉管と雌組織である胚珠を扱った最新の成果二つを紹介する。一つ目はマイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析、二つ目はマイクロケージアレイを用いた胚珠の長時間ライブイメージングである。PDMS は透明で微細加工が容易であるだけでなく、高い生体適合性、低価格など、生物実験との相性が極めて高い。更に、真空チャンバなどで脱気をした PDMS は自動的に空気を吸い込むため (Hosokawa et al. 2004; Arata et al. 2012)、しばしば実験の妨げとなる狭い空間に入り込んだ気泡を自動的に除去することができるという利便性も兼ね備えている。

2. マイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析

花粉が雌しべに受粉すると、花粉から伸び出した花粉管細胞が標的の卵装置（胚のう）に精細胞を運び、受精が行われる。この過程は、花粉管と雌しべとの間で複雑かつ精密な細胞間コミュニケーションにより達成されるため花粉管ガイダンス（花粉管誘導）と呼ばれている。近年、花粉管ガイダンスに関わる様々な興味深い分子機構が明らかにされつつあり、雌しべ内での複雑なシグナリングの実態解明からは、学術的に価値の高い知見ばかりでなく、食糧、環境、エネルギー問題解決への糸口が期待できる。これらの研究は、従来のアガロースゲル培地上での体外受精系にて遂行されてきたが、従来法においては無数の花粉管がゲル上で無秩序に伸長してしまうため、その伸長速度や方向の定量的な解析だけでなく、ゲル上で物質を定量的に添加したり計測したりすることも困難であった（図1; Higashiyama et al. 2001）。我々は、マイクロ流路デバイスを用いて花粉管伸長を定量解析することにより、花粉管と雌しべ間コミュニケーションの定量解析を目指した基盤技術の開発を行ってきた。

花粉管伸長速度計測実験用に製作したPDMS マイクロ流路デバイスは、受粉した花柱から伸びた多数の花粉管を個別にチャンネルに誘導する形状であり、流路の高さが5~20 μm で、幅は8、12、16、20 μm のデバイスをそれぞれ製作した（図2）。花粉管伸長実験においては、デバイス内に液体培地を充填した後、受粉させたトレンニア（花瓜草：*Torenia fournieri*）の花柱を1 cm程度の長さに切り、花柱差込口に設置した。受粉後約3~5時間で、伸長した花粉管は花柱を通過、デバイス内に進入し、マイクロ流路に到達する。このように、花粉管が*in vivo*から*in vitro*環境下へ、負荷なく伸長し、その挙動をライブイメージングできるシステムとプロトコルを確立した。花粉管一本を2次元空間に閉じ込め、かつ無理なく伸長させることができる最適なチャンネルの高さは5 μm から12 μm の範囲であることをつきとめた。流路幅は花粉管の速度に影響を与えず、5 μm から12 μm の範囲であれば花粉管一本のみが進入することが分かった。また、従来のアガロースゲルを用いた花粉管伸長アッセイと本手法での花粉管伸長の計測速度を比較すると、前者（ $10.2 \pm 6.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ）に比べ、後者（ $50.2 \pm 9.6 \mu\text{m}/\text{min}$ ）が測定値も高く、かつ相対的にバラつきも抑えられていた。これは、アガロースゲル上では花粉管は垂直方向にもランダムに伸長することが要因の一つであると考えられる。また、流路内での伸長速度は、*in vivo*での伸長速度を、花柱を通過する時間から計測した先行研究（約40 $\mu\text{m}/\text{min}$ ）（Higashiyama et al. 1997）により近い値であるため、本計測法は従来法に比べ、*in vivo*により近い環境での花粉管伸長速度計測が可能であることを示した（Horade et al. 2014）。マイクロ流路又はスリット内で花粉管伸長を計測する本手法を用いると、花粉管伸長は顕微鏡焦点面内に限定されるので、高精度で高効率な個々の花粉管の伸長観察が可能となる。本計測法を用いることにより、花粉管が誘引シグナルを受容し応答するしくみや、花粉管が誘引シグナルに応答できるようになる受精能獲得のしくみや、助細胞以外のガイダンス因子の探索など、学術的価値の高い知見の獲得が期待できる。

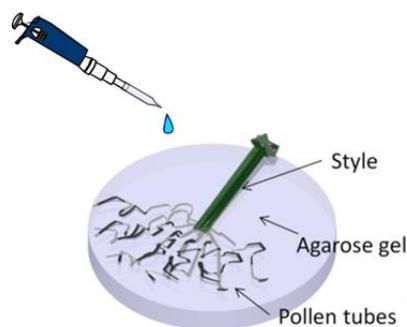


図1 アガロースゲルを用いた、従来の花粉管伸長実験（体外受精系）。

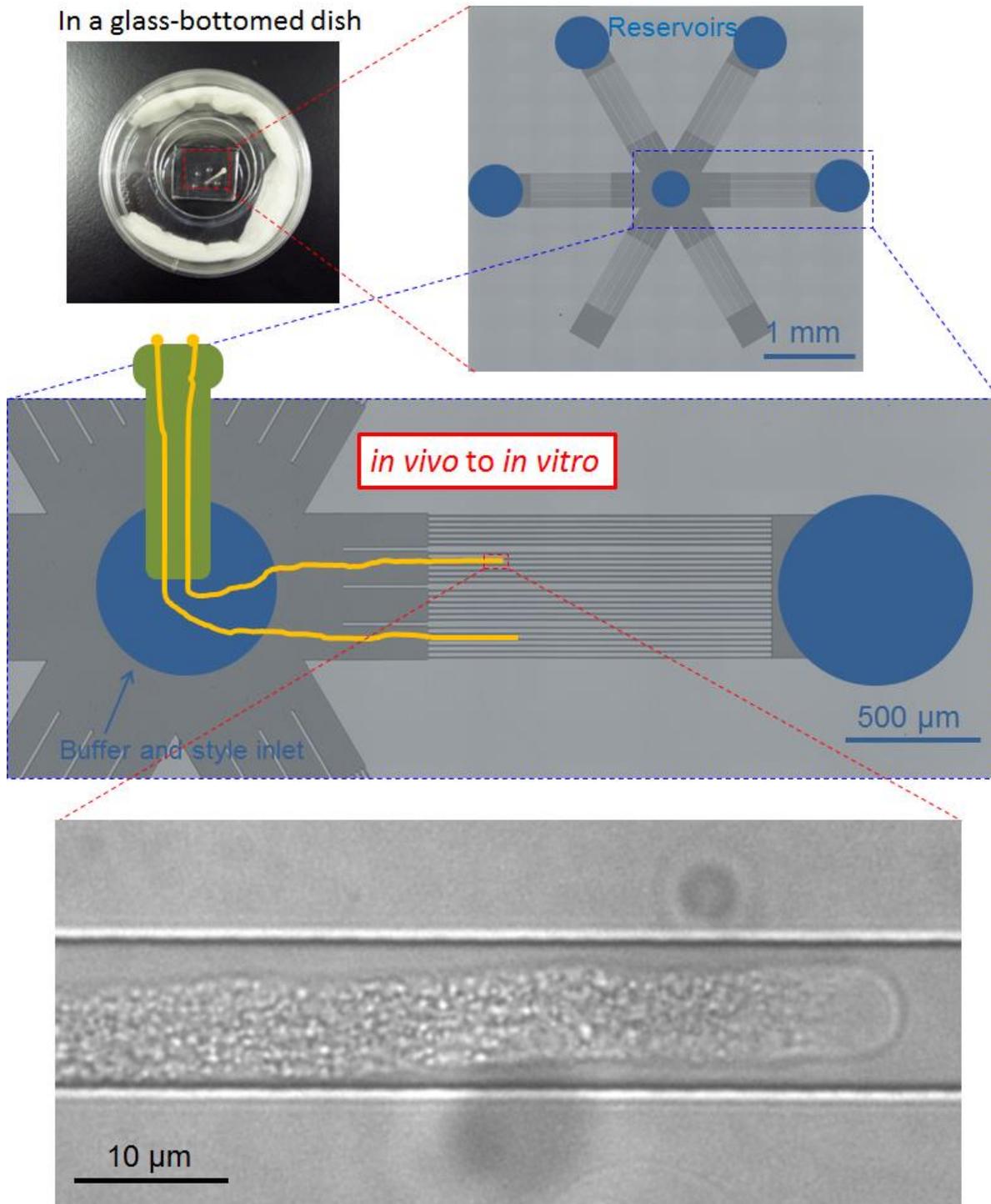


図2 花粉管伸長速度計測用マイクロ流路デバイス。PDMSで製作されたマイクロ流路デバイスはガラスボトムディッシュ内に配置され、流路内に液体培地を充填した後、受粉させた花柱を1 cm程度の長さに切り、花柱差込口に設置することにより、伸長した花粉管が花柱を通過後デバイス内に入し、マイクロ流路に到達する。

3. マイクロケージアレイを用いた胚珠の長時間ライブイメージング

植物の胚発生とその一連の過程は受精卵という単細胞から高等生物としての複雑な構造と機能を構築する基本的で重要なプロセスであり、胚発生研究は植物科学分野で最も先端的に研究が進んでいる分野の1つである。胚発生の機構解明のためには安定した種子（胚珠）の長時間培養技術とライブイメージングが必要不可欠であるが、水溶液中でその成長を観察する従来の手法では、観察中に胚珠が移動してしまい、長時間に渡って経時的に観察することが難しかった。また、マイクロニードルなどの既存の実験器具を用いて固定しようとする、その成長を阻害してしまうなどの問題があった。そのため、胚珠の成長を阻害することなく長時間、安定的に培養する技術の開発が重要な課題となっていた。また、多数の胚珠を同時に同じ条件で培養、観察することも必要不可欠であり、その手法が簡便、シンプルであることも望まれていた。本研究では、微小なケージ（檻）型の構造物をアレイ化したマイクロデバイスにより、胚珠を固定し、長時間固定するというアイデアを考案した。

培養されたシロイヌナズナの胚珠の寸法を参考にして、マイクロケージ・マイクロアレイの設計を行った。その後、PDMS を素材とし、ソフトリソグラフィ（マイクロ加工技術の一種）により、多数のマイクロケージとマイクロピラーをアレイ（配列）状に配置したマイク

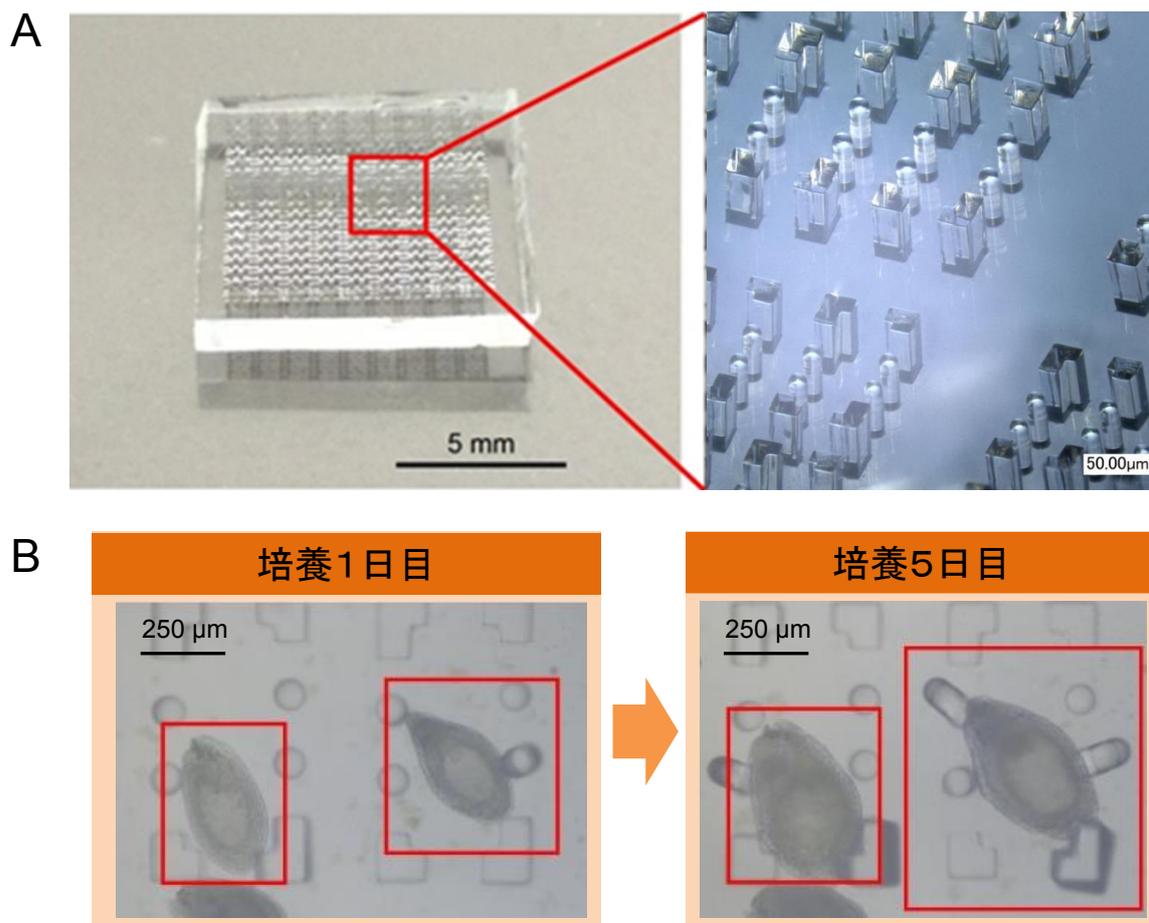


図3 (A) ケージの幅が $250\ \mu\text{m}$ のマイクロケージアレイの全体図（左）と、その拡大図（右）。デバイス全体は、一辺が約1センチメートルの正方形の形になっていて、その中に96個（ケージ幅 $200\ \mu\text{m}$ のアレイでは112個）のマイクロケージが配列されている。(B) マイクロケージアレイ内で培養され、成長する胚珠。

マイクロアレイを作製した (図 3 A)。PDMS は柔軟性を持つため、胚珠の成長を阻害する物理的な影響を与えずに、長時間の培養が可能である。ケージの設計では、その全長は胚珠の成長後の長さを想定し、650 μm に設計したが、幅は 150, 200, 250, 300 μm の四つの異なる幅を持つデバイスを作製して、胚珠を格納するために最適な規格を割り出す検証実験を行った。その結果から、長期間にわたる胚珠の培養に適するケージ幅として、200 μm と 250 μm を選択した。その後、マイクロアレイを用いて、胚珠を固定し、1 週間培養を行い、その成長を記録した (図 3 B)。その結果、胚珠がはじめの位置と向きを維持したまま成長していく過程の観察を実現した。また、生体適合性が高く、かつ柔軟性を持つポリマーを材料に選んだため、胚珠の成長を物理的負荷により阻害しないことも確認できた。このように、マイクロアレイを用いて胚珠を固定することで、観察対象の胚珠を見失うことがなく、長時間にわたる多点観察を容易にし、実験にかかる所要時間も大幅に短縮することができた (Park et al. 2014)。今回開発したマイクロアレイはその規格を変更するだけで、有用な農作物など、シロイヌナズナ以外の種の胚珠の培養実験と成長観察、胚発生や胚乳発生のライブイメージング、更には胚珠以外の植物組織の培養実験、長時間観察にも応用が可能であり、その実験効率を大幅に改善することができる。

4. 展望

本稿では、マイクロデバイスを用いて初めて可能となった、花粉管伸長解析、胚珠の長時間ライブイメージングについて紹介した。従来のバルク計測システムに比べ、マイクロデバイスを用いることにより、実験の高精度化、高速化だけでなく、多点観察や並列処理などが可能となる。今後、雄組織である花粉管解析用デバイスと、雌組織である胚珠観察用デバイスの要素技術を融合すれば、更に精緻で多様な実験や観察が期待できる。更に、実験チップの使い捨て利用や、少量の試料での実験を、生物系実験室の現場で、大がかりな設備なしに遂行できるなど、実用的なメリットも享受できる。そのため、マイクロ流路デバイスを用いた花粉管伸長解析や、マイクロアレイを用いた胚珠ライブイメージングの技術が植物科学コミュニティに普及すれば、関連分野の研究が加速され、学術的価値の高い知見の獲得だけでなく、農作物の収量の向上、乾燥や病気に強い作物を作り出す農業、育種技術、種子の成長向上や食料増産技術など、環境問題や食糧問題、エネルギー問題解決への糸口が期待できる。

PDMS やガラスを主な材料とし、その表面に微細加工を施したマイクロチップは、主に生物物理学分野で威力を発揮してきた磁気ピンセット、光ピンセット、一分子蛍光イメージングなど、ナノメートルスケールで生体試料を操作・計測する一分子システムと相性がよい。そのため、双方を融合させることにより、分子レベルでの精緻で高精度な実験や新たなパラメータの計測を実現し (Arata et al. 2009)、現在では生物物理学分野で必要不可欠な技術となった。これまでマイクロチップを用いたバイオ実験といえば、核酸や蛋白質など、分子スケールを対象とする実験ばかりが注目されてきた。しかし、植物科学への貢献を目指す場合、対象とすべき階層は組織から細胞であることも多く、そのスケールはミリメートルから数百マイクロメートルである。扱う試料のサイズも多岐にわたるため、これまでのトレンドから

視点を変え、ナノ・マイクロだけでなく、ミリの技術へ目を向けることも重要な方向性の一つであると考えている。従来の掘削型精密加工技術だけでなく、近年複雑な立体構造物製作が可能となった光造形技術（通称3Dプリンタ）などを積極的に取り込むことにより、スマートで実用的な” Plant/Machine Interface (PMI)” 技術が期待でき、その応用は無限に広がるといっても過言ではない。マイクロスケールのプラットフォームを基盤に、ナノからミりに渡るスケール横断的技術連携から、植物科学、ひいては農業技術にブレークスルーをもたらす新技術が生まれるものと確信している。

謝辞

本稿で紹介した研究は、科学技術振興機構 ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト、並びに科学研究費補助金若手研究（A）（研究課題番号：25706013）の助成により遂行された。

引用文献

- 新田英之、東山哲也 2014. 極微小デバイスを用いた生体分子・細胞・組織の顕微操作と解析. *Plant Morphology* 25: 61-66
- Arata, H. F., Rondelez, Y., Noji, H., Fujita, H. 2005. Temperature alternation by an on-chip microheater to reveal enzymatic activity of beta-galactosidase at high temperatures. *Analytical Chemistry* 77: 4810-4814
- Arata, H. F., Fujita, H. 2009. Miniaturized thermocontrol devices enable analysis of biomolecular behavior on their timescales, second to millisecond. *Integrative Biology* 1: 363-370
- Arata, H., Dupont, A., Miné, J., Disseau, L., Renodon-Cornière, A., Takahashi, M., Viovy, J.L., Cappello, G. 2009. Direct observation of twisting steps during Rad51 polymerization on DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 19239-19244
- Arata, H.F. 2010. Portable diagnostic technologies for resource poor environments, *Micro Electro Mechanical Systems, MemS: Technology, Fabrication Processes and Applications*, Chapter 11, Nova Science Pub Inc.
- Arata, H., Komatsu, H., Hosokawa, K., Maeda, M. 2012. Rapid and Sensitive MicroRNA Detection with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification on Power-Free Microfluidic Chip. *PLOS ONE* 7, p.e48329
- Auroux, P. A., Iossifidis, D., Reyes, D. R., Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry* 74: 2637-2652
- Bogue, R. 2007. MEMS sensors: past, present and future. *Sensor Review* 27: 7-13
- Craighead, H. 2006. Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* 442: 387-393
- Dao, D.V., Nakamura, K., Bui, T.T., Sugiyama, S. 2010. Micro/nano-mechanical sensors and actuators based on SOI-MEMS technology. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol* 1: 013001- 013010
- El-Ali, J., Sorger, P.K., Jensen, K.F. 2006. Cells on chips. *Nature* 442: 403-411
- 藤田博之 2003. 「マイクロ・ナノマシン技術入門」工業調査会

- Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., Kuroiwa, T. 1997. Kinetics of double fertilization on *Torenia fournieri* based on direct observation of the naked embryo sac. *Planta* 203: 101–110
- Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480-1483
- Horade, M., Yanagisawa, N., Mizuta, Y., Higashiyama, T., Arata, H. 2014. Growth assay of individual pollen tubes arrayed by microchannel device. *Microelectronic Engineering* 118: 25-28
- Hosokawa, K., Sato, K., Ichikawa, N., Maeda, M. 2004. Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis. *Lab on a Chip* 4: p.181–185
- Huh, D., Torisawa, Y.S., Hamilton, G.A., Kim, H.J., Ingber, D.E. 2012. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a chip* 12: 2156-2164
- Park, JH., Kurihara, D., Higashiyama, T., Arata, H. 2014. Fabrication of microcage arrays to fix plant ovules for long-term live imaging and observation. *Sensors & Actuators B: Chemical* 191: 178–185
- Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A. 2002. Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry* 74: 2623-2636
- Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K. V., Arata, H., Fujita, H., Takeuchi, S., Noji, H. 2005. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nature Biotechnology* 23: 361-365
- Whitesides, G. M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442: 368-373
- Toshiyoshi, H., Fujita, H. 1996. Electrostatic micro torsion mirrors for an optical switch matrix. *Journal of Microelectromechanical Systems* 5: 231-237

試験管内再構築系を用いたブレブ駆動型アメーバ運動機構の研究

西上 幸範, 伊藤 弘明, 市川 正敏
 京都大学大学院理学研究科
 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Yukinori Nishigami, Hiroaki Ito, & Masatoshi Ichikawa

Studies of bleb-driven cell locomotion using reconstituted systems

Key words: actomyosin, amoeba, bleb, cortex, locomotion

Department of Physics, Graduate School of Science, Kyoto University

Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

1. はじめに

アメーバ運動は接着性真核細胞が一般に行う運動様式であり様々な生命現象において重要であることが分かっている。実際、原生動物アメーバの移動だけでなく、多細胞生物の発生過程(Jaglarz & Howard 1995, Blaser et al. 2006, Terayama et al. 2013)や、外傷の修復(Nuccitelli 2003, McCaig et al. 2009, Zhao 2009), 免疫細胞の移動(Lin et al. 1998, Loosley et al. 2015), 癌の転移(Friedl & Wolf 2003, Sahai & Matshall 2003, Wolf et al. 2003, Pinner & Sahai 2008)などでこの運動が観察されている。これまで、アメーバ運動の駆動力は伸長中の仮足前端でのアクチン重合による(アクチン重合駆動型アメーバ運動)と考えられてきた(図 1A: Mitchison & Cramer 1996, Ridley et al. 2003, Parent 2004, Pollard & Borisy 2003)。しかしながら近年、アクチンダイナミクスに依らない運動様式が発見された(図 1B: Charras et al. 2008, Fackler & Grosse 2008, Paluch & Raz 2013)。この運動様式はブレブ駆動型アメーバ運動といわれ、三次元マトリックスや組織中を移動する細胞でしばしば観察され、好中球(Mandeville et al, 1997) や癌細胞(Sahai & Mashall 2003, Wolf et al. 2003), 始原生殖細胞(Blaser et al. 2006)等の移動において重要であるという報告がなされている。本稿ではこのブレブ駆動型アメーバ運動機構メカニズムに関して近年、我々が開発した試験管内再構築系の話題も含めて説明する。

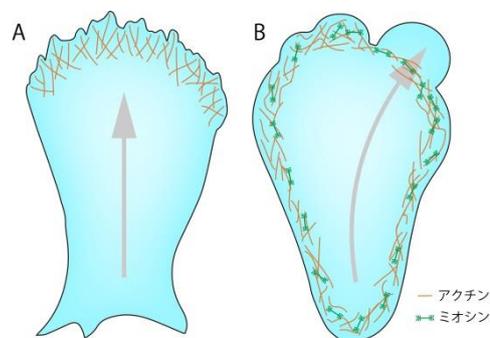


図 1. 二つのアメーバ運動機構
 アクチン重合駆動型アメーバ運動(A)の駆動力はアクチン重合である。一方でブレブ駆動型アメーバ運動(B)の駆動力はアクトミオシンの収縮である。細胞運動の方向を矢印で示した。

2. ブレブ形成と細胞機能

ブレブとは細胞表層部のアクトミオシンの収縮力によって形成される, “細胞膜の球形の突出”を指す。現在, ブレブ形成の機構は下記の様に考えられている(図 2: Charras & Paluch 2008, Fackler & Grosse 2008)。(1)細胞表層部分に存在するアクチンとミオシン(アクトミオシンコーテ

ックス)が収縮することで細胞内静水圧を上昇させる。(2)予定突出部位でアクトミオシンコーテックスが細胞膜から乖離する(Cunningham 1995)。もしくはアクトミオシンコーテックスの一部が破壊される(Keller & Egli 1998, Paluch et al. 2005)。(3)(2)により強度が低下した部分に(1)の静水圧によって細胞質が流入し、細胞膜が押し延ばされ細胞膜が突出する。(4)突出後の細胞膜にアクトミオシンコーテックスを再構築後、突出が縮退する。このようにブレブは葉状仮足や糸状仮足(アクチン重合により駆動される)などのよく知られた細胞膜突出構造とは異なる形成機構を持つ。

ブレブ形成は細胞分裂(Tokumitsu & Maramorosch 1967, Fishking et al. 1991, Hickson et al.

2006, Sedzinski et al. 2011) や細胞伸展(Erickson & Trinkaus 1976, Bereiter-Hahn et al. 1990), ウイルスに感染した細胞(Mercer & Helenius 2008), アポトーシスの execution phase(Robertson et al. 1978), 高浸透圧ショックを与えた細胞(Ruan et al. 2015), 一様な化学誘引物質溶液中の細胞性粘菌(Langridge & Kay 2006)など様々な細胞で確認されており, いくつかの過程では重要な役割を果たしている事が分かっている。例えば, 細胞分裂においてはブレブ形成によって, 細胞表面の収縮力を弱めることで分裂装置を赤道面に保持する事に役立っている(Sedzinski et al. 2011)。また, 高浸透圧ショックを受けた際には, ブレブ形成を起こすことで細胞の浸透圧耐性を上昇させる(Ruan et al. 2015)。

3. ブレブ駆動型アメーバ運動

3-1. 運動機構

ブレブ形成と同様の機構で細胞の重心が移動する場合をブレブ駆動型アメーバ運動と呼ぶ(通常のブレブ形成と異なり, 上述の過程(4)膜突出縮退過程はない)。このような機構は原生生物アメーバの運動機構として 20 世紀初頭から提唱されてきた。Mast (1926) は大型の自由生活型アメーバである *Amoeba proteus* ($\sim 500 \mu\text{m}$) や *Chaos carolinense* ($\sim 5000 \mu\text{m}$) を用いて, その細胞内流動の観察や仮足形成部位での細胞表面構造(プラズマゲルシート)の崩壊と再構築を観察し, ブレブ駆動型アメーバ運動と同様の機構でアメーバが動いている事を提唱している。電子顕微鏡 (Stockem et al. 1982) や蛍光修飾アクチンを用いた研究 (Pomorski et al. 2007) から同様の事が示唆されており, 運動が細胞内静水圧によって駆動されている事も示されている(Kamiya 1964, Yanai et al. 1996)。また, ヒトに対して病原性を持つアメーバ *Entamoeba histolytica* (Maugis et al. 2010) や, アクチン駆動型アメーバ運動研究のモデル生物として用いられてきた細胞性粘菌においても, ブレブ駆動型のアメーバ運動機構の存在が知られている(Yoshida & Soldati 2006)。

この運動機構は単細胞生物のアメーバ運動だけでなく, 多細胞生物における細胞運動でも

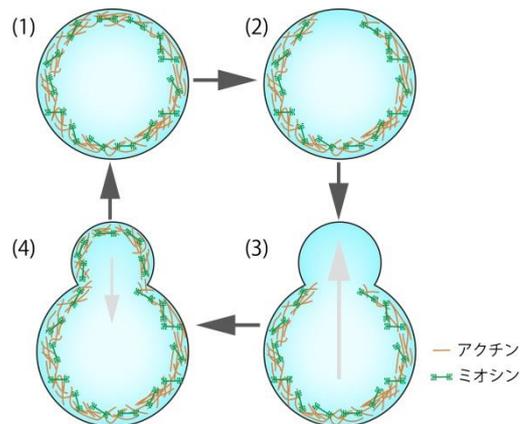


図2. ブレブ形成の過程
(1)細胞表面部のアクトミオシンコーテックスが収縮し細胞内静水圧が上昇する。(2)予定突出部位でアクトミオシンコーテックスが局所的に破壊される。(3)強度が低下した部分に(1)の静水圧で細胞質が流入し, 細胞膜が伸長する。(4)アクトミオシンコーテックスが再生し突出が縮退する。

観察される。発生において始原生殖細胞が生殖腺へ移動する事はよく知られているが、この細胞を単離するとブレブ駆動型の仮足形成をみせる(Terayama et al. 2013)。また、胚における始原生殖細胞の動きをライブ観察することで、生体内でもこの機構が重要である事が示されている(Blaser et al. 2006)。ショウジョウバエを用いた実験でも良く似た結果が得られている(Jaglarz & Howard 1995)。この過程では、ブレブ駆動型アメーバ運動に加えアクチン重合駆動型の運動も確認されており(Trinkaus 1973, Diz-Muñoz et al. 2010)、発生段階ではこれら二つの機構を使いながら細胞の移動は起こっていると考えられている(Paluch et al. 2013)。

癌の浸潤や転移には癌細胞の運動能力が重要である。癌細胞は細胞外マトリクス中をアメーバ運動で移動することが分かっている(Friedl & Wolf 2003)が、その運動様式はアクチン重合によるもの(Cramer 1999, Rohatgi et al. 1999)とブレブ駆動によるもの(Sahai & Marshall 2003, Wolf et al. 2003, Pinner & Sahai 2008)の二つが存在している。特にこの癌細胞におけるブレブ駆動型アメーバ運動は抗がん剤処理した細胞で確認されている(Friedl & Wolf 2003, Sahai & Marshall 2003, Wolf et al. 2003, Pinner & Sahai 2008)。また、一部の細胞では基質との結合に接着斑を持たず細胞膜全体で接着しているものも確認されている(Bergert et al. 2015)。

上述したように単純なブレブ形成とブレブ駆動型アメーバ運動の違いは、後者には膜突出後の縮退過程がなく、そのまま重心の移動が起こるという点である。このような事が起こるためには突出した細胞膜にアクトミオシンコーテックスが再構築されない。もしくは再構築されても一度破壊されると再破壊がおこりやすいという性質を持つ必要がある(Charras & Paluch 2008, Paluch & Raz 2013)。この原因となる細胞内の不均一性因子としてはこれまでに細胞外からのカルシウムイオンの部分的な流入(Blaser et al. 2006)や細胞内のERMタンパク質(ezrin, radixin, moesin)等のアクチンと細胞膜を結合させるタンパク質の局在(Rossy et al. 2007, Martinelli et al. 2013)などが報告されている。

3-2. 試験管内再構築系を用いた研究

3-2-1. 細胞膜を持たない試験管内再構築系

上述のようにブレブ駆動型アメーバ運動は様々な細胞で観察され、多くの生命現象において重要であることが分かっているが、その機構の詳細に関しては不明な点が多い。この理由としてはこの運動が細胞全体の関与する複雑な運動であるという事が挙げられる。この複雑なブレブ駆動型アメーバ運動の本質を取り出して、その機構を理解することを目的に、筆者らはこの運動を試験管内で再構築することを試みた。これまでに、ブレブ駆動型アメーバ運動の駆動力源であるアクトミオシン系を脂質二重層(リポソーム)に封入した系は存在するが(Takiguchi et al. 2008, 2011, Tsai et al. 2011, Carvalho et al. 2013)、これらの系は活発に変形する事はなかった。我々は常にブレブ駆動型アメーバ運動で移動する自由生活型アメーバ *Amoeba proteus* 由来のミオシンを用いることで、アクトミオシン系で活発に運動する試験管内再構築系を初めて作製する事に成功した(Nishigami et al. 2013)。この系ではアクトミオシン懸濁液を細胞抽出液中に注入することでアクトミオシン懸濁液がアメーバ様の運動を行った(図3)。電子顕微鏡観察、アクチンの蛍光観察の結果、アクトミオシン懸濁液と細胞抽出液の界面にアクトミオシンが高密度に凝集・収縮し、この構造の破壊によって仮足様構造の形成が誘導さ

れ、重心移動が起こることが分かった。このような事から、この再構築系は前述のブレブ駆動型アメーバ運動とよく似た機構で動いているという事が分かった。

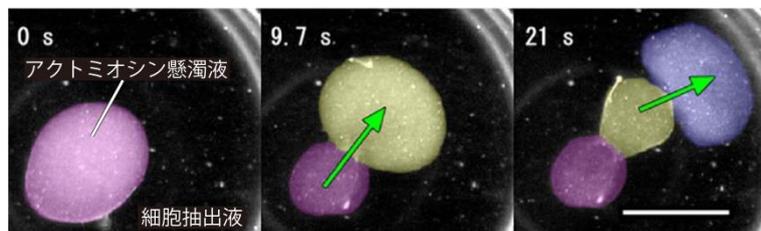


図3. 細胞膜を持たない再構築系
アクトミオシン懸濁液を細胞抽出液中
に注入するとアクトミオシン懸濁液が
アメーバ様の運動を行う。赤・黄・青は
この順番で形成された仮足様構造を色
付けして示したものである。Bar = 1
mm. Nishigami et al. (2013) より改変し
て転載。

3-2-2. 細胞質ゾル-ゲル分布機構

ブレブ駆動型アメーバ運動に伴い、細胞は新たに伸長する仮足に細胞質を流動させる必要がある。したがって細胞質ゲルは部分的にゾル化する必要がある。大型の原生生物アメーバでは運動に伴い明確な細胞質内のゾル-ゲル分布が確認される(Mast 1926, Allen 1973, Bovee & Jahn 1973)。この細胞の細胞質ゲルは細胞表層部分に分布し、その内部を細胞質ゾルが仮足伸長方向へ活発に流動する(図4)。流動したゾルは仮足前端部分においてはゲルに変換される。このように、ブレブ駆動型アメーバ運動においては細胞質ゾルとゲルの分布が移動方向や外部の環境等に応じて時空間的に正確な制御を受けていることが重要である。もし細胞質が均質であれば細胞はアメーバ運動を行うことができない。さらに、細胞質のゾル-ゲル状態はカルシウムイオンによって担われている事が試験管内の実験より明らかになっている(Janson & Taylor 1993)。これらのことから、生体内においてもこの制御機構にはカルシウムイオンが重要であると考えられてきた。しかしながら、大型アメーバの生体内におけるカルシウムイオンの分布に関しては統一した見解が得られていない。実際、細胞後端部分でカルシウムイオン濃度が高いという報告(Gollnick et al. 1991, Kuroda et al. 1998, Taylor et al. 1980), や前端部分で高いという報告(Taylor et al. 1980), 細胞全体で低濃度である(Cobbold, 1980)といった種々の報告がある。そこで、我々はゾル-ゲル変換の制御に関して、上述の試験管内再構築系を用いてタンパク質物性という異なる側面からの解明を試みた。

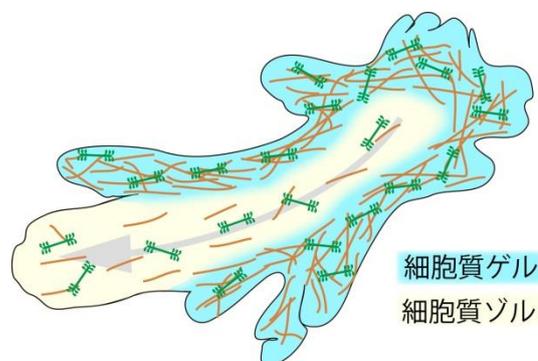


図4. 大型アメーバの細胞質ゾル-ゲル分布
細胞表層部に細胞質ゲルが分布し、その内部
を細胞質ゾルが運動方向へ流動していく。

細胞を模したサブミリメートルオーダーの細い流路中で再構築系の運動を制御し、その際のアクトミオシン懸濁液の動きを解析した。その結果、一様なアクトミオシン懸濁液を流動させているにも関わらず、

Y. Nishigami, H.

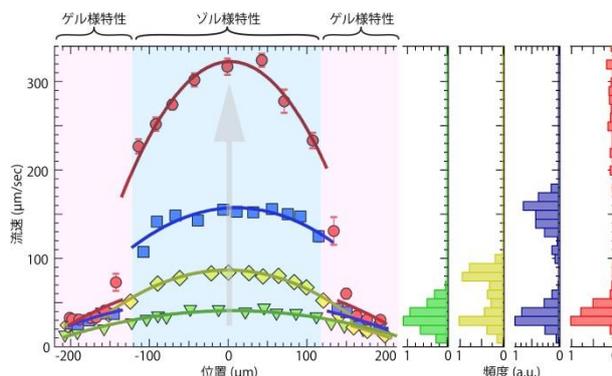


図5. 流路中でのアクトミオシン懸濁液の流動
アクトミオシン懸濁液を様々な速度で流路中に流すと、低速ではハーゲンポアズイユ流に近い性質を示す(緑)。一方、流速が早くなってくると(黄・青・赤)流路の壁より少し離れた部分に滑り面ができ、中心部分の流速が上昇する事が分かった。図中の矢印はアクトミオシン懸濁液の移動方向を示し、横軸は流路の中心部分からの距離を示した。この分布は、生細胞における細胞質ゾル-ゲル分布と類似している。Nishigami et al. (2013) より改変して転載。

流路の中心部分のみがゾルとして流動し、流路の壁近傍付近はゲル様の振る舞いをみせるという事がわかった(図 5)。つまりアクトミオシン懸濁液におけるゾル-ゲルの分布は、カルシウムイオン濃度が一樣であっても、そこにかかるずり応力だけで細胞様に自律制御されることが示唆された。また、細胞内においても同様に流動特性を測定すると、モデル系と相似な流動パターンがみられ、さらにゾル化が起こる部分のずり歪の値も再構築系より測定された値に近いものが得られた。従って、生体内においても、“応力によるゾル化”というゾル-ゲル変換が起こっていることが示唆された。この仮説は従来の細胞内シグナリングを介した細胞質のゾル-ゲル変換という概念とは異なり、細胞に加わる局所的な応力に対して、タンパク質構造体の物理化学的な応答を利用してゾル-ゲル変換を行うという新しい概念である。

3-2-3. 脂質一重膜を持つ試験管内再構築系

上述の系では細胞膜非存在下でブレブ駆動型アメーバ運動様の動きを誘導することに成功した。この運動はアクトミオシン懸濁液の表面に高濃度のアクチンフィラメントが集積し実現したと考えられるが、実際の細胞では細胞膜に結合するアクチンコーテックスがこの役割を果たしていると考えられる。そこで細胞サイズの脂質一重層(ドロップレット)にアクトミオシンを封入した。条件検討の結果、脂質一重層が収縮と緩和を繰り返す(振動モード)系を作製することに成功した(図 6: Nishigami et al. 2015)。

揺らぎ解析よりこの膜変形は熱揺らぎとは著しく異なる性質を持っていた。振動モードは 10 秒程度の短い時間スケールで起こる現象である一方で、この系

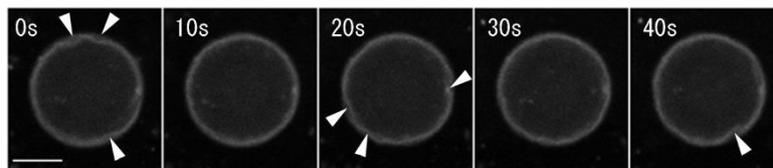


図 6. アクトミオシンドロップレットの振動モード運動(アクチン染色) 脂質一重層にアクトミオシンを封入すると界面が振動し変形する現象が見られた(矢じり)。この運動は 10 秒程度の時間スケールの現象である。Bar = 10 μ m.

を 10 分程度の長い時間スケールでみると、振動モードとは異なる、脂質一重層のしわ構造が成長するモードが存在する事が分かった。この変形モードは脂質一重層の表層と結合したコーテックスの収縮によって駆動されており、ブレブ駆動型アメーバ運動とよく似た駆動力発生機構を持っている。このしわ構造と脂質一重層ドロップレットのサイズを比較すると、その凹み幅はドロップレットのサイズに正の相関があり、凹み深さは負の相関がある事が分かった(図 7: Ito et al. 2015)。

この変形は、コーテックスの弾性と収縮性を考慮した物理モデルを用いて説明する事が出来た。以上の結果は、膜直下でアクトミオシンコーテックスが収縮した場合、その構造が置かれた場の形状に応じて、最終的に発現する形状が変化する事を示している。つまり、細胞で考えると、コーテックスの物理的性質として、細胞の局所形状に

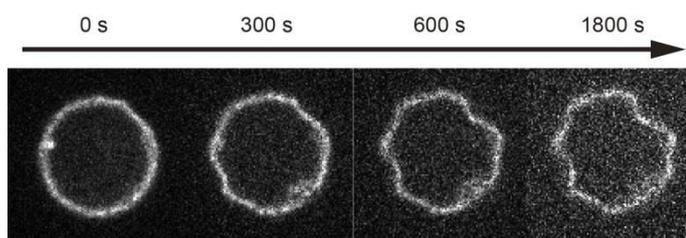


図 7. アクトミオシンドロップレットのしわ振動モード運動 脂質一重層にアクトミオシンを封入すると 10 分程度の長い時間スケールでは、界面に凹凸が出来る現象が見られた。Bar = 10 μ m. Ito et al. (2015) より改変して転載。

て収縮形状が決まっていく可能性が示唆される。このことは、従来の細胞内シグナリングに

よる運動制御に加えて、細胞の曲率や形状といった物理的なパラメータが運動性という機能に直接かかわっている可能性を示しており、まったく新しい切り口と言えるだろう。

4. おわりに

ブレブ駆動型アメーバ運動は様々な細胞で行われており、多くの生命現象において重要であることが分かってきた。しかしながらこの機構が複雑であるために、依然不明な点が多い。我々はこの運動の試験管内再構築系を作製し、運動の本質を取り出した単純な系を用いてこの運動機構の理解を深めることに成功した。また、これらの系の解析から新規のゾル-ゲル変換機構やアクトミオシン系が場の形状依存的に変形を起こすことが明らかにした。今後は、実際の生細胞の細胞形状とその時間発展を詳細に調べることで、これらの実験から得られた物理モデルが生細胞に如何に寄与しているかを検証する必要がある。本稿で紹介した試験管内再構築系を用いたアプローチを通じて、細胞が不定形の不可思議な形をしながらその形状を外的・内的環境に応じて変化させ、さらに一つの生命として統合され生きている原理を知ることが出来ると期待している。

5. 引用文献

- Allen, R.D. 1973. Biophysical aspects of pseudopodium formation and retraction. In: Jeon, K.E. (eds.) *The biology of amoeba*. pp. 201-247. Academic Press, New York & London.
- Bereiter-Hahn, J., Luck, M., Miebach, T., Stelzer, H.K., & Voth, M. 1990. Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements. *J. Cell Sci.* 96: 171-188.
- Bergert, M., Erzberger, A., Desai, R.A., Aspalter, I.M., Oates, A.C., Charras, G., Salbreux, G., & Paluch, E.K. 2015. Force transmission during adhesion-independent migration. *Nat Cell Biol.* 17: 524-529.
- Blaser, H., Reichman-Fried, M., Castanon, I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami, K., Solnica-Krezel, L., Heisenberg, C.P., & Raz, E. 2006 Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev. Cell* 11: 613-627.
- Bovee, E.C., & Jahn, T.L. 1973. Locomotion and behavior. In: Jeon, K.E. (eds.) *The biology of amoeba*. pp. 249-290. Academic Press, New York & London.
- Carvalho, K., Tsai, F.C., Lees, E., Voituriez, R., Koenderink, G.H., & Sykes, C. 2013. Cell-sized liposomes reveal how actomyosin cortical tension drives shape change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110: 16456-16461.
- Charras, G.T., & Paluch, E. 2008. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 730-736.
- Cobbold, P. 1980. Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement. *Nature* 285: 441-446.
- Cramer, L.P. 1999. Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem. Soc. Symp.* 65: 173-205.
- Cunningham, C.C. 1995. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol.* 129: 1589-1599.

- Diz-Muñoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D.J., Paluch, E., & Heisenberg, C.P. 2010. Control of Directed Cell Migration In Vivo by Membrane-to-Cortex Attachment. *PLoS Biol.* 8: e1000544.
- Erickson, C.A., & Trinkaus, J.P. 1976. Microvilli and blebs as sources of reserve surface membrane during cell spreading. *Exp. Cell Res.* 99: 375–384.
- Fackler, O.T., & Grosse, R. 2008. Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181: 879–884.
- Fishkind, D.J., Cao, L.G., & Wang, Y.L. 1991. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 114: 967–975.
- Friedl, P., & Wolf, K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Rev. Cancer* 3: 362–374.
- Gollnick, F., Meyer, R., & Stockem, W. 1991. Visualization and measurement of calcium transients in *Amoeba proteus* by fura-2 fluorescence. *Eur. J. Cell Biol.* 55: 262–271.
- Hickson, G.R., Echard, A., & O’Farrell, P.H. 2006. Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis. *Curr. Biol.* 16: 359–370.
- Ito, H, Nishigami, Y., Sonobe, S., & Ichikawa, M. 2015. Wrinkling of a lipid interface induced by actomyosin cortex. *arXiv*: 1505.04371.
- Jaglarz, M.K., & Howard, K.R. 1995. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development.* 121: 3495–3503.
- Janson, L., & Taylor, T.D. 1993. *In vitro* models of tail contraction and cytoplasmic streaming in amoeboid cells. *J. Cell Biol.* 123: 345–356.
- Kamiya, N. 1964. The motive force of endoplasmic streaming in the amoeba. In: Allen, R.D., & Kamiya, N. (eds.) *Primitive Motile Systems in Cell Biology*. pp. 257–277. Academic Press, New York & London.
- Keller, H., & Egli, P. 1998. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 41: 181–193.
- Kuroda, K., Yoshimoto, Y., & Hiramoto, Y. 1998. Temporal and spatial localization of Ca²⁺ in moving *Amoeba proteus* visualized with aequorin. *Protoplasma* 144: 64–67.
- Langridge, P.D., & Kay, R.R. 2006. Blebbing of Dictyostelium cells in response to chemoattractant. *Exp. Cell Res.* 312: 2009–2017.
- Lin, C.L., Suri, R.M., Rahdon, R.A., Austyn, J.M., & Roake, J.A. 1998. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* 28: 4114–4122.
- Loosley, A.J., O’Brien, X.M., Reichner, J.S., & Tang, J.X. 2015. Describing Directional Cell Migration with a Characteristic Directionality Time. *PLoS ONE* 10: e0127425.
- Martinelli, S., Chen, E.J., Clarke, F., Lyck, R., Affentranger, S., Burkhardt, J.K., & Niggli, V. 2013. Ezrin/radixin/moesin proteins and flotillins cooperate to promote uropod formation in T cells.

Front. Immunol. 4: 84.

- Mandeville, J.T., Lawson, M.A., & Maxfield, F.R. 1997. Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J. Leukoc. Biol.* 61: 188-200.
- Mast, S.O. 1926. Structure, movement, locomotion, and stimulation in amoeba. *J. Morphol. Physiol.* 41: 347-425.
- Maugis, B., Brugues, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., & Amblard, F. 2010. Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J. Cell Sci.* 123: 3884-3892.
- McCaig, C.D., Song, B., & Rajnicek, A.M. 2009. Electrical dimensions in cell science. *J. Cell Sci.* 122: 4267-4276.
- Mercer, J., & Helenius, A. 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320: 531-535.
- Mitchison, T.J. & Cramer, L.P. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-379.
- Nishigami, Y., Ichikawa, M., Kazama, T., Kobayashi, R., Shimmen, T., Yoshikawa, K., & Sonobe, S. 2013. Reconstruction of Active Regular Motion in Amoeba Extract: Dynamic Cooperation between Sol and Gel States. *PLoS ONE* 8: e70317.
- Nishigami, Y., Ito, H., Sonobe, S., & Ichikawa, M. 2015. Non-periodic oscillatory deformation of an actomyosin microdroplet encapsulated within a lipid interface. *Sci. Rep.*
- Nuccitelli, R. 2003. A role for endogenous electric fields in woundhealing. *Curr Top Dev Biol* 58: 1-26.
- Paluch, E., Piel, M., Prost, J., Bornens, M., & Sykes, C. 2005. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys. J.* 89: 724-733.
- Paluch, E.K., & Raz, E. The role and regulation of blebs in cell migration. 2013. *Curr Opin Cell Biol* 25: 582-590.
- Parent, C.A. 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 4-13.
- Pinner, S., & Sahai, E. 2008. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nature Cell Biol.* 10: 127-137.
- Pomorski, P., Krzemiński, P., Wasik, A., Wierzbička, K., Barańska, J. & Kłopočka, W. 2007. Actin dynamics in Amoeba proteus motility. *Protoplasma* 231: 31-41.
- Pollard, T.D., & Borisy, G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., & Horwitz, A.R. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., & Kirschner, M.W. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97: 221-231.
- Robertson, A.M., Bird, C.C., Waddell, A.W., & Currie, A.R. 1978. Morphological aspects of

- glucocorticoid- induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J. Pathol.* 126: 181–187.
- Rossy, J., Gutjahr, M.C., Blaser, N., Schlicht, D., & Niggli, V. 2007. Ezrin/moesin in motile Walker 256 carcinosarcoma cells: signal-dependent relocalization and role in migration. *Exp. Cell Res.* 313: 1106–1120.
- Ruan, R., Zou, L., Sun, S., Liu, J., Wen, L., Gao, D., & Ding W. 2015. Cell Blebbing upon Addition of Cryoprotectants: A Self-Protection Mechanism. *PLoS ONE* 10: e0125746.
- Sahai, E., & Marshall, C.j. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis, *Nat. Cell Biol.* 5: 711–719.
- Sedzinski, J., Biro, M., Oswald, A., Tinevez, J.Y., Salbreux, G., & Paluch, E. 2011. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature* 476: 462–466.
- Stockem, W., Hoffmann, H.U., & Gawlitta, W. 1982. Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*. *Cell Tissue Res.* 221: 505–519.
- Takiguchi, K., Yamada, A., Negishi, M., Tanaka-Takiguchi, Y., & Yoshikawa, K. 2008. Entrapping Desired Amounts of Actin Filaments and Molecular Motor Proteins in Giant Liposomes. *Langmuir* 24: 11323–11326.
- Takiguchi, K., Negishi, M., Tanaka-Takiguchi, Y., Homma, M., & Yoshikawa, K. 2011. Transformation of ActoHMM Assembly Confined in Cell-Sized Liposome. *Langmuir* 27: 11528–11535.
- Taylor, D.T., Blinks, J., & Reynolds, G. 1980. Contractile basis of amoeboid movement. VII. Aequorin luminescence during amoeboid movement, endocytosis, and capping. *J. Cell Biol.* 86: 599–607.
- Terayama K., Kataoka K., Morichika K., Orii H., Watanabe K., & Mochii M. 2013 Developmental regulation of locomotive activity in *Xenopus* primordial germ cells. *Dev. Growth Differ.* 55: 217–228.
- Tokumitsu, T., & Maramorosch, K. 1967. Cytoplasmic protrusions in insect cells during mitosis *in vitro*. *J. Cell Biol.* 34: 677–683.
- Trinkaus, J.P. 1973. Surface activity and locomotion of *Fundulus* deep cells during blastula and gastrula stages. *Dev. Biol.* 30: 69–103.
- Tsai, F.C., Stuhmann, B., & Koenderink, G.H. 2011. Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes. *Langmuir* 27: 10061–10071.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bocker, E.B., & Friedl, P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 160: 267–277.
- Yanai, M., Kenyon, C.M., Butler, J.P., Macklem, P.T., & Kelly, S.M. 1996. Intracellular pressure is a motive force for cell motion in *Amoeba proteus*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 33: 22–29.
- Yoshida, K., & Soldati, T. 2006. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J. Cell Sci.* 119: 3833–3844.
- Zhao, M. 2009. Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration.

Semin. Cell Dev. Biol. 20: 674-682.

曲面上におけるパターンの運動

栄 伸一郎

北海道大学理学研究院, 科学技術振興機構 CREST

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

Motion of patterns on a curved surface

Keywords:

interface, curvature flow equation, plasma membrane, reaction-diffusion model, self-organization

Shin-Ichiro Ei

Faculty of Science, Hokkaido Univ.

N10 W8, Kita-ku, Sapporo, 060-0810, Japan

1. 序

植物の葉や細胞膜表面など, 必ずしもまっすぐではない領域の上で生命活動の多くが営まれている。一方, これまで提案されてきた, 生命現象を記述する数理モデルの多くは直線上や平面上あるいは空間上といった, 曲がっていない領域上で考えられてきた。本報告では数理モデルを曲面上で考察した場合, 曲面のどのような幾何的情報が解の挙動にどのように影響を与え得るのかを考えてみたい。またそれにより従来の曲がっていない領域上での解析結果との差異を検証してみたい。

一方で生命現象は大変複雑であり, 実際の生命活動を忠実にモデル方程式として記述しようとすると, 非常に巨大で複雑な系になるであろう。したがって, 本報告において扱うモデル方程式が単純で具体的であれば, そこから得られる主張は実際現象とは無縁のものと思われる可能性がある。そこで本報告では, 扱うモデル方程式を特定せず, 非常に一般的な状況で理論的に帰結できる結果を対象としてみたい。これにより理論が成立するための条件等をチェックできれば, 現象においても実際に成立しているであろうと予想できるだけの根拠を与えるものと期待される。

2. モデル方程式

本報告では対象とするモデル方程式として, 反応拡散型のモデル方程式を考えるが,

$$(2.1) \quad U_t = D\Delta U + F(U), \quad t > 0, \quad x \in \Omega$$

を考える。ここで U は N 個の未知変数 u_j をまとめたベクトル $U = (u_1, \dots, u_N) \in \mathbf{R}^N$ であり, Ω はモデル方程式をその上で考えている領域で, 多くの場合, 平面 \mathbf{R}^2 や空間 \mathbf{R}^3 の部分集合であるが, 本報告では先述のように, ある曲面の一部として考えることになる。 Δ はラプラス微分作用素¹で,

¹ 熱伝導現象や物質拡散現象の記述に出てくる作用素で, 最も単純な空間移動効果である, いわゆる拡散を表現したものである。

たとえば, $\Omega \in \mathbf{R}^2$ ならば $x = (x, y)$, $f = f(x, y)$ に対して $\Delta f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2}$ となる。また, D は非負の定数を成分に持つ対角行列 $D = \text{diag}\{d_1, \dots, d_N\}$ とする。すなわち(2.1)において $U_t = D\Delta U$ の項は各未知変数 u_j がそれぞれ独立に単純拡散していることを表している。最後に F は \mathbf{R}^N から \mathbf{R}^N への十分滑らかな関数であり, $U_t = F(U)$ の項は各未知変数 u_j が相互に作用し合う, 反応の効果に対応する。このように(2.1)は未知関数の拡散と反応の効果を取り入れた方程式であり, 一般に反応拡散型方程式と呼ばれる由縁である。

以下で係数はすべて0以上の適当な条件をみたす実数として, 反応拡散型モデル方程式の代表的な例をいくつかあげておくと, まず燃焼状態の温度 T と燃料濃度 n の状態を記述した, いわゆる燃焼方程式:

$$(2.2) \quad \begin{cases} T_t = d_1 \Delta u + \beta n f(T), \\ n_t = d_2 \Delta v - \beta n f(T), \end{cases}$$

(ここで $f(T) = e^{\frac{p(T-q)}{r(T-q)^{1+s}}}$ という形の, アレニウス則に従う関数形)がある。また FitzHugh-Nagumo タイプと呼ばれる, 神経伝播や化学反応系を記述したモデル方程式:

$$(2.3) \quad \begin{cases} u_t = d_1 \Delta u + u(1-u)(u-a) - v, \\ v_t = d_2 \Delta v + \delta(u - \gamma v), \end{cases}$$

生体における形態形成の過程を記述した Gierer-Meinhardt モデル:

$$(2.4) \quad \begin{cases} u_t = d_1 \Delta u - u + \frac{u^p}{v^q}, \\ n_t = d_2 \Delta v - v + \frac{u^r}{v^s}, \end{cases}$$

などもあげることができる。いずれも $U = {}^t(u, v) \in \mathbf{R}^2$ などと置けば(2.1)のタイプの方程式に表すことができる。これらの例以外にも(2.1)のタイプのモデル方程式は多く提案されているが, 興味のある方はマレー-数理生物学入門(三村 2014)などを参考にされたい。また反応拡散型モデル方程式の小史に関しては岩波数学辞典第4版(日本数学会 2007)に詳しい記述がある。

反応拡散型モデル方程式の最も大きな特徴は, その単純な外観によらず, 豊かな数理構造を内包していることである。たとえば2変数系モデル

$$(2.5) \quad \begin{cases} u_t = d_1 \Delta u + f(u, v), \\ v_t = d_2 \Delta v + g(u, v), \end{cases}$$

において $f_u < 0$, $g_u > 0$ がみたされるとき, 活性化-抑制化因子系と呼ばれる(先にあげた(2.2), (2.3), (2.4)はいずれもその例になっている)が, 活性化-抑制化因子系に対して, Turing が1952年に拡散誘導不安定性を用いて自己組織化により空間パターンが生じうる可能性を示して以来, 反応拡散

系は空間パターンを記述する上でなくてはならないものとなっている(拡散誘導不安定性による自己組織化に関しては、たとえば栄 & 山田 2008 に簡単な解説が、自己組織化一般に関しては下村 & 山口 2009 などを参照されたい)。更に近年、反応拡散型モデル方程式の解の時・空間パターンを解析するための様々な手法が開発され、理論解析が進展している(たとえば、三村ら 2006 や西浦 2008 などに複雑な時・空間パターンの解析方法が紹介されている)。本報告では特に反応拡散型の方程式に限定するが、未知変数の数 N や非線形項(反応項) F の形には特段の制限は課さないことは序章で述べたとおりである。一方、反応拡散型のモデル方程式に限定する理由として最も大きなものは、マレー数理生物学入門(三村 2014)にも多くの例が示されているように、生命現象を記述する数理モデルとして反応拡散型のモデル方程式が既に多く提案されていることである。ただし、関与する物質の数や相互作用の仕方が多様であり、未だ解明されていない部分も多いため、ある程度ブラックボックス化したままの状態で扱う必要があると思われる。そのためには未知変数の数 N や非線形項(反応項) F の形には特段の制限を課さない状態で扱うことが重要と考えられる。反応拡散型のモデル方程式に限定して理論展開する、もう一つの大きな理由は反応拡散近似理論の近年の発展である。これはモデル方程式が自由境界値問題²など、必ずしも(2.1)の形をしていない、反応拡散型ではない方程式でも、変数の数を増やすことにより、(2.1)の形の方程式を用いて近似できるというものであり、近年の村川らの仕事(Murakawa 2007)が顕著である。これに関しては、ある種の界面運動がPhase-field タイプの反応拡散型方程式で近似できることが古く

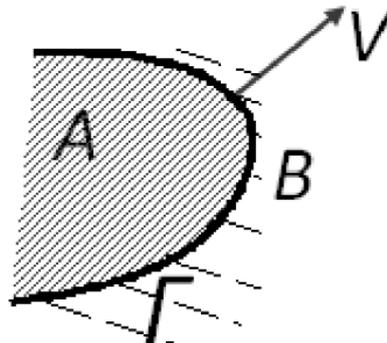


図1: 曲線 Γ と法線速度 V

から知られていた(たとえば Fife 1988)。その典型例を一つあげておくと、図1のように、平面 \mathbf{R}^2 内にある、ある曲線 $\Gamma = \Gamma(t)$ が平面を2つの領域A(内側とする)、B(外側とする)に分割し、かつ

$$(2.6) \quad V = -\kappa$$

という運動方程式により時間発展するというある種の自由境界値問題がある。この例の Γ のように2つの異なる性質の領域の境界を一般に界面と呼ぶ。ここで V は曲線 Γ の外側法線方向(領域B

² 凝固現象における固相と液相の境界などを幅が0の理想的な境界面あるいは境界線とみなし、その運動を考える問題であり、境界面自身が未知関数となる。

に向かう方向)への単位時間あたりの成長速度, κ は(内側方向を正として測った) Γ の曲率³である。(2.6)は曲率流方程式と呼ばれる方程式の一つである。

(2.6)の解を解析することは数値計算的にも様々な手法があり, 難しいことも多いが, 一方で(2.6)を直接扱わず, 代わりに $u = u(t, x) \in \mathbf{R}$ として

$$(2.7) \quad u_t = \varepsilon^2 \Delta u + f(u),$$

を考えるとという方法がある。ただし $\varepsilon > 0$ は十分小の定数, $f(u) = u(1-u^2)$ である。このとき $\Gamma_\varepsilon(t) = \{x \in \mathbf{R}^2; u(t, x) = 0\}$ ($u = 0$ の等高線) と定義するとある意味で $|\Gamma_\varepsilon(t) - \Gamma(t)| \rightarrow 0$ ($\varepsilon \rightarrow +0$) であることが知られている。これは(2.6)という曲線の運動の問題が(2.7)という反応拡散型の方程式の解により近似として表現されることを意味しており, 反応拡散近似の典型例といえる。またこの例のように, 界面を滑らかな関数の等高線として扱う方法が古典的なPhase-field法であり, 同様の近似が凝固問題や蒸発問題などの多種多様な自由境界値問題に対して可能であることが知られている(Fife 1988)。また, 理論的な解析においても数値計算的にも(2.7)の方がずっと取り扱いが易しいというメリットがある((2.6)の更なる応用に関してはEi 2014を参照)。

近年, 村川らはこの考えを更に進めて(Murakawa 2007), 自由境界値問題に限らず, 非常に非線形性の強い, 多変数系の問題でさえも, 更に変数を増やすことにより, (2.1)のタイプの方程式による近似が可能であることを示した。

以上のような状況から, 反応拡散型のモデル方程式(2.1)に対して一般的に成り立つ理論を構築しておくことは解析を容易にするだけでなく, 今後多くの現象が反応拡散型のモデル方程式に帰着されるであろうという将来性も込めて大変重要であることが分かる。

3. 曲面上の界面運動

この節では, 現象として2つの異なる安定状態(A, B とする)が存在する場合に, それらの間の境界 Γ (界面という)はどのように運動するかを考えてみることにする(図1参照)。イメージとしては凝固点近傍における固相と液相の境界を思い浮かべてもよいし, 拮抗した勢力を持つ2種の生物が互いに陣地拡大を狙って生存競争している, その前線を思い浮かべてもよいであろう。それが具体的にどのような現象に対応していようが, 前章で述べたように, 結果として(2.1)のタイプのモデル方程式で記述されたとしよう。このとき十分大きな空間スケールでその界面を観察すると, (2.1)は

$$(3.1) \quad U_t = \varepsilon^2 D \Delta U + F(U), \quad t > 0, x \in \Omega$$

という形に表される。このとき, もし領域 Ω が平面であれば曲線としての界面 Γ の運動は必ず

$$(3.2) \quad V = -M\kappa + c$$

³ 曲がりの度合いを表す量で, その値の絶対値が大きいほど急な曲がりをしていること, またその符号により, 内側(A側)と外側(B側)のどちらに出っ張るように曲がっているかを表している。

という界面方程式で表されることが知られている。ここで、 M は(3.1)から決まるある定数、 c は2つの状態 A, B の強さの差に関係する定数である。(2.6)のところでも述べたように、 V が A から B に向かう法線方向への界面 Γ の成長速度であることから、たとえば状態 A の方が B より、より安定性が強ければ $c > 0$ となる。 κ は(2.6)と同様に、(領域 B に向かう方向を正として測った) Γ の曲率である。

以下、 $M > 0, c \geq 0$ として(3.2)に従う界面 Γ の運動について以下にまとめておく(たとえばEi 2014を参照)。まず $c = 0$ の場合、 $\Gamma = \Gamma(t)$ の曲線としての長さが時間 t に関して単調減少であることが知られている。その事実からの帰着として、もし初期界面 $\Gamma(0)$ が有界な閉曲線(領域 A が B で囲まれている状況)ならば有限時間で消滅すること(領域 A がなくなる, 図2A), また領域 Ω が境界を持つ領域で、 Γ がその境界と常に交点を有しながら運動するとき、 Ω の最短の幅に相当する直線に近づいていくことなどを示すことができる(図2B)。

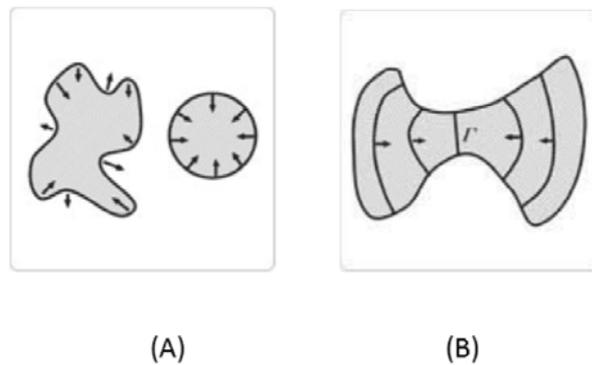


図2: (3.2)で $M > 0, c = 0$ の場合の界面の運動

(A) 初期界面 $\Gamma(0)$ が有界な閉曲線の場合

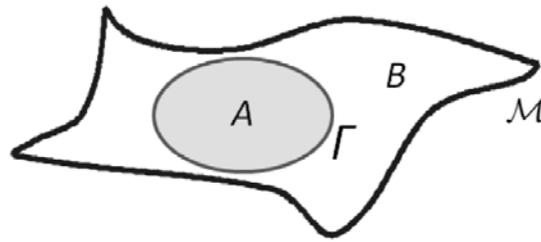
(B) 界面 $\Gamma(t)$ が領域 Ω の境界と共有点を有しながら運動する場合

次に $c > 0$ の場合、ある半径 $r_c = \frac{1}{c}$ が存在して、初期界面 $\Gamma(0)$ が半径 r_c を持つ円周界面 $C = \{|x| = r_c\}$ の内部に含まれるならば $\Gamma(t)$ は有限時間で消滅(領域 A がなくなる), 円周界面 C を内部に含むなら時刻 t とともに無限に大きくなる, といった挙動が示されている。これは、初期形状がある臨界値より大きい小さいかでその後成長するかどうかが決まることを意味している。その境目となる半径 r_c は臨界半径と呼ばれ、凝固現象の最も単純な原理の一つをうまく説明していると考えられている。

次に同様な現象を空間 \mathbf{R}^2 に埋め込まれた十分滑らかな曲面 $\mathcal{M} \subset \mathbf{R}^3$ 上で考えるとどうなるであろうか(図3)。この場合考える \mathcal{M} 上の反応拡散型モデル方程式は

$$(3.3) \quad U_t = \varepsilon^2 \Delta_{\mathcal{M}} U + F(U), \quad t > 0, x \in \mathcal{M}$$

となり、 $\Delta_{\mathcal{M}}$ はLaplace-Beltrami作用素と呼ばれる、曲面 \mathcal{M} に沿った拡散を表す。 \mathcal{M} がまっすぐであれば $\Delta_{\mathcal{M}}$ はもちろん普通の拡散 Δ に一致する。この場合、領域 A と B の境界に対応する界面 Γ は

図3: 曲面 \mathcal{M} 上の界面 Γ

$$(3.4) \quad V = -M\kappa_g + c$$

という界面方程式で表されることが知られている。ここで、定数 M と c は (3.1) と (3.4) で D や F が同じなら同じ定数である。曲面 \mathcal{M} の効果はただ一カ所、 κ_g の部分に現れる。 κ_g は曲面 \mathcal{M} の測地的曲率と呼ばれるものであり、曲面 \mathcal{M} に沿った曲がりの度合いを表す量である。 \mathcal{M} が平面であればもちろん普通の曲率 κ に等しい。平面内で曲率 $\kappa=0$ ならばその曲線は直線であり、曲面上で $\kappa_g=0$ ならばその曲線は測地線になる。測地線とは曲面上にある2点を結ぶ最短経路を与える曲線のことであることから、曲率が小さくなると、どちらの場合も2点を結ぶ最短経路に近づくことになる。このように (3.4) の方がより一般的な式であるといえる。(3.4) に従う界面も臨界半径の存在など、(3.2) に従う平面上の界面と同様の性質を持っていることが知られており、それらはある程度普遍的な性質といえるであろう。

4. 曲面上のスポットパターンの運動

この節では細胞膜近傍に、ある物質が高濃度に局在する現象(スポット化)を想定して、その局在する場所が細胞膜の曲面としての形状にどのような影響を受けるのかを考えてみよう。

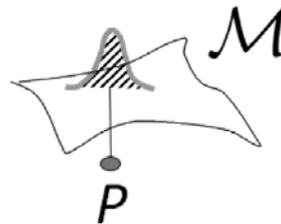


図4: 曲面 \mathcal{M} 上のスポットパターンイメージ
 P はスポットパターンの中心を表す

まず局在パターン(以降、スポットパターンと呼ぶことにする)が曲面 \mathcal{M} 上にあり、 \mathcal{M} 上のみのメカニズムによりスポットパターンが形成される場合を考える(図4)。これはスポットパターンが細胞膜表面の要因のみに依存しており、内部の状態とは無関係に形成される場合である(図5)。たとえば Arai et al. 2010 では、細胞膜上の状態のみに依存して、ある種のリン酸加水分解酵素が高濃度で細胞膜上に局在する例が示されている。この場合それを記述する反応拡散型のモデル方程式は曲面 \mathcal{M} 上の (3.3) であると考えてよいであろう。図4のように、一山のパターンがあり、そ

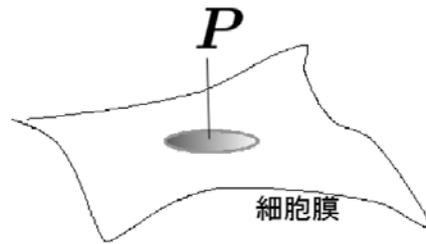


図5: 細胞膜上のスポットパターンイメージ
 Pはスポットパターンの中心。

のピークの場合(スポットパターンの中心)を $P \in \Omega$ とすると、いくつかの仮定の下ではあるが、 P の運動が曲面から影響を受ける部分の項は本質的に

$$(4.1) \quad \frac{dP}{dt} = \varepsilon^2 M_0 \nabla_{\Omega} K$$

であることが示されている (Ei & Yagisita 2014)。ここで M_0 は方程式 (3.3) から決まるある定数、 ∇_{Ω} は曲面 Ω に沿った勾配、 $K = K(P)$ は曲面 Ω の P におけるガウス曲率を表す。ガウス曲率の正負

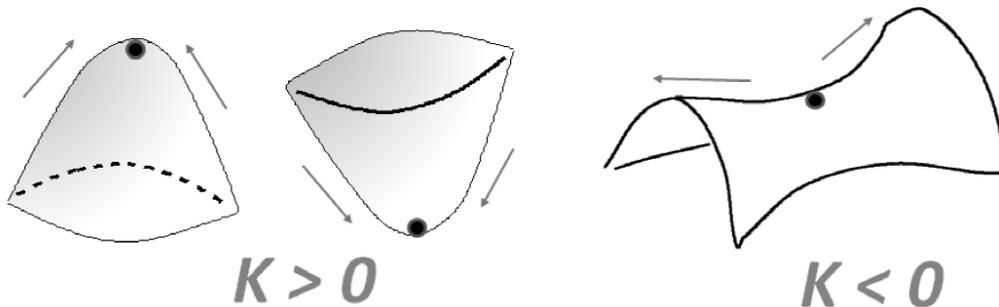


図6: ガウス曲率 K の正負と曲面の曲がり方の関係
 矢印はガウス曲率勾配流 (4.1) に従う運動の方向を表す ($M_0 > 0$ の場合)

は曲面がその点においてどの方向に曲がっているかを表しており、たとえば図6のように、 $K > 0$ であればどの方向からも同じような曲がり方をしているが、 $K < 0$ であれば方向により曲がり方が異なることを意味する。一方 $|K|$ は曲がり方の強さを表す。(4.1) は、スポットパターンの中心 P がガウス曲率の勾配流⁴になっていることを示しているから、 $M_0 > 0$ であれば、 P はより K の値の大きい場所に向かうことを示唆している (図6)。すなわち、曲面が外部に出っ張っているか内部に出っ張っているかにかかわらず、図6にあるように、一番曲がりの強い場所に向かう運動となる。

⁴ 一般に(4.1)の形に表される微分方程式が勾配系と呼ばれる。この場合必ず $M_0 K$ に相当する部分の関数の極大値に向かって時間発展していくことが知られている。

一方、スポットパターンの形成に細胞内部の状態が何らかの関与をしていると細胞膜付近に局在した、いわゆる境界スポットパターンとなる(図7)。この場合、 P の運動は

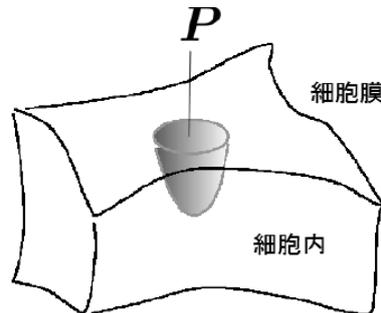


図7: 境界スポットパターンのイメージ

$$(4.2) \quad \frac{dP}{dt} = \varepsilon^2 M_0 \nabla_{\mathcal{M}} H$$

で表されることが知られている。ここで $H=H(P)$ は曲面 \mathcal{M} の P における平均曲率を表す。平均曲率の正負は図8にあるように、外部により出っ張っているほど値が大きくなり、逆に内部に出っ張っているほど負で絶対値が大きくなる。(4.2)は、境界スポットの中心 P が平均曲率の勾配流になっていることを示しているから、 $M_0 > 0$ であれば、 P はより平均曲率の値の大きい場所に向かうことを示唆している(図8)。すなわち、曲面が外部により出っ張っている場所に向かう運動となる(図8)。上記の問題は、更にスポットパターンが複数ある場合にもその相互作用等を考察して興味深い結果を得ることができるが(たとえばEi et. al 2006 など)、本報告では述べないこととする。

5. まとめ

この報告では、モデル方程式の詳細に依らず、それが反応拡散型で記述される限り成り立つ性質について、特に曲面上のパターンの運動に関連して紹介した。そのためかなり一般的な状況でも理論的に帰結できる、普遍的な性質を述べたともいえる。その実際現象への応用は色々考え得ると思われるが、ここでは一つの示唆を与えて終わりとしたい。

細胞膜上に、あるスポットパターンを観察したとき、そのパターンが真に細胞膜上に限定されたメカニズムで起きているのか、あるいは細胞膜近傍の状態に依存したメカニズムによるものなのかは様々な実験により確認することになるであろう。しかし本報告で主張することは、スポットパターンの発生場所を観察することにより、ある程度の予測を立てることができるということである。前節でも述べたように、もしスポットパターンが細胞膜の外部・内部への出っ張り方にかかわらず、とにかく出っ張っている場所に同程度に発生しているならば、ガウス曲率に依存して形成されており、細胞膜上のみのメカニズムによるものである可能性が高いのではないかと、一方、出っ張りの外部・内部に依存して発生頻度が大きく異なるならば、平均曲率の影響を受けて形成されており、細胞膜近傍の状態に依存したメカニズムによるものである可能性が高いであろう、といったことが期待される。実際、Arai et al. 2010 では変形運動するアメーバの細胞膜上にリ

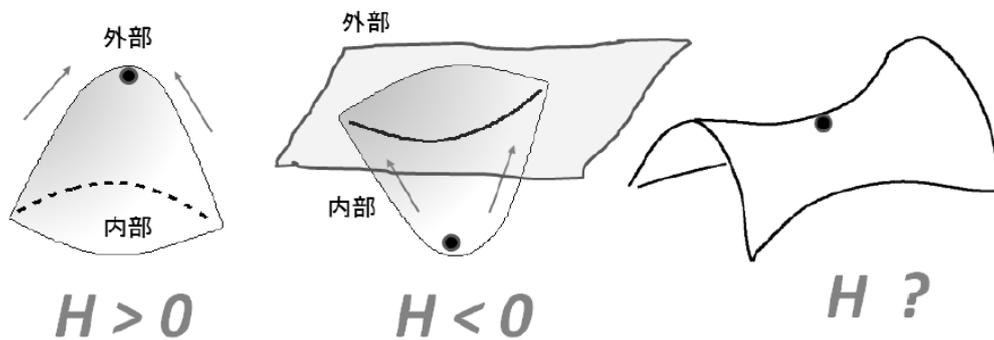


図8: 平均曲率 H の正負と曲面の曲がり方の関係

矢印は平均曲率勾配流 (4.2) に従う運動の方向を表す ($M_0 > 0$ の場合)

ン酸加水分解酵素が高濃度で局在する現象を実験により再現しており、図9はそのストロボ写真である(赤い斑点状の様相がリン酸加水分解酵素のスポットパターンである。なお Arai et al. 2010 では細胞膜形状を実験的に制御し、リン酸加水分解酵素のスポット運動を調べるという、この報告の内容を遙かに超えたところを見据えていることに注意しておく)。図9の状況では細胞膜の形状自身が時間発展しているため、上述の固定された曲面上での理論は必ずしも直接適用できない難しい問題を含むが、仮に上記の解釈に当てはめると、図9からは確かに細胞膜の外部・内部への出っ張り方にかかわらず同程度でスポットが存在しているように見える。Arai et al. 2010 ではそのメカニズムが細胞膜上にあることを示唆しており、本報告で紹介した結果と矛盾しないものとなっていることは大変興味深い。

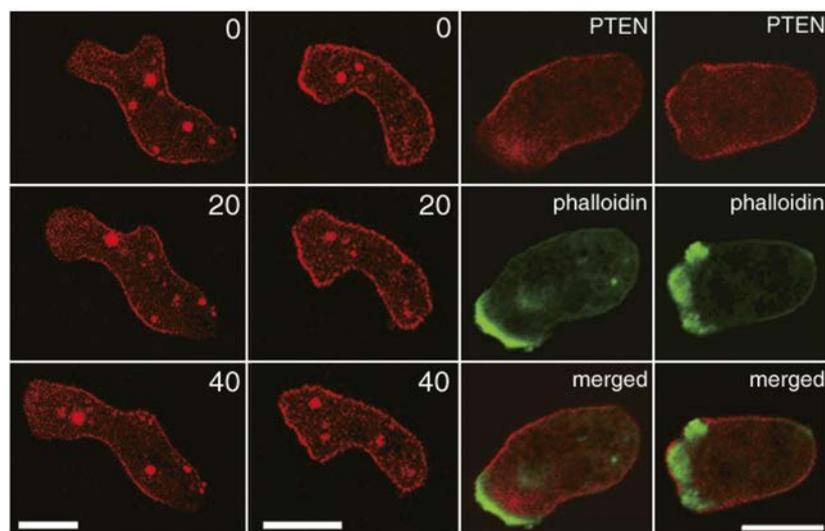


図9: 細胞膜上に局在するリン酸加水分解酵素のスポットパターン (Arai et al. 2010 より転載)

細胞膜が外部に出っ張っているか内部に出っ張っているかにかかわらず、一番曲がりの強そうな場所にリン酸加水分解酵素(赤色)が局在しているように見える。

引用文献

- Arai Y., Shibata T., Matsuoka S., Sato M. J., Yanagida T. & Ueda M. 2010. Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107: 12399-12404.
- Ei S.-I. 2014. Mathematical Analysis for Pattern Formation Problems. In: Nishii R., Ei S.-I., Koiso M., Ochiai H., Okada K., Saito S. & Shirai T. (eds.) *A Mathematical Approach to Research Problems of Science and Technology, Mathematics for Industry 5*. pp. 133-139. Springer, Berlin.
- Ei S.-I., Mimura M. & Nagayama M. 2006. Interacting spots in reaction diffusion systems. *Discret Contin Dyn S.* 14: 31-62.
- Ei S.-I. & Yagisita H. 2014. Dynamics of localized solutions for reaction-diffusion systems on two dimensional domain - Spot dynamics on curved surface-. 数理解析研究所講究録1881巻66-70
- 栄伸一郎 & 山田光太郎 2008. パターン形成の数理. 講談社. 東京.
- Fife P.C. 1988. Dynamics of internal layers and diffusive interfaces, CBM-SNSF Regional Conference Series in Applied Mathematics 53. SIAM. Philadelphia.
- 三村昌泰, 上山大信, 西浦廉政, 長山雅晴 & 栄伸一郎 2006. パターン形成とダイナミクス. 東大出版会. 東京.
- 三村昌泰 (総監修) Murray J. D. (著) 2014. マレー数理生物学入門. 丸善出版. 東京.
- Murakawa H. 2007. Reaction-diffusion system approximation to degenerate parabolic systems. *Nonlinearity*, 20: 2319-2322.
- 日本数学会 2007. 岩波数学辞典 第4版. 岩波書店. 東京.
- 西浦廉政, 2009. 非平衡ダイナミクスの数理. 岩波書店. 東京.
- 下村政嗣, 山口智彦 2009. 自己組織化ハンドブック. エヌ・ティー・エス. 東京.

葉の表面構造と撥水性の発現機構 —イネの葉における微細構造とロータス効果—

相賀彩織・伊藤純一

東京大学大学院 農学生命科学研究科 育種学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Leaf epidermal structure and mechanisms of water-repellency

Relationship between microstructures and lotus effect in rice leaves

Keywords: epidermis, water-repellency, papilla, superhydrophobicity, *Oryza sativa*

Saori Aiga & Jun-ichi Itoh

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Tokyo University
Tokyo, 113-8657, Japan

1. はじめに

植物の表皮は植物体と外環境との境界に位置し、様々なストレスに対する物理的防御や環境-植物体間の相互作用の一端を担っている。これまで植物の表皮に関する研究はモデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を中心に、気孔やトライコーム等の特殊化した細胞の分化・形態形成機構、クチクラやワックスの蓄積に関わる遺伝子の解析などが行なわれてきた。一方、表皮細胞の形態は植物種によって大きく異なる。その一例として、イネ (*Oryza sativa*) の葉の表皮細胞にはシロイヌナズナには見られない微細構造 (乳頭状突起など) が観察される。葉の表面の微細構造は撥水性と関連することが古くから知られ、超撥水性を示す植物の代表格であるハスの葉においても乳頭状突起が観察される。

撥水性は植物-外環境との物理的相互作用を評価する最も基本的な性質の一つであるが、撥水性を発現する遺伝学的メカニズムに関わる知見は乏しい。筆者らは超撥水性を示すイネを用いて、撥水性と表面構造との関係、それらの分子遺伝学的な制御メカニズムを理解することを目的に、撥水性に異常をもったイネの変異体系統の同定と形態学的解析を進めている。本稿では植物の表皮構造と撥水性の発現機構を概説すると共にイネを用いた撥水性研究の展望について述べる。

2. 植物の葉の表面構造

2-1. 植物の表皮の基本構造

植物の葉は最外層を表皮系に覆われており、表皮系は表皮細胞とその上を覆うクチクラからなる。表皮細胞は通常一層で、一般的な表皮細胞 (pavement cell) 以外に孔辺細胞、毛状突起 (トライコーム) 等から構成される (図 1a)。

表皮細胞のうち最も多くを占めるのが一般的な表皮細胞 (pavement cell) であり、種によって長方形や多角形、不定形といった様々な形態をとる。これらは前表皮細胞から分化し、内部の組織

を保護するほか、他の特殊化した細胞同士が適切な間隔を保てるようにする役割を果たしている (Glover 2000, Ramsay & Glover 2005)。

孔辺細胞は葉緑体を含む特殊化した表皮細胞で、一対となって気孔を形成する。孔辺細胞は、細胞壁が内側(気孔側)と外側で不均一に肥厚しているため、光や二酸化炭素濃度、湿度といった条件への応答により細胞内の浸透圧や膨圧が変動すると、それに応じて細胞が変形し気孔が開閉する。こうした開閉を通じて気孔は水やガスの交換をつかさどっている。孔辺細胞も一般的な細胞と同様に前表皮細胞から分化するが、シロイヌナズナではその過程でメリステモイド母細胞(MMC)と呼ばれる始原細胞の不等分裂によって小さい娘細胞(メリステモイド)が生じ、そのうちいくつかは孔辺母細胞(GMC)となり、最終的にはGMCが等分裂を起こすことで孔辺細胞が生じる (Barton 2007)。

毛状突起は形態、機能ともに多様であり、蜜や粘液などを分泌する腺毛(図1b)や、他の生物に付着するための鉤毛(図1c)、背の低い突起である乳頭状突起(図1d)といった様々な種類に分類され、種を特定する際の重要な特徴になりうる。モデル植物であるシロイヌナズナの毛状突起は単細胞性の分岐毛であり、細胞運命の決定やパターン形成のモデルとして研究が進められ、すでに関与する数々の遺伝子とその相互作用が明らかとなって

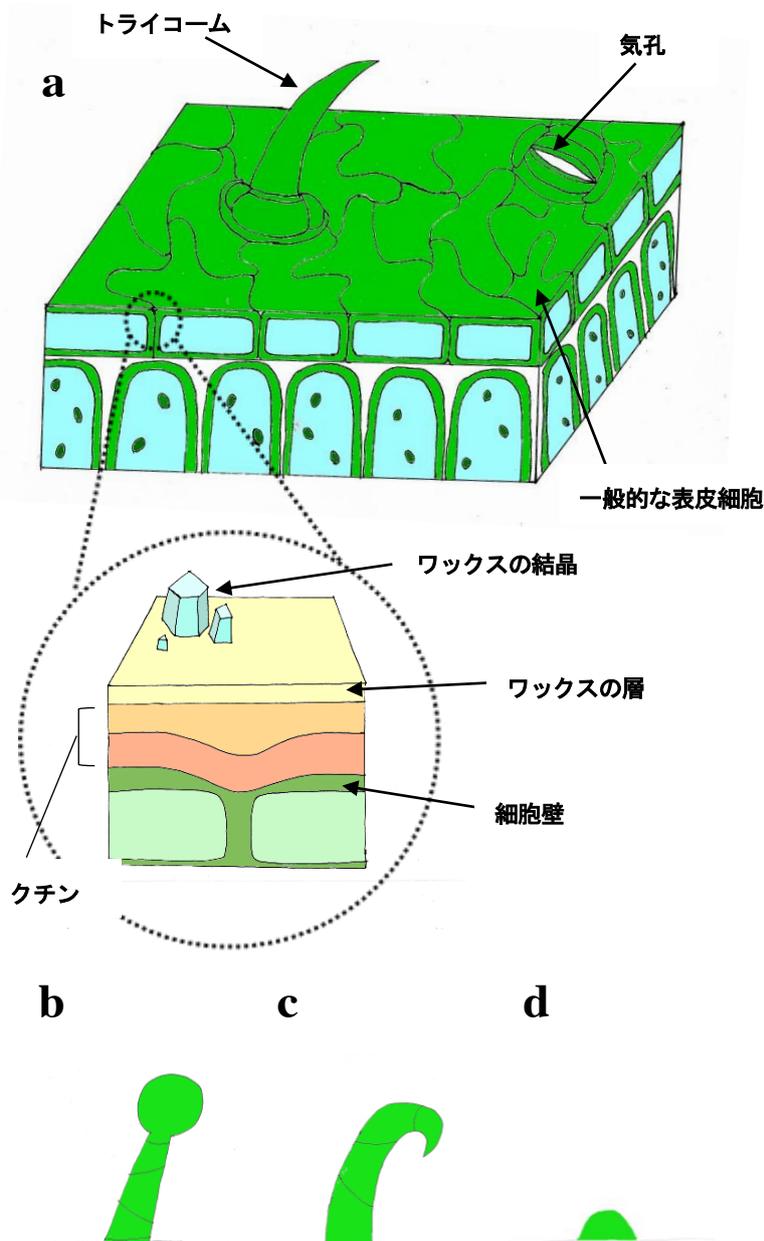


図1. 葉の表皮構造

- a. 植物における一般的な葉の表皮構造を示した。点線円内は表皮の拡大図を示す。
b. 腺毛, c. 鉤毛, d. 乳頭状突起

いる (Szymanski et al. 2000)。また、毛状突起の形成や伸長にはF-アクチンや表層微小管といった細胞骨格系や膜輸送が関与していることも判明しており (Kang et al. 2003, Sambade et al. 2014)、現在さらなる研究が進められている。

上述の種々の表皮細胞の上を覆うのがクチクラである。クチクラは不飽和脂肪酸の重合体であるクチンの層とそれを覆うワックスの層に分けられる (Yeats & Rose 2013)。ワックスはクチクラの主たる構成要素であり、表皮細胞中で合成される。シロイヌナズナではまず炭素数 16 あるいは 18 の脂肪酸がプラスチドで合成されたのち、これらが小胞体内で長鎖脂肪酸 (VLCFA) として炭素鎖が延長され、更にアルコールやエステル、アルデヒド、アルカン、ケトンに変換され、表皮に分泌されることでワックスとなる (Samuels et al. 2008)。ワックスは気孔以外からの水の喪失を防ぎ乾燥ストレス耐性を高めているだけでなく、病原体や植食性の昆虫、紫外線から植物体を保護するといった多面的な役割も果たしている (Jenks et al. 1994, Krauss et al. 1997, Riederer & Schreiber 2001)。

2-2. 撥水性とロータス効果

前述のように植物の表皮は特殊な細胞を分化することによって、植物体と外環境間の相互作用の一端を担っているが、その最も基本的な物理的性質として撥水性がある。一般に多くの植物は高い撥水性を持ち、生涯にわたり高撥水性を維持する種と、短期間のみ高撥水性を示す種が存在する。なかでも高撥水性を常に示す種の葉には、クチクラを覆う明確なワックスの層があり、特にワックスの結晶が密に存在することが知られている (Neinhuis & Barthlott 1997)。また、表面にこうしたワックスが存在する場合に、乳頭状突起や毛状突起といった微細構造が存在すると更に撥水性の効果が増すことが知られてきた (Holloway 1970)。その中でも極めて高い撥水性を持つ代表的な植物としてハス (*Nelumbo nucifera*) やサトイモ (*Colocasia esculenta*) 等が知られ、これらの葉の表面にもワックスの結晶や乳頭状突起のような微細構造が観察される (Barthlott & Neinhuis 1997)。

このような表面の撥水性を評価する指標として、静止液体において固体壁と接する場所における液面と固体面とのなす角である接触角や、傾斜させたときに液滴が滑り落ち始める

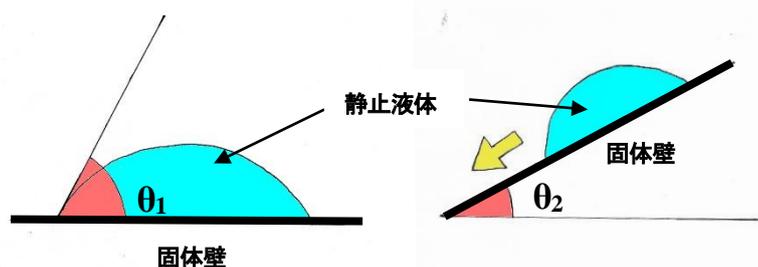


図2. 接触角と滑落角

θ_1 は接触角、 θ_2 は滑落角を示す。

角度である滑落角が広く用いられている (図2)。接触角は高ければ高いほど、滑落角は低ければ低いほど撥水性は高い。特に固体面が 150 度以上の接触角で液滴と接触する性質を、超撥水性 (superhydrophobicity) と呼ぶ。たとえばハスでは接触角が 150 度以上かつ滑落角が 10 度以下である (Koch & Barthlott 2009, Mockenhaupt et al. 2008)。ハスは葉の表面にワックスで覆われた乳頭状突

起が密に存在しており, 突起によって生じた空洞に空気が入って表面と液滴の境界面が減る一方, 液滴と空気の境界面が増えることで液滴が球状となるため, 高い撥水性を示す (Bhushan & Jung 2008, Extrand 2005, Li & Amirfazli 2008)。特にハスの乳頭状突起は他の超撥水性を示す種よりも頂部の直径が小さく, 液滴との接着面が最小化されていると考えられている (Ensikat et al. 2011)。またこのような凸状の微細構造がある超撥水表面においては, 表面に付着した粒子との接着力も極めて小さくなるため, 水滴が粒子と接触すると粒子と水滴との接着力のほうが大きくなり, 粒子が水滴にとらわれて除去されるという自浄作用が働く (Barthlott & Neinhuis 1997)。

こうしたハスの高い撥水性や自浄作用については古くから知られており, 水滴がつくとそれが転がり落ちることによって葉の表面の汚れが洗い流されることから, ハスは長い間清浄さの象徴とされてきた。このような背景から, 高い撥水性のために表面の汚れが洗い流される現象はハスにちなんでロータス効果と名付けられている (Barthlott & Neinhuis 1997)。ロータス効果を持つ表面は生物界に広く存在し, 昆虫においては翅を清潔に保つ効果があるとされる (Karthick & Maheshwari 2008)。植物においては葉の表面に付着した細菌や菌を洗い流すことで, 病気への感染リスクを減らすことができるという効果が推定されている (Karthick & Maheshwari 2008, Stosch et al. 2007)。

3. イネの撥水性と表面構造

3-1. イネの表皮構造

イネの葉は葉身, 葉鞘という二つの部分から構成され, 稈にむかう側(表側)を向軸側, 反対側(裏側)を背軸側と呼ぶ。ここでは葉身について詳述する。

イネの葉身の表面には, 通常の表皮細胞 (pavement cell) や孔辺細胞, 毛状突起といった一般的な構造以外に, 機動細胞やケイ酸細胞が存在しており (図3), こうした表皮特異的な細胞は葉の発生の比較的初期 (P4期) に発生することが知られている (Itoh et al. 2005)。

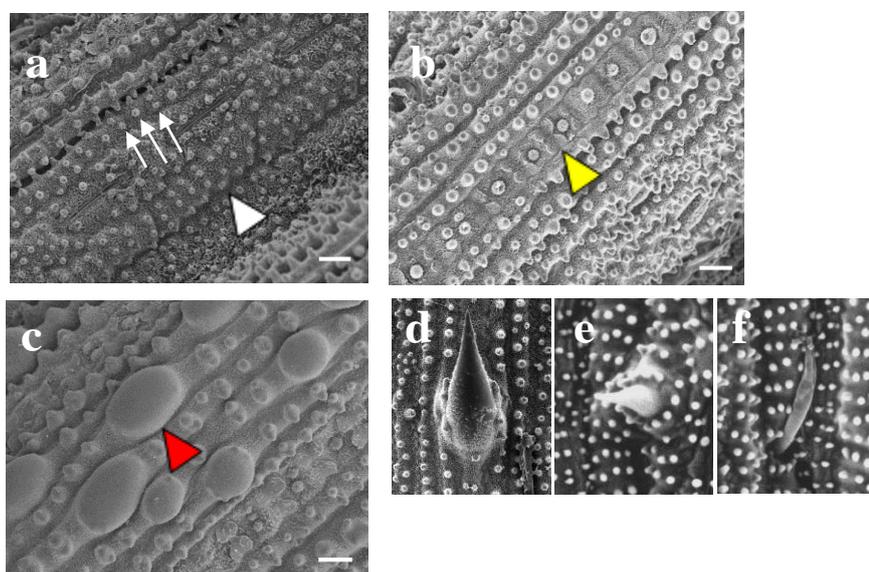


図3. イネの葉の表皮構造

a, b. 野生型の第4葉向軸側, c. 野生型の第4葉背軸側

d. macro hair, e. micro hair, f. glandular hair

Bars= 10 μ m

白矢頭は機動細胞, 白矢印は乳頭状突起, 黄矢頭はケイ酸細胞, 赤矢頭は背軸側のみ見られる大きい乳頭状突起を示す。

機動細胞はイネ科植物の葉に分化する特殊な細胞で葉身の向軸側にのみ分化する (図 3a)。機動細胞は水分が減少すると膨圧を失って収縮するため、乾燥状態では葉が向軸側に巻く。水分が適度に得られる状態になると再び葉は開く。このように機動細胞は水分の増減で葉が開閉するのを制御しており、乾燥時には蒸散量を減らし、水分量を保持することができる。また、ケイ酸細胞は1列ずつ存在する皿鈴型の細胞で、機動細胞とともにケイ酸を蓄える役割を果たしており、蓄積されたケイ酸は様々なストレス耐性を高めるだけでなく、収量に影響を与えることも知られている (図 3b) (Epstein 1999, Korndörfer & Lepsch 2001, Ma & Takahashi 2002)。

またイネの葉身には、三種類の毛状突起 (macro hair, micro hair, glandular hair) が存在しており (図 3d, e, f), macro hair はケイ酸細胞上に存在し, micro hair と glandular hair は孔辺細胞や機動細胞の近くで観察される (Li et al. 2010)。

このようにイネの葉身においても複数の特殊化した細胞がみられるが、これらの細胞分化とは (恐らく) 独立に乳頭状突起と呼ばれる小さな突起が細胞表面に数列にわたり分化する (図 3a)。乳頭状突起は葉身の向軸側では $5\mu\text{m}$ 以下の小さいもののみが存在するが、背軸側ではそれに加え $9\mu\text{m}$ 以上の大きい乳頭状突起も存在する (図 3c) (Yoo et al. 2011)。イネ科内では乳頭状突起の有無は系統関係を反映しておらず、その獲得は進化の過程で独立に起こったと考えられている (Prasad et al. 2011)。

3-2. 撥水性と乳頭状突起形成に関わる変異体

イネの葉の表面は水と 150 度以上の接触角を持つことから、超撥水性を示す (Guo & Liu 2007)。また短軸方向に傾けた時の滑落角は 9 度から 15 度である一方、長軸方向に傾けた時の滑落角は 3 度から 5 度であり (Feng et al. 2002), 異方性を持った滑落角を示す。一般に接触角が 150 度以上かつ滑落角が 10 度以下である場合、自浄性を持つとされており (Koch & Barthlott 2009), イネはハスと同様にロータス効果を持つと考えられる。また上に述べたイネの葉の表面構造はワックスに覆われた乳頭状突起を多数もつという点でハスと類似しており、ロータス効果の発現機構の関連性が示唆される。

このように超撥水性で自浄作用を持つ表面構造を持ち、モデル植物として分子基盤の整ったイネは、植物の表皮においてロータス効果を発現する遺伝的制御機構を明らかにする上で優れたモデルとなりうる。その足がかりとして有用なのが撥水性に異常を持つ変異体である。イネの突然変異体の中には葉が水をはじかず、濡れたように見える濡れ葉変異体 (*dripping wet leaf*) が知られている (Welker & Nagamine 1996)。しかしそれらの詳細な解析は行われていなかった。

そこで筆者らはイネの変異体コレクションのうち、濡れ葉性を示すと記載のあった 100 以上の系統を収集し、接触角を測定することによって濡れ葉性を定量的に評価した。その結果、半数以上の系統において、野生型と比較して有意に接触角が低いことが明らかとなった。更にそれらのいくつかの系統についてその表面構造を走査型電子顕微鏡で観察したところ、野生型 (図 3a) と比較してワックスの形態に異常があるもの (図 4a) や、乳頭状突起の形状や大きさ、密度に異常があるもの (図 4b) が確認された。

このことから、イネの濡れ葉性は表面のワックスや乳頭状突起の異常など、様々な原因によって生じると考えられる。特に乳頭状突起の異常が撥水性に関わることを示す例として、*bright green leaf (bgl)* 変異体が知られている。*bgl* は、植物特異的 Rho ファミリー GTPase である Rop/Rac GTPase において、GDP の解離と GTP の結合を促進すると考えられる RopGEF を原因遺伝子とし、葉身の向軸側と背軸側において $5\mu\text{m}$ 以下の小さい乳頭状突起が消失

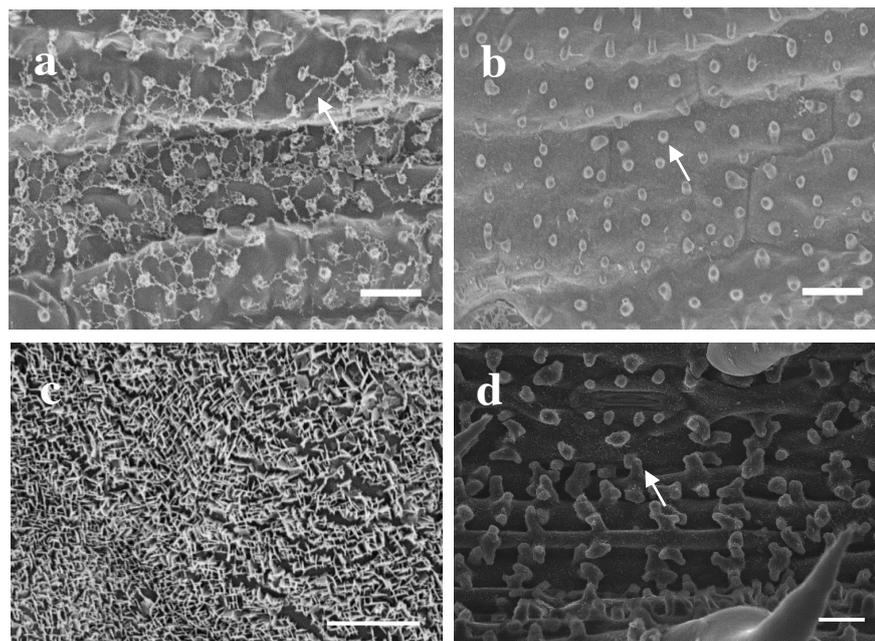


図4. 撥水性に異常がみられるイネ変異体の表面構造

a. CM371, b. TCM3016, c. *bgl* 変異体, d. *ntm* 変異体

Bars= $10\mu\text{m}$ (a, b, d), $5\mu\text{m}$ (c)

白矢印は異常が見られる箇所を示す。a: 網状のワックスが見られる。b: 乳頭状突起が小さい。c: 乳頭状突起がみられない。d: 過伸長した乳頭状突起が見られる。

する(図4c) (Yoo et al. 2011)。また、当研究室では乳頭状突起が伸びる表現型を示す *narutomaki (ntm)* 変異体が同定されている(図4d)。これらの葉について接触角を測定したところ、ともに野生型に比べ接触角が有意に低下していることが明らかとなった。このことから乳頭状突起の撥水性への関与が強く示唆される。

以上のことから葉の撥水性は乳頭状突起、ワックス、クチクラといった表面構造に関わる様々な因子が寄与していると考えられる。すでにワックス・クチクラ形成に関与する遺伝子はシロイヌナズナを中心に多数報告され (Samuels et al. 2008), イネにおいても *OsGLI* や *OsWRI*, *WSLI* などが報告されている (Qin et al. 2011, Wang et al. 2012, Yu et al. 2008)。その一方で、イネでは乳頭状突起形成に関与する遺伝子は *bgl* 変異体の原因遺伝子である *OsRopGEF10* のみであり (Yoo et al. 2011), ほとんど研究が行われていない。イネ以外での細胞表面の微細構造に関与する遺伝子として MYB 転写因子があげられている (Yoo et al. 2011)。キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) の花卉にある円錐細胞にはイネの乳頭状突起と形態が似た乳頭様の突起が存在し、その形成を制御する *MIXTA* は MYB 転写因子をコードしている (Glover & Martin 1998, Martin et al. 2002, Noda et al. 1994)。またペチュニア (*Petunia hybrida*) において *MIXTA* 様遺伝子の *PhMYB1* が細胞の方向性のある成長を制御していること (Baumann et al. 2007), ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の *LjMYB17-like* をタバコで過剰発現させると乳頭状突起の顕著な増加が認められる (Brockington et al. 2013) ことが知られている。

しかしながら、乳頭状突起をはじめとした細胞表面の微細構造の分子遺伝学的な制御機構については不明な点が多く、更なる解析が求められている。

4. 撥水性の応用と今後の展望

ロータス効果を持った物質は自浄作用を示すため、速乾性を持ち表面は常に汚れのない状態に保たれる。このような生物が持つ優れた特徴を模倣し、製品開発に役立てる研究分野はバイオミメティクス (biomimetics) と呼ばれる。ロータス効果はバイオミメティクスの分野でも注目を集めており、これまでもさまざまな技術により、ハスの葉の表面に類似した微細構造を作り出すことで超撥水性を持つ素材が実現されてきた (Roach et al. 2008)。微細構造を持った表面は構造が壊れたり変化したりしやすいものの、塗装やレインコートといった様々な製品に応用されている (Koch & Barthlott 2009)。コーティングすることで微細構造を作り超撥水性を生み出すような薬剤も開発されており、ガラスや建物などに広く応用できることが期待されている (Su 2010)。またイネの撥水性は前述したとおりハスとは異なり、波打った表皮や乳頭状突起の配置によって、長軸方向に傾けた時に滑落角が特に低くなるという異方性をもった撥水性を示すことが知られている (Feng et al. 2002)。既にイネの表面構造を模した素材も作られており (Lee et al. 2013)、こうした特性を工業的に利用することも可能であろう。

ここまで植物の葉の表皮構造と撥水性の関わりについて概説してきた。特にイネはロータス効果を持つモデル植物として、超撥水性の分子遺伝学的な基盤を明らかにする最も適した研究材料であると考えられる。変異体や分子遺伝学的な解析を用いた今後の更なる解析によって、植物における撥水性発現の仕組みについての理解、更には新たな応用的利用の可能性が深まることを期待している。

引用文献

- Barthlott, W., & Neinhuis, C. 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 202: 1-8.
- Barton, M.K. 2007. Making holes in leaves: promoting cell state transitions in stomatal development. *Plant Cell* 19: 1140-1143.
- Baumann, K., Perez-Rodriguez, M., Bradley, D., Venail, J., Bailey, P., Jin, H., Koes, R., Roberts, K., & Martin, C. 2007. Control of cell and petal morphogenesis by R2R3 MYB transcription factors. *Development* 134: 1691-1701.
- Bhushan, B., & Jung, Y.C. 2008. Wetting, adhesion and friction of superhydrophobic and hydrophilic leaves and fabricated micro/ nanopatterned surfaces. *J. Phys.: Condens. Matter* 20: 225010.
- Brockington, S.F., Alvarez-Fernandez, R., Landis, J.B., Alcorn, K., Walker, R.H., Thomas, M.M., Hileman, L.C., Glover, B.J. 2013. Evolutionary analysis of the MIXTA gene family highlights potential targets for the study of cellular differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 30: 526-540.
- Ensikat, H.J., Ditsche-Kuru, P., Neinhuis, C., Barthlott, W. 2011. Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2: 152-161.

- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641–664.
- Extrand, C.W. 2005. Modeling of ultralyophobicity: suspension of liquid drops by a single asperity. *Langmuir* 21: 10370-10374.
- Feng, L., Li, S., Li, F., Li, H., Zhang, L., Zhai, J., Song, Y., Liu, B., Jiang, L., & Zhu, D. 2002. Super-hydrophobic surfaces: from natural to artificial. *Adv. Mater.* 14: 1857–1860.
- Glover, B.J. 2000. Differentiation in plant epidermal cells. *J. Exp. Bot.* 51: 497-505.
- Glover, B.J., Martin, C. 1998. The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity* 80: 778-784.
- Guo, Z., & Liu, W. 2007. Biomimic from the superhydrophobic plant leaves in nature: Binary structure and unitary structure. *Plant science* 172: 1103-1112.
- Holloway, P.J. 1970. Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pestic. Sci.* 1: 156-163.
- Itoh, J., Nonomura, K., Ikeda, K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamagishi, H., Kitano, H. & Nagato, Y. 2005. Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol.* 46: 23-47.
- Jenks, M.A., Joly, R.J., Peters, P.J., Rich, P.J., Axtell, J.D., & Ashworth, E.N. 1994. Chemically induced cuticle mutation affecting epidermal conductance to water vapor and disease susceptibility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 105: 1239-1245.
- Kang, B.H., Busse, J.S., & Bednarek, S.Y. 2003. Members of the Arabidopsis Dynamin-Like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* 15: 899-913.
- Karthick, B., & Maheshwari, R. 2008. Lotus-inspired nanotechnology applications. *Resonance* 13: 1141-1145.
- Koch, K., & Barthlott, W. 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 367: 1487-1509.
- Korndörfer, G.H., & Lepsch, I. 2001. Effect of silicon on plant growth and crop yield. In: Datnoff L.E., Snyder, G.H., & Korndörfer, G.H. (eds.) *Silicon in agriculture*. pp 133–147. Elsevier Press, Amsterdam.
- Krauss, P., Markstader, C., & Riederer, M. 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. *Plant Cell Environ.* 20: 1079-1085.
- Lee, S.G, Lim, H.S., Lee, D.Y., Kwak, D, & Cho, K. 2013. Tunable anisotropic wettability of rice leaf-like wavy surfaces. *Adv. Funct. Mater.* 23: 547-553.
- Li, W., & Amirfazli, A. 2008. Hierarchical structures for natural superhydrophobic surfaces. *Soft Matter* 4: 462-466.
- Li, W., Wu, J., Weng, S., Zhang, D., Zhang, Y., & Shi, C. 2010. Characterization and fine mapping of the glabrous leaf and hull mutants (*gll*) in rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Rep.* 29: 617–627.
- Ma, J.F., Takahashi, E. 2002. Functions of silicon in plant growth. In: *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. pp. 5–26. Elsevier Press, Amsterdam.
- Martin, C., Bhatt, K., Baumann, K., Jin, H., Zachgo, S., Roberts, K., Schwarz-Sommer, Z., Glover, B.J., & Perez-Rodrigues, M. 2002. The mechanics of cell fate determination in petals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 357: 809–813.

- Mockenhaupt, B., Ensikat, H.J., Spaeth, M., & Barthlott, W. 2008. Superhydrophobicity of biological and technical surfaces under moisture condensation: Stability in relation to surface structure. *Langmuir* 24: 13591-13597.
- Neinhuis, C., & Barthlott, W. 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Ann. Bot.* 79: 667-677.
- Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P., & Martin, C. 1994. Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* 369: 661-664.
- Prasad, V., Strömberg, C.A.E., Leaché, A.D., Samant, B., Patnaik, R., Tang, L., Mohabey, D.M., Ge, S. & Sahni, A. 2011. Late Cretaceous origin of the rice tribe provides evidence for early diversification in Poaceae. *Nature communications* 2, 480
- Qin, B.X., Tang, D., Huang, J., Lia, M., Wu, X.R., Lu, L.L., Wang, K.J., Yub, H.X., Chen, J.M., Gu, M.H. & Cheng, Z.K. 2011. Rice *OsGLI-1* is involved in leaf cuticular wax and cuticle membrane. *Mol. Plant* 4: 985-995.
- Ramsay, N.A., & Glover, B.J. 2005. MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci.* 10: 63-70.
- Riederer, M., & Schreiber, L. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* 52: 2023-2032.
- Roach, P., Shirtcliffe, N.J., & Newton, M.I. 2008. Progress in superhydrophobic surface development. *Soft matter* 4: 224-240.
- Sambade, A., Findlay, K., Schaffner, A.R., Lloyd, C.W., & Buschmann, H. 2014. Actin-dependent and –independent functions of cortical microtubules in differentiation of *Arabidopsis* leaf trichomes. *Plant Cell* 26: 1629-1644.
- Samuels, L., Kunst, L., & Jetter, R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 683–707.
- Stosch, A.K., Solga, A., Steiner, U., Oerke, E.-C., Barthlott, W., & Cermann, Z. 2007. Efficiency of self-cleaning properties in wheat (*Triticum aestivum* L.) *J. Appl. Bot. Food. Qual.* 81: 49-55.
- Su, C. 2010. Facile fabrication of a lotus-effect composite coating via wrapping silica with polyurethane. *Appl. Surf. Sci.* 256: 2122-2127.
- Szymanski, D.B., Lloyd, A.M. & Marks, M.D. 2000. Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 5: 214-219.
- Wang, Y., Wan, L., Zhang, L., Zhang, Z., Zhang, H., Quan, R., Zhou, S., & Huang, R. 2012. An ethylene response factor OsWR1 responsive to drought stress transcriptionally activates wax synthesis related genes and increases wax production in rice. *Plant Mol Biol* 78:275–288.
- Welker, O.A., & Nagamine, T. 1996. Structural differences of wax particles in dripping leaf mutants of rices in relation to their wettability. *Jpn. J. Crop. Sci.* 65: 43-44.
- Yeats, T.H., & Rose, J.K.C. 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* 163: 5-20.
- Yoo, J.H., Park, J.H., Cho, S.H., Yoo, S.C., Li, J., Zhang, H., Kim, K.S., Koh, H.J., & Paek, N.C. 2011. The rice

bright green leaf (bgl) locus encodes OsRopGEF10, which activates the development of small cuticular papillae on leaf surfaces. *Plant Mol Biol* 77: 631–641.

Yu, D., Ranathunge, K., Huang, H., Pei, Z., Franke, R., Schreiber, L., & He, C. 2008. Wax Crystal-Sparse Leaf1 encodes a β -ketoacyl CoA synthase involved in biosynthesis of cuticular waxes on rice leaf. *Planta* 228:675–685.

葉の凹凸形態形成の制御機構

小山知嗣

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所
〒619-0284 京都府相楽郡精華町精華台 8-1-1

Tomotsugu Koyama

Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences
Seikadai 8-1-1, Seikacho, Soraku-gun, Kyoto 619-0284, Japan

1. はじめに

植物の葉はしばしば凹凸形態を有し、そのサイズや位置、数などの違いにより多様な形態を示す。図 1 は、滑らかな縁形態を有する単葉と複雑な凹凸形態を有する複葉の例を示している。単葉では、しばしば縁に小さな凹凸形態である鋸歯を形成する (図 1 A)。複葉では、小さな葉のような構造 (小葉) が集まって一つの葉となる複雑な凹凸形態を有する (図 1 B)。同種同系統の同じ成長ステージであれば、各個体は類似した葉を形成するので、その形態は正確に制御されているはずである。ところが、同一の個体が幼苗期と成熟期で凹凸形態の異なる葉を形成する例も多い (図 1 C, Poethig 1997)。また、環境変化に応じて葉の凹凸形態はしばしば大きく変換される場合もある (Nakayama et al. 2014)。外来生物の侵入により、葉の凹凸形態が誘導されることも知られている (Sugio et al. 2011)。さらに、健全な生育条件下でも偶発的に葉の凹凸形態に変化が生じてしまい、あたかも出来損ないのような葉を形成することもある (図 1 D)。このような例から、葉の形態形成は正確に制御されるとともに、多様な形態を発現させる柔軟性も兼ね備えたものと言える。

本稿では、まず、葉の発生の概観とその凹凸形態の形成における分子レベルでの枠組みについて紹介する。次に、葉の凹凸形態形成の制御に重要な役割を果たす TCP 転写因子の機能を起点として、単葉や複葉でどのような制御が行われているのかを述べる。本稿を通じて、葉の凹凸形態形成における頑健かつ柔軟な制御系の一端を紹介したい。

2. 葉の形態形成の概観

葉の形態に関わらず、全ての葉は幹細胞を含む細胞集団 (シュートメリステム) から生じる (図 1 E)。シュートメリステムから葉原基を形成する過程で、シュートメリステムを維持する遺伝子の発現が抑制されるとともに、新たに確立された軸情報に従って細胞分裂と伸長の方向が制御される (Nakata & Okada 2013, Tameshige et al. 2013, Bar & Ori 2014, Tsukaya 2014)。葉原基内では発生に伴って徐々に細胞分裂が停止するとともに細胞伸長が開始されるが、周縁部では分裂活性が長期間にわたり維持され、凹凸形態を形成する能力を持つ領域となる (Hagemann & Gleissberg 1996, Donnelly et al. 1999, Andriankaja et al. 2012)。シロイヌナズナの鋸歯の形成において、周縁部特異的な細胞分裂と伸長が観察され、凹凸形態形成の過程が

T. Koyama - 1!

!

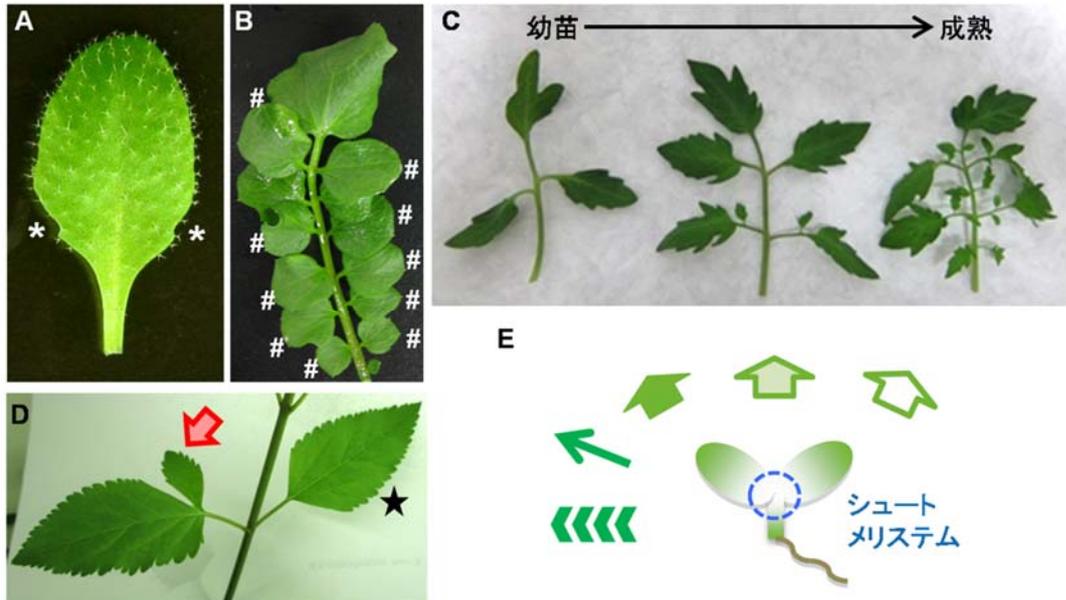


図1. 様々な凹凸形態を有する葉

A 単葉の例として、アブラナ科シロイヌナズナの葉を示す。アスタリスクは鋸歯を表す。

B 複葉の例として、アブラナ科タネツケバナ属植物の葉を示す。シャープは小葉を示す。

C トマトは複葉を形成するが、幼苗期に形成された葉は比較的単純な形態を示し、成熟期に形成された葉は多くの小葉を有する複雑な形態を示す。

D アイノコレンギョウは通常星印のような単葉を形成するが、赤矢印のように偶然に小葉様の形態を形成することもある。

E どのような形態をとるかに関わらず、全ての葉はシュートメリステムから生じる。芽生えの模式図で、青の点線部にシュートメリステムがある。シュートメリステムから生じた葉原基が拡大して葉になる発生過程が多様であることを、異なる矢印で表している。

追跡されている (Kawamura et al. 2010)。また、伸長中の葉の周縁部の一部分に限って人為的に細胞分裂を促進させた場合、形成された葉には大きな凹凸形態が生じる (Wyrzykowska et al. 2002)。

ところが、葉全体で細胞分裂を促進しても葉の形態は変わらない (Cockcroft et al. 2000)。葉に凹凸形態を形成するためには、単なる細胞分裂の制御ではなく、分裂可能な領域が周縁部の局所に偏在することが重要と指摘されている (Wyrzykowska et al. 2002)。このような偏在を生じるための分子機構を理解するためには、シロイヌナズナなどで葉の凹凸形態に異常を示す変異体から得られる知見は有効である。これら変異体の原因遺伝子の中には、ゲノムDNA代謝と構造制御 (Takahashi et al. 2002, Engelhorn et al. 2012), RNA代謝 (Allen et al. 2005, Nelissen et al. 2005, Hunter et al. 2007, Laubinger et al. 2008, Gregory et al. 2008, Zhan et al. 2012, Kougioumoutzi et al. 2013), 翻訳と翻訳後修飾 (Byrne 2009, Moschopoulos et al. 2012, Horiguchi et al. 2012) の過程で機能するものであった。これらの制御の全容解明には至っていないが、後述するオーキシン応答の制御遺伝子や転写因子など凹凸形態の制御因子を調節している可能性が高い (Ori et al. 2012, Fahlgren et al. 2006, Szakonyi & Byrne 2011, Rosado et al. 2012)。

3. 葉の凹凸形態形成におけるオーキシンと *CUC* 遺伝子の役割

葉の凹凸形態形成を理解するうえで、オーキシンの生合成と輸送機構、情報の受容と伝達に異常を示すシロイヌナズナ変異体は重要な材料となっている。オーキシン情報伝達が活性

T. Koyama - 2!

!

化されている部位は、オーキシニン応答性遺伝子のプロモーターから同定された DR5 エレメントのレポーターで可視化することができる (Ulmasov et al. 1997)。DR5 エレメントを導入した形質転換体の解析から、オーキシニン応答が鋸歯の頂端部で活性化されることが明らかである (図2)。さらに、オーキシニン局在に必要な輸送タンパク質遺伝子の変異体とオーキシニン応答を制御する転写因子遺伝子の変異体では鋸歯が形成されないため、凹凸頂端部におけるオーキシニン応答が鋸歯の形成に必須である (Hay et al. 2006, Koenig et al. 2009, Kawamura et al. 2010)。

鋸歯の基部では、NAC ドメイン転写因子をコードする *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* 遺伝子ファミリーが特異的に発現し、鋸歯の基部に「くびれ」を形成する (図2)。シロイヌナズナでは *CUC* 遺伝子は3遺伝子からなるファミリーを形成し、葉の鋸歯形成では *CUC2* と *CUC3* が大きな役割を担う (Nikovic et al. 2006, Hasson et al. 2011)。 *CUC2* mRNA は microRNA164 (miR164) により分解され、転写後の負の制御を受ける。 *CUC2* と miR164 とのバランスは鋸歯のサイズの制御に重要で、miR164 の制御を受けない塩基置換を導入した変異 *CUC2* 遺伝子過剰発現体や *mir164a* 変異体では大きくくびれた鋸歯を形成し、逆に過剰な *MIR164A* 遺伝子の発現や *cuc2* 変異体は鋸歯の形成が阻害される。また、 *CUC3* は miR164 の制御は受けないが、 *CUC2* と機能重複して鋸歯の形成を促進する。

興味深いことに、鋸歯の頂端部と基部でそれぞれ活性化されているオーキシニンと *CUC* 遺伝子は相互作用を示す (図2, Bilsborough et al. 2011)。オーキシニン投与は *CUC2* 遺伝子の発現を抑制するが、逆にオーキシニン応答に異常を示す変異体では *CUC2* 遺伝子の発現領域が拡大し、その発現量も増加する。一方、 *cuc2* 変異体ではオーキシニンの極性輸送が阻害されて鋸歯の形成が阻害されるが、 *mir164a* 変異体で認められる鋸歯の拡大はオーキシニンの極性輸送を阻害すると抑圧される (Kawamura et al. 2010, Bilsborough et al. 2011)。このようなフィードバックループが維持されて凹凸形態が強調された結果、鋸歯が形成される。これらの知見に加えて、葉の凹凸形態に異常を示す多くのシロイヌナズナ変異体で、オーキシニン応答や *CUC* 遺伝子発現パターンに異常が認められる (Bar & Ori 2014)。

上記のシロイヌナズナの鋸歯の形成機構は、トマトやミチタネツケバナなどの複葉における凹凸形態の形成にも認められる。これらの複葉では小葉原基が葉原基内に形成されるが、小葉原基の先端部においてオーキシニン活性が活性化される。しかし、オーキシニン極性輸送が阻害された変異体や薬剤処理により、小葉や鋸歯の形成は阻害される (Hay & Tsiantis 2006, Koenig et al. 2009)。一方、トマト *CUC2* ホモログ *GOBLET (GOB)* 遺伝子は小葉原基の基部で発現し、小葉の形成に必要なものである。 *GOB* が miR164 に制御されることと、オーキシニンと *GOB*

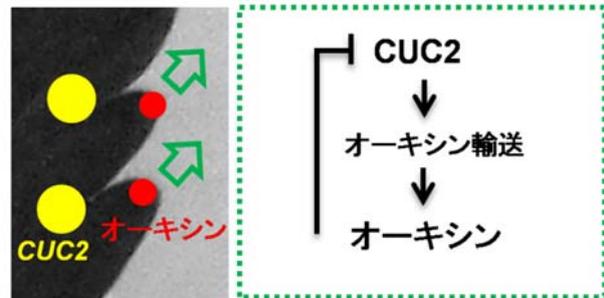


図2. 鋸歯の形成モデル

左は葉の周縁部の模式図で、鋸歯の頂端部の赤で示した領域にオーキシニンが、基部の黄色で示した領域に *CUC2* 遺伝子が発現する。

右の模式図では、 *CUC2* はオーキシニン極性輸送を促進し、頂端部にオーキシニンを蓄積する。オーキシニンは *CUC2* 遺伝子を抑制するので、頂端部で *CUC2* 遺伝子の発現が阻害される。

がフィードバックを形成することも明らかである (Blein et al. 2008, Berger et al. 2009, Ben-Gera et al. 2012)。さらに、葉の凹凸形態に異常を示すトマト変異体ではオーキシン応答あるいは *CUC* 遺伝子の発現パターンの異常が報告されている (David-Schwartz et al. 2009, Naz et al. 2013)。このように、凹凸形態の頂端部でオーキシン応答が活性化され、その基部で *CUC* 遺伝子が発現する制御機構が、単葉でも複葉でも共通に認められる。

それでは、オーキシン応答や *CUC* 遺伝子の発現を適切な領域で活性化する機構とはどのようなものだろうか？シロイヌナズナとトマトの葉において、凹凸形態を大きく変化させる *KNOX* 転写因子や *TCP* 転写因子は重要な制御因子である。*KNOX* 遺伝子はオーキシン応答や *CUC* 遺伝子群の発現誘導を伴って、凹凸形態の形成を促進することなどが明らかである (Hay et al. 2006 Spinelli et al. 2011)。本稿では、*KNOX* 転写因子についての総説を紹介するに留め (Hay & Tsiantis 2010, 木村 2013)、以降は *TCP* 転写因子の機能について焦点を絞る。

4. *TCP* 転写因子による凹凸形態形成の制御

葉の凹凸形態形成において、*TCP* 転写因子ファミリーは重要である。*TCP* は植物特異的転写因子で、シロイヌナズナゲノムでは 24 遺伝子にコードされている。それぞれの *TCP* は保存領域のアミノ酸配列相同性により、クラス I と *CINCINNATA* (*CIN*)-like, *CYC/TB* のサブグループに分類されている (図 3, Martin-Trillo & Cubas 2010)。8 遺伝子からなる *CIN*-like *TCP* 遺伝子の中の 5 遺伝子は *miR319* による負の制御を受ける (Palatnik et al. 2003)。キンギョソウ *cin* 変異体の解析から、*CIN* は葉における細胞分裂の抑制因子として分裂の停止領域を規定することにより、葉の滑らかな平面を形成すると提案されたが (Nath et al. 2003)、シロイヌナズナにおける機能は不明であった。

筆者らは、転写因子をドミナントネガティブに阻害する *SRDX* 配列を利用した *CRES-T* 法 (Hiratsu et al. 2003, Koyama et al. 2012)、ならびに多重変異体を用いた解析から、*CIN*-like *TCP* 転写因子が葉の形態の複雑さを制御することを明らかにした (図 4, Koyama et al. 2007, 2010)。*CIN*-like *TCP* 遺伝子破壊株では一遺伝子破壊では表現型異常は認められないが、多重変異体では抑制された *TCP* 遺伝子の数に応じて葉が縮れた。これらの形態異常は *miR319* を過剰に蓄積するシロイヌナズナ *jaw-d* 変異体における葉の波打ち形態と似た、あるいは強調された形態であった (Palatnik et al. 2003)。一方、*miR319* の標的配列に変異を導入し *TCP3* を過剰に蓄積する *mTCP3* 遺伝子発現体では、鋸歯の形成が阻害され、滑らかな縁が形成された。さらに、*CIN*-like *TCP* 遺伝子の発現量が増加した *mir319a* 変異体の葉において鋸歯の形成が阻害さ

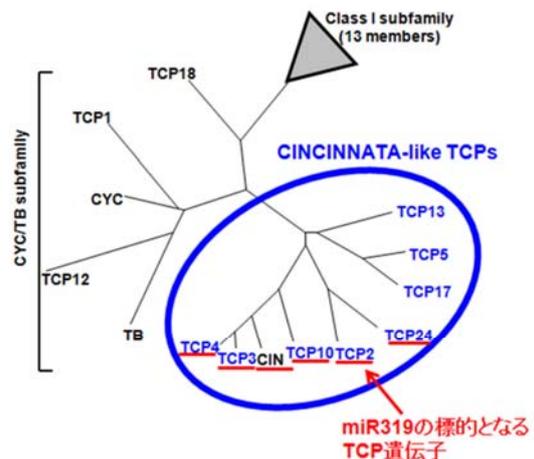


図 3. *TCP* 転写因子の系統樹
シロイヌナズナ *TCP* 遺伝子のうち、青文字の 8 遺伝子が *CIN*-like *TCP* に分類され、赤下線の 5 遺伝子が *miR319* による制御を受ける。*CIN* と *CYC* はキンギョソウ、*TB* はトウモロコシの配列で、シロイヌナズナ *TCP* 遺伝子のグループ分けをする目的で系統樹に加えている。

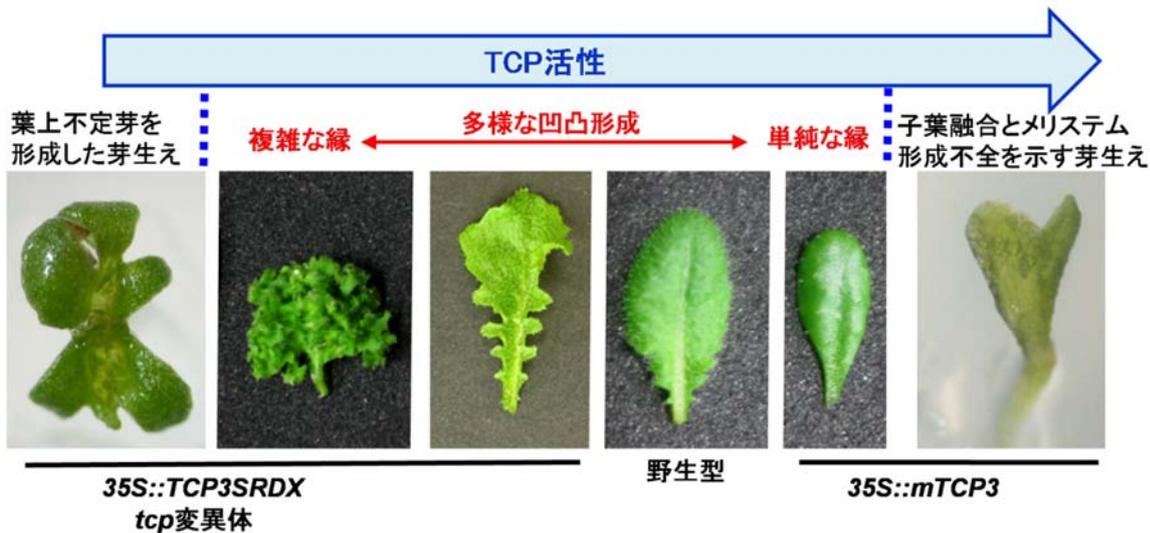


図4. *TCP*遺伝子の機能重複により多様な凹凸形態が形成される。
*TCP*遺伝子が機能重複するので、*TCP*活性を変化させることで段階的に多様な葉が生じる。
 点線の左側は極端に*TCP*活性が弱く、点線の右側は極端に*TCP*活性が強い植物。ともに致死である。

れたことから、*TCP3*を含む *CIN*-like *TCP* 遺伝子の過剰発現は滑らかな縁形態を生じることが明らかになった。

興味深いことに、7つの *CIN*-like *TCP* 遺伝子を阻害した変異体では葉上不定芽が形成され、メリステムが過剰に形成される表現型を示した (図4, Koyama et al. 2007, 2010)。逆に、*mTCP3* と *mTCP4* の過剰発現体の強い表現型では子葉が融合し、シュートメリステムの形成が阻害された (Palatnik et al. 2003, Koyama et al. 2007)。極端に *TCP* 転写因子の活性が低いとシュートメリステム形成が促進され、極端に *TCP* 活性が高いとその形成が阻害され、どちらの表現型も致死であった。仮に、一遺伝子による単純な制御を想定すると、過剰発現でも遺伝子破壊でも致死となり、多様な表現型が発現される可能性はない。つまり、*CIN*-like *TCP* 遺伝子の幾重にもわたる機能重複は、葉の形態形成に頑健性を与えるとともに、形態の多様性発現の基盤となる制御系と考えられた。

さらに、筆者らは *TCP* 転写因子の下流遺伝子の発現解析を行った。まず、*TCP* 転写因子に関連する形態異常が *CUC* 遺伝子に関連する変異体の形態異常と似ているので、*CUC* 遺伝子の発現解析を行ったところ、*TCP* 転写因子の機能阻害が *CUC* 遺伝子ファミリーの異所発現を示し、逆に *mTCP3* により *CUC* 遺伝子ファミリーの発現が抑制されることを見出した (図5 A, Koyama et al. 2007)。次に、マイクロアレイとクロマチン免疫沈降、プロモーター解析から、*TCP3* が *ASYMMETRIC LEAVES1 (ASI)* と *MIR164A*, *SAUR*, *IAA3/SHY2* 遺伝子を活性化することと、これらの標的遺伝子が部分的に *CUC* 遺伝子の発現を抑制することを明らかにした (Koyama et al. 2010)。*ASI* 遺伝子は葉の凹凸形態形成を制御する *MYB* 様転写因子をコードし、*miR164* は *CUC2* 遺伝子の発現を阻害する。*SAUR* と *IAA3/SHY2* はオーキシン応答を抑制する機能を持つ。*mTCP3* を過剰発現する植物はオーキシンへの感受性が低くなるが、*TCP3-SRDX* 植物では異所的にオーキシン応答が誘導されるので、*TCP* 転写因子はオーキシン応答を阻害すると考えられる。このように、*CIN*-*TCP* 転写因子は冗長かつ多層な制御系の起点となり、凹凸形態形成の鍵であるオーキシン応答と *CUC* 遺伝子を抑制する制御機構が解明

された(図5 A, Koyama et al. 2010, 小山 2011)。

上記の筆者らの発見に加えて, シロイヌナズナ CIN-like TCP の活性制御が報告されている(図5 A)。CIN-like TCP 遺伝子の発現は, 葉の形態形成に重要な *INDOLE-ACETIC-ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE* 遺伝子,

YABBY 遺伝子, ミトコンドリア ATP 合成酵素サブユニット遺伝子によって調節される (Qin et al. 2005, Robinson et al. 2009, Sarojam et al. 2010)。さらに, TCP 転写因子の翻訳後調節による凹凸形態の制御も報告されている。

CIN-like TCP は転写抑制因子と相互作用し, 当因子による阻害的な調節を受ける (Tao et al. 2013)。TCP3 はオーキシン作用を阻害するフラボノイドを介した制御を

行う (Li & Zachgo 2013)。また, TCP4 はクロマチンリモデリング因子と相互作用し, サイトカイニン応答抑制因子遺伝子の発現を活性化する (Efroni et al. 2014)。興味深いことに, TCP4 が CUC2 と CUC3 と相互作用し, 翻訳後レベルで CUC 転写因子の機能を阻害する可能性も指摘されている (Rubio-Somoza et al. 2014)。一方, TCP4 はジベレリンやジャスモン酸の生合成を促進するとともに, 細胞分裂抑制因子の発現を活性化する (Schommer et al. 2009, 2014, Sarvepalli & Nath 2011)。このように, CIN-like TCP 転写因子は転写, 転写後, 翻訳後の各レベルで調節され, 様々な下流遺伝子の発現制御を介して葉の凹凸形態を形成する。

5. 複葉における TCP 転写因子の役割

上述のようなシロイヌナズナ CIN-like TCP 転写因子による凹凸形態の形成について, 複数の植物種で共通な制御系が指摘されている。CRES-T による転写因子の機能阻害を利用して園芸的価値を付与することを目的とした「花き CRES-T プロジェクト」では (Ohtsubo 2011), CIN-like TCP 転写因子を SRDX 配列に融合しドミナントネガティブ体として用いることにより, トレニア, シクラメン, バラ, アサガオで葉や花弁が縮れたフリンジ咲きのような形態が得られた (図6、Narumi et al. 2011, Gion et al. 2011, Tanaka et al. 2011, Ono et al. 2012)。複葉を形成するバラにおいて, シロイヌナズナ TCP3-SRDX が小葉の数を増加させたので, 複

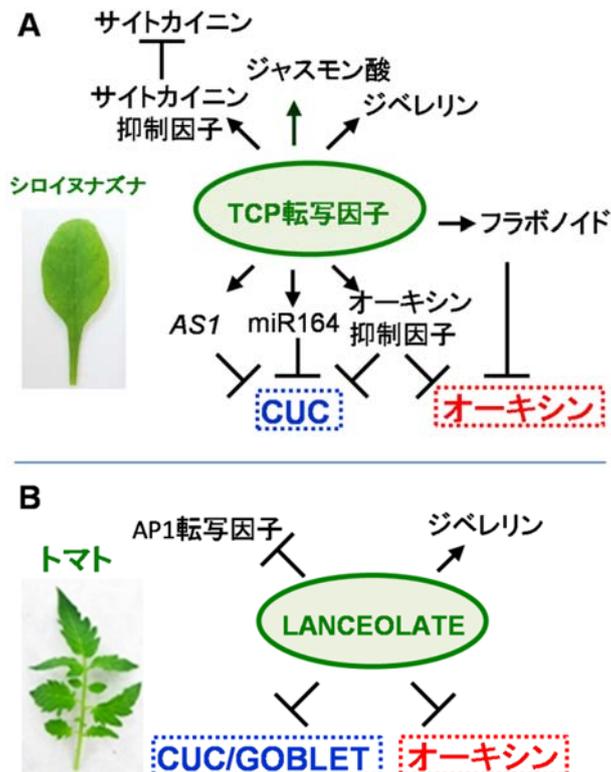


図5. シロイヌナズナ(A)とトマト(B)におけるTCP転写因子の下流遺伝子ネットワークの模式図
矢印は活性化をT字線は抑制を示す。トマト LANCEOLATEがGOBLET遺伝子の発現やオーキシン応答を阻害する機構は不明である。詳細は本文を参照。

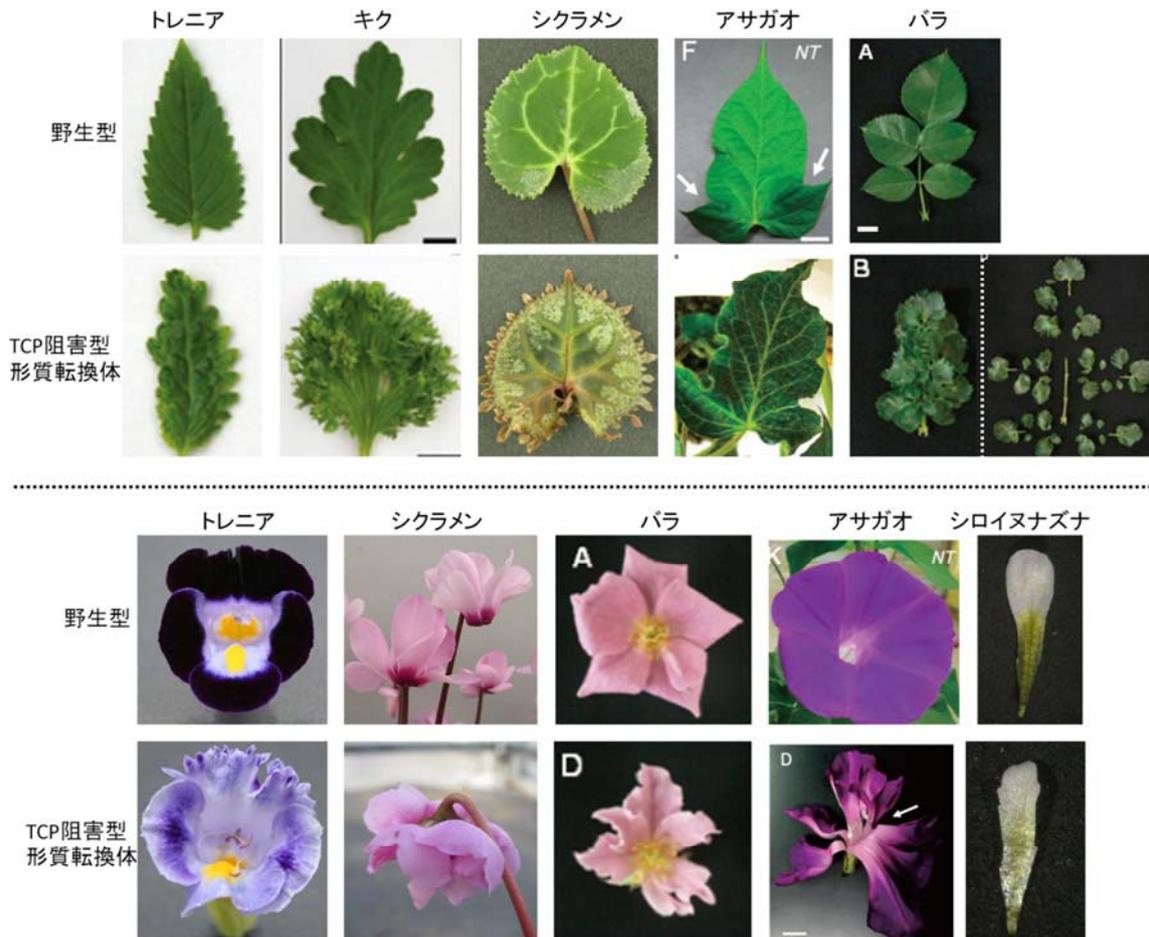


図6 TCP転写因子の阻害による凹凸形態の付与。

葉（上段）と花（下段）における野生型と形質転換体の表現型をそれぞれ列記している。この図では正確なスケールは反映されていない。詳細は原著論文を参照のこと。トレニア、キク (Narumi et al. 2011)、シクラメン (Tanaka et al. 2011)、バラ (Gion et al. 2011)、アサガオ (Ono et al. 2012)、シロイヌナズナ (Koyama et al. 2007)。転載に際して、出版社の許可を得ている。

葉においてもシロイヌナズナと同様の制御系が存在することが示唆された (図 6、Gion et al. 2011)。

一方、トマトは栽培種であるので、育種の過程で葉の形態が変化した自然突然変異株が維持されてきた。それら表現型異常の解析から葉の凹凸形態を形成する遺伝子が同定された (Chen et al. 1997, Parnis et al. 1997, Jasinski et al. 2008, Kimura et al. 2009, David-Schwartz et al. 2009, Naz et al. 2013)。トマトの自然突然変異 *lanceolate* 変異体は、ヘテロ接合体では小葉をほとんど形成しない単葉に似た表現型を示し、ホモ接合体は子葉の融合やシュートメリステムの形成不全を伴う異常を示し、致死である (Mathan & Jenkins 1962, Settler 1964)。その異常の原因遺伝子が同定された結果、CIN-like TCP 転写因子をコードする *LANCEOLATE* (*LA*) の miR319 標的配列に塩基置換があり、*LA* 遺伝子が過剰に発現していることが明らかとなった (Ori et al. 2007)。逆に、miR319 を過剰発現し、*LA* を含む CIN-like TCP 遺伝子の発現を抑制した形質転換トマトでは葉の形態が複雑化し、小葉の形成が著しく促進された。これらの表現型はシロイヌナズナで CIN-like TCP 転写因子が引き起こす形態変化と共通であった。

LA がオーキシン応答と *CUC/GOB* 遺伝子の発現を阻害する点はシロイヌナズナ CIN-like TCP の機能と似ている (図 5 B)。*LA* 遺伝子の過剰発現を示す *lanceolate* 変異体では、野生型

T. Koyama - 7!

!

で認められる小葉原基でのオーキシン応答と *CUC/GOB* 遺伝子の発現が阻害される (Blein et al. 2008, Ben-Gera & Ori 2012)。一方, *LA* はジベレリン応答の促進因子としても機能する (Yanai et al. 2011)。ジベレリンの投与, あるいは *procera* 変異体 (ジベレリン受容体の変異による構成的ジベレリン応答変異体) との交配により, *miR319* 過剰発現体の小葉の過剰な形成が阻害される。さらに, *LA* が *APETALA1 (API) /FRUITFUL* 遺伝子を標的とすることも明らかとなっている (Burko et al. 2013)。シロイヌナズナでは *jaw-d* 変異体で *API* 遺伝子の発現が上昇する (Li et al. 2012), *TCP* 転写因子による *API* 遺伝子の発現制御について詳細は不明である。

単葉と複葉で共通な *CIN-like TCP* 転写因子の機能が明らかにされつつあるが, 種特異的な機能についての知見は断片的である。*CIN-like TCP* 遺伝子はシロイヌナズナとトマトで, ともに葉で発現する (Palatnik et al. 2003, Koyama et al. 2007, Ori et al. 2007)。葉原基における *LA* 相同遺伝子の発現の開始時期をナス科植物で比較した研究では, 単葉では葉の発生の早い時期に *LA* の発現が誘導され, 複葉では比較的遅れて *LA* の発現が誘導されると報告された (Shleizer-Buruko et al. 2011)。また, シロイヌナズナでは, *CIN-like TCP* の発現量を発生時期特異的に改変したところ, 凹凸形態変化を誘導可能な時期が規定されていると提案された (Efroni et al. 2008)。このような時期的な幅を規定する制御が形態の多様性発現に関わっているのかもしれないが, 葉原基から成熟葉を形成する過程は非常に多様であり (Hagemann & Gleissberg 1996), なお一層の解析が必要である。

6. 終わりに

進化の過程で, 単葉と複葉の変換など形態の大きな変化は何度も行われている。最近, アブラナ科の植物は進化の過程でホメオドメイン転写因遺伝子が重複や消失することで, 葉の凹凸形態を変化させたと報告されている (Vlad et al. 2014, Sicard et al. 2014)。このように新たに獲得あるいは消失した遺伝子が *TCP* 転写因子とその制御系にどのような影響を与えるのか興味深い。また, 本稿では, 主に単葉と複葉に共通な凹凸形態形成の制御機構について述べたが, 植物種特異的な制御機構も注力すべき解析対象である (Efroni et al. 2010, Tsukaya 2014)。種特異的な制御機構と *TCP* 転写因子がどのように相互作用するのか, 今後の解析が待たれる。

本稿では, *TCP* 転写因子の役割を中心にして, 遺伝子機能重複と多層的な活性調節を基盤とした葉の凹凸形態の形成機構について述べてきた。最近になって, 加齢による葉型の変化に *TCP* 転写因子が関わると指摘されたが, 内生シグナルと *TCP* 転写因子との相互作用の解析は端緒についたばかりである (Rubio-Somoza et al. 2014)。*lanceolate* 変異体では *KNOX* 遺伝子を過剰発現しても表現型は *lanceolate* 変異体に似た単純な形態であるので (Hareven et al. 1996), *TCP* 転写因子と *KNOX* 遺伝子の機能が相互作用することも明らかである。今後は, 複数の情報を *TCP* 転写因子が統合してどのように葉の形態として出力するのか, 他の制御系との相互作用解析も重要となる。また, *TCP* 転写因子による情報の出力は標的遺伝子を網羅的に同定することにより理解できる。これらの解析により, 新たな凹凸形態の制御因子を探索し, 葉の周縁部の細胞がどのように分裂と伸長を協調するのか明らかにしたい。さらに遺伝子レベルの知見を利用して, 平滑な周縁部と凹凸部でそもそも何が違うのか, 分子実体の解

明にも迫りたい。

7. 謝辞

京都大学生態学研究センター・工藤洋博士からタナツケバナ属植物 *Cardamine dentata* を分与いただき、お礼を申し上げます。本総説で紹介した形質転換植物に関して、トレニアとキクは農研機構花き研究所・大坪憲弘博士、シクラメンは北興化学工業株式会社・寺川輝彦博士、バラはサントリーグローバルイノベーションセンター株式会社・田中良和博士、アサガオは筑波大学遺伝子実験センター・小野道之博士による研究成果である。著者が研究を遂行するうえで、産業技術総合研究所・高木優博士、京都大学大学院生命科学研究科・佐藤文彦博士にお世話になった。名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・為重才覚博士、立教大学理学部・中田未友希博士、匿名の査読者の先生に、貴重なご意見を頂戴し、感謝申し上げます。本研究は科学研究費補助金基盤 C (26440148) による支援を受けた。

8. 引用文献

- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., & Carrington, J.C. 2005. MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Andriankaja, M., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Mühlenbock, P., Skiryecz, A., Gonzalez, N., Beemster, G.T., & Inzé, D. 2012. Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Dev. Cell* 22: 64-78.
- Bar, M., & Ori, N. 2014. Leaf development and morphogenesis. *Development* 141: 4219-4230.
- Ben-Gera, H., & Ori, N. 2012. Auxin and LANCEOLATE affect leaf shape in tomato via different developmental processes. *Plant Signal Behav.* 7: 1255-1257.
- Ben-Gera, H., Shwartz, I., Shao, M.R., Shani, E., Estelle, M., & Ori, N. 2012. ENTIRE and GOBLET promote leaflet development in tomato by modulating auxin response. *Plant J.* 70: 903-915.
- Berger, Y., Harpaz-Saad, S., Brand, A., Melnik, H., Sirding, N., Alvarez, J.P., Zinder, M., Samach, A., Eshed, Y., & Ori, N. 2009. The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* 136: 823-832.
- Bilsborough, G.D., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H.W., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., & Tsiantis, M. 2011. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 3424-3429.
- Blein, T., Pulido A., Vialette-Guiraud, A., Nikovics, K., Morin, H., Hay, A., Johansen, I.E., Tsiantis, M., & Laufs P.A. 2008. Conserved molecular framework for compound leaf development. *Science* 322: 1835-1839.
- Burko, Y., Shleizer-Burko, S., Yanai, O., Shwartz, I., Zelnik, I.D., Jacob-Hirsch, J., Kela, I., Eshed-Williams, L., & Ori, N. 2013. A role for APETALA1/fruitfull transcription factors in tomato leaf development. *Plant Cell* 25: 2070-2083.
- Byrne M.E. 2009. A role for the ribosome in development. *Trends Plant Sci.* 14: 512-519.
- Chen, J.J., Janssen, B.J., Williams, A., & Sinha, N. 1997. A gene fusion at a homeobox locus:

- alterations in leaf shape and implications for morphological evolution. *Plant Cell* 9: 1289-1304.
- Cockcroft, C.E., den Boer, B.G., Healy, J.M., & Murray, J.A. 2000. Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature* 405: 575-579.
- David-Schwartz, R., Koenig, D., & Sinha, N.R. 2009. LYRATE is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in tomato. *Plant Cell* 21: 3093-3104.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., & Dengler, N.G. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* 215: 407-419.
- Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., & Eshed, Y. 2008. A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 20: 2293–2306.
- Efroni, I., Eshed, Y., & Lifschitz, E. 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* 22: 1019-1032.
- Efroni, I., Han, S.K., Kim, H.J., Wu, M.F., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y., & Wagner, D. 2013. Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev. Cell* 24: 438-445.
- Engelhorn, J., Reimer, J.J., Leuz, I., Göbel, U., Huette, I. B., Farrona, S., & Turck, F. 2012. DEVELOPMENT-RELATED PcG TARGET IN THE APEX 4 controls leaf margin architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 139: 2566-2575.
- Fahlgren, N., Montgomery, T.A., Howell, M.D., Allen, E., Dvorak, S.K., Alexander, A.L., & Carrington, J.C. 2006. Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 16: 939-944.
- Gion, K., Suzuri, R., Shikata, M., Mitsuda, N., Oshima, Y., Koyama, T., Ohme-Takagi, M., Ohtsubo, N., & Tanaka, Y. 2011. Morphological changes of *Rosa x hybrida* by a chimeric repressor of *Arabidopsis* TCP3. *Plant Biotechnol.* 28: 149-152.
- Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urlich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., & Ecker, J.R. 2008. A link between RNA metabolism and silencing affecting *Arabidopsis* development. *Dev. Cell* 14: 854-866.
- Hagemann, W., & Gleissberg, S. 1996. Organogenetic capacity of leaves: The significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Syst. Evol.* 1999: 121-152.
- Hareven, D., Gutfinger, T., Parnis, A., Eshed, Y., & Lifschitz, E. 1996. The making of a compound leaf: Genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 84: 735–744.
- Hasson, A., Plessis, A., Blein, T., Adroher, B., Grigg, S., Tsiantis, M., Boudaoud, A., Damerval, C., & Laufs, P. 2011. Evolution and diverse roles of the CUP-SHAPED COTYLEDON genes in *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 23: 54-68.
- Hay, A., Barkoulas, M., & Tsiantis, M. 2006. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development* 133: 3955-3961.
- Hay, A., & Tsiantis, M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nat. Genet.* 38: 942-947.!!

- Hay, A., & Tsiantis, M. 2010. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137: 3153-3165.
- Hiratsu, K., Matsui, K., Koyama, T., & Ohme-Takagi, M. 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 733-739.
- Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J.L., & Tsukaya, H. 2012. Ribosomes and translation in plant developmental control. *Plant Sci.* 191-192: 24-34.
- Hunter, C., Willmann, M.R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutie' rrez-Nava, M., & Poethig, S.R. 2006. Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133: 2973-2981.
- Jasinski, S., Tattersall, A., Piazza, P., Hay, A., Martinez-Garcia, J.F., Schmitz, G., Theres, K., McCormick, S., & Tsiantis M. PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *Plant J.* 56: 603-612.
- Kawamura, E., Horiguchi, G., & Tsukaya, H. 2010. Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62: 429-441.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F.Y., & Sinha, N. 2008. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Curr. Biol.* 18: 672-677.
- 木村成介 2013 複葉の発生と進化 生物の科学 遺伝 67: 50-56.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., & Sinha, N. 2009. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* 136: 2997-3006.
- Kougioumoutzi, E., Cartolano, M., Canales, C., Dupré, M., Bramsiepe, J., Vlad, D., Rast, M., Dello Ioio, R., Tattersall, A., Schnittger, A., Hay, A., & Tsiantis, M. 2013. SIMPLE LEAF3 encodes a ribosome-associated protein required for leaflet development in *Cardamine hirsuta*. *Plant J.* 73: 533-545.
- Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., & Ohme-Takagi, M. 2007. TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 473-484.
- Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. 2010. TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 3574-3588.!!
- Koyama, T., Ohme-Takagi, M., & Sato, F. 2011. Generation of serrated and wavy petals by inhibition of the activity of TCP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 6: 697-699.
- 小山知嗣 2011 平らな葉を縮れさせてわかったこと 生物の科学 遺伝 65: 15-23.
- Koyama, T., Sato, F., & Ohme-Takagi, M. 2012. CRES-T for the functional analysis of transcription factors and modification of morphological traits in plants. *Curr. Biotechnol.* 1: 23-32.
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J.U., Ratsch, G., & Weigel, D. 2008. Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 8795-8800.

- Li, S., & Zachgo, S. 2013. TCP3 interacts with R2R3-MYB proteins, promotes flavonoid biosynthesis and negatively regulates the auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 76: 901-913.
- Moschopoulos, A., Derbyshire, P., & Byrne, M.E. 2012. The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1 is required for organ patterning. *J. Exp. Bot.* 63: 5233-5243.
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. 2010. TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends Plant Sci.* 15: 31-39.
- Mathan, D., & Jenkins, J. 1962. A morphogenic study of lanceolate, a leaf-shape mutant in the tomato. *Am. J. Bot.* 49: 504-514.
- Nakata, M., & Okada, K. 2013. The leaf adaxial-abaxial boundary and lamina growth. *Plants* 2: 174-202.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N., & Kimura, S. 2014. Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress. *Plant Cell* 26: 4733-48
- Narumi, T., Aida, R., Koyama, T., Yamaguchi, H., Sasaki, K., Shikata, M., Nakayama, M., Ohme-Takagi, M., & Ohtsubo, N. 2011. *Arabidopsis* chimeric TCP3 repressor produces novel floral traits in *Torenia fournieri* and *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Biotechnol.* 28: 131-140.
- Nath, U., Crawford, B.C., Carpenter, R., & Coen, E. 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299: 1404-1407.
- Naz, A.A., Raman, S., Martinez, C.C., Sinha, N.R., Schmitz, G., & Theres, K. 2013. Trifoliolate encodes an MYB transcription factor that modulates leaf and shoot architecture in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 2401-2406.
- Nelissen, H., Fleury, D., Bruno, L., Robles, P., De Veylder, L., Traas, J., Micol, J.L., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Lijsebettens, M. 2005. The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 7754-7759.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M. & Laufs, P. 2006. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2929-2945.
- Ohtsubo, N. 2011. Beyond the blue rose: Modification of floral architecture with plant-specific chimeric repressors. *Plant Biotechnol.* 28: 113-121.
- Ono, M., Hiyama, S., Higuchi, Y., Kamada, N., Nitasaka, E., Koyama, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., & Sage-Ono, K. 2012. Morphological changes in *Ipomoea nil* using chimeric repressors of *Arabidopsis* TCP3 and TCP5. *Plant Biotechnol.* 29: 457-463.
- Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J.L., & Hake, S. 2002. Mechanisms that control knox gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* 127: 5523-5532.
- Ori, N., Cohen, A.R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J.P., Blum, E., Zamir, D., & Eshed, Y. 2007. Regulation of LANCEOLATE

- by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat. Genet.* 39: 787–791.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C., & Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Parnis, A., Cohen, O., Gutfinger, T., Hareven, D., Zamir, D., & Lifschitz, E. 1997. The dominant developmental mutants of tomato, Mouse-ear and Curl, are associated with distinct modes of abnormal transcriptional regulation of a Knotted gene. *Plant Cell* 9: 2143-2158.
- Poethig S. 1997. Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 9: 1077-1087.
- Qin, G., Gu, H., Zhao, Y., Ma, Z., Shi, G., Yang, Y., Pichersky, E., Chen, H., Liu, M., Chen, Z., & Qu, L.J. 2005. An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 17: 2693-2704.
- Robison, M.M., Ling, X., Smid, M.P., Zarei, A., & Wolyn, D.J. 2009. Antisense expression of mitochondrial ATP synthase subunits OSCP (ATP5) and gamma (ATP3) alters leaf morphology, metabolism and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50:1840-1850.
- Rosado, A., Li, R., van de Ven, W., Hsu, E., & Raikhel, N.V. 2012. *Arabidopsis* ribosomal proteins control developmental programs through translational regulation of auxin response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 19537-19544.
- Rubio-Somoza, I., Zhou, C.M., Confraria, A., Martinho, C., von Born, P., Baena-Gonzalez, E., Wang, J.W., & Weigel, D. 2014. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes. *Curr. Biol.* 24: 2714-2719.
- Sarojam, R., Sappl, P.G., Goldshmidt, A., Efroni, I., Floyd, S.K., Eshed, Y., & Bowman, J.L. 2010. Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined YABBY activities. *Plant Cell* 22: 2113-2130.
- Sarvepalli, K., & Nath, U. 2011. Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* accelerates multiple aspects of plant maturation. *Plant J.* 67: 595-607.
- Schommer, C., Palatnik, J.F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E.E., Nath, U., & Weigel, D. 2008. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLOS Biol.* 23: e230.
- Schommer, C., Debernardi, J.M., Bresso, E.G., Rodriguez, R.E., & Palatnik, J.F. 2014. Repression of cell proliferation by miR319-regulated TCP4. *Mol. Plant* 7: 1533-1544.
- Settler, R. 1964. Dosage effects of the Lanceolate gene in tomato. *Am. J. Bot.* 51: 253–264.
- Shleizer-Burk, S., Burko, Y., Ben-Herzel, O., & Ori, N. 2011. Dynamic growth program regulated by LANCEOLATE enables flexible leaf patterning. *Development* 138: 695-704.
- Sicard, A., Thamm, A., Marona, C., Lee, Y.W., Wahl, V., Stinchcombe, J.R., Wright, S.I., Kappel, C., & Lenhard, M. 2014. Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene. *Curr. Biol.* 24: 1880-1886.
- Spinelli, S.V., Martin, A.P., Viola, I.L., Gonzalez, D.H., & Palatnik, J.F. 2011. A mechanistic link between STM and CUC1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.* 156: 1894-1904.
- Sugio, A., Kingdom, H.N., MacLean, A.M., Grieve, V.M., & Hogenhout SA. 2011. Phytoplasma

- protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: E1254-1263.
- Szakonyi D., & Byrne M.E. 2011. Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 65: 269-281.
- Takahashi, T., Matsuhara, S., Abe, M., & Komeda, Y. 2002. Disruption of a DNA topoisomerase I gene affects morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2085-2093.
- Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Kawaguchi, M., Nishimura, M., & Okada K. 2013. Pattern dynamics in adaxial-abaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLOS Genet.* 9: e1003655.
- Tanaka, Y., Yamamura, T., Oshima, Y., Mitsuda, N., Koyama, T., Ohme-Takagi, M., & Terakawa, T. 2011. Creating ruffled flower petals in *Cyclamen persicum* by expression of the chimeric cyclamen TCP repressor. *Plant Biotechnol.* 28:141-147.
- Tao, Q., Guo, D., Wei, B., Zhang, F., Pang, C., Jiang, H., Zhang, J., Wei, T., Gu, H., Qu, L.J., & Qin, G. 2013. The TIE1 transcriptional repressor links TCP transcription factors with TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors and modulates leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 421-437.
- Tsukaya, H. 2014. Comparative leaf development in angiosperms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 103-109.!!
- Ulmasov, T., Murfet, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T.J. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.
- Vlad, D., Kierzkowski, D., Rast, M.I., Vuolo, F., Dello Ioio, R., Galinha, C., Gan, X., Hajheidari, M., Hay, A., Smith, R.S., Huijser, P., Bailey, C.D., & Tsiantis, M. 2014. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* 343: 780-783.
- Wyrzykowska, J., Pien, S., Shen, W.H., & Fleming, A.J. 2002. Manipulation of leaf shape by modulation of cell division. *Development* 129: 957-964.
- Yanai, O., Shani, E., Russ, D., & Ori, N. 2011. Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. *Plant J.* 68: 571-582.
- Zhan, X., Wang, B., Li, H., Liu, R., Kalia, R.K., Zhu, J.K., & Chinnusamy, V. 2012. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 18198-18203.