T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	植物形態形成の多様性に対する数理的研究
Title(English)	
著者(和文)	早川慶紀
Author(English)	Yoshinori Hayakawa
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10299号, 授与年月日:2016年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,小長谷 明彦,三宅 美博,青西 亨,瀧ノ上 正浩,木賀 大介,望月 敦史
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10299号, Conferred date:2016/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

学位論文

植物形態形成の多様性に対する数理的研究

知能システム科学専攻

早川　慶紀

博士課程 11D35138
早川慶紀
望月理論生物学研究室

目次

1 序論 4
2 オーキシンパターン形成 9
2.1 序文 9
2.2 オーキシンフラックスモデルのパターン形成能 11
2.2.1 オーキシンフラックスモデル 11
2.2.2 オーキシンフラックスモデルの数値計算 13
2.2.3 オーキシンフラックスモデルの数理解析 13
2.2.4 オーキシンフラックスモデルの解析のまとめ 15
2.3 オーキシンフラックスモデルの改変 16
2.4 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの解析 17
2.4.1 オーキシン依存 PIN 分解モデル 17
2.4.2 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算 17
2.4.3 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数理解析 18
2.4.4 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの解析のまとめ 19
2.5 オーキシン自己フィードバックモデルの解析 19
2.5.1 オーキシン自己フィードバックモデル 19
2.5.2 オーキシン自己フィードバックモデルの数値計算 20
2.5.3 オーキシン自己フィードバックモデルの数理解析 20
2.5.4 オーキシン自己フィードバックモデルの解析のまとめ 21
2.6 葉と茎頂分裂組織におけるパターンの数値シミュレーション 21
2.6.1 葉脈形成 22
2.6.2 茎頂分裂組織上での原基配列形成 22
2.7 考察 23
3 平坦葉形成の数理 42
3.1 序文 42
3.2 葉形成の数理モデル 44
3.2.1 細胞ベースの形態形成モデル（VERTEX DYNAMICS） 45
3.2.2 遺伝子発現ダイナミクス 46

3.2.3 数値計算の初期条件 47
3.3 結果.....47
3.3.1 RANDOM CELL DIVISION.....47
3.3.1 POLARIZED CELL DIVISIONS 50
3.4 考察.....51
4 総合討論 66
REFERENCE 78
謝辞 93

1 序論

背景と目的

理論生物学の意義

分子生物学はワトソンとクリックの DNA 二重らせん構造発見から始まり、生命のセントラルドグマという生物を構成する基本的なメカニズムを明らかにしてきた。DNA は膨大な遺伝情報を含み、それぞれの遺伝子は転写、翻訳されタンパク質としてその機能を果たす。あるものは体を構成し、またあるものは代謝を担い、またあるものは他の遺伝子の発現を制御する。DNA に刻まれた遺伝子たちは次々と関連しあい、遺伝子ネットワークを形成する。分子生物学は生命現象を遺伝子の働きに還元するという思想のもとに発展した学問分野であろう。分子生物学は膨大な実験からこれらの遺伝子の関わり合いの関係を同定してきた。ある遺伝子がある遺伝子を制御しているという矢印が描かれる。つまり遺伝子制御ネットワークが得られる。このように得られた情報の積み重ねの中で、多数の分子が複雑に相互作用するシステム全体のダイナミクスから生命機能は生まれてくるのだということがわかってきた。しかしながら、その理解は静的であり定性的に語られることが多い。つまり、これまでの生物学はダイナミクスを扱うことには不慣れであり、目まぐるしく変化する生物の動的な振る舞いを理解するには、ダイナミクスをうまく扱う手段が必要である。そのような要請から、現実の複雑なシステムの振舞いを数理モデルを通して理解しようとする試みが重要性を増しつつある。このような分野は理論生物学と呼ばれている。対象の本質をとらえた比較的簡単な数理モデルを構築し、数理解析や数値計算によりその挙動を調べることで現象を理解しようとするスタンスをとる。このような背景から生物学は新たなフェーズを迎えている。本研究では生物学のこのような要請にこたえるため数理的な手法によって行われる。

形態形成現象に対する数理的アプローチ

生物個体をミクロに見てみると、膜をつくり外界から内部状態を隔離した構造を作っていることが分かる。その内部では様々な分子が働いていて分子間でネットワークを構築している。このような構造は細胞と呼ばれ生物の最小単位として考えられている。単細胞生

物であればここまでであるが、多くの真核生物ではこの細胞が多数集まって色々な組織を作る。それは表皮であったり柔組織であったり様々である。それらの組織は集まってさらに高次元な構造体である器官を構成する。植物であれば花や葉などがそれにあたる。多細胞生物は一般にこのように細胞・組織・器官・個体という階層構造を持つ。つまり生物個体は細胞という部品によって作りあげられた様々な組織や器官の集まりとしてみなされる。

生物は多くの細胞から作られた様々な組織や器官によって構成される。この考えは現代の生物学の知識では当たり前の事実である。しかしながら、生物個体の形づくり、これは形態形成現象と呼ばれるが、この現象はよく考えてみると非常に不思議な現象である。それは一つ一つの細胞は同じゲノムを持っているにも関わらず組織の中ではそれぞれの細胞が異なる役割を果たしているからである。器官についても同様で、様々な異なる組織が集まってある機能を持った器官を作り上げている。つまり生物体とは単なる細胞の寄せ集めではなく、各々の間でシグナルのやりとりなどの相互作用の結果、自己組織化により生じるものである。この謎めいた形態形成の仕組みを明らかにするためにはミクロな情報をもとにマクロな構造がどう組織化されるのかという疑問に答えることが必要である。

本研究では形態形成現象の謎に対して数理的なアプローチをとり、この自己組織化の現象を生み出すメカニズムについて考察する。具体的には形態形成を二つのプロセスに分けて考える。一つ目は位置情報の形成のプロセスである。それは分子や遺伝子が組織という空間中に作るパターン形成により実行される。もう一つのプロセスはパターン形成により生じた位置情報をもとに組織自体の変形が起こるというプロセスである。生物個体はこれら二つのプロセスからなるサイクルによって作り上げられている。つまり、形態形成現象とはこのようなサイクルから生じる組織または器官の変形の時間発展であると捉えることができる。

本論ではこのような形態形成現象を理解するために植物の形態形成に焦点を当てた。植物の形態は動物を比べるとシンプルに見えるが、その形を作る過程は実にさまざまであり、全てを扱うのは難しい。そこで、具体例を使って形態形成のプロセスを見ていくことにする。

本論は 3 章によって構成される。第 2 章では一つ目のプロセスだけに注目した例として植物ホルモンであるオーキシンのパターン形成について述べる。第 3 章ではパターン形成と組織の変形両方のプロセスを盛り込んだ例として葉の形態形成について述べる。第 4 章では総合討論として本論では扱わなかった多くの植物の形態形成現象についてとりあげており、それらの問題に対しても本論で行ったダイナミクスの視点を取り入れた解析の提言を行っている。また、近年注目されつつある植物の形態形成におけるメカニクスの役割について論じている。

本論の概要

以下に章ごとの概要を述べる。

第 2 章 : 植物のマクロな形態において規則的な構造が観察される。例えば茎頂分裂組織においては花や葉が規則的は位置にできるという葉序と呼ばれる現象が知られている。また、葉では葉脈という栄養分や水分を植物全体に行き届けるための網目構造が観察される。実はこれらの構造は植物ホルモンであるオーキシンの非一様パターンから生じる。植物はこのパターンを位置情報として利用している。これらの代表的なパターンは具体的にはスポットパターンと脈状パターンの二つである。スポットパターンは茎頂分裂組織などで花や葉のできる位置を決めるために、また脈状パターンは葉で葉脈を作るために必要なパターンである。分子は一種類にもかかわらず多様なパターンをつくる。オーキシンのパターン形成はオーキシンと PINFORMED(PIN)と呼ばれるオーキシンの排出キャリアタンパク質との相互作用によって生じるとされ、そのメカニズムは長い間論じられているが未だ決定的な理解は得られていない。本研究において、オーキシンと PIN の相互作用に関する三つの数理モデル((A)オーキシンフラックスモデル、(B)オーキシン濃度依存 PIN 分解モデル、(C)オーキシン自己フィードバックモデル)を構築し、オーキシンのパターン形成について調べた。三つの数理モデルについて様々なパラメータや初期条件のもと二次元六角格子上で数値計算により解析したところ、いくつかのモデルは一様分布、脈状パターン、スポットパターンといった三つの

異なるパターンを形成する能力を有することが明らかになった。さらに一次元格子空間を用いた近似により三つのパターンの安定性を数理解析により調べることでパターンを生成するパラメータ条件を決定した。これらの解析から、上述のモデルのうちモデル(B)だけがパラメータの値をわずかに変えることですべてのパターンを作り分けることができるメカニズムであることが分かった。実際の植物を考えてみると部位特異的にパターンを作り分ける必要があり、形態形成の戦略としてパラメータの値を使い分けることで安全にパターンの作り分けをしていると考察できる。

第３章：一般に葉は背腹軸に対して平坦な構造をもち、表側は光合成に特化しており、裏側は気孔を多く作り、ガス交換に特化しているという性質をもつ。近年の分子遺伝学的な研究から組織の形態変化と遺伝子発現のカップリングが平坦な葉を作るのということがわかってきている。平坦葉形成にはある仮説が提唱されており、その仮説は二つの実験事実から成り立っている。一つは裏表特異的に発現する遺伝子群が相互に抑制し合い、裏表の空間パターンを形成しているということ、もう一つは細胞分裂が葉の端でかつ裏表遺伝子群が発現する境界面という限られた場所で起きるということである。この仮説が平坦葉を形成すると信じられてきた。本研究では、この仮説について力学系の観点から議論するために、葉の形態を組織変形と遺伝子発現のダイナミクスをカップルすることでモデル化した。組織変形のダイナミクスには Vertex dynamics を用いた。このモデルでは多角形近似した細胞の形が多角形の頂点の位置に関する微分方程式により表現される。一方、遺伝子発現ダイナミクスは組織中の各々の細胞が発現する表裏遺伝子の活性を微分方程式により記述することでモデル化した。この解析により上述の仮説だけでは葉の成長は最大でも 60%程度にとどまり、高い確率で平坦な構造を作るには不十分であることがわかった。そこで極性のある二通りの細胞分裂規則(1)Periclinal division と(2)Anticlinal division の導入を試みた。(1)は細胞分裂面が組織の表面に対して平行に入る、一方(2)では分裂面が表面に対して垂直にはいるというメカニズムである。これらの導入の結果、分裂規則(1)では 90%以上の高い成功率で平坦な葉が形成されること明らかとなった。また、細胞分裂周期というパラメータに対してもロバス

トであるという結果を得た。一方、分裂規則(2)では対照的な結果であり、平坦な葉は作られづらかった。これらの解析から細胞分裂の規則は平坦な葉をつくるために必要な制御であると結論付けられる。植物細胞は動物のそれとは異なり組織内での自由度が小さい。そのため分裂面の方向性の制御は葉の形成だけでなく植物の正常な形態形成に必須のメカニズムであると期待される。

2 オーキシンパターン形成

2.1 序文

生物システムでみられるパターン形成ダイナミクスの理解はとても重要であり、近代生物学において主要な問題のひとつである。多くの生物システムにおいて実験から得られた知識があるにも関わらず、我々は未だにその自発的なパターンの形成のメカニズムやパターン多様性の制御のメカニズムを理解することはできていない。

本研究では植物の中で観察される植物ホルモン・オーキシンのパターンについて考える。オーキシンとは植物ホルモンのひとつであり、細胞分裂の促進、側芽の成長抑制、落葉・落果の抑制など植物の発生段階や様々な成長過程で働く。また、オーキシンはモルフォゲンとしても働き、細胞分化を制御する。これまでオーキシンを欠く変異体は得られておらず、植物にとって必須のホルモンであることが分かっている。オーキシンは拡散性の物質にも関わらず、植物組織中で特徴的なパターンを形成する。そしてこのパターンが植物形態形成に直接影響を与える(Vanneste and Friml,2009)。つまりオーキシンのパターンは植物形態形成の中で位置情報としての役割を担っている。

植物は多様なオーキシンパターンを形成する。それらのパターンは“スポットパターン”と“脈状パターン”の大きく二つに大別される。スポットパターンは茎頂分裂組織において花や葉の原基が形成される際に観察される(Benkova E, 2003)。茎頂分裂組織では細胞分裂が盛んに起こっているが、オーキシンがスポット状に濃度が高くなった所から新たな側生器官の分裂組織、つまり花や葉の原基が生まれる。このスポットパターンの配列は葉序というさらに高次なパターンを形成する。スポットパターンは根の側根形成時にも観察される(Benková et al., 2003; Dubrovsky et al., 2008)。オーキシンの代表的なパターンとしてもう一つ、脈状パターンが挙げられる。脈状パターンとは線状にオーキシン濃度が高い分布パターンを意味し、葉で観察される(Mattsson et al., 1999; Sieburth,1999; Scarpella et al., 2006)。この脈状パターンは網目構造を形成し、葉脈を作るための基盤となる。葉脈とは葉において水分や養分を運搬するための重要なネットワーク構造であり、脈状パターンの形成がうまくいかないことは植物にとって危険な状況と言える。このようにスポットパターンと脈状パタ

ーンの両方のパターンは一つの個体中の別々の部位で観察される。オーキシンというただ一種類の物質により形成されるのにも関わらず異なる部位で異なるパターンが形成されるのである。この事実から何か共通のメカニズムによりオーキシンパターンの多様性は説明され得るのではないかと考えさせられる。

オーキシンのパターン形成にはオーキシン自身に加えて、PINFORMED(PIN)というオーキシン排出タンパク質が必須である(Okada et al., 1991)。オーキシン分布のパターン形成はオーキシンと PIN の相互作用による自己組織化現象であると考えられている。実際に多くの実験からオーキシンのパターン形成は PIN の細胞内極性に大きく依存しているということが分かっている(Mattsson et al., 1999; Sieburth,1999; Scarpella et al., 2006)。オーキシンと PIN の相互作用はオーキシンのパターン形成にとって重要であるが具体的な相互作用のメカニズムが未だ不明な点が多い。さらに、パターンの多様性を生み出す本質的なメカニズムもわかっていない。本研究ではパターンの多様性を生み出す一つのメカニズムを理解し議論するために、スポットパターンと脈状パターンの両方を生み出すことのできる数理モデルを考える。

オーキシンのパターン形成は主にカナリゼーション仮説を基にした数理モデル研究が行われてきた(Sachs, 1981, 1991, 2000; Mitchison,1980,1981; Feugier et al., 2005; Fujita and Mochizuki, 2006a,b)。この仮説に基づいて構築されたモデル群はフラックスベースのもモデルと呼ばれ、オーキシンのフラックスと PIN の局在の間にポジティブフィードバックの存在を仮定している。この仮説に基づいたオーキシン脈状構造の形成過程は以下のように予想される。PIN は細胞膜に局在してオーキシンを細胞外に排出する。一度ある方向にオーキシンが流れるとさらに PIN が局在する。その結果、その方向のオーキシンフラックスはさらに増加する。カナリゼーション仮説を採用した一連の数理モデルは実際に脈構造パターンや分岐パターン(Fujita and Mochizuki 2006; Feugier et al., 2005)、さらには閉じたループ構造等を生み出すことができるという報告がなされている(Rolland-Lagan and Prusinkiewicz, 2005; Feugier and Iwasa, 2006)。これまでのところスポットパターンを形成

することのできるカナリゼーション仮説をもとにした数理モデルの報告はいくつかあるが、それらは事前にオーキシンの分解速度が格段高い特別な細胞を用意するなど、未知のメカニズムを仮定している(Stoma et al., 2008; Walker et al., 2013)。そのような仮定なしにはカナリゼーション仮説のみでスポットパターンを作り出すことは難しいと思われたが、本研究においてカナリゼーション仮説をもとにした脈状パターンとスポットパターン両方のパターンを生み出すメカニズムを見出した。

第二節では、フラックスベースのモデルのパターン形成能力について調べる。その具体的な数理モデルとして Fujita and Mochizuki (2006)により提唱されたモデルを採用し、それをオーキシンフラックスモデルと呼ぶ。本研究においてオーキシンフラックスモデルは脈状パターンを生み出すことができるが、スポットパターンを形成することはできないということを数理解析により示した。第三節では、オーキシンフラックスモデルが脈状パターンに加えスポットパターンも形成することができるようにモデル改変を行った。その改変により新たに“オーキシン濃度依存 PIN 分解モデル”と“オーキシンン自己フィードバックモデル”という二つの数理モデルの構築を行った。第四節、第五節ではモデル改変により得られた二つのモデルについて数値計算と数理解析を行い、それらの性質を調べた。第六節においては、改変モデルが現実に近い振る舞いをすることを特別な形状の成長する場での数値計算によって示した。最後に二つの改変モデルの性質を比較することで実際の植物で観察される多様なオーキシンのパターンの生成メカニズムについて議論する。

2.2 オーキシンフラックスモデルのパターン形成能

2.2.1 オーキシンフラックスモデル

オーキシンフラックスモデルは細胞のオーキシン濃度と細胞膜に局在する PIN の量のダイナミクスとして記述される。植物組織は二次元平面上に並べた六角格子細胞によりモデル化される(Fig. 1.1)。各細胞は$i \in N$により番号付けされ、細胞の各辺はkで番号付けし、隣接細胞 i'のk'番目の辺と向き合う。オーキシン濃度(a_i)と PIN の量(p_{ik})に関する常微分方程式は以下のように記述される。

$$\frac{da_i}{dt} = 1 - Aa_i - \sum_k f_{ik} \qquad (1)$$

$$\frac{dp_{ik}}{dt} = B\frac{g(p_{ik})}{\sum_l g(f_{il})} - p_{ik} \qquad (2)$$

$$f_{ik} = a_i p_{ik} - a_{i'} p_{i'k'} \qquad (3)$$

$$g(f_{ik}) = \frac{1}{1 + \exp\{-\alpha(f_{ik}/f_0 - \beta)\}} \qquad (4),$$

a_i、p_{ik}、f_{ik}はそれぞれ、細胞iのオーキシン濃度、細胞iのk番目の辺（細胞膜に相当する）における PIN の量、オーキシンフラックスを表す。各細胞ではオーキシンはコンスタントに合成され、分解速度 A で分解するとする。k番目の細胞膜からのアウトフラックスはオーキシン濃度(a_i)と PIN の量(p_{ik})との積で定義される(式(3))。トータルのフラックス(f_{ik})はインフラックスとアウトフラックスの差で与えられる。オーキシンの流入キャリアとして知られる AUX1 は細胞膜に一様に分布しているとし、またアポプラスト経路によるオーキシンの拡散は考慮しない。そのため、オーキシンは直接細胞間を移動すると仮定している。このモデルはオーキシンフラックスと PIN の局在との間に正のフィードバックの効果を仮定している。具体的には関数$g(f_{ik})$がその効果を表現している。$g(f_{ik})$はシグモイド状の関数であり、f_{ik}に依存した PIN の細胞膜kへの配向の強さを表す。また、このモデルはパラメータ α と β により特徴付けられ、それぞれフラックスセンシティビティとフラックスの閾値を意味している。f_0は B/A に等しい。PIN の分解は PIN の量に比例して起こるものとする。また上述の微分方程式は無次元化してある。無次元化については Fujita and Mochizuki (2006)を参照のこと。

2.2.2 オーキシンフラックスモデルの数値計算

数理モデルの数値計算は、二次元正方領域に 30×30 の細胞を敷き詰めた空間で行った。境界条件は周期境界で、微小時間幅(Δt=0.001)でオイラー法により数値的に計算した。初期条件は、オーキシン濃度については 1/A にランダムノイズを与えたもの、PIN 量は B/6 にランダムノイズを与えわずかに右方向にバイアスを与えた。1/A、B/6 は一様分布を与える定常解の値である。

Fujita and Mochizuki (2006)で報告されているように、オーキシンフラックスモデルは適切なパラメータの値で脈状パターンを作ることを確認した。数値計算による脈状パターンの時間発展を Fig. 1.2 に示す。数値解析により脈状パターン形成能は確認できたが、一方で広範なパラメータ領域において数値計算を行ったが、スポットパターン形成は認められなかった。

2.2.3 オーキシンフラックスモデルの数理解析

本節では対象とするパターンに相当する解の存在とその線形安定性を調べた。この数理解析では注目する三つのパターンは（0）一様分布、（1）脈状パターン、（2）スポットパターンの三種類である。本論で扱っている微分方程式系は二次元格子上で定義され、7×(細胞数)の変数からなり、極めて大きなシステムである。ここでは数理的にモデルを解析するためにシステムサイズを小さくする近似法である“三細胞近似法”を導入する。この近似法では三つの細胞を一次元で配列させた一次元周期境界構造を考える。三細胞は注目するパターン、スポットパターンと脈状パターンを生み出すことのできる最小サイズである。この簡約化したシステムの変数は 9 個で、各細胞のオーキシン濃度(a_i) (i=1,2,3)、各細胞の左右の細胞膜に定義される PIN 量(p_{ik}) (i=1,2,3; k=l (left), r (right))である。注目するパターンは以下に述べるように変数間の等式や不等式で特徴づけられる。

(0) 一様分布の条件

$$a_1 = a_2 = a_3$$

$p_{1l} = p_{1r} = p_{2l} = p_{2r} = p_{3l} = p_{3r}$

(1) 脈状パターンの条件

$a_1 = a_2 = a_3$

$p_{1l} < p_{1r}, \quad p_{2l} < p_{2r}, \quad p_{3l} < p_{3r}$

or

$p_{1l} > p_{1r}, \quad p_{2l} > p_{2r}, \quad p_{3l} > p_{3r}$

(2) スポットパターンはシンク型とソース型二つに分類することができ、それぞれに対し異なる条件が付与される。

シンク型オーキシンマキシマム

$a_1 < a_2 \; and \; a_2 > a_3$

$p_{1l} < p_{1r}, \quad p_{1r} > p_{2l}, \quad p_{2r} < p_{3l}, \quad p_{3l} > p_{3r}$

ソース型オーキシンマキシマム

$a_1 < a_2 \; and \; a_2 > a_3$

$p_{1l} > p_{1r}, \quad p_{1r} < p_{2l}, \quad p_{2r} > p_{3l}, \quad p_{3l} < p_{3r}$

この解析ではモデルを特徴づける二つのパラメータを変えながら、それぞれのパターンに相当する解の存在と安定性を数値的に調べた。選択したパラメータのもとパターンの条件を満たす解をニュートン法により探索し、その解に対し安定性を決定するため線形安定性解析を行った。

この数理解析からフラックスセンシティビティ α とフラックスの閾値 β 空間の広い領域で脈状パターンの解が存在し安定であることがわかった(Fig 1.3)。α が小さい時には一様分布が安定であり、脈状パターンは不安定解であることが分かる。数理解析の結果、オーキシンフラックスモデルはスポットパターンを定常解として持たないことが分かった。この結果は数値計算の結果と定性的に一致する。

2.2.4 オーキシンフラックスモデルの解析のまとめ

α が十分小さいとき一様分布は唯一安定解として存在する。しかしながら β の値を固定し α の値を大きくしていくと臨界値 $\alpha = \alpha^*$でピッチフォーク分岐が起き、一様分布は不安定な解となり、新たに脈状パターンが安定な解として出現する。このピッチフォーク分岐により一様分布の等方的な対称性が破れ、代わりに異方的な解である安定な脈状パターンが出現する。

数値計算と数理解析によりオーキシンフラックスモデルは、脈状パターン形成能はあるもののスポットパターンを形成することができないことを示した。これは定常状態における PIN の総量の保存という観点から直観的に理解することができる。各細胞の PIN の総量$P_i(=\sum_k p_{ik})$の微分方程式は$\frac{dP_i}{dt} = B - P_i$であり、$t \to \infty$のとき B に収束する。オーキシンのフラックスはオーキシン濃度と PIN 量の積であるから、オーキシン濃度に対して線形に増加する。そのため細胞内の総 PIN 量が保存されていると、オーキシン濃度が高くなればなるほどオーキシンは細胞外に排出されることになる。つまり、一つの細胞にオーキシンを高濃度で保持することができず、たとえ形成されたとしても一過的である。これがオーキシンフラックスモデルではスポットパターンを形成できないことの直観的な理解である。加えて簡単な近似から周囲にオーキシン濃度が低い細胞で囲まれた時に中心の細胞がとれるオーキシン濃度の高さに制限があることもわかる。ここで等方的な分布をもつ 7 つの細胞を考え、中心細胞と周辺細胞のオーキシン濃度をそれぞれa_cとa_sとする。このときもし中心細胞が周辺細胞よりも多くオーキシンを保持しようとすると、フラックスは全てのkに対し

$f_{ck} < 0$となる。このことと、式(1)の定常状態から$a_s = \{(A+B)a_c - 1\}/6B$が得られ、$1/A < a_c < 6a_s$という条件があることが分かる。最後の不等式は中心細胞のオーキシン濃度は周辺細胞の濃度の 6 倍を超えないことを意味している。

2.3 オーキシンフラックスモデルの改変

前節では数値計算と数理解析によりオーキシンフラックスモデル（モデル(A)）が脈状パターンを生み出すことはできるがスポットパターンは作れないことを見た。オーキシンフラックスと PIN の局在の間の制御関係を保持したままスポットパターンを形成するためにはオーキシンフラックスモデルを改変する必要がある。そこで、注目する二つのパターンを実現するための具体的なメカニズムを考える。論理的に考えて二通りある。一つは PIN 分解にオーキシン濃度に依存した新たなフィードバック効果を考える(Fig 1.4(a))。もし PIN の総量が減少すれば、細胞はオーキシンを排出することができなくなると考えられ、結果として高オーキシン濃度の細胞が得られるだろう。そこでオーキシンフラックスモデルの PIN のダイナミクス(式(2))において細胞の辺について和をとった微分方程式$(dP_i)/dt = B - CP_i$ (P_iは細胞 i の PIN の総和)を考える。オーキシン(a_i)に依存したP_iのダイナミクスの改変は B(a_i)とするか C(a_i)とするかの二通りに思えるかもしれない。しかしながら、PIN の総和のダイナミクスのレベルで考えるならば、どちらを採用するにしてもa_iが増えたらP_iが減るというダイナミクスの基本的な振る舞いは不変である。本研究では PIN の分解がオーキシン濃度に依存するメカニズムを採用した。この数理モデルをモデル(B)として“オーキシン濃度依存 PIN 分解モデル”と呼ぶことにする。もう一つの改変は、オーキシン合成において自己フィードバックの効果を考える(Fig. 1.4(b))。もしオーキシン合成が自己触媒的に強化されれば、ある細胞は高オーキシン濃度を維持できるであろう。この二つ目のモデルをモデル(C)として“オーキシン自己フィードバックモデル”と呼ぶことにする。オーキシンのダイナミクスにおいて、オーキシンレベルが高くなったら自身を増やすメカニズムとして双安定のダイナミクスを採用した。実は合成分解は一つの関数で表現できるので、これを見て合成を改変したかとみるか、分解を改変したかとみるかは解釈の問題であり、具体的なメカニズムを探

索するときに問題になるだけでモデリングに関しては等価である。本研究では扱いやすいという利点から生物の数理モデリングでよく用いられるパーツとして合成項に Hill 関数を加えるという改変を行った。オーキシンフラックスモデルを基礎として二つの改変モデルを構築し導入した。

2.4 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの解析

2.4.1 オーキシン依存 PIN 分解モデル

オーキシンフラックスモデルに対し PIN 分解がオーキシン濃度に依存して非線形的に起こるという効果を加える。具体的には、以下のように微分方程式(2)を式(5)に書き換える。

$$\frac{dp_{ik}}{dt} = B\frac{g(f_{ik})}{\sum_l g(f_{il})} - \left\{1 + C\left(\frac{a_i^\gamma}{K^\gamma + a_i^\gamma}\right)\right\}p_{ik} \qquad (5),$$

パラメータについては、C はオーキシン濃度に依存した PIN 分解の強度を、K は PIN 分解の閾値、γ は Hill 係数をそれぞれ表す。PIN 分解の閾値(K)は、このモデルを特徴づける量であり、オーキシン濃度に対して PIN がどのくらい分解しやすいかを意味している。

2.4.2 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算

数理モデルの数値計算は、二次元正方領域に 30×30 の細胞を敷き詰めた空間で行った。境界条件は周期境界で、オイラー法により微小時間幅(Δt=0.001)で数値的に計算した。初期条件は、オーキシン濃度については一様にランダムな値を与え、PIN 量もランダムに値を与え、わずかに左右方向にバイアスを与えた。

オーキシンフラックスモデルと同様にオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルも脈状パターンを形成することを確認した。脈状パターン形成の時間発展の様子を Fig. 1.5(a)に示す。数値計算の結果、オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルが脈状パターンに加え、スポットパターンも形成することを観察した。パラメータの値は脈状パターンを形成するものとは

異なった。初期条件の値は$a_i \in [0, 0.5]$でランダムに与えた。スポットパターン形成の時間発展を Fig 1.5(b)に示す。

数値計算により観察されたスポットパターンは、その周囲の細胞のオーキシン濃度と比べると高い状態で維持されている。周囲の細胞の PIN の分布を観察すると、スポット方向の細胞膜に局在していることが分かる(Fig. 1.5(c))。PIN はオーキシンの排出キャリアであるから、観察されるスポットは周囲の細胞からのオーキシンの流入により維持されていると考えられる。この意味で、オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルにより形成されるスポットはシンク型のオーキシンマキシマムといえる。

2.4.3 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数理解析

本節ではオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルについて三細胞近似法（2.2.3 参照）を用いた数理解析の結果について述べる。パラメータ空間(K, α)において注目するパターン（一様分布、脈状パターン、スポットパターン）に相当する解の存在と安定性を Fig. 1.6 に示す。Fig. 1.6 から分かるようにパターンの存在と安定性は K の値に大きく依存している。一様分布は、パラメータ空間の広範囲で不安定であるが、K と α の値が小さい時に安定な解として存在する。脈状パターンは K の値が小さい時は存在しないが、その値を大きくしていくと不安定解が生じ、さらにある値を超えると安定な解となる。K の値が大きいときスポットパターンの解は存在しない。しかし、K の値を徐々に小さくしていくと不安定解が出現し、さらに小さくしある値を過ぎると安定な解が現れる。これらのことからオーキシン濃度に対する PIN 分解の閾値のパラメータ K がこのモデルを特徴づける量であることが分かる。

上述したように注目する三つのパターンの解の存在と安定性に関する相図を示したが、これらの相図を重ね合わせることにより一つの相図を得ることができる。この操作により複数のパターンが、あるパラメータ条件下で共存するかどうかが分かる。例えば Fig 1.7III においてパラメータ K と α が赤い領域の値をとる場合、オーキシンと PIN の初期分布に依存して脈状とスポット両方のパターンが得られる。この状態を“脈状パターンとスポットパターンが共存する”という。あるパラメータ領域では脈状パターンが安定な解として存

在し（Fig 1.7 I）、またある領域ではスポットパターンが安定に存在する（Fig 1.7 II）。Fig 1.7 IV のように一様分布とスポットパターンが共存する領域もある。しかし、オーキシンフラックスモデルと同様に脈状パターンと一様分布が共存する領域は認められない。

2.4.4 オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの解析のまとめ

オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの振る舞いはパラメータ *K* の値に大きく依存する。*K* の値を徐々に大きくしていくと、一様分布、一様分布とスポットの共存、スポットのみ、スポットと脈状の共存、そして脈状のみというように出現するパターンが変化する。数値計算によっても *K* の値を大きくしていったとき上述の順序でパターンが出現することを確認した。これは数値計算によって調べられたパラメータ空間の解構造が数理解析によって得られる構造と定性的に等しいことを示唆している。一連の解析の結果から、オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルはパラメータの値を選ぶことによって安定に脈状パターンとスポットパターンを作り分けることができると結論付けられる。

2.5 オーキシン自己フィードバックモデルの解析

2.5.1 オーキシン自己フィードバックモデル

脈状パターンとスポットパターンの両方を実現しうる第二のメカニズムを考える。オーキシンフラックスモデルの枠組みを基本とし、オーキシンのダイナミクスにオーキシンの自己触媒効果を加える。具体的には、以下のように微分方程式(1)を式(6)に書き換える。

$$\frac{da_i}{dt} = 1 + D\frac{a_i^n}{a_i^n + K_a^n} - Aa_i - \sum_k f_{ik} \qquad (6),$$

D はオーキシンの自己フィードバックの強さを、K_a はオーキシン自己フィードバックの閾値、*n* は Hill 係数をそれぞれ表す。

2.5.2 オーキシン自己フィードバックモデルの数値計算

数理モデルの数値計算は、二次元正方領域に 30×30 の細胞を敷き詰めた空間で行った。境界条件は周期境界で、オイラー法により微小時間幅(Δt=0.001)で数値的に計算した。初期条件は、オーキシン濃度については一様にランダムな値を与え、PIN 量もランダムに値を与え、わずかに左右方向にバイアスを与えた。オーキシンフラックスモデルと同様にオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルも脈状パターンを形成することを確認した。脈状パターン形成の時間発展の様子を Fig. 1.8(a)に示す(t=0, 2.8, 3.6, 5.2)。このモデルで現れる脈状パターンはトラベリングパルスのように脈状方向に伝搬することで形成される。

数値計算の結果、オーキシン自己フィードバックモデルが脈状パターンに加え、スポットパターンも形成することを観察した。パラメータの値は脈状パターンを形成するものとは異なる。スポットパターン形成の時間発展の様子を Fig. 1.8 (b)に示す(t=0, 0.04, 0.4, 3.2)。初期条件の値は$a_i \in [0, 0.5]$、$p_{ik} \in [0, 0.5]$でランダムに与えた。

数値計算により観察されたスポットパターンは、その周囲の細胞のオーキシン濃度と比べると高い状態で維持されている。スポットとなる細胞とその周辺の細胞における PIN の分布パターンを観察すると、スポットとなる細胞は活発にオーキシンを合成し、しきりに細胞外に排出することでスポットを維持していることがわかる（Fig. 1.8 (c)）。この意味で、オーキシン自己フィードバックモデルで形成されるスポットをソース型のオーキシンマキシマムと呼ぶ。

2.5.3 オーキシン自己フィードバックモデルの数理解析

本節では前節までと同様にオーキシン自己フィードバックモデルに対し三細胞近似法を用いた数理解析の結果について述べる。三細胞近似法については 2.2.3 参照。パラメータ空間(A, D)において注目するパターン（一様分布、脈状パターン、スポットパターン）に相当する解の存在と安定性を Fig. 1.9 に示す。これら二つのパラメータがこのモデルを特徴付けていて、A と D がある程度大きく、バランスしているところで安定なスポットパターンが存在することが分かる。D を大きくしていくとフラックスの効果が相対的に弱くなり

細胞自律性が強くなる。この過程で A と D のバランスがオーキシンのダイナミクスが双安定を形成するのに適切な場合、スポットパターンができるパラメータ領域が現れると考えられる。

注目する三つのパターンの解の存在と安定性に関する相図を重ね合わせることにより一つの相図を得る。この操作により安定性の相図をパターンごとに区画化することができる（Fig. 1.10）。スポットパターンと脈状パターンに注目すると、安定なスポットパターンが存在するパラメータ領域は、安定な脈状パターンが存在する領域に完全に含まれていることがわかる（Fig. 1.10 II）。このことは、スポットパターンのみをつくるパラメータ条件は存在しないということである。言い換えれば、スポットパターンが生じる条件下では初期状態によっては脈状パターンも同時に生じる場合があるということである。

2.5.4 オーキシン自己フィードバックモデルの解析のまとめ

オーキシン自己フィードバックモデルに対する数理解析の結果から、パターンに対応する解の存在と安定性はパラメータ A と D の比に大きく依存することが分かった。二つのパラメータの比が適切でないと、スポットパターンの安定性は崩れる。このパラメータの比の依存性は数値計算でも確認される。また、この解析では初期値依存的にスポットパターンは常に脈状パターンと共存してしまうということも明らかになった。このような共存は数値計算においても観察されている。つまり、オーキシン自己フィードバックモデルにおいてパラメータの値を調節することでパターンを選択することは不可能である。

2.6 葉と茎頂分裂組織におけるパターンの数値シミュレーション

本節ではオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルが植物の組織の形や成長を模倣した空間でシミュレーションを行うことにより、実際に植物で観察されるようなパターンを生成できることを示す。葉様の構造と成長を組み込むことで葉の発達でみられる葉脈の枝分かれ構造が観察された。また、茎頂分裂組織(SAM)様構造と細胞分裂を組み込むことでメリステム上における葉原基や花原基のパターンを模したスポットパターンが観察された。

2.6.1 葉脈形成

葉の形は二つの円弧($(x-t)^2+\{y-(t+25)\}^2 \leq \left(\sqrt{2t}\right)^2$ と $(x-t)^2+\{y+(t-25)\}^2 \leq \left(\sqrt{2t}\right)^2 (0 \leq x \leq 50)$)に囲まれた格子領域でシミュレーションした。葉の成長はそれら二つの円弧の直径を増加することで起きる。葉の付け根に相当する細胞以外は領域の境界においてオーキシンと PIN の量はそれぞれa_i=0.5 とp_{ik} =20.0 に固定している。計算領域は、領域周辺部に初期値a_i=0.5, p_{ik}=20.0 の細胞が新たに加わることで増大する。領域成長は 3,200 計算ステップごとに起こるものとした。このような非正方格子上でオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算を行った結果を Fig. 1.11 に示す。この計算には脈状パターンを形成するパラメータセット(K=60, C=1200, γ=8, α=25, β=2, A=2, B=120)を用いた。

計算領域が小さいうちは、その領域の中央に一筋の脈状パターンが形成されるが、領域が拡大するにつれてその中心脈から枝分かれする脈が現れる。これは実際の葉脈の発達過程に似ている。Fujita と Mochizuki はオーキシンフラックスモデルで様々な格子領域でシミュレーションすることで葉脈の多様性を実現できることを示しており(Fujita and Mochizuki, 2006)、そのモデルを改変して得られたオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルも多様な葉脈を形成しうる能力を有していると考えられる。

2.6.2 茎頂分裂組織上での原基配列形成

メリステムの構造はドーム状であり、細胞分裂によってドーム中の細胞は周辺部に追いやられるように移動する。オーキシンのダイナミクスと細胞移動はメリステムの表面層(L1 層)で主なプロセスが生じていると考えられているため、数値計算ではメリステムの構造を二次元の格子空間中の円領域で近似した。また、細胞の移動は分裂による細胞数増加により押しやり効果で起こるものとし、移動は細胞が周辺部にシフトすることで起こるというようにモデル化した。細胞分裂と細胞移動のルールを Fig.1.12(b)に示す。

細胞分裂により新たに生じた細胞は初期状態を$a_i \in [0,\ 0.2]$, $p_{ik} \in [0,\ 20.0]$であると設定した。円領域外でのオーキシンと PIN の量はゼロに固定した。また、細胞分裂と細胞

移動は計算ステップ 16,000 ごとに起こるものとした。上述の条件で数値計算した結果をFig.1.12(a)に示す。この計算においてスポットパターン形成するようなパラメータセット(K=1.1, C=1200, α=10, β=2, γ=8, A=2, B=120)を使用した。

数値計算の結果、実際のメリステム上での原基形成のようなスポットパターンが観察された。スポットはメリステム上で擬周期的に出現し、周辺部へと移動していく。新しいスポットは古いスポットからある程度離れた位置に出現するようにみえる。我々の数値計算では良く順序づけられた葉序のようなパターンは観察されなかったものの、定性的にはSAM 上での現象をよく模している。おそらく実際の植物ではスポット配列の規則正しさを増す付加的な制御が存在すると考えられる。

2.7 考察

本研究では植物のモルフォゲンであるオーキシンが作り出すパターンの多様性を実現しうるメカニズムについて調べた。数値計算や数理解析により、カナリゼーション仮説を基にしたオーキシンフラックスモデル（モデル(A)）では期待されるパターンの多様性を説明することはできないことを明らかにした。カナリゼーション仮説は葉脈形成を理解するスタンダードな考え方であるが、オーキシンフラックスモデルはスポットパターンを作ることはできない。

スポットパターンや脈状パターンのようなオーキシンのパターンの多様性を生み出すためには、オーキシンフラックスと PIN の局在との間の正のフィードバック効果だけでは不十分である。定常状態において各細胞で PIN の総量が保存することがスポットパターンの形成を阻んでいる。パターンの多様性を実現するためには付加的な効果が必要であった。そこで、オーキシンフラックスモデルから出発して、二通りの改変を行うことで二つの新たな数理モデル、オーキシン濃度依存 PIN 分解モデル（モデル(B)）とオーキシン自己フィードバックモデル（モデル(C)）を得た。さらにこれらの改変モデルに対し数値計算と数理解析を行うことにより、二つのモデルともパラメータの値を調節することで脈状パターンとスポットパターン、両方のパターンを作り出すことができること明らかにした。

パターンの多様性を説明するために重要なパラメータはモデルによって異なる。モデル(B)では PIN 分解に対するオーキシン濃度の閾値を表す K が強く影響しており、一方モデル(C)ではオーキシンの自己フィードバックの強さを表す *D* とオーキシンの分解レベルを表す *A* に大きく依存する。

植物は正常な形態形成のために様々な器官で適切なオーキシンパターンを作らなくてはならない。茎頂分裂組織（SAM）では花や葉の原基の位置を決定するためにスポットパターンを作らなくてはならないし、葉では葉脈分化のために脈状パターンを形成しなくてはならない。本研究の結果から実際の植物におけるパターン形成の多様性について説明することができる。モデル(B)を使ってパターンの作り分けを説明するならば、植物は SAM においては *K* の値を小さくすることでスポットパターンを実現し、一方、葉では *K* の値を大きくすることで脈状パターンを実現していると考えられる。モデル(A)は Fig. 1.7 でも示したように、スポットパターンと脈状パターンが共存してしまうようなパラメータ領域を持つ。このような条件は正常な形態形成にとって非常に危険であるから避けられるべきである。他方、植物がモデル(C)のメカニズムを採用しているとすると、SAM ではスポットパターンを形成するためにパラメータ *D* と *A* の値がバランスさせていると考えられ、葉で葉脈を形成する場合には、脈状パターンを形成するのに適したパラメータ領域の値を使っていると考えられる。

オーキシンフラックスモデルの改変により得られた二つのモデルはともに期待されたオーキシンの空間分布の多様性を実現しうる。しかしながら、実はこれら二つのモデルの間にはスポットパターンのロバストネスに関して違いがある。モデル(C)では安定なスポットパターンを作るパラメータ領域は、安定な脈状パターンを作る領域に完全に含まれている。これが意味することはスポットパターンが安定な時、同時に脈状パターンも安定であるということである。そのような条件下では、得られるパターンはオーキシン濃度と PIN 量の初期状態に依存する。言い換えるならば、モデル(C)を使う時には、たとえパラメータの値が適切であったとしても、スポットパターンだけを得ることはできない。モデル(B)では、ス

ポットパターンのみをつくることのできるパラメータ領域が存在したり、脈状パターンのみをつくる領域が存在する。モデル(B)のメカニズムを使うならば、植物の体の部分に依存してパラメータの値を調節することでスポットパターンと脈状パターンとの間のスイッチが可能である。他方、モデル(C)のメカニズムではパラメータの値を調節することでパターンを切り替えるようなロバスト性はない。このような観点から考えると、モデル(C)と比べるとモデル(B)のメカニズムの方が実際の植物ではオーキシンの多様性を説明するという点においてより信頼性のあるメカニズムであると考えられる。つまり、オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルは、少なくともカナリゼーション仮説をもとにしたメカニズムにおいては、合理的な方法でオーキシンパターンの多様性を生み出すことができると結論づけられる。

本研究ではモデル(B)を特別な計算領域の形とその成長の中で実装することで実際の植物で観察されるようなリアリスティックなパターンを作ることができることを示した。同時にそれらのパターンを形成するには適切なパラメータを設定する必要があることも分かった。葉様領域上で脈状パターン形成のパラメータで計算すると枝分かれした葉脈構造が得られ、細胞分裂を組み込んだ SAM 様領域上でスポットパターン形成のパラメータで計算すると原基様スポットパターンが得られる。植物で観察されるパターンの違いはパラメータの違いと空間構造の違いに依存すると考えられる。

これまでカナリゼーション仮説の欠点として、途切れた脈状のような構造は説明することができず、連続した脈構造しか形成できないということが挙げられてきた。実際に *van3* 変異体(Scarpella et al., 2006)のようなノックアウト変異体の表現型では葉でとぎれとぎれの脈構造が島のようにあらわれるパターンが観察されている。本研究で考案された新たなモデルではそのようなとぎれとぎれの脈構造も説明できる。

数理的に解析することで植物がわずかな違いによって異なる組織で脈状パターンとスポットパターンを切り替えることの出来得るメカニズムを示した。実際の植物のパターン形成を理解するにはどちらのメカニズムが適切であるのかを実験的に検証する必要がある。ここでは検証方法について述べる。

まず、改変して得られたモデルに対応する可能性のある実験事実について述べる。モデル(B)に対応する実験的事実としてはオーキシンにより合成が活性化されるサイトカイニンによる PIN の不活性化があげられる。PIN は細胞膜上で働くが細胞質中にエンドソームにより移動するとその活性は失われる。オーキシンにより *LONLEYGUY*(*LOG*)という遺伝子の発現が正に制御されていることが報告された（De Rybel et al., 2014）。*LOG* はサイトカイニン(CK)合成酵素をコードしている(Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009)。またサイトカイニンにより PIN の細胞膜への輸送が抑制されることが報告されている（Marhavý et al., 2011）。つまり、分子的にはオーキシンにより局所的に合成されたサイトカイニンにより細胞膜で働く PIN の量が抑制されている。ここでは便宜上オーキシンに依存した *LOG* 発現とそれに伴う CK 合成誘導、PIN の不活性化(モデルの言葉で言うならば分解)を LOG-CK 経路システムと呼ぶことにする。一方、モデル(C)に対応する実験的事実は IAA 自身によるインドール-3-酪酸-インドール-3-酢酸(以下 IBA-IAA)経路の活性化があげられる。活性型オーキシンはインドール-3-酢酸(IAA)であることが知られており、その生合成は大きく分けて二つある。それらはトリプトファンを介した *de novo* 経路と storage form からの供給である。トリプトファンから合成されるトリプトファン依存 *de novo* 経路も細かく見ると複数の経路からなる。そのうちで植物ではインドール-3-ピルビン酸を介した経路が主経路と考えられており、これらの反応を触媒する酵素も同定されている。それらをコードする遺伝子は *TAA* と *YUCCA* である。また別の経路としてインドール-3-アセトアミドを介した *AMI1* という遺伝子によって触媒される経路もある。以上のような *de novo* 経路の他に植物はオーキシンをインドール-3-酪酸(IBA)や結合型オーキシンという IAA にアミノ酸や糖が結合した化合物などの storage form の形から変換するという経路によっても生成される。このように IAA を作り出すには多くの経路が存在するが、実はこれらのほとんどの経路は IAA が自身の合成を抑制するような制御がなされていることが分かっている(Suzuki et al., 2015; Paponov et al., 2008)。しかし、IBA からの IAA への変換経路のみがオーキシン自身によって正に制御されているという報告がある（Strader et al., 2011）。IBA は IAA よりも炭素鎖が

二つ分長い構造をもつ。IBA から IAA への変換は多段階の反応で構成され、*IBR*、*ECH*、*PED* などのβ酸化で働く遺伝子によってコードされる酵素群により触媒される。

以上のことを踏まえ、モデルの選択としてまず挙げられるのが PIN のパターンの観察である。オーキシンのスポットの周囲の細胞の PIN のパターンは、モデル(B)をもとに考えるならばスポットに対してオーキシンが流れ込むように PIN は配置する（シンク型）と予想され、モデル(C)をもとにして考えるならば、スポットからオーキシンが流れ出るように PIN が配置するよう（ソース型）なパターンが観察されるはずである。実際の茎頂ではオーキシンスポットのまわりの PIN の配置は、オーキシンがスポットに流れ込むように配置（シンク型）されている観察結果が得られている(Bayer et al., 2009; Reinhardt et al., 2003)。これはモデル(B)の結果と一致する。また、実験的にはそれぞれの仮定のもと働くと予想される特定の遺伝子発現からもモデル選択が可能である。スポットパターンでの関連遺伝子の発現は、モデル(B)をもとに考えるならば *LOG* の発現が促進されると予想され、モデル(C)をもとにして考えるならば *IBR* などのβ酸化経路の遺伝子の発現が促進されると予想される。これらの解析は蛍光タンパク質を融合した *LOG::LOG-GFP* や *IBR::IBR-GFP* などの遺伝子導入植物体においてこれらの発現と *DR5::YFP* などの共発現を解析することで検証できると考えられる。葉脈形成においても同様の解析が可能であり、仮にオーキシンの脈で *IBR* などの遺伝子群が働いている場合、脈パターンを作るにはオーキシン合成の自己フィードバックの効果が重要であることが示唆できると考えられる。

現在までに得られている変異体の解析と我々の研究結果との比較もすることができる。本研究の結果からオーキシンに依存した PIN の活性の低下はオーキシンのスポットパターン形成に必要であることが示唆されたが、実際の植物のことを考えた場合、*LOG* 遺伝子をノックアウトすればスポットパターンは作られづらくなると考えられる。実はイネの *log* 変異体では floral meristem の活性が著しく低下し、野生型と比べて顕著に花ができづらくなる（Kurakawa et al., 2007）。またシロイヌナズナにおいてもイネほど強い表現型はでないものの floral meristem の活性が低下するとの報告がある（Kuroha et al., 2009）。これら

の結果は茎頂でスポットパターンを作るには LOG-CK 経路システムが必要である可能性を示唆している。一方で葉に関して考察してみると、我々のモデル研究の結果からは *LOG* 遺伝子をノックアウトしても葉脈は正常に作られるはずであると予想されるが、これも *log* 変異体の表現型をみたところ葉脈は正常に作られていることが確認できた（Kuroha et al., 2009）。実際の植物体でオーキシン濃度の閾値に相当するのはオーキシンに依存した LOG-CK 経路システムの働き具合であると考えられる。葉ではこのシステムの活性が低い（モデルの言葉で言えば *K* が大きい）と予想される。実験的には LOG-CK 経路システムの遺伝子（*MP*, *LHY*, *LOG* など）発現のレベルを葉と茎頂で比較することがあげられる。また葉で LOG-CK 経路の遺伝子群を強制発現させてスポットができるかどうか観察することにより、より確かなことがわかると考えられる。オーキシンのパターン形成の多様性を生み出すのは PIN の細胞膜と細胞質の間の輸送の制御が主要なメカニズムであると考えられる。LOG-CK 経路以外でも *van3* 変異体では葉でスポットやとぎれとぎれの脈状パターンが観察されている。VAN3 は PIN の細胞膜と細胞質の輸送の調整に関連するタンパク質であると考えられている(Koizumi et al., 2005; Sieburth et al., 2006)。一方で IBA からの IAA 合成経路を触媒すると考えられている酵素群の変異体では野生型型と比較して花芽分裂組織の形成の異常は観察されない（Strader et al., 2011）。この観察結果からオーキシンスポットに対する PIN の配向の観察と合わせても IBA-IAA 経路が茎頂でのスポットパターン形成に関与している可能性は低いと考えられる。

本研究ではカナリゼーション仮説を基礎としたオーキシンのフラックスのフィードバックによるパターン形成について調べた。オーキシンのパターン形成のモデルには隣接細胞オーキシン濃度依存モデルという別のクラスのモデルがある(Reinhardt et al., 2003; Jönsson et al., 2006; Smith et al., 2006; Merks et al., 2007; Sahlin et al., 2009)。この別クラスのモデルは、オーキシンと PIN の間にオーキシンフラックスモデルとは異なる相互作用のメカニズムを仮定している。具体的には隣接する細胞のうち最もオーキシン濃度が高い細胞に接する細胞膜に PIN が蓄積しやすいという仮定をおく。これらのモデルを扱った研究

も多く行われており、スポットパターンやストライプパターンを形成することができるという報告がなされている。本研究以前では、隣接細胞オーキシン濃度依存モデルがスポットパターンを形成することのできる唯一のモデル族であった。しかし、本研究ではカナリゼーション仮説の基本的な解釈にわずかな改変を与えることでスポットパターンを生み出すことのできるもう一つのメカニズムを見つけることができた。

本研究はモデルドリブンな研究であり、実験的にその有効性を示す必要があると考えられるが、数理モデリングによりカナリゼーション仮説に基づいたパターンの多様性を生み出すメカニズムを提案することができた。また、オーキシンフラックスモデルのパターン形成能の限界を示すことができた。本研究は実際の植物の形成するオーキシンのパターンの多様性を生みだす根本的なメカニズムを理解するのに役立つと思われる。

Figures

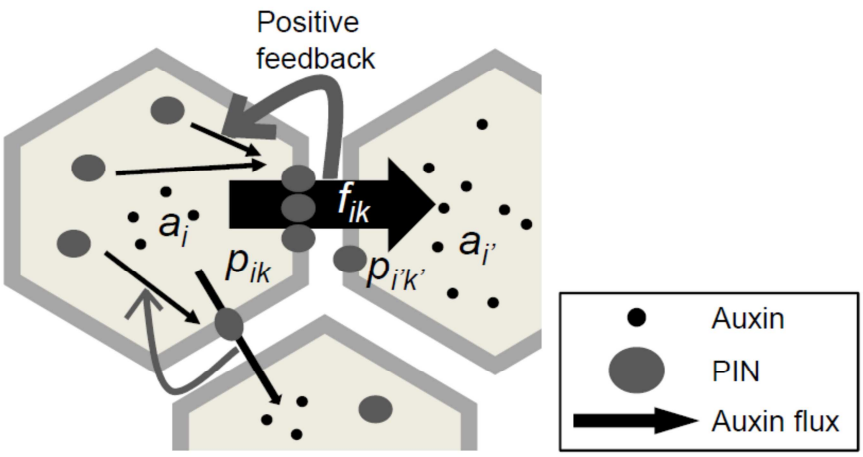

Figure 1.1
オーキシンフラックスモデルの概念図。数理モデルはオーキシンフラックスと PIN の配向の間に正のフィードバックの効果があると仮定する。オーキシン濃度(a_i)とオーキシン排出キャリア(p_{ik})の量は各細胞と六角形に近似した細胞の各辺（細胞膜）にそれぞれ与えられる。ある細胞の *k* 番目の細胞膜から流出するオーキシンのアウトフラックスはオーキシン濃度(a_i)と PIN(p_{ik})の積で定義される。また、トータルフラックス(f_{ik})は、アウトフラックスとインフラックスの差によって定義される。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

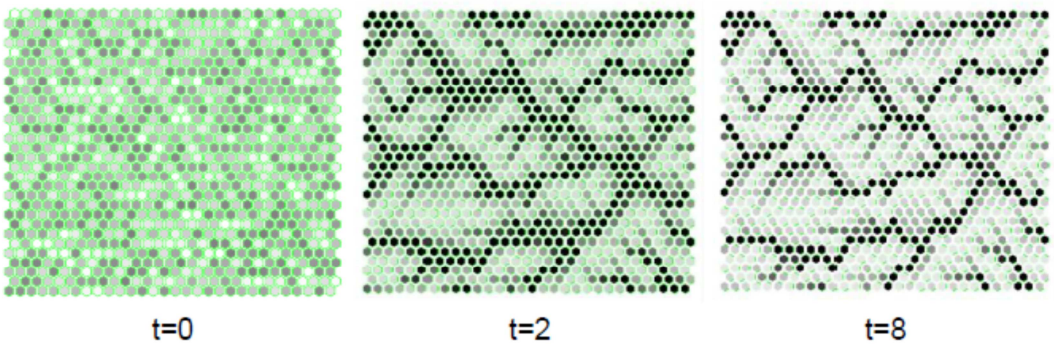

Figure 1.2
オーキシンフラックスモデルの数値計算で得られるオーキシンのパターン。オーキシン濃度の脈状パターンの時間発展。グレーレベルはオーキシン濃度を表し、グリーンレベルはPIN の量を表している。使用したパラメータは A=1, B=10, α=50, β=1 である。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

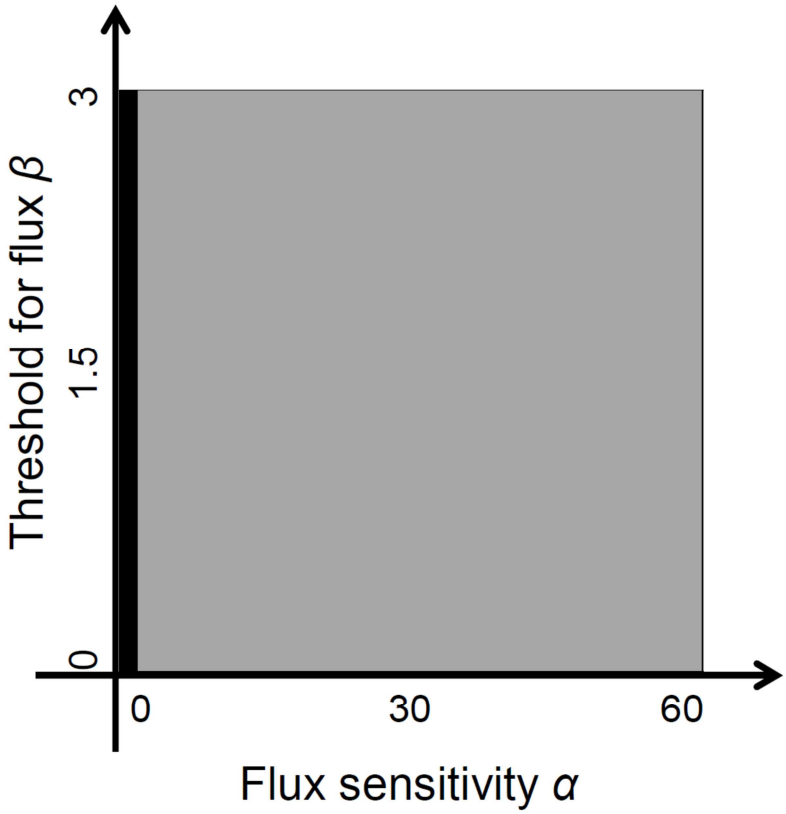

Figure 1.3
オーキシンフラックスモデルの *α*-*β* 空間におけるパターンの存在と安定性。注目するパターン、(0)一様分布、(1)脈状パターン、(2)スポットパターンに対する線形安定性解析。黒はパターンに相当する解が存在し安定、グレーは、解は存在するが不安定、白は解が存在しないことをそれぞれ意味する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

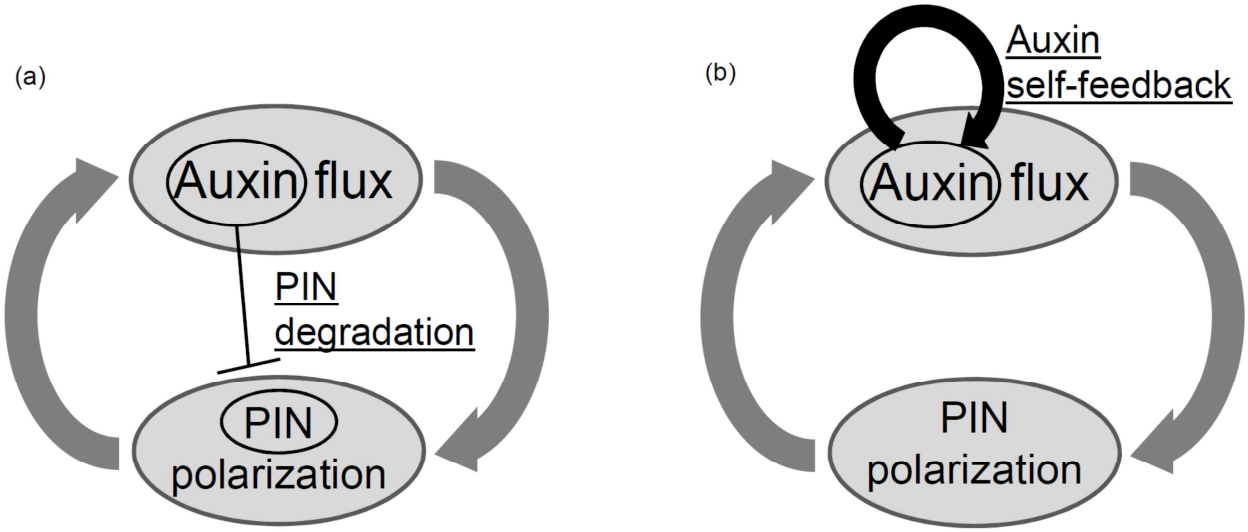

Figure 1.4
改変モデルの概念図。(a)オーキシン濃度依存 PIN 分解モデル(モデル(B))。(b)オーキシン自己フィードバックモデル(モデル(C))。モデル(B)は PIN の分解がオーキシン濃度に依存すると仮定する。もしある細胞が PIN の量を減らせば、その細胞はオーキシンを流出する能力を失う。モデル(C)はオーキシンの自己触媒効果を仮定する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

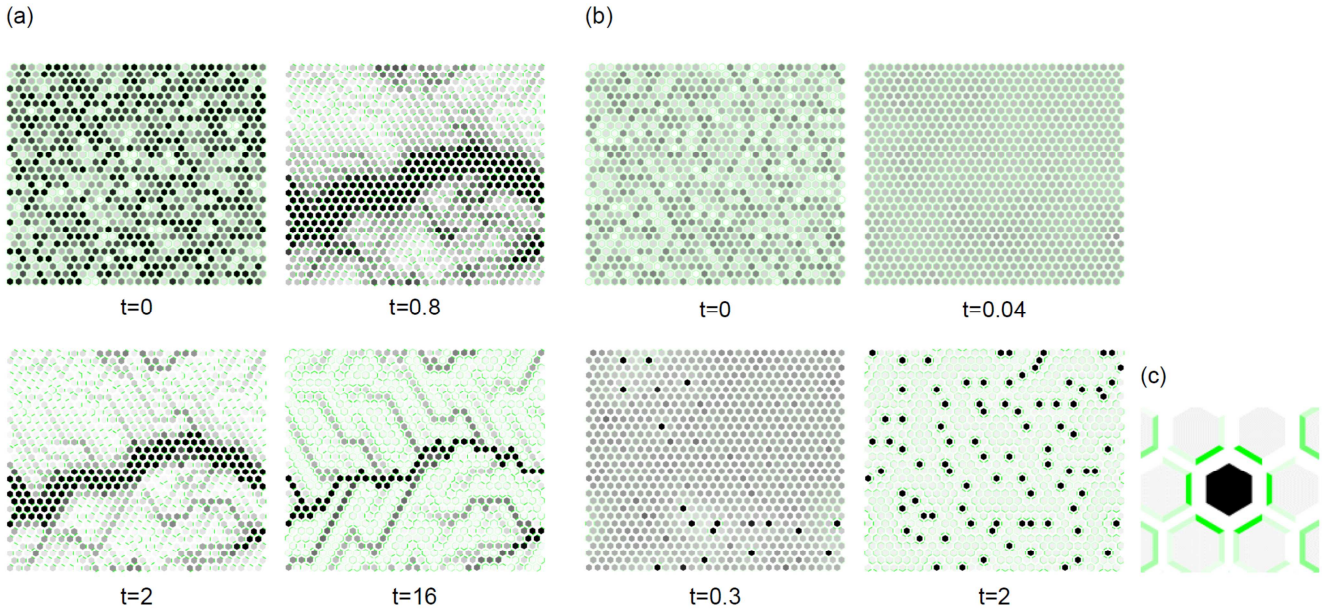

Figure 1.5
オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算によって得られたオーキシンパターン。(a)脈状パターンの時間発展。使用したパラメータは、A=2, B=120, C=1200, α=50, β=2, γ=8, K=250。(b)スポットパターンの時間発展。使用したパラメータは、A=2, B=120, C=1200, α=30, β=2, γ=8, K=0.8。(c)オーキシンマキシマム周辺の PIN の配向パターン。オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルはシンク型のオーキシンマキシマムを形成する。グレーレベルはオーキシン濃度を表し、グリーンレベルはPINの量を表している。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

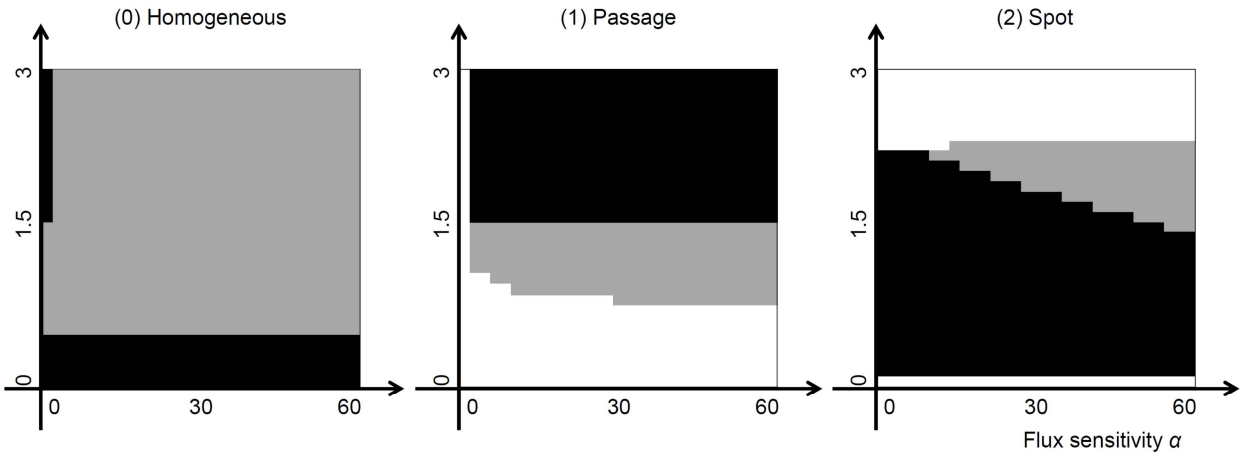

Figure 1.6
オーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの *K*-*α* 空間におけるパターンの存在と安定性。注目するパターン、(0)一様分布、(1)脈状パターン、(2)スポットパターンに対する線形安定性解析。黒はパターンに相当する解が存在し安定、グレーは、解は存在するが不安定、白は解が存在しないことをそれぞれ意味する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

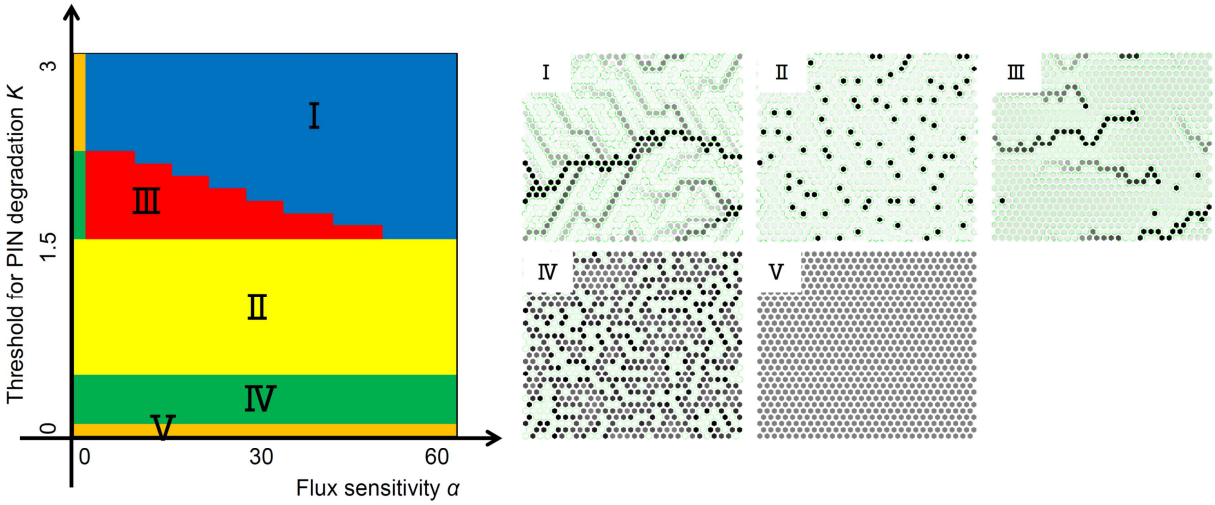

Figure 1.7
図 1.6 で得られた安定性の相図をひとつに重ねるとパラメータ空間をパターンごとに区画化することができる。パラメータ空間それぞれの区画で異なるパターが形成される。それぞれ(Ⅰ) 脈状パターン、 (Ⅱ)スポットパターン、(Ⅲ)脈状パターンとスポットパターンの共存、(Ⅳ) スポットパターンと一様分布の共存、(Ⅴ)一様分布を形成する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

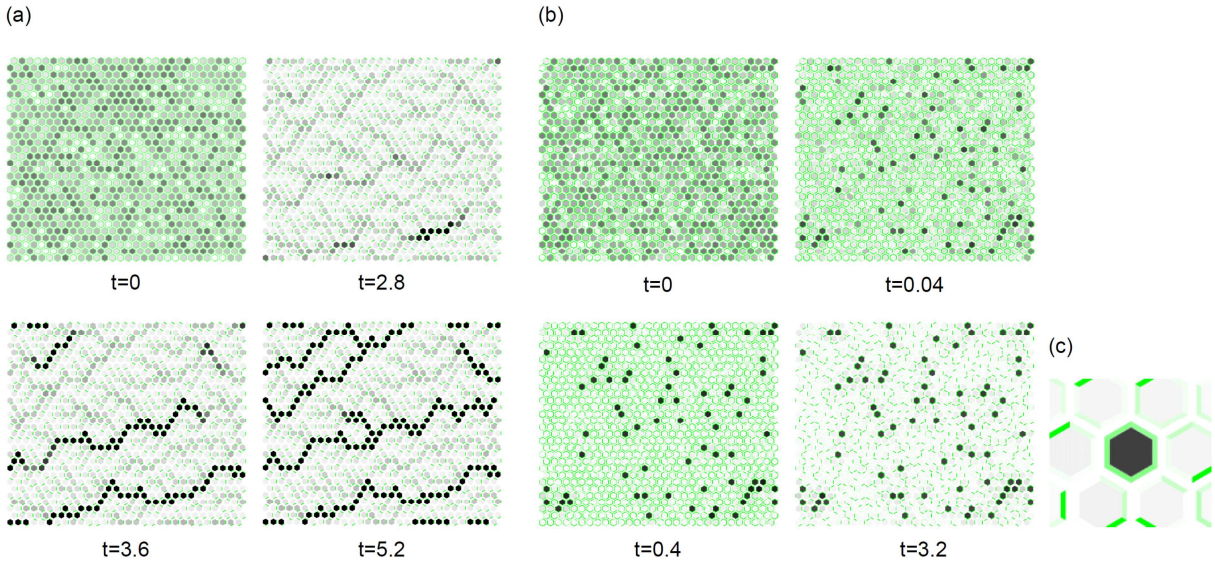

Figure 1.8
オーキシン自己フィードバックモデルの数値計算によって得られたオーキシンパターン。(a)脈状パターンの時間発展。使用したパラメータは、A=8, B=10, α=12, β=1, n=6, D=8, K_a=0.5。(b)スポットパターンの時間発展。使用したパラメータは、A=40, B=10, α=12, β=1, n=6, D=39, K_a=0.5。(c)オーキシンマキシマム周辺の PIN の配向パターン。オーキシン自己フィードバックモデルはソース型のオーキシンマキシマムを形成する。グレーレベルはオーキシン濃度を表し、グリーンレベルは PIN の量を表している。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

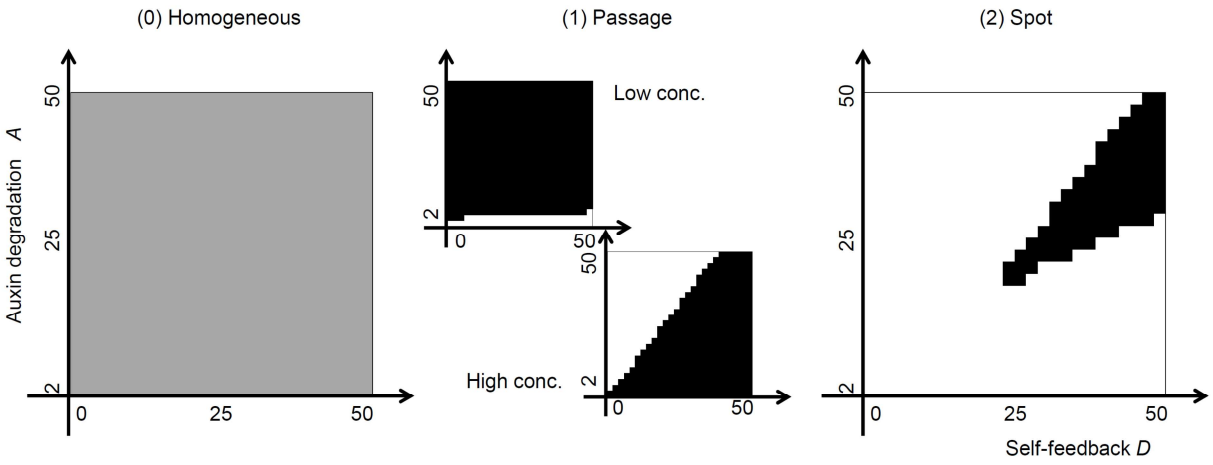

Figure 1.9
オーキシン自己フィードバックモデルの *A-D* 空間におけるパターンの存在と安定性。注目するパターン、(0)一様分布、(1)脈状パターン、(2)スポットパターンに対する線形安定性解析。黒はパターンに相当する解が存在し安定、グレーは、解は存在するが不安定、白は解が存在しないことをそれぞれ意味する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

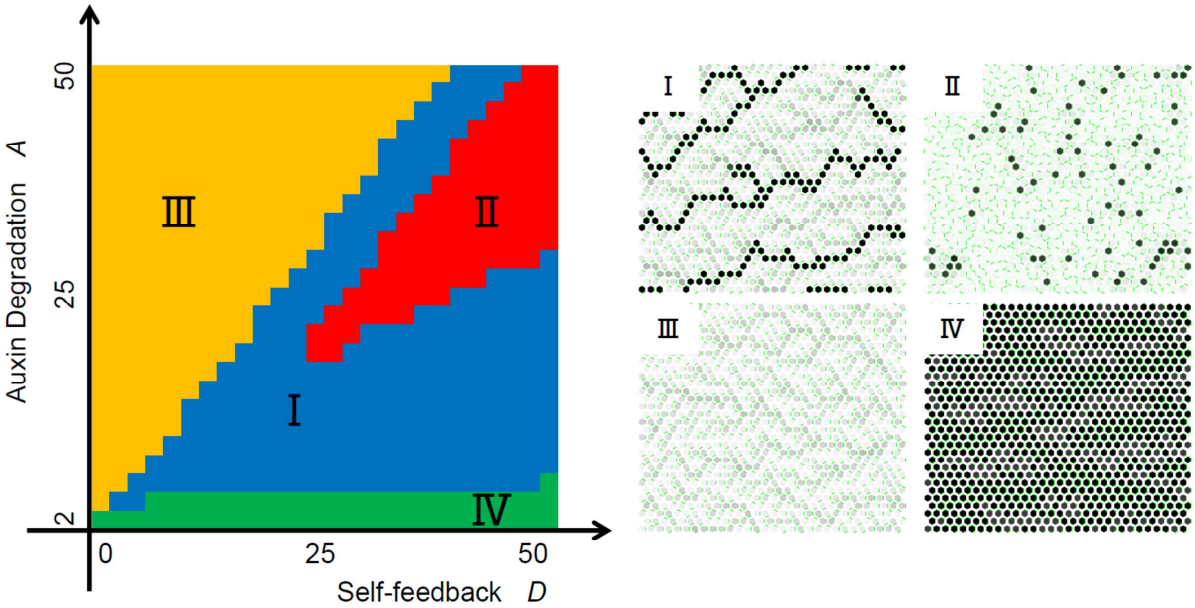

Figure 1.10
図 1.9 で得られた安定性の相図をひとつに重ねるとパラメータ空間をパターンごとに区画化することができる。パラメータ空間それぞれの区画で異なるパターンが形成される。それぞれ(Ⅰ) 脈状パターン、 (II)脈状パターンとスポットパターンの共存、(III)低濃度脈状パターン、(IV)高濃度脈状パターンを形成する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

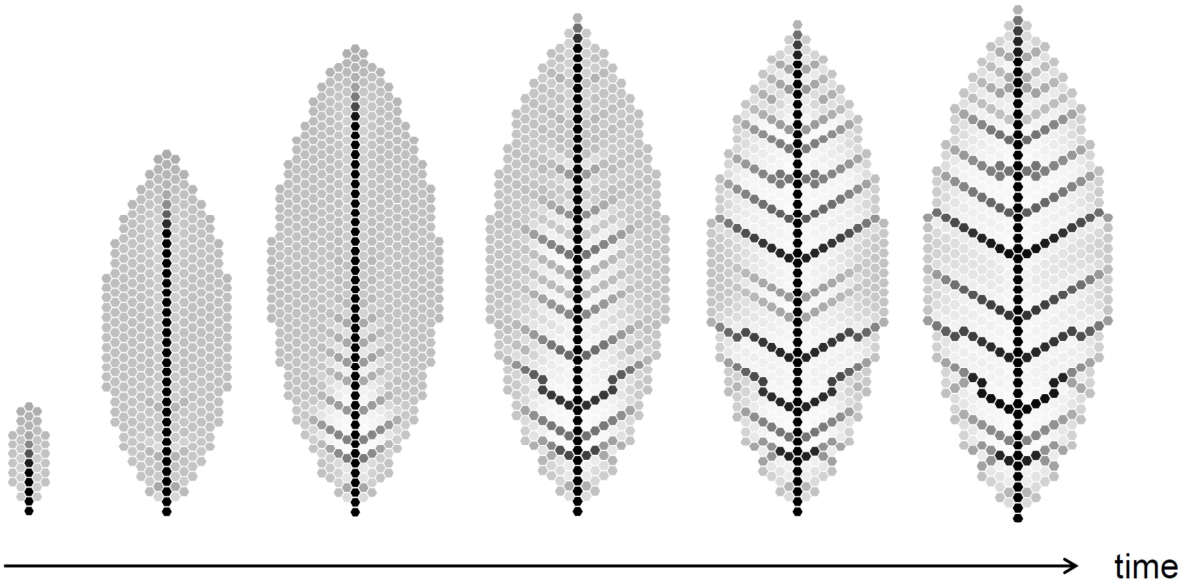

Figure 1.11
葉様領域でのオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算。葉の発達とオーキシン脈状パターンの時間発展。使用したパラメータは、A=2, B=120, C=1200, α=25, β=2, γ=8, K=60。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

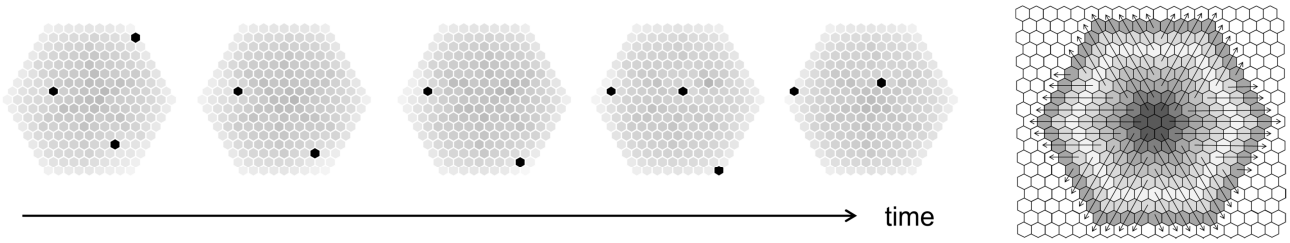

Figure 1.12
(a) 茎頂分裂組織（SAM）様領域でのオーキシン濃度依存 PIN 分解モデルの数値計算。細胞分裂とスポットパターン形成の時間発展。使用したパラメータは、A=2, B=120, C=1200, α=10, β=2, γ=8, K=1.1。(b) 細胞分裂と細胞移動のルール。細胞は領域中心部から分裂により増殖し、押し合いの効果により領域周縁部へ移動する。(Hayakawa et al., 2015, JTB)

3 平坦葉形成の数理

前章では、形態形成に必要なプロセスである位置情報の形成の例として静的でフラットな二次元平面上でのオーキシンが作り上げるパターンの多様性に関して述べた。オーキシンは植物の成長になくてはならないホルモンであり実に多様な役割を果たしている。オーキシンの役割を調べることで植物について多くのことがわかることは事実であるが、それだけで植物の成長すべてを理解できるわけではない。実際の成長過程ではオーキシンに限らず様々な分子や遺伝子発現の情報をもとにして組織などの形そのものが歪み、変形する。つまり、パターンの位置情報をもとに組織の変形が起こるのである。本章では、そのような例を扱うために葉の形態形成に注目することにする。多くの葉には裏と表があり、それぞれの領域に特異的に発現する遺伝子が存在する。近年、これらの組織のアイデンティティを決定する遺伝子の発現と組織の変形のプロセスがカップルしているという知見が得られている。これは先に述べた位置情報の形成と組織変形という二つのプロセスが作り出すサイクルの良い例となっている。具体的な例として平坦な葉がどのようなメカニズムにより作られるのかという問題を扱う。

3.1 序文

多くの植物種は背腹軸に対して平坦な葉つける。そのような葉は裏表が明確に定義されている。表側は adaxial と呼ばれ、光合成に特化した性質を持つ。一方、裏側は abaxial と呼ばれ、気孔を通したガス効果に特化した性質を持つ。このように機能的に分化した葉を両面葉と呼ぶ。

表裏の極性構造と葉の形態形成との遺伝的な関連性が明らかになったのはキンギョソウ *Antirrhinum majus* (snapdragon)の *phantastica* (*phan*)変異体の解析からであった(Byrne et al., 2000; Waites et al., 1998; Waites and Hudson, 1995)。また、最近ではモデル植物であるシロイヌナズナを用いた遺伝学的な研究からいくつかの遺伝子群が裏表領域特異的に発現していることが明らかになっている(Yamaguchi et al., 2012; Fukushima and Hasebe, 2014)。それらの研究によると、各細胞の裏と表という性質はいくつかの裏表特異

的に発現する転写因子群により直接的に、また small RNA を介して間接的に相互抑制するというメカニズムにより決められているということが分かっている(Eshed et al., 2001; Izahki and Bowman, 2007; Kerstetter et al., 2001; Husbands et al., 2009; Kidner and Timmermans, 2010)。このような相互抑制のメカニズムが組織レベルでの空間相補的な裏表の極性パターンを作り出していると考えられている。表裏極性構造を形成するのにいくつかの転写因子のファミリーが重要な役割を果たしている。*The class III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER* (*HD-ZIPIII*)は表領域特異的に発現し、細胞運命を表と決定するために必要な遺伝子である。 *HD-ZIPIII* 欠損変異体では“裏化（abaxialized）”した子葉ができる(Emery et al., 2003; Prigge et al., 2005)。一方で *KANADI* (*KAN*) (Eshed et al., 2001; Izahki and Bowman, 2007; Kerstetter et al., 2001) や *AUXIN RESPOSE FACTORS3/ETTIN* (*ARF3/ETT*)、 *ARF4* (Pekker et al., 2005)といった遺伝子群は葉原基の裏側領域特異的に発現し、細胞の性質が裏になるように促進する。*kan* 変異体においても様々な表現型をしめし、葉身が“表化（adaxialized）”し平坦なラミナ構造が消失した棒状の葉や、裏側に異所的に表領域が出現した幅の狭い葉ができたりする(Eshed et al., 2001; Eshed et al., 2004)。 転写因子に加えて small RNA も表裏特異的に分布していることも分かっており(Chitwood et al., 2009; Kidner and Martienssen, 2004; Garcia et al., 2006)、さらにはこれらの小さな RNA 分子はプラズモデスマータを介して細胞間を移動できることもわかっている(Carlsbecker et al., 2010; Miyashima et al., 2011; Vatén et al., 2011)。これらの実験結果は、裏表のアイデンティティを決定する遺伝子の発現と葉の形との間に強い関連性があることを意味している。

組織学的な観察から葉身の成長の初期段階では細胞分裂は葉の周辺部という限られた領域で起きているという報告がある(Esau, 1977)。Waites と Hudson は葉ラミナの成長の分布を観察し、それが表と裏の境界領域であることを見出した。これらの観察から彼らは、裏表遺伝子の発現の空間パターンによる細胞増殖の制御が平坦な葉の形態形成を実現しているという仮説を提案した(Waites and Hudson, 1995)。この仮説は二つの実験事実により

支持される。一つ目は、表裏のアイデンティティを決定する二つの遺伝子群が相互抑制の関係にあるということ。もう一つは細胞分裂が葉の周縁部かつ裏表領域の境界部分という限られた領域で起きるということである。これらのメカニズムにより多くの研究者は表裏の極性構造と葉の平坦化が同時に実現すると考えている。しかしながら、この仮説に基づいたダイナミクスが平坦な葉の安定な成長を実現するかどうかは自明ではない。さらに言うならば細胞分裂という摂動のもと時間発展する中で、遺伝子発現の境界で誘導される成長端がその形を保てるかどうかは簡単にわかる問題ではない。本研究では数理モデルを使って力学系の観点から Waites と Hudson の仮説の妥当性を検証する。我々はまず Waites と Hudson により提案されたメカニズムが平坦葉の形成にとっての主要な原動力であるとする立場からスタートした(Fig. 2.1)。そしてこの仮説が平坦な葉を作るのに十分かどうか議論した。その結果、この仮説だけでは平坦な葉を高確率で作るには十分であることが分かった。この結果を踏まえ、極性を持った細胞分裂規則というメカニズムを付加的に導入した。そうすることで平坦な葉の安定な形態形成を実現することが明らかとなった。

3.2 葉形成の数理モデル

葉原基は高濃度のオーキシンをシグナルとして茎頂分裂組織(Shoot Apical Meristem, SAM)の一部から突出する形ででき始める。さらに細胞分裂や組織の変形により、二次元に広がるシートのような構造を作り、葉が出来上がっていく。我々は葉原基の頂端基部軸に対して垂直な横断面を考え、その断面にある細胞群を二次元平面上でモデル化する。実際の葉の成長は三次元で起こるが、ここでは簡単のため頂端基部軸方向の成長は一様とし、左右軸（medio-lateral）方向の成長のみに着目する。

葉の形成を表現するために、葉の成長を細胞ベースの組織形態形成と細胞内遺伝子発現ダイナミクスをカップルした力学系として考える。細胞ベースの組織形態形成には Vertex dynamics を利用する(Nagai and Honda, 2001)。このモデルでは、多角形近似した細胞の変形の時間発展は多角形の頂点の位置に関する微分方程式により表現される。組織の形態形成に加えて細胞内ダイナミクスも考える。遺伝子発現ダイナミクスは、組織中の各々の

細胞が発現する裏表遺伝子の活性を微分方程式により記述することでモデル化した。上述したように実際の植物では表裏遺伝子が複雑に直接または small RNA を介して間接的に相互抑制している。本研究では簡単のために表領域と裏領域それぞれのアイデンティティが一因子ずつより決定される対称な相互抑制システムを考える。

以下二つのダイナミクス、Vertex Dynamics と細胞内の遺伝子発現ダイナミクスをカップルした具体的な数理モデルを述べる。微小時間幅(Δt=0.001)でオイラー法により数値的に計算した。

3.2.1 細胞ベースの形態形成モデル（Vertex Dynamics）

ベクトル$\boldsymbol{r}_i$を各頂点 i の座標を示す位置ベクトルとし、各頂点は以下に定義されるポテンシャルエネルギーを最小にするように動く。$\boldsymbol{\nabla}_i$は、$\boldsymbol{\nabla}_i = \left(\frac{\partial}{\partial x_i}, \frac{\partial}{\partial y_i}\right)$ と定義され、$\boldsymbol{\eta}_i$はランダムノイズを意味する。

$$\frac{d\boldsymbol{r}_i}{dt} = -\boldsymbol{\nabla}_i U + \boldsymbol{\eta}_i$$

$$U = \sigma_L \sum_{k \in IT} L_k + \sigma_O \sum_{k' \in TS} L_{k'} + \kappa_S \sum_{\alpha} (S_\alpha - S_{std})^2$$

$$IT;\ \text{Internal tissue}, TS; \text{Tissue surface}$$

変数とパラメータはL_k; 辺kの長さ, $O_{k'}$; 組織表面に露出している辺k'の長さ、S_α; 細胞αの面積、S_{std}; 参照細胞面積を意味する。ポテンシャルエネルギーUの第一項は、隣接細胞同士に生じる表面エネルギー、第二項は組織表面が持つ表面張力に関するエネルギー、第三項は細胞の収縮と膨張のエネルギーを意味する。 σ_L、 σ_Oはそれぞれ単位長さあたりの接着エネルギーと表面エネルギーであり、 κ_Sは弾性係数である。

3.2.2 遺伝子発現ダイナミクス

細胞内の遺伝子発現のダイナミクスは Tameshige et al. (2013)を参考にした。細胞タイプは遺伝子発現のレベルで決定される。ここでは表を表す Adaxial(AD)と、裏を表す Abaxial(AB)の 2 タイプを考える。AD 因子の活性レベルが AB 因子のそれよりも高ければ細胞タイプは AD とみなし、その逆もまた同様に考える。AD 因子、AB 因子の活性のダイナミクスは以下の常微分方程式により表現される。

$$\frac{dAD_i}{dt} = p_{AD} + r_{AD}\frac{1}{1+AB_i^2} - \left(d_{AD} + c_{AD}\frac{AB_i}{1+AB_i}\right)AD_i + D_{AD}\sum_k \frac{l_k}{S_i}(AD_k - AD_i)$$

$$\frac{dAB_i}{dt} = p_{AB} + r_{AB}\frac{1}{1+AD_i^2} - \left(d_{AB} + c_{AB}\frac{AD_i}{1+AD_i}\right)AB_i + D_{AB}\sum_k \frac{l_k}{S_i}(AB_k - AB_i)$$

AD_i; *i* 番目の細胞の AD 因子の活性、AB_i; *i* 番目の細胞の AB 因子の活性、p_{AD}, p_{AB}; AD/AB 因子生成レベル、r_{AD}, r_{AB}; AD/AB 因子転写抑制レベル、d_{AD}, d_{AB}; AD/AB 因子分解速度、c_{AD}, c_{AB}; small RNAs による転写後抑制レベル、D_{AD}, D_{AB}; 拡散係数、S_i; *i* 番目細胞の面積、l_k; *k* 番目の隣接細胞との接触長を表す。

細胞ベースの組織パターン形成と細胞内ダイナミクスのカップリングを考えるために組織周縁部の細胞が AD/AB 因子が両方とも閾値 *K* (=0.15)を超えた時に分裂すると仮定した。娘細胞の形やサイズは Vertex dynamics に従って速やかに最適値に落ち着く。分裂の際にどの二辺を選択するかに依存して三つのタイプの細胞分裂; Random、Periclinal、Anticlinal division、をモデル化した。細胞分裂は、分裂する細胞を構成する二つの隣接していない二辺の中点に新たに頂点を加え、その二つの中点をつなぐことで実装される。N 角形細胞のどの二辺を選択するかに依存して細胞分裂の規則が決まる。Random cell division では、まず分裂細胞を構成する一辺をランダムに選択し、その辺の中点に新たに頂点を加える。次に最初に選択した辺から左に(N/2)番目の辺を選び、その中点に新たに頂点を加える。これらの

二つの頂点を新たな辺でつなぐ。Periclinal cell division では、分裂細胞の外部に接している辺の両隣の二辺の中点に新たに頂点を加え、これらの頂点を新たな辺でつなぐ。Anticlinal cell division では、まず分裂細胞の外部に接している辺を選択し、その中点に新たに頂点を加える。次に最初に選択した辺から左に(N/2)番目の辺を選び、その中点に新たに頂点を加える。これらの二つの頂点を新たな辺でつなぐ。細胞分裂によって生じた娘細胞は親細胞と同等の活性を受け継ぐとした。葉の周縁部での各細胞は 0.3, 0.33, 0.47, 0.5, 1.0, 2.0 の単位時間毎に上述の条件と照らし合わせ、遺伝子の発現状態から細胞分裂するか否かが判断される。選択された細胞が上記の条件を満たしていない場合細胞分裂は起こらない。それぞれのパラメータは、σ_L=2.0, σ_O=3.4, κ_S=1.0, S_{std}=3.5, p_{AD}, p_{AB}=0.1, r_{AD}, r_{AB}=2.0, d_{AD}, d_{AB}=0.1, c_{AD}, c_{AB}=2.0, D_{AD}, D_{AB}=0.075 に固定した。このような条件のもと様々な細胞分裂頻度で細胞数が 900 になるまで増殖させるという数値計算を 250 回ずつ行った。

3.2.3 数値計算の初期条件

初期状態として 24 細胞からなる楕円上の構造を考える。初期の葉原基はすでに表裏(AD-AB)極性構造を形成している(Sussex, 1951, 1954)。そこで 9 細胞を AD の細胞群とし AD 因子濃度と AB 因子濃度それぞれ AD=0.9、AB=0.1 とした。中間領域の 6 細胞は AD=0.5、AB=0.5 とした。楕円構造の下側に位置する 9 細胞は AD の細胞群とし AD/AB 因子濃度をそれぞれ AD=0.1、AB=0.9 とした。

3.3 結果

3.3.1 Random cell division

細胞分裂面の方向がランダムに生じると仮定する。便宜上この分裂則を Random cell division と呼ぶことにする。細胞分裂ルールの詳細に関しては 3.2.2 を参照のこと。この仮定のもと二次元平面上で乱数の種を変えて数理モデルの数値計算を行い、その結果を観察した。

数値計算により正常に成長した葉の例を Fig. 2.2(a)に示す。この葉は平坦な構造を

持つ。AD領域と AB 領域の作る境界面は葉のほぼ中央に位置している。一方、この構造以外のものすべては失敗とする。いくつかの異常成長の例を Fig. 2.2(b)に示す。これらの葉は平坦ではないことが分かる。一つの例では AD 領域が AB 領域よりも多くの面積を占有していることが分かる(Fig. 2.2(b)上段右)。他の例では AD 領域が AB 領域に含まれてしまっている(Fig. 2.2(b)上段中央)。

ここで葉の成長を評価するために、数値計算の結果を定量的に表現する characteristic parameter (CP)という量を導入する。CP の値は、数値計算により得られるパラメータの値の変化に応じた多様な葉の形の特徴づけを行うことができる。CP は以下の測定値をもとに算出される。*C*; 葉の組織周長、*A*; 組織断面積、*B*; 境界面の長さ、C_{AD}; Adaxial 領域の表面長、C_{AB}; Abaxial 領域の表面長。具体的に CP1 から CP4 の四つを導入する。CP1 は、$\mathrm{CP1} = \frac{C}{2\sqrt{\pi A}}$で定義され、葉の平坦度合を表す。CP1 は形が円に近いとき 1.0 に近づく(Fig. 2.3#1)。その値が大きければ形はより平坦であることを意味する(Fig. 2.3#2)。CP2 は、$\mathrm{CP2} = \frac{B}{C}$で定義され、AD/AB 境界面の歪みの程度を表現する。つまり、CP2 の値は AD-AB 境界面の形を反映したものである。もし境界面が組織の中で曲がりくねっているならば、CP2 の値は 0.5 から大きくずれるはずである(Fig. 2.3#3)。境界面が曲がりくねっておらず葉の組織中央に維持されているならばその値は 0.5 に近くなると考えられる。しかしながら数値計算の結果から組織表面はスムーズである一方、境界面はジグザグ状になっており、CP2 の値は境界面が曲がりくねっていなくても 0.5 よりわずかに高い値にシフトする。CP3 は、$\mathrm{CP3} = \frac{|C_{AD} - C_{AB}|}{C}$で定義され、AD または AB が占有する領域に偏りがあるかどうかを表す値である。もし偏りがなければ CP3 の値は 0 に近づき(Fig. 2.3#2)、偏りが強いほど 0 から離れた値をとる(Fig. 2.3#4)。$\mathrm{CP4}$は 0 か 1 の整数値を持ち、AD/AB それぞれの一つずつ領域を持つとき 1、それ以外は 0 をとる。CP の値を抽出するために前処理として数値計算の結果を整える。初期条件として数値計算の結果を用いて拡散係数 D_{AD}=D_{AB}=0、σ_O=5.2 の条件で一定ステップ計算する。この処理による数値計算結果の幾何学的変化はわずかであり

本質的な結果に違いは生じない。

CP の値で成功と判断された結果の中に目で見て判断した場合、失敗と判断されるような“false positive”が存在する。これは幾何学的な形という高次元空間から 4 次元の CP 空間という低い次元に落としているため判定が完全でないことは原理的に起こり得る。Fig. 2.10 にそのような例をいくつか示す。これらはこぶのような突出という異常な形が見られるが、CP による判定ではこれらを棄却できない。Periclinal division ではこのような失敗はめったに観察されず、一方で Anticlinal division ではこのような例が多く観察される。つまり、ふたつの分裂ルールの成功率の差は CP で得られた差より大きくなる。しかしながら、そのような高次元のパターンを少数の統計的な値により特徴づけることは実際的には有用であり、複雑な形の理解の助けとなる。

正常な成長を判定する基準値を決めるため、細胞周期 1.0 で数値計算した 750 のサンプルセットを用意した。そのうち人工的に 497 の成功セットとそれら以外の失敗セットの二つに分けた。Fig. 2.3 はサンプルセットの CP 値の散布図を示し、CP の値により数値計算によって得られた葉の特徴を表現できることを例証している。成功パターンを与える CP の値の範囲は、成功サンプルセット全ての CP の値が含まれるような最小の領域として決定した。言い換えれば、CP の値が以下の閾値により表現される条件を満たす場合である；$Thl1<CP1$, $Thl2<CP2<Thu2$, $CP3<Thu3$。閾値 Thl1, Thl2, Thu2, Thu3 の具体的な値は以下のように与えられる：$Thl1\equiv min[spCP1_i]$, $Thl2\equiv min[spCP2_i]$, $Thu2\equiv max[spCP2_i]$, $Thu3\equiv max[spCP3_i]$ ($spCP_i$; successful pattern CP (i; successful pattern number)。このアルゴリズムに従い、成功サンプルセットから Thl1=1.8, Thl2=0.58, Thu2=0.72, Thu3=0.29 と決定した。

上述のように定義した条件を用いて数値計算によって得られた結果を評価し、正常な葉であるかどうかを機械的に判断する。この条件を満たすものは Fig. 2.3 に示すように平坦な構造をとる(Fig. 2.3#2)。一方、この成功条件の外では、葉の形は平坦ではなく多様な構造が観察される(Fig. 2.3)。

いくつかの細胞分裂周期で同様の計算してみると、成長の成功率は最大でも 60%程度であった(Fig. 2.4 Green)。生物学的な要請により反応項のパラメータは細胞タイプが AD と AB 状態の bi-stability の性質を示す値に設定した。そのようなパラメータの条件を一つきめ、二つのパラメータ、拡散係数と(D_{AD},D_{AB})と分裂の閾値(K)の影響を調べた。これらのパラメータは分裂能を有する細胞の数に影響を与える。そこで、さまざまな拡散係数(D_{AD},D_{AB})と分裂の閾値(K)において成功率がどのように影響を受けるか調べた。細胞分裂ルールは random cell division で細胞周期は 1.0 のもと計算を行った。すると、拡散係数や閾値は大きすぎたり小さすぎたりすると成功率が極端に低下することがわかった(Fig. 2.5(a))。また、平たん成長に最適なパラメータ領域が存在することがわかったが、それでも成功率は最大でも 75%程度であった(Fig. 2.5(b))。拡散係数が小さく分裂閾値が小さい場合、各細胞は自律性の性質が強くでるため AB-AD の境界面が強くゆがむ(Fig. 2.5 (c))。拡散係数が小さく細胞分裂閾値は大きい場合、細胞分裂できる細胞がなくなり成長が止まってしまう(Fig. 2.5(d))。拡散係数が大きいと細胞分裂が揺らぎとなりトラベリングウェーブが生じ、組織は AD のみもしくは AB のみの細胞群に占有され、結果として成長は停止してしまう(Fig. 2.5(e))。）これらの結果は、Waites と Hudson による仮説だけでは高い確率で平坦な葉を作ることはできないことを意味しており、モデルの修正が必要である。

では Random cell division でなぜ異常な形の葉ができるか。その直観的な説明を与える。Random cell division というモデルのままでは、葉周辺部での AD-AB 境界面はダイナミクス中で平坦成長方向から頻繁にずれる。平坦方向への成長は安定ではなく中立であることから、このずれを解消するメカニズムはない。そのため、このずれはひとたび起これば消えることない。つまり、平坦方向への成長は容易に乱され、そのずれは自動的にもとに戻されることはない。その結果、多くの異常な形をした葉が観察されてしまう。

3.3.1 Polarized cell divisions

成長軸の不安定性の問題を解決するために、二通りの細胞分裂ルールを導入した(Fig. 2.6)。一つ目は Periclinal division である。この分裂ルールは、新しい分裂面が組織表

面の辺に対して平行に入る様式である(Fig. 2.6(a))。もう一つは Anticlinal division で、この分裂ルールは新しい分裂面が組織表面の辺に対し垂直に入るという細胞分裂の様式である(Fig. 2.6(b))。これらの分裂ルールをまとめて Random cell division に対し Polarized cell division と呼ぶことにする。Fig.2.7 に Periclinal division による葉の成長シミュレーションの時間発展の様子の例を示す。

Fig. 2.4 にそれぞれの細胞分裂ルールにおける平坦葉形成の成功率(%)と細胞周期との関係を示す。細胞周期が 0.5 のとき、Random division での成功率は 50 %を下回った。Anticlinal division ではさらに下回り 10 %以下の成功率であった。一方で、同じ細胞周期において Periclinal division では、平坦葉形成の成功率はおよそ 90 %を上回った。細胞周期を長くすると次第に Random division と Anticlinal division での成功率は上昇していき、Periclial division では低下する。これらの分裂規則の間の成功率の差は細胞周期が長くなるにつれて低下するが、Periclinal division での成功率は細胞周期の長さがどうであれ常に一番高い。

単純な細胞分裂規則の修正により組織発達プロセスの中で生じる成長方向のゆらぎが低減される(Fig. 2.8)。葉の周辺部での成長軸のずれは細胞分裂時に頻繁に起こる。Random division や Anticlinal division による細胞分裂で生じる娘細胞は、両方とも遺伝子発現の継承によりほぼ等確率で次の分裂の候補になりうる。そのためどの細胞が分裂するか特定するとはできない。Fig. 2.9(b)に Anticlinal division での異常成長の時間発展の様子を示す。一方、Periclinal division では、組織表層に位置する娘細胞が次の細胞分裂の候補になりやすい。このメカニズムは細胞分裂により生じた細胞の向かう方向が平坦成長軸の方向と等しくなりやすいため、結果として境界面のゆらぎが低減され高い確率で平坦な葉をつくることを可能にしていると考えられる(Fig. 2.9(a))。

3.4 考察

本研究では、数理モデルを用いることによって平坦葉形成における古典的な仮説の妥当性を検証した。この仮説のエッセンスである遺伝子発現と細胞増殖とをカップルしたダイナミクスだけでは高確率で平坦な葉を作るには不十分であることが分かった。Random

cell division では、形態形成プロセスの中で裏表の境界面の位置が葉の周辺部で揺らいでしまう。この位置のずれは自動的に低減されるものではなく、結果として平坦成長は安定ではなくなってしまう。境界面のずれから引き起こされる成長軸のずれは結果として平坦ではない凸凹の葉を作り出す。この問題を解決し、平坦葉形成の能力が向上するようなメカニズムの探索を試みた。それにより、平坦葉形成の成功率を大幅に改善する単純なメカニズムがあることを見出した。それは細胞分裂の分裂面の入る方向の制御であった。具体的には、Periclinal division と Anticlinal division という二種類の Polarized cell division を新たな細胞分裂ルールとして導入した。これら二つの規則は平坦葉形成という観点において全く逆の効果を与える。Periclinal division は平坦葉形成の成功率を劇的に改善させた。一方 Anticlinal division では成功率は低下した。Periclinal division によるポジティブな効果は他にもある。それは成功率が細胞周期の広い範囲にわたってロバストであったということである。我々はこの極性を持った細胞分裂という制御が実際の植物においても平坦葉形成にとって重要なメカニズムであると予想する。この予想は実験的に検証可能であると考える。実際に茎頂分裂組織の葉原基の周辺部では Periclinal division が観察されたとの報告もあり、これは我々の予想と一致するものである(Cunninghame and Lyndon, 1986; Tepfer, 1960)。

動物細胞と異なり、細胞壁の存在により植物細胞は組織内を自由に動くことはできない。そのような状況を考えると、植物の形態形成現象は細胞分裂の蓄積によって個体を作り上げる実に見事なプロセスである。このような視点から考えると、細胞分裂面の方向性のルールとは植物形態形成において主要なメカニズムの一つであると考えるのは自然なことであるように思える。しかしながら、そのような視点は同時に新たな疑問をもたらす。それは、各細胞が組織内での自分の位置をどのように知っているのか、という疑問である。細胞が細胞分裂面の方向性についての制御メカニズムを有するように見える観察結果は、我々にまるで各細胞が組織の中での自分の位置を把握しているように思わせる。両面葉の形成の場合では裏表遺伝子発現の空間パターンが位置情報の候補となるかもしれない。両面葉形成に加えて、単面葉の形成の研究が細胞分裂面のルールに関する理解への鍵となるかもしれない。

両面葉とは異なり、単面葉には裏表遺伝子発現の空間パターンがなく裏のアイデンティティをもった組織だけで構成されている。しかしながらある種の単面葉をつける植物ではそのような空間パターンを持たないにも関わらず、平坦な葉をつけるものがある(Yamaguchi et al., 2010)。このような観察は裏表遺伝子発現の空間パターンがなくとも組織中の細胞たちは自分たちの位置や方向という情報を持っているということを示唆している。Fukushima らは細胞分裂面の方向性の制御が食虫植物の *Sarracenia purpurea* のピッチャー状の複雑な形状の葉を形成するのに必須であると報告している（Fukushima et al., 2015）。

Polarized cell division を実現するための候補としてモルフォゲンによる化学的なシグナルと機械的なシグナルというものが考えられそうである。実は最近植物胚発生においてオーキシンが細胞分裂面の方向性を決めているという報告がなされている(Yoshida et al., 2014)。葉において同じようなメカニズムがあるかどうか今後の実験的研究が待たれる。動物の形態形成においては機械的な刺激が細胞分裂面の方向を決めているという報告があるが(Fink et al. 2011)、植物にも同じような制御があってもおかしくないかもしれない。特定の遺伝子による制御という観点からは、*yabby* 変異体では裏表遺伝子発現の空間パターンがあるにも関わらず、ラミナ構造の成長が見られなくなってしまったという報告があり(Sarojam et al., 2010)、もしかしたら YABBY 活性が polarized cell division を実現するシグナルの出力として働いているのかもしれない。

葉の細胞の分裂パターンを定量的に調べることは難しかったが、最近チミジンのヌクレオシド類似体である 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU)を用いて細胞分裂の制御の方向をモニターする新しい方法が Yin らによって開発された(Yin and Tsukaya, 2016)。この結果では組織周辺部では Periclinal division がほぼ 100%起きていることを示唆しているが、組織内部での細胞分裂も観察されており、全体の傾向として主軸に対して平行な分裂面が多く観察されるという報告がある。この手法は考案されたばかりなので、これから葉での細胞分裂面の方向が異常になる変異体などが見つかる可能性があり、細胞分裂面の制御の葉の形態形成への影響を詳しく調べることができるようになると考えられる。本研究では細胞分裂

する領域を周辺部だけに限定したが、Yin らの測定の結果を取り込んだモデルを作り内部の細胞分裂も考慮したモデルを考え解析することが今後の課題となる。

本研究で我々は平坦な両面葉形成が裏表遺伝子発現の空間パターンに加えて細胞分裂面の方向性の制御にも依存していることを理論的に明らかにした。最近の分子遺伝学的な研究によって裏表のアイデンティティの決定に関わる遺伝子群の制御ネットワークの詳細についてかなり明らかにされてきている。しかしながら細胞分裂面の方向性を決めるメカニズムに関してはほとんどわかっていない。本研究の我々の結果は、そのよう分裂ルールを決めるメカニズムを明らかにすることが植物形態形成のより一般的な理解につながるということを示唆している。

葉の進化と平坦性

古生代中ごろまでは大気中の CO_2 濃度が高く、気孔の数密度を増やす仕組みとして平坦な葉という構造は必要がなかった。気孔の少ない葉を展開すると太陽光により葉の温度が上昇してしまい生存に逆に不利になる。古生代後期デボン紀頃になると大気中の CO_2 濃度が低下してきて植物は気孔の数密度を上げる必要が出てきた。そこで気孔の数をかせぐことのできる平坦な葉という構造が確立していったのではないかと考えられている。また、気孔を増やすと蒸散による潜熱で葉の温度の上昇を抑えられることができ葉は進化的に残ったと考えられている(Beerling et al., 2001)。生存競争の面から考えると、植物が上陸した当初は、地上の植物の密度は低かったと予想されるが、条件の良い場所であれば植物の密度は徐々に高まり、植物間で光をめぐる競争が起こるようになったと考えられる。コケ植物では根、茎、葉の分化はない。シダ植物の祖先も、当初は茎に相当する器官だけしかもたなかったが、しだいに光合成器官である葉が形成され、それを地上高く広げるようになったと考えられている。

維管束植物から小葉類(Lycophytes)を除いた残りの単系統群は、大葉類(Euphyllophytes)と呼ばれる。大葉類の共通祖先はトリメロファイツ類であり、大葉類の茎

葉はトリメロファイツ類の枝状構造から進化したと考えられている。しかし、トリメロファイツ類の枝状構造と大葉類の茎や葉は大きく異なっており、どのように進化してきかのかは未だに謎である。一つの仮説として Zimmerman によってテローム説が提唱されている。この説は「トリメロファイツ類の枝状構造が融合することでシダ類や種子植物の茎や葉が進化したのではないか」という仮説である(Beerling and Fleming, 2007)。

キンギョソウやシロイヌナズナを用いた変異体の解析によると葉が扁平になるには葉の Adaxial-Abaxial の極性が必要である。現在これらの極性を決めるとされている HD-ZIPIII や KANADI などの遺伝子群が知られている(Yamaguchi et al, 2012)。HDZIP に関しては現存のほとんどの緑色植物で同定されている(Floyd et al., 2006)。発現パターンや遺伝子系統から維管束植物の共通の祖先が茎頂の機能制御や維管束の放射パターンの形成に関与する一つの HDZIP 遺伝子を持っていたと考えられている。そして進化的な倍加やつづく種特異的な機能の多様化によって新しい役割が付与されたと考えられている。種子植物では前形成層の特異化や維管束のパターン形成に加えて葉での Adaxial-Abaxial 極性の形成において HDZIP が働くようになった。種子植物では HDZIP はこれと相反して働く KANADI や microRNA165 や 166 との相互作用によって Adaxial の極を特徴づける。HDZIP の Seed-free euphyllophytes（種子植物ではない大葉類（小葉類ではないシダ植物など））での発現解析が進んでいない、また KANADI ホモログの非被子植物での解析が行われていないことから葉の進化における HDZIP-KANADI の相互作用の役割の理解はこれからさらに進んでいくと考えられる。一つの解釈としてはおそらく植物 HDZIP-KANADI 相互作用がこのような極性形成に関与するようになったのは、上述の古代環境の知見と合わせると古生代デボン紀のころであると考えられる。平坦な葉を展開して光合成効率を増加させるシステムとして現存の植物にも残ったのであると推察される。

Figures

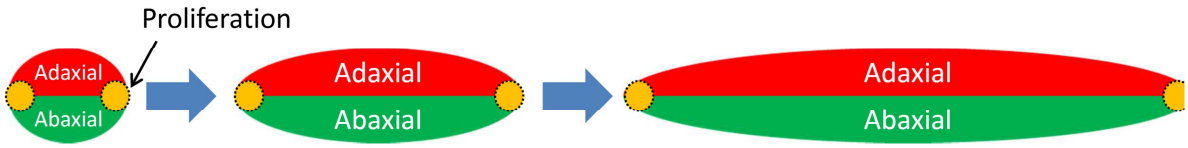

Figure 2.1

Waites と Hudson による平坦葉形成の仮説概念図

平坦葉形成の仮説は二つの実験事実により支持される。(i)表裏特異的に発現する遺伝子群が相互に抑制しあう関係にある。(ii)細胞分裂が裏表領域の境界面付近かつ葉の周辺部という限られた領域でおこる。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

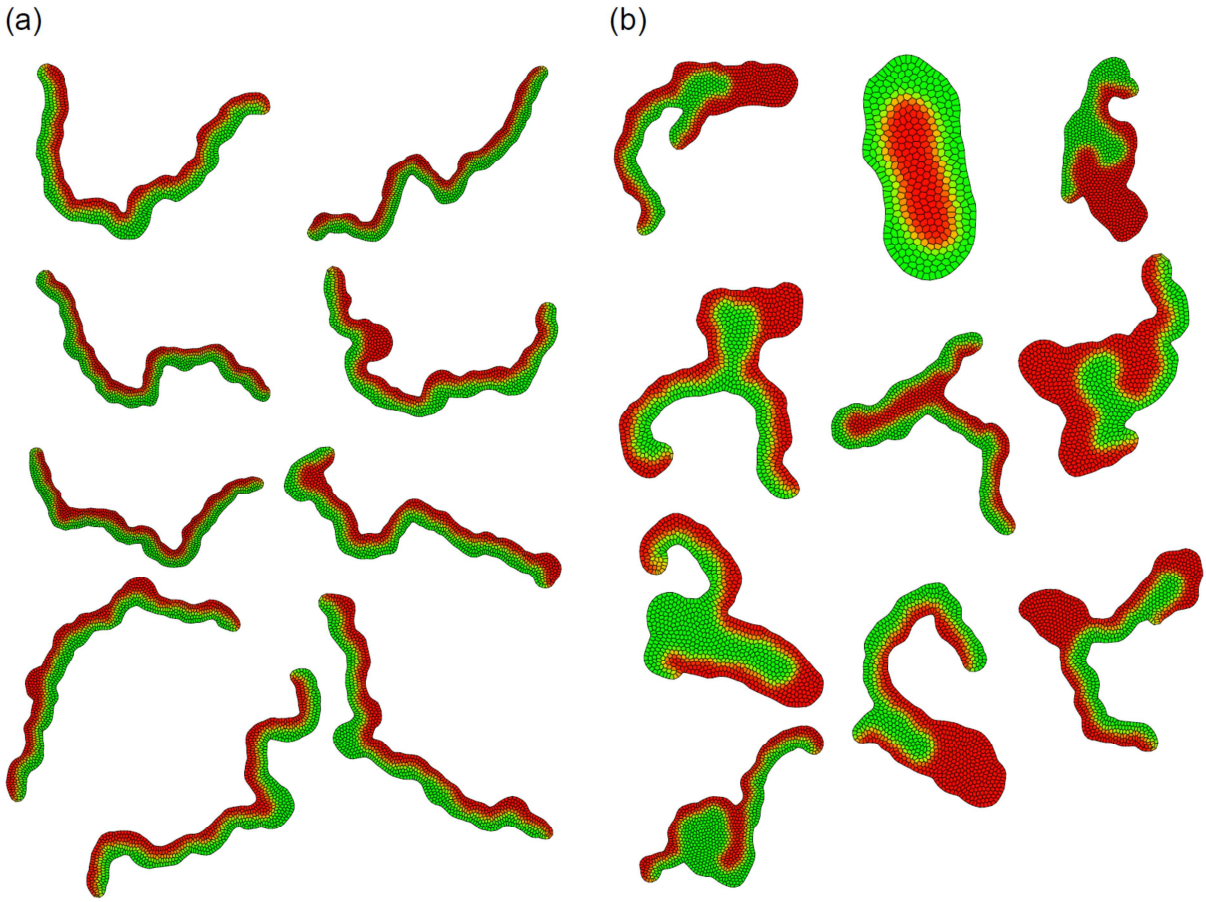

Figure 2.2

数値計算により得られた葉の例

(a)平坦葉の例、(b)異常な形状をした葉の例をそれぞれ示す。赤と緑の濃さはそれぞれ、表裏因子の活性レベルを表す。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

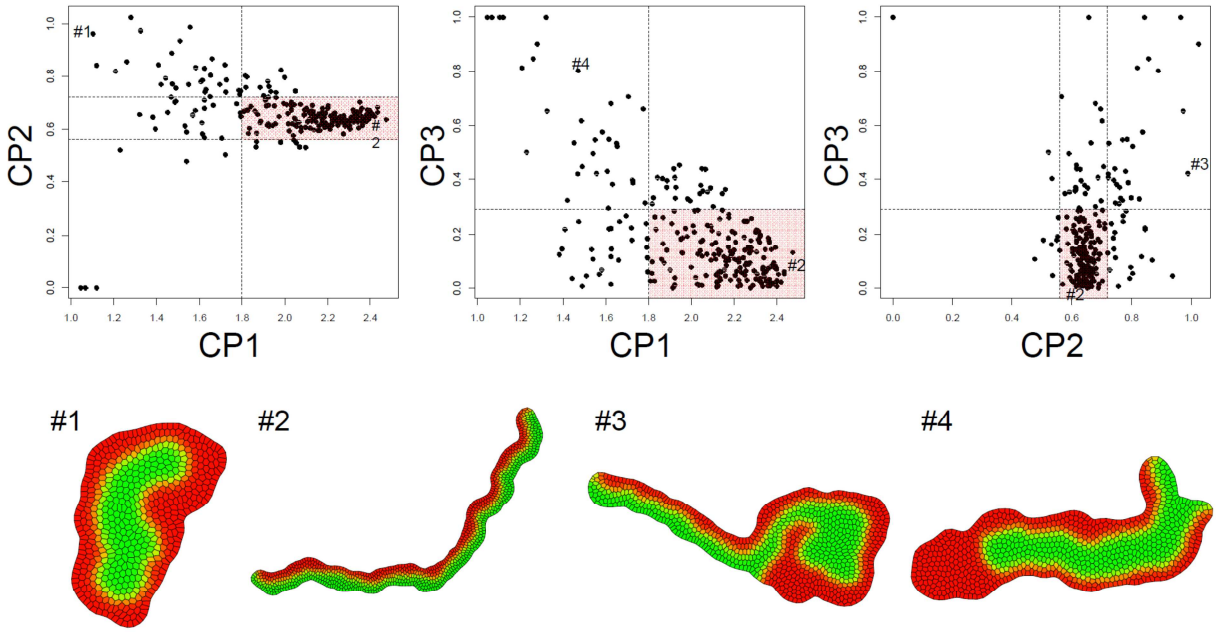

Figure 2.3

細胞周期 1.0 における Random cell division での数値計算結果に対する Characteristic parameter (CP)散布図。点線で囲まれた赤い領域が正常に平坦成長した葉を特徴づける CP の領域である(CP1>1.8, 0.58<CP2<0.72, CP3<0.29 and CP4=1)。#1-#4 は色々な CPs に相当する得られた葉のパターン例を示す。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

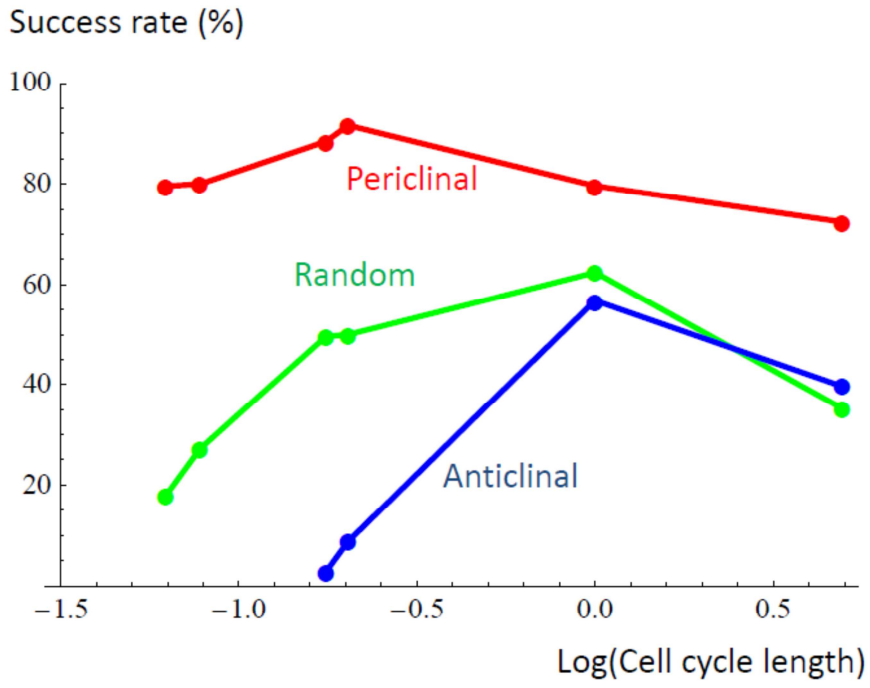

Figure 2.4

さまざまな細胞周期に対する平坦葉成長の成功率(%)。赤、緑、青はそれぞれ periclinal division、random division、anticlinal division を表す。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

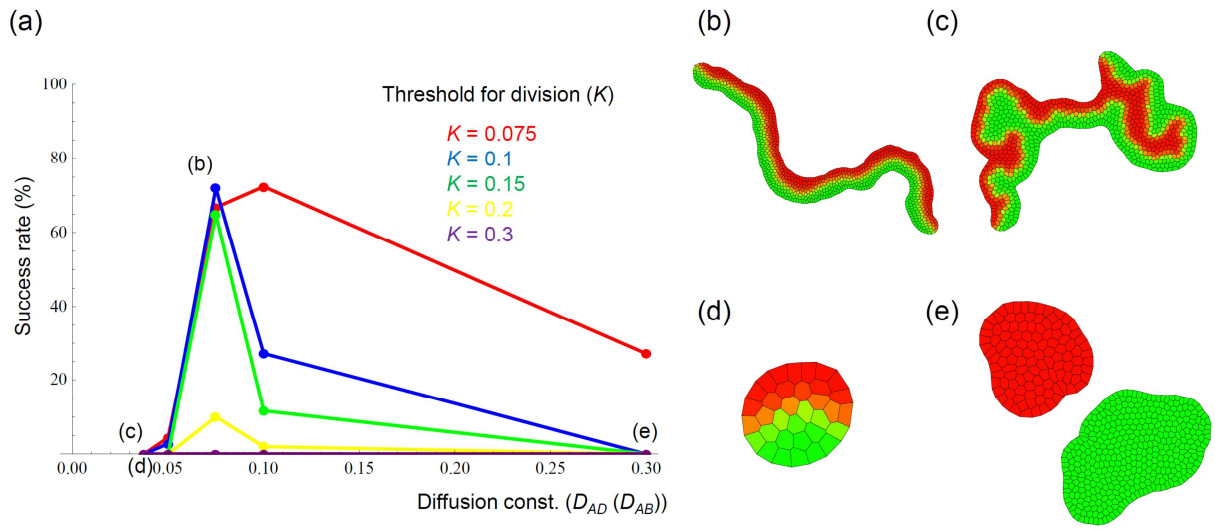

Figure 2.5

(a)　様々な表裏(AD/AB)因子の拡散係数(D_{AD} (D_{AB}))や細胞分裂閾値(K) での平坦葉成長の成功率(%)。数値計算は random cell division かつ細胞周期 1.0 で行った. (b)-(d) 数値計算例. (b) D=0.075, K=0.1. (c) D=0.0375, K=0.1. (d) D=0.0375, K=0.3. (e) D=0.3, K=0.2. (Hayakawa et al., 2016, JTB)

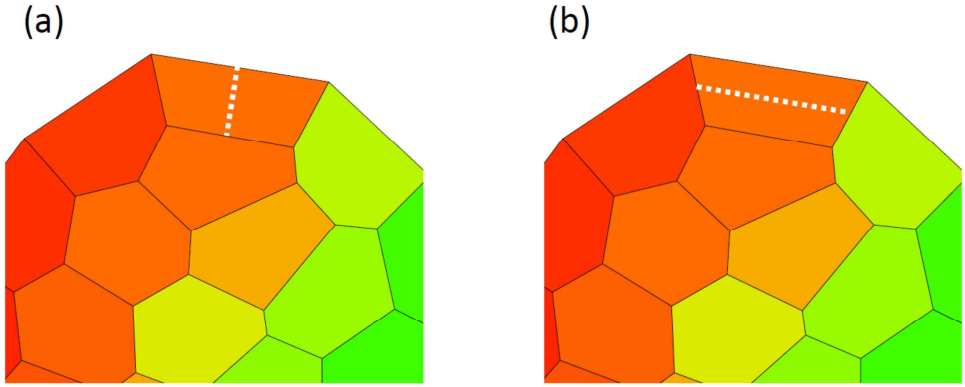

Figure 2.6

Polarized cell division; (a) anticlinal division: 組織表面に対して分裂面が垂直に入る。(b) periclinal division: 組織表面に対して分裂面が平行にはいる。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

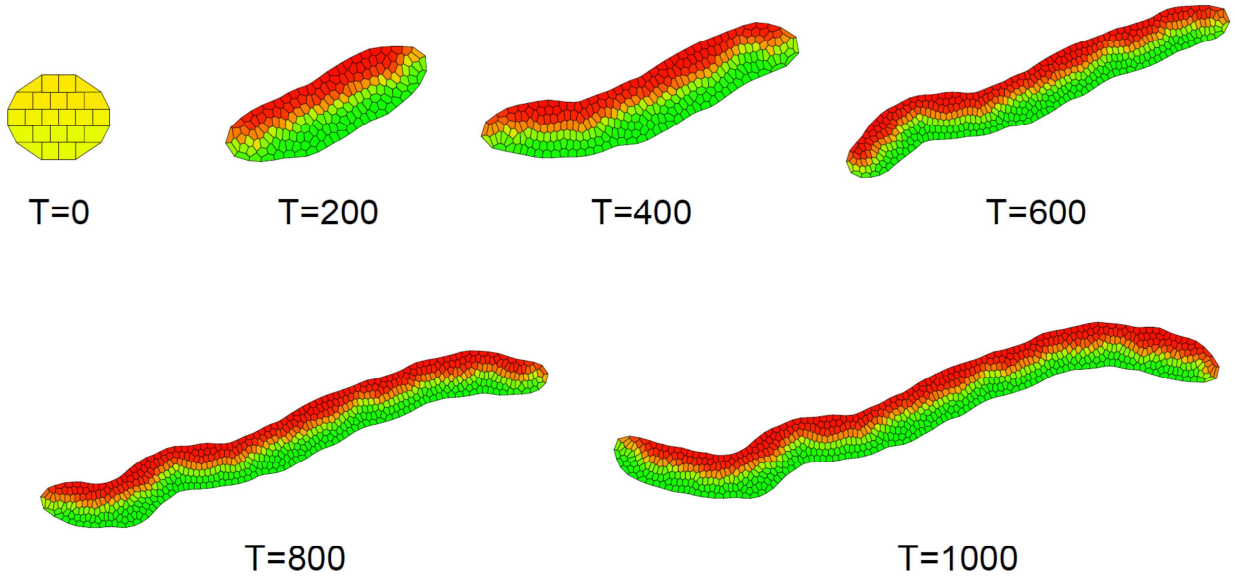

Figure 2.7

Periclinal division での葉成長数値計算の時間発展例。
(Hayakawa et al., 2016, JTB)

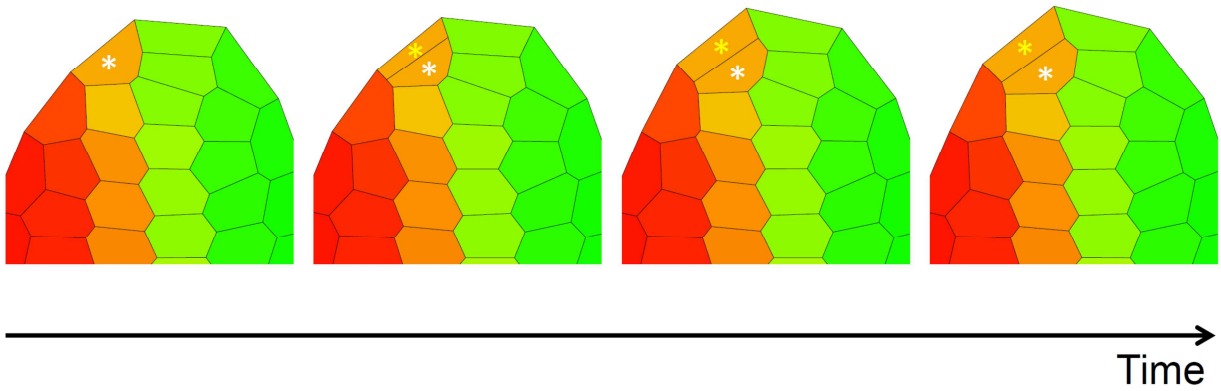

Figure 2.8

Periclinal division での成長軸の方向は細胞分裂の方向と同じになる。葉の周縁部の拡大図。黄色アスタリスクで示した細胞は白色アスタリスクの細胞の娘細胞を表す。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

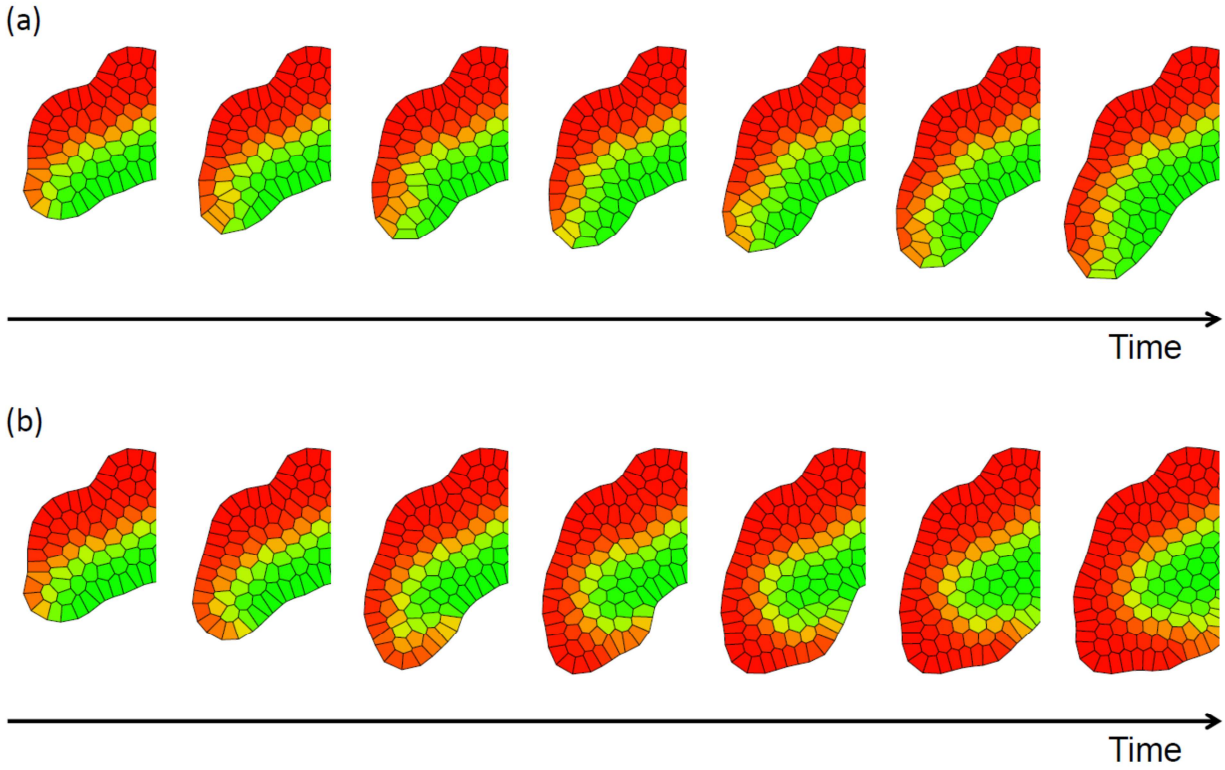

Figure 2.9

(a)Periclinal division と(b)Anticlinal division での葉の成長の時間発展。

一度境界面が揺らぐと、その揺らぎはAnticlinal divisionの効果により拡大しやすくなる。
(Hayakawa et al., 2016, JTB)

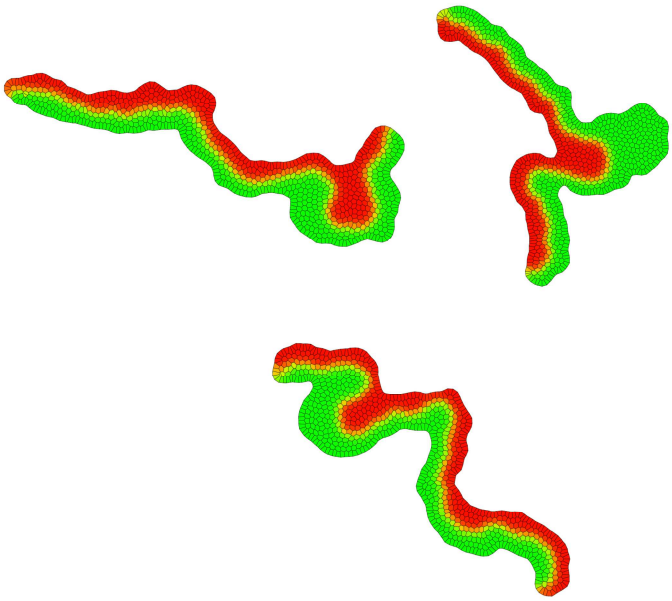

Figure 2.10

Characteristic parameter (CP)の値により棄却されない異常形状葉の例。(Hayakawa et al., 2016, JTB)

4 総合討論

本論では植物の形づくりという形態形成現象が化学シグナルや遺伝子発現のパターン形成とその形成されたパターンを位置情報として利用した組織自体の変形という二つのプロセスからなると考えた。分子が作るパターン形成の例としてオーキシンのパターン形成に触れ、二つのプロセスからなるサイクルの時間発展の例として葉の形態形成を論じた。

オーキシンのパターン形成の解析を通して、オーキシンと PIN の相互作用による分子レベルのミクロ現象と葉序や葉脈形成といったマクロな形態現象の基盤となるパターン形成をつなぐ理解が得られた。また、この研究では今まで知られていなかったオーキシンパターンの多様性を生み出すメカニズムを発見することができた。現在ではこの研究によって得られた解釈に対応する実験結果も見つかってきており、実験植物学への貢献もできつつあると考える。

葉の形態形成の解析では、遺伝子発現ダイナミクスと組織の変形のダイナミクスをカップルすることで葉の形態形成を裏表遺伝子の発現パターンというミクロな情報をもとにした組織変形の時間発展として考えた。その結果、従来の植物学において平坦な葉を形成するための理解の不十分さを明らかにし、さらに、その理解を発展させる新たなメカニズムの提案を行うことができた。これは現代の実験生物学では扱うことの難しい動的な現象にまで理解を進めることができた一例となり得る。

本研究全体を通して植物形態形成の理解を進めることができた。実際の植物の中では他にも分子が作るパターンとそれをもとにした形の変形という二つのプロセスからなるサイクルが繰り返し色々な部位で起きているに違いない。そこでは本論で扱った方法によりその多くが説明できるはずである。ここでは本論では取り上げなかったさまざまな植物の形態形成について概観し、現在までの理解とこれからの方向性を探ってみることにする。

茎頂分裂組織や根端分裂組織などのニッチの維持

植物は、動物のように体細胞分裂の回数を最低限にかぎるようなことをせず、体細胞をつくる幹細胞は、茎頂と根のそれぞれの頂端分裂組織において維持され、一生を通じて

活動を続ける。植物の地上部では茎頂分裂組織から供給される細胞群により葉や花の側生器官が作られる。盛んに分裂して細胞数が劇的に増加しているはずなのに幹細胞の数は限られた数に制限され一定の形を維持したまま成長する。この茎頂分裂組織における幹細胞の維持と分化のバランスを保つためには *CLAVATA*(*CLV*)と *WUSCHEL*(*WUS*)という遺伝子の働きが必須であることが知られている。*clv* 変異体では未分化の細胞が蓄積し、その結果肥大化した茎頂分裂組織を作ってしまう。一方、*wus* 変異体では茎頂分裂組織を作らなくなったり、幹細胞群が維持されず成長の初期段階で器官分化が終了してしまう。CLV と WUS はそれぞれ幹細胞とそのすぐ下側にある形成中心で発現が確認されており、また、WUS は CLV を正に制御し、CLV は WUS の発現を負に制御しているという報告がある（Clark, 2001）。このフィードバック制御により茎頂分裂組織における幹細胞の維持と分化細胞の供給のバランスが保たれていると考えられている。このような遺伝子の発現解析の一方で、数理的なアプローチも行われている。この WUS-CLV の制御関係はチューリングモデルにおけるアクチベーターインヒビターモデルの制御関係と同じであり、Fujita らは反応拡散モデルを使って茎頂分裂組織が維持されるメカニズムを自己組織的なパターン形成の問題に焼き直して説明しようとしている(Fujita et al, 2011)。

根端分裂組織は、茎頂分裂組織と同様に幹細胞を生み出し続け、かつ分化細胞も作る組織である。根端分裂組織では静止中心とよばれる特殊な細胞のまわりに幹細胞群が取り囲むように存在している。これらの幹細胞は分裂する際、静止中心に接触している娘細胞は幹細胞性を維持し、もう一つの接触していない方は特定の機能を持った細胞に分化する。静止中心より下側や側方にある細胞は不等分裂により幹細胞とコルメラ細胞となる。上側は中心柱や内皮などを構成する細胞の供給源となる。根の成長は主にこの部分の細胞増殖と細胞伸長による。このように地中部では分裂組織の維持と組織が形を保ちつつ成長するというプロセスが同時に実現されている。この組織維持のメカニズムを駆動するために *SCARECROW* (*SCR*)や *SHORTROOT*(*SHR*)などの遺伝子の存在が多く報告されている(Sabatini et al, 2003; Helariutta et al, 2000; Nakajima et al, 2001)。*SHR* は中心柱で発現し、

一層外側の細胞層に移動して *SCR* の発現を誘導する。*SCR* は静止中心で発現する遺伝子であることがわかっているが、これらの遺伝子の発現だけでは、静止中心と分裂組織の維持は説明できない。じつはここでもオーキシンの非一様分布が位置情報となっており、これらの遺伝子群との協調で静止中心の位置を動的に決定かつ維持している(Sabatini et al, 2003)。実際にオーキシンの極性輸送を阻害することで、オーキシンを均一に分布させてやると中心柱の外側の層すべてが静止中心に分化する。

茎頂分裂組織や根端分裂組織では形成中心や静止中心が隣接する幹細胞の活性維持に重要なシグナル発信源としての役割を果たしている。このような組織は幹細胞を保つためのニッチと呼ばれる微小な環境を構成している。一般的には、シグナルの発信源とそのシグナルが及ぶ範囲がニッチに相当する。幹細胞の分裂によりニッチから外へでた細胞は分化へ向かい、ニッチにとどまるものは幹細胞の性質を保つ。静止中心や形成中心の機能を考えると、これら二つの組織はニッチの概念によくあてはまる。ニッチは分裂組織のなかに埋め込まれ、そこでは絶えず新しい細胞がうみだされる。このように動的に細胞が常に入れ替わっていくなかで、植物は安定にニッチの位置を維持していかなくてはならない。

植物の生殖器官である花の形態形成モデル（ABC モデル）

植物の胚発生では動物のそれとは異なり、胚発生の段階で生殖幹細胞の決定がされない。植物では茎頂分裂組織において花芽誘導により一部が花芽分裂組織を生み出したときはじめてその中で生殖系列の幹細胞が作られる。植物における生殖器官は花であり、その形態形成に関する分子遺伝的な研究がホメオティック遺伝子の研究を通じて行われてきた。それらをまとめるかたちで Meyerowitz らによって ABC モデルが提唱された(Coen and Meyerowitz, 1991)。このモデルによると、花芽には、がく、花弁、雄蕊、心皮ができる四つの同心円領域(whorl)があり、となり合う二つの Whorl で ABC それぞれのクラスの遺伝子が働きその組み合わせにより決まった器官が作り上げられる。シロイヌナズナでは、whorl1 で A 遺伝子である *APETALA1,2* が単独で働き、がくが作られる。Whorl2 では B クラス遺伝

子である *APETAL3* と *PISTILLATA* と A クラス遺伝子が働き、花弁ができる。Whorl3 では B クラス遺伝子と C クラス遺伝子である *AGAMOUS* により雄蕊ができる。そして Whorl4 では *AGAMOUS* 単独で心皮の形成を制御している。さらに A クラス遺伝子と C クラス遺伝子は相互に抑制し合っていて、それぞれの遺伝子の発現の空間パターンを形成しているらしい (Coen and Meyerowitz, 1991)。この ABC モデルは様々な植物種に対して成り立ち、今日、花の形態形成の基本モデルとして広く受け入れている。上述のように ABC モデルによって花の形態形成は理解されてきているのだが、ホメオティック遺伝子から形態形成に至る分子レベルでの作用機構は、植物のみならず動物でも未解明のままである。つまり、重要な遺伝子は分かったが、それらの遺伝子が花弁や雄蕊、雌蕊などの器官でどのように細胞の分化が進み、どのような細胞同士の相互作用により出来上がっていくのかといった具体的な形態形成のプロセスやメカニズムは不明なことが多い。形態形成の機構を真の意味で理解することは、ホメオティック遺伝子から三次元の形態構築に至る、動的な遺伝子発現ネットワークとそれとカップルした組織変形を含めたダイナミクスを調べることで可能となるかもしれない。

孔辺細胞やトライコームの二次元空間パターン形成

植物の葉の表面には特徴的な器官の存在が知られている。その代表例として二つ、気孔とトライコームがあげられる。気孔は孔辺細胞という細胞により構成されており、植物はこの器官を通して外界と光合成に必要なガス交換を行う。他方トライコームは、葉の表面に存在する棘のような構造で、害虫から身を守るための化学物質をその内部に蓄積しており自己防衛のための組織であると考えられている。これら二つの器官は葉の表面上に等間隔に一様に分布しているように観察される。これは二次元上でのパターン形成の問題として捉えることが可能であろう。動物組織であればこのような一様な等間隔パターンを実現するために Notch-Delta 系のように細胞移動や直接的な接触によるシグナル伝達のメカニズムの存在が知られている。一方で植物組織は細胞壁の存在により動物と同じメカニズムは考えづらい。

では、どのようなメカニズムにより実現されているのだろうか。現在までに多くの遺伝学的な研究が蓄積されている。

気孔の形成には必須な遺伝子として *SPEEACHLESS*(*SPCH*), *MUTE*, *FAMA* が同定されており、それぞれが気孔形成におけるシーケンシャルな細胞分化の各ステップにそれぞれの遺伝子が促進因子として作用していることが明らかになっている(Torii et al, 2007)。気孔の形成はメリステモイドと呼ばれる孔辺細胞の前駆的な細胞が表皮細胞から不等分裂によって生じるところから始まる。メリステモイドは不等分裂を繰り返す一方で、MUTE の働きによりその幹細胞的な性質が抑制され孔辺母細胞へと分化する。さらに孔辺母細胞は *FAMA* の働きにより最終的に等分裂により二つの孔辺細胞ができる。*SPCH* は表皮細胞のメリステモイドへの分化を促進する一方で、気孔形成の抑制因子である抑制性の細胞間隙で働く分泌ペプチド *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR1*(*EPF1*) の転写も活性化する(Kanaoka et al, 2008; Hunt and Gray, 2009; Hara et al, 2009)。実験的な観察によると葉の形成初期段階の葉の前表皮細胞では一様に *SPCH* が発現しているが、時間とともにその発現パターンは一定の間隔を保つように局在化していく(Pillitteri et al, 2007)。このようなことから、気孔のパターン形成はアクチベータインヒビターの制御メカニズムにより実現されているのではないかと推測されている。

トライコームの空間パターンは多くの関連遺伝子が同定されているが、気孔形成と同様活性化因子群と抑制因子群に大別できる。活性化因子の代表は *GRABRA*(*GL*)遺伝子群で(Rerie et al, 1994)、抑制因子は Myb 転写因子である *CAPRICE* (*CPC*) や *TRIPTYCHON*(*TRY*)などが挙げられる(Zhao et al, 2008; Schellmann et al, 2002)。トライコーム関連遺伝子の発現も葉の形成初期段階では活性化因子、抑制因子ともに一様に発現しているのだが、時間とともには発現が局在化していく(Zhao et al, 2008; Schellmann et al, 2002)。気孔形成の時と異なるのは抑制因子が、EPF1 が細胞間隙を移動する分泌ペプチドであったが、トライコーム形成の抑制因子はプラズモデスマータを介した直接的な移動である点である。いずれにせよ気孔とトライコームどちらの空間パターン形成においても植物の

葉に見られる二次元パターンの形成はチューリングモデルのアクチベータインヒビターの概念によりうまく説明できるようである。

シロイヌナズナのトライコームは空間パターンだけでなく、その形状自体も特徴的な構造をもち、その形態形成のメカニズム興味深い。通常のトライコームは三つ又に分岐している。遺伝学的研究から *TRYPTICHON* (*TRY*)変異体では三分岐からさらに分岐が起き、一方で *BRANCHLESS TRICHOMES* (*BLT*) 変異体では全く分岐が起きなくなってしまうというような観察結果が得られている。このトライコームの特徴的な構造がどのようなメカニズムによって実現さているのかは明らかになっておらず、興味深い問題である。

ダイナミクスとして形態形成を理解する

ここまで述べてきたどの例においても、ある時刻におけるスナップショットの組織中で発現する遺伝子群やオーキシンの空間分布について詳細に観察されてきた。しかしながら、時間発展の考えや組織変形を考慮しきれていない。植物は細胞壁をもち細胞移動の自由度が動物のそれとは比べられないほど小さいといえども細胞同士の位置関係は刻々と変化する。現在までに実験的に明らかになっている事実に基づいたダイナミクスがそれぞれの器官（花、根端分裂組織、茎頂分裂組織など）の安定な成長を実現するかどうかは不透明である。さらに言うならば細胞分裂という摂動のもと時間発展する中で、その形を保てるかどうか自明な問題ではない。これらすべての問題に対しても本論で行ったことと同様な数理的なアプローチは有効であり、解くべき課題である。

機械的なストレスシグナルによる形態形成

前節までは遺伝子やモルフォゲンといった分子の形態形成における働きついて概観してきた。一方で近年、測定技術の向上もあり機械刺激がどう植物の形態形成に関わっているのか、という研究が注目されてきている。ショウジョウバエの胚発生段階において機械的な圧縮歪みによりある形態形成に関連する遺伝子の発現が誘導され、形態変形を引き起こす

ことが報告されている(Farge, 2003)。動物の骨組織は外部の力学環境に応じて応力が減少する方向に向かい強度上好ましい形状変化するという Wolff の法則などが知られている。これらの例からもわかるように、機械刺激と形態形成には密接な関係があるようだ。植物も同様にして外部環境や自らの成長によるシグナルを常に受け取っている。そのシグナルは機械刺激として伝わるだろう。植物ではどのように機械刺激を形態形成に利用しているのだろうか。以下では、植物形態形成における機械的な刺激の役割や、その理論的な研究の取り組みを概観する。

植物形態形成における力学的なシグナルの役割

植物の細胞はさまざまな形のものがある。茎や根など植物体を支持する組織の細胞は円筒型をしたものが多い。一方、葉の表皮はジグソーパズルのような凸凹した細胞でできている。花粉管や根毛といった細胞はチューブのような細長い構造を作る。これらの細胞の形は細胞分裂後にどの方向にどれだけ伸長するかという異方性の程度によって決まる。植物細胞の形は外骨格である細胞壁の形の変化に大きく依存する。植物細胞壁はセルロースを主成分とする繊維からできており、その組成や配向の仕方が細胞壁の局所的な機械強度を決め、膨圧とのバランスで細胞の形が決定する。例えば茎や根の細胞は円筒型であるが、そのような細胞では円筒軸に対し垂直な方向にセルロース繊維が配向し、側面方向への肥大を抑制する。これが形の拘束条件となり、膨圧による内的な力により細胞は円筒軸方向へと伸長する。このようにセルロース繊維の配向の仕方により細胞の異方的な伸長が実現されるのである(Baskin 2005)。この配向の仕方の分子レベルでのメカニズムは、細胞膜表面下に存在する表層微小管に依存していることが知られている。表層微小管によりセルロース合成酵素が直接ガイドされているという証拠が得られている(Paredez et al, 2006)。シロイヌナズナの茎頂分裂組織ではセルロース繊維が細胞の膨圧成長や機械刺激によって生じる応力方向のうち最大の方向に沿って蓄積されることが分かっている。このことにより最大応力方向への細胞壁強度があがる。この制限のもと細胞は成長し新たな応力場を生じる。このようにして次

の時間ステップでの細胞壁の局所的な強度が決まる。つまり力学的な力と細胞壁の制御の間にフィードバックループがある(Hamant et al, 2008)。ここで働く力学的なシグナルを感知するメカニズムは不明だが、細胞壁中や細胞膜中のメカノセンサーとして働くタンパク質の存在が有力視されている。機械刺激は微小管配向以外にも大事な役割がある。例えば、PIN の細胞内局在の変化などが知られている。本論ではオーキシンと PIN の配向の相互作用により様々なオーキシンのパターン形成が実現されることを議論したが、PIN の配向はオーキシンだけでなく機械刺激によっても制御を受けているらしく、最もストレッチされた膜に局在しやすくなるという報告がある(Heisler et al, 2010)。他には、細胞壁中に存在する TOUCH とよばれるタンパク質は、風などのような外部の機械的な拘束条件に対して茎を太く短くするという役割を果たしている(Lee et al, 2005)。

力学モデル研究の必要性

細胞や細胞の集合体である組織、器官の形を決めるメカニズムは複雑であることが容易に想像できることから力学的なモデルの構築が重要になる。工学の分野では様々な構造の物体内部における応力分布などを正確に求めるために弾性体力学や塑性力学のようなモデルが広く使われてきた。しかしながら生物の物理モデルを作ることは容易ではないようだ。それは生物個体が非常にたくさんの要素から成り立っているということや環境との間で質量やエネルギーのやりとりがあること、さらには機械的な性質や形そのものが刻々と変化しているからである。このように様々な困難があるが、現在までに多くの試みがなされてきている。

植物細胞は細胞壁の存在により一つ一つの細胞は動物細胞のように自由に動き回ることはできない。そのため各細胞の成長の積み重ねが一個体の形に直接的に影響してくる。このようなことから植物個体全体や器官の形づくりを知るためにはまず、一細胞の成長の振る舞いを考えることが必須である。膨圧による細胞の成長は Sachs によって提唱され、その考えは Lockhart によりシンプルな膨圧と体積成長の関係のモデルとして次のように定式

化された: $1/VdV/dt = \mu(P - P_y)$ (Lockhart, 1965)。μは伸展性、P_yは降伏の閾値で膨圧Pがこの値を超えない場合は体積Vの成長は起きない。このモデルが基礎となり、様々な拡張が行われた。Ortega は Lockhart モデルに弾性体の性質を加え拡張し（Ortega, 1985）、Green は膨圧と降伏閾値との間のフィードバックを考慮しモデルの拡張を行った(Green, 1971)。これらのモデルは膨圧成長の概念的な表現はできているものの、細胞の形や細胞壁の成分組成の異方性などは考慮されていなかった。最近になり Dumais らが異方性をも含んだ定式化を行い、根毛のような一細胞単純な変形を説明している(Dumais et al, 2006)。

植物において組織の中ではある細胞の成長は周りの細胞の成長の仕方に依存する。植物の組織レベルの形態変形を扱う場合、そのような拘束条件のもと組織変形を考えなくてはならない。細胞の集まりである組織レベルでの変形を扱う試みとして様々な構成則に基づいたモデル化がされている。構成則には粘性や弾塑性が仮定された。粘性モデルでは膨圧による応力が歪み率に比例する。一方で弾塑性は、ある閾値に変形が達したら要素弾性体の静止長が変化し、達しない場合は弾性変形するという性質である。粘性モデルの例として、Dupuy らは茎頂分裂組織での側生器官発生時や、根における側根形成時の応力や歪みの分布とオーキシン分布との関係とともに解析した(Dupuy et al, 2008)。また、藻類の *Coleochaete* の発生の自己組織化を同様のモデルを使って解析している(Dupuy et al, 2010)。Forzard らは同じく粘性モデルにより有限要素法を細胞レベルで適用し、根の屈性や成長を調べている(Forzard et al, 2013)。弾塑性モデルを使った研究では、Hamant らがシロイヌナズナの茎頂分裂組織における細胞内の微小管配向と機械刺激との間のフィードバックの関係を知るために実験と合わせて利用している。ここでは茎頂分裂組織の L1 層の成長がどう機械刺激により制御されているかを検証するために、内部層からの一様な圧力により成長すると仮定している。そのような状況で組織が力学平衡に達したら各細胞の細胞壁の弾性歪みは塑性閾値と比較され、閾値を超えている場合、弾性変形と閾値との差に比例して静止長を増加させるという方法で組織変形をモデル化している(Hamant et al, 2008)。また、確率モデル使ったアプローチとして Uyttewaal らは組織の成長に対して個々の細胞の成長率のば

らつきがどう影響するかということを調べている。各々の細胞が異なる target growth rate (TGR)を持つとし、組織の中で隣接する細胞同士は互いの成長率の違いにより機械的なストレスが発生する。さらに、このように生じる応力のうち最大の応力方向での growth rate が減少するという仮定し、機械的なストレスと成長率の間にフィードバックループを盛り込んだモデルを構築した。このモデルでは二つの鍵となるパラメータがありそれは TGR のばらつきの大きさとフィードバックの強さである。その結果は直観に反するものとなっていて、TGR が大きくフィードバックの効果が小さいと細胞間の成長率の違いが低下し、TGR が小さくフィードバックの強さが大きいと実効的な成長率の違いが大きくなり組織の成長不均一性が上昇する。著者らはこれは組織の突出現象などでの重要性を主張しており、実際に微小管の束化や断裂に関与するタンパク質であるカタニンの変異体を用いて茎頂分裂組織における側生器官の発生現象において機械刺激のフィードバックが影響することを報告している(Uyttewaal et al. 2012)。

上述のように組織の成長を細胞ベースのモデルを使って解析する研究の一方で、組織を粗視化して考える連続体として扱う試みも行われ、様々な問題に適用されている。Coen ら組織の変形は微小な領域に限れば等方的な成長と異方性に分解できると考えた(Coen et al, 2004)。さらにこの考えを計算可能にするために Green らや Kennaway らは組織をメッシュで区切り、それぞれの区画がある規則で成長するという仮定をするモデルである Growing Polarized Tissue (GPT)を導入した。(Green et al, 2010; Kennaway et al, 2011)。実際に植物の花弁の成長を様々な遺伝子の変異体を解析し、このモデルを使うことでそれらの遺伝子の形態形成における物理的な役割を推定するという研究がなされている(Green et al, 2010)。GPT の考え方は細胞ベースでのモデリングにも拡張されてきており、Boudon らは SAM での側生器官の形成に細胞壁の進展性の異方性の重要性を主張している(Boudon et al, 2015)。また違った趣の研究としては、つる性植物のらせん構造に注目したものがある。例えばアサガオでは右巻きらせんを形成する。このらせん構造形成のメカニズムはシロイヌナズナの微小管の変異体の解析から明らかにされつつある。野生型のシロイヌナズナの根はね

じれていないのだが、微小管関連遺伝子の変異体ではねじれが生じる。細胞レベルの観察によると、そのような変異体では微小管がらせんの配向を示すことが分かっている(Thitamadee et al., 2002)。微小管のらせん配向によりセルロースの異方性のある蓄積が起こり、細胞自体が傾いた成長をすると考えられている。分子遺伝学的なアプローチの一方で、この問題に対して Wada らは、細胞以下レベルのミクロな微小管の示すらせんがマクロにスケールアップされることで、根のマクロならせんが実現されることを微分幾何を用いた連続体としての記述により説明している (Wada, 2012)。このような手法は、様々な形態変化にも適用されており、葉のような二次元シートのような器官の形成を薄膜の連続体のシンプルな変形成長とみなし、しわくちゃな葉やドーム状の葉の形成を説明できるという報告もある(Audoly and Boudaoud 2003; Dervaux and Ben Amar 2008; Efrati et al. 2009)。動的な組織変形にともなった葉脈のリモデリングのような問題にも連続体を使った解析が試みられている。葉脈は葉の成長の間、サイズが大きくなるにもかかわらず基本的な編み目構造や水や養分を輸送するという機能は維持される。Bar-Sinai らは、葉脈を粘弾性のロッドからなるネットワークであると仮定し、組織の成長や外力に対してどのように葉脈のパターンが変化するか調べた。その結果、成長に従って葉脈は引き延ばされるだけではなく、葉の成長に合わせて再構成を繰り返しながらその構造を維持していくことを明らかにした(Bar-Sinai et al., 2016)。

植物形態形成の総合的な理解にむけて

シロイヌナズナやイネのゲノムが解読されて以降、植物の形態形成は遺伝子や植物ホルモン等の分子がどうかかわっているのかという視点で解析されてきた。しかし、それらの形態形成においての重要性は抽象的でかつ定性的にしか語られていない。実際の植物の形づくりへの遺伝子の役割は直接的ではなく、細胞や組織を構成する要素の物理的な性質の変化を通じて伝わる。Lockhart モデルの言葉で言うならば、組織中の一つ一つの細胞において進展性 μ や降伏閾値 P_y が遺伝子ネットワークによる制御を受けており、その応答の結果細

胞が変形するということである。具体的には、オーキシンや expansin、ペクチン修飾酵素といった分子により細胞壁の性質の変化がこれらのパラメータの変化を引き起こす。これらのタンパク質の発現は *MONOPTEROS* や *APETALA2*、*AGAMOUS* といった転写因子の制御下にあることが知られている。各細胞が適切に応答し、その集まりの組織が変形して器官が出来上がっていくという考えは広く受け入れつつある。しかしながら、遺伝子の制御ネットワークが具体的にどのように特徴的な器官の形を生じさせているのかという疑問には答えられていない。これらの問題は分子スケールと細胞スケールさらには組織スケールといったマルチスケールの間でのフィードバックが存在することによりさらに複雑になる。例えば、モルフォゲンのパターン形成は組織の幾何に依存するし、組織の中では細胞ごとに成長率が異なるために生じる力により各細胞の異方成長や成長率自体の変化を生む。特定の遺伝子やローカルな力が器官全体の形にどう影響しているかは自明ではない。

ある時刻で実現した植物の形態はモルフォゲンの空間分布といった化学シグナルや力学的なシグナルに依存した結果である。遺伝子発現やホルモンの作用により細胞の状態が変化し成長する。その成長に伴い組織にはあらたに応力場が生じる。その応力場はさらに成長の仕方を決めるだろう。このようなフィードバックが連続して起こることで生物の成長は実現していると考えられる。化学シグナルや遺伝子発現、さらには応力場といった形態形成に関与する刺激どれをとってもキーワードはフィードバックと、これらが強調して引き起こされる自己組織化であるようだ。これまで述べてきたように植物形態形成現象は近年急速にかつ多角的に研究されてきている。しかし、ここで取り上げた例は植物形態形成現象全体で考えればごく一部である。時空間ダイナミクスとしての形態形成は、化学シグナルや遺伝子発現、さらには力学的なシグナルが複雑に絡み合う複雑な現象として統合的に理解される必要があるだろう。理論生物学に課せられた使命は数理的アプローチにより様々な現象に潜むメカニズムを解き明かし、実証可能な予測というものを打ち出すことであると考える。今後も形態形成現象のさらなる理解のために貢献していきたい。

Reference

2 章

Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell 115: 591–602.

De Rybel B, Adibi M, Breda AS, Wendrich JR, Smit ME, Novák O, Yamaguchi N, Yoshida S, Isterdael GV, Palovaara J, Nijsse B, Boekschoten MV, Hooiveld G, Beeckman T, Wagner D, Ljung K, Fleck C, Weijers D. (2014) Integration of growth and patterning during vascular tissue formation in Arabidopsis. Science 345: 1255215

Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E. (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. Proc Natl Acad Sci USA 105: 8790–8794.

Feugier FG, Mochizuki A, Iwasa Y. (2005) Self-organization of the vascular system in plant leaves: inter-dependent dynamics of auxin flux and carrier proteins. J Theor Biol 236: 366–375.

Feugier FG, Iwasa Y. (2006) How canalization can make loops: A new model of reticulated leaf vascular pattern formation. J Theor Biol 243: 235–244.

Fujita H, Mochizuki A. (2006) Pattern formation of leaf veins by the positive feedback regulation between auxin flow and auxin efflux carrier. J Theor Biol 241: 541–551.

Fujita H, Mochizuki A. (2006) The origin of the diversity of leaf venation pattern. Dev Dyn 235: 2710–2721.

Hayakawa Y, Tachikawa M, Mochizuki A. (2015) Mathematical study for the mechanism of vascular and spot patterns by auxin and pin dynamics in plant development. J. Theor. Biol. 365:12-22

Jönsson H, Heisler MG, Shapiro BE, Meyerowitz EM, Mjolsness E. (2006) An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. Proc Natl Acad Sci USA 103: 1633–1638.

Koizumi K, Naramoto S, Sawa S, Yahara N, Ueda T, Nakano A, Sugiyama M, Fukuda H. (2005) VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. Development. 132(7):1699-711.

Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyozuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature. 445(7128):652-5.

Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H. (2009) Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. Plant Cell. 21(10):3152-69.

Mattsson J, Sung ZR, Berleth T. (1999) Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. Development 126: 2979–2991.

Mattson J, Ckurshumova W, Berleth T. (2003) Auxin signaling in Arabidopsis leaf vascular development. Plant Physiol 131: 1327–1339.

Marhavý P, Bielach A, Abas L, Abuzeineh A, Duclercq J, Tanaka H, Pařezová M, Petrášek J, Friml J, Kleine-Vehn J, Benková E. (2011) Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. Dev. Cell 21: 796–804.

Merks RMH, Van de Peer Y, Inzé D, Beemster GTS. (2007) Canalization without flux sensors: A traveling-wave hypothesis. Trends Plant Sci 12: 384–390.

Mitchison GJ. (1980) A model for vein formation in higher plants. Proc R Soc Lond B 207: 79–109.

Mitchison GJ. (1981) The polar transport of auxin and vein patterns in plants. Phil Trans R Soc Lond B 295:461–471.

Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. Plant Cell 3: 677–684.

Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JA, Palme K. (2008) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. Mol Plant. 1(2):321-37

Reinhardt D, Pesce ER, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J,

Kuhlemeier C. (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. Nature 426: 255–260.

Rolland-Lagan AG, Prusinkiewicz P. (2005) Reviewing models of auxin canalization in the context of leaf vein pattern formation in Arabidopsis. Plant J 44: 854–865.

Sachs T. (1981) The control of patterned differentiation of vascular tissues. Adv Bot Res 9:151–262.

Sachs T. (1991) Cell polarity and tissue patterning in plants. Development Suppl 1: 83–93.

Sachs T. (2000) Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. Plant Cell Physiol 41: 649–656.

Sahlin P, Söderberg B, Jönsson H. (2009) Regulated transport as a mechanism for pattern generation: capabilities for phyllotaxis and beyond. J Theor Biol 258: 60–70.

Scarpella E, Marcos D, Friml J, Berleth T. (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. Genes Dev 20: 1015–1027.

Sieburth LE. (1999) Auxin is required for leaf vein pattern in Arabidopsis. Plant Physiol 121:1179–1190.

Sieburth LE, Muday GK, King EJ, Benton G, Kim S, Metcalf KE, Meyers L, Seamen E, Van Norman JM. (2006) SCARFACE encodes an ARF-GAP that is required for normal auxin

efflux and vein patterning in Arabidopsis. Plant Cell. 18(6):1396-411.

Smith RS, Guyomarch S, Mandel T, Reinhardt D, Kuhlemeier C, Prusinkiewicz P. (2006) A plausible model of phyllotaxis. Proc Natl Acad Sci USA 103: 1301–1306.

Strader LC, Wheeler DL, Christensen SE, Berens JC, Cohen JD, Rampey RA, Bartel B. (2011) Multiple facets of Arabidopsis seedling development require indole-3-butyric acid-derived auxin. Plant Cell. 23(3):984-99

Stoma S, Lucas M, Chopard J, Schaedel M, Traas J, Godin C. (2008) Flux-based transport enhancement as a plausible unifying mechanism for auxin transport in meristem development. PLOS Comput Biol 4: e1000207.

Suzuki M, Yamazaki C, Mitsui M, Kakei Y, Mitani Y, Nakamura A, Ishii T, Soeno K, Shimada Y. (2015) Transcriptional feedback regulation of YUCCA genes in response to auxin levels in Arabidopsis. Plant Cell Rep. 34:1343–1352

Vanneste S, Friml J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. Cell 136:1005–1016.

Walker ML, Farcot E, Traas J, Godin C. (2013) The flux-based PIN allocation mechanism can generate either canalyzed or diffuse distribution patterns depending on geometry and boundary conditions. PLOS One 8:e54802

3 章

Beerling DJ, Osborne CP, Chaloner WG. (2001) Evolution of leaf-form in land plants linked to atmospheric CO2 decline in the Late Palaeozoic era. Nature. 410(6826):352-4.

Beerling DJ, Fleming AJ. (2007) Zimmermann's telome theory of megaphyll leaf evolution: a molecular and cellular critique. Curr Opin Plant Biol. 10(1):4-12.

Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, Martienssen RA. (2000) Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. Nature 408:967–971.

Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN. (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. Nature 465:316–321.

Cunninghame ME, Lyndon RF. (1986) The relationship between the distribution of periclinal cell divisions in the shoot apex and leaf initiation. Ann Bot 57:737–746.

Emery, J.F., Floyd, S.K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N.P., Izhaki, A. et al. (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. Curr. Biol. 13: 1768–1774.

Esau, K. Anatomy of Seed Plants (Wiley, 1977).

Eshed, Y., Baum, S.F., Perea, J.V. and Bowman, J.L. (2001) Establishment of polarity in lateral organs of plants. Curr. Biol. 11: 1251–1260.

Eshed, Y., Izhaki, A., Baum, S.F., Floyd, S.K. and Bowman, J.L. (2004) Asymmetric leaf development and blade expansion in Arabidopsis are mediated by KANADI and YABBY activities. Development 131:2997–3006.

Fink J., Carpi N., Betz T., Bétard A., Chebah M., Azioune A., Bornens M., Sykes C., Fetler L., Cuvelier D., and Piel, M. (2011). External forces control mitotic spindle positioning. Nat. Cell Biol. 13, 771–778.

Floyd SK, Zalewski CS, Bowman JL. (2006) Evolution of class III homeodomain-leucine zipper genes in streptophytes. Genetics.173(1):373-88.

Fukushima, K. & Hasebe, M. (2014) Adaxial–abaxial polarity: the developmental basis of leaf shape diversity. Genesis 52:1–18.

Fukushima, K., Fujita, H., Yamaguchi, T., Kawaguchi M., Tsukaya, H. and Hasebe, H. (2015) Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of Sarracenia purpurea. Nat Commun. 6:6450

Garcia, D., Collier, S.A., Byrne, M.E., Martienssen, R.A. (2006) Specification of leaf polarity in Arabidopsis via the trans-acting siRNA pathway. Curr Biol 16: 933–938.

Hayakawa Y, Tachikawa M, Mochizuki A. (2016) Flat leaf formation realized by cell-division

control and mutual recessive gene regulation. J. Theor. Biol. 404:206-214

Izhaki, A. and Bowman, J.L. (2007) KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in Arabidopsis. Plant Cell 19: 495–508.

Kerstetter, R.A., Bollman, K., Taylor, R.A., Bomblies, K. and Poethig, R.S. (2001) KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. Nature 411:706–709.

Kidner, C.A., Martienssen, R.A. (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. Nature 428: 81–84.

Miyashima S, Koi S, Hashimoto T, Nakajima K. (2011) Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dosedependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root. Development 138:2303–2313.

Nagai T, Honda H. (2001) A dynamic cell model for the formation of epithelial tissue. Phylos. Mag., B81, 699-719.

Pekker, I., Alvarez, J.P. and Eshed, Y. (2005) Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. Plant Cell 17: 2899–2910.

Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N. and Clark, S.E. (2005) Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development. Plant Cell 17: 61–76.

Sarojam R, Sappl PG, Goldshmidt A, Efroni I, Floyd SK, Eshed Y, Bowman JL. 2010. Differentiating Arabidopsis shoots from leaves by combined YABBY activities. Plant Cell 22:2113–2130.

Sussex, I.M. (1951) Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. Nature 167:651–652.

Sussex, I.M. (1954) Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. Nature 174:351–352.

Tepfer SS. 1960. The shoot apex and early leaf development in Clematis. Am J Bot 47:655–664.

Vatén A, Dettmer J, Wu S, Stierhof YD, Miyashima S, Yadav SR, Roberts CJ, Campilho A, Bulone V, Lichtenberger R, Lehesranta S, Mähönen AP, Kim JY, Jokitalo E, Sauer N, Scheres B, Nakajima K, Carlsbecker A, Gallagher KL, Helariutta Y. (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. Dev Cell 21:1144–1155.

Waites R, Hudson A. (1995) phantastica: A gene required for dorsoventrality of leaves in Antirrhinum majus. Development 121:2143–2154.

Waites R, Selvadurai HR, Oliver IR, Hudson A. (1998) The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in

Antirrhinum. Cell 93:779–789.

Yamaguchi T, Yano S, Tsukaya H. (2010) Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of Juncus prismatocarpus. Plant Cell 22:2141–2155.

Yamaguchi,T., Nukazuka, A. and Tsukaya, H. (2012) Leaf adaxial–abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. Plant Cell Physiol. 53(7):1180-1194.

Yin X, Tsukaya H. (2016) A pulse-chase strategy for EdU labelling assay is able to rapidly quantify cell division orientation. New Phytol. doi: 10.1111/nph.13980.

Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G.W., Prusinkiewicz, P., Smith R.S. and Weijers, D. (2014) Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. Dev. Cell 29:75–87.

4 章

Audoly B, Boudaoud A. (2003) Self-similar structures near boundaries in strained systems. Phys. Rev. Lett. 91:086105

Bar-Sinai Y, Julien J, Sharon E, Armon S, Nakayama N, Adda-Bedia M, Boudaoud A. (2016) Mechanical stress induces remodeling of vascular networks in growing leaves. PLoS Comp Biol. 12(4): e1004819

Baskin T. (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. Annu Rev Cell Dev Biol

21:203–22

Boudon F, Chopard J, Ali O, Gilles B, Hamant O, Boudaoud A, Traas J, Godin C. (2015) A computational framework for 3D mechanical modeling of plant morphogenesis with cellular resolution. PLOS Comput Biol. 11(1):e1003950

Coen ES, Meyerowitz EM. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature. 353: 31–37.

Coen E, Rolland-Lagan AG, Matthews M, Bangham JA, Prusinkiewicz P. (2004) The genetics of geometry. PNAS 101(14):4728–35

Dervaux J, Ben Amar M. (2008) Morphogenesis of growing soft tissues. Phys. Rev. Lett. 101:068101

Dumais J, Shaw SL, Steele CR, Long SR, Ray PM. (2006) An anisotropic viscoplastic model of plant cell morphogenesis by tip growth. Int J Dev Biol 50:209–222.

Dupuy L, Mackenzie J, Haseloff J. (2010) Coordination of plant cell division and expansion in a simple morphogenetic system. PNAS. 107(6):2711–16

Dupuy L, Mackenzie J, Rudge T, Haseloff J. (2008) A system for modelling cell-cell interactions during plant morphogenesis. Ann Bot. 101(8):1255–65

Efrati E, Sharon E, Kupferman R. (2009) Buckling transition and boundary layer in

non-Euclidean plates. Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys. 80:016602

Farge E. (2003) Mechanical induction of Twist in the Drosophila foregut/stomodeal primordium. Curr. Biol. 13:1365–1377.

Fozard A, Lucas M, King JR, Jensen OE. (2013) Vertex-element models for anisotropic growth of elongated plant organs. Front Plant Sci. 4:233

Fujita H, Toyokura K, Okada K, Kawaguchi M. (2011) Reaction-diffusion pattern in shoot apical meristem of plants. PLoS One. 6, e18243.

Green PB, Erickson RO, Buggy J. (1971) Metabolic and physical control of cell elongation rate: in vivo studies in Nitella. Plant Physiol. 47(3):423–30

Green AA, Kennaway JR, Hanna AI, Bangham JA, Coen E. (2010) Genetic control of organ shape and tissue polarity. PLOS Biol. 8(11):e1000537

Hamant O, Heisler MG, Jönsson H, Krupinski P, Uyttewaal M, Bokov P, Corson F, Sahlin P, Boudaoud A,Meyerowitz EM. (2008) Developmental patterning by mechanical signals in *Arabidopsis*. Science 322:1650–1655.

Hara K, Yokoo T, Kajita R, Onishi T, Yahata S, Peterson KM, Torii KU, Kakimoto T. (2009) Epidermal cell density is autoregulated via a secretory peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis leaves. Plant Cell Physiol. 50: 1019–1031

Heisler MG, Hamant O, Krupinski P, Uyttewaal M, Ohno C, Jönsson H, Traas J, Meyerowitz EM (2010) Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. PLoS Biol. 8(10): e1000516.

Helariutta Y, Fukaki Y, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN. (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. Cell 101(5):555–67

Hunt L, Gray JE. (2009) The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. Curr. Biol. 19: 864–869

Kanaoka, MM, Pillitteri LJ, Fujii H, Yoshida Y, Bogenschutz NL, Tkabayashi J, Zhu JK, TOrii KU. (2008) SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to Arabidopsis stomatal differentiation. Plant Cell 20: 1775–1785

Kennaway R, Coen E, Green A, Bangham A. (2011) Generation of diverse biological forms through combinatorial interactions between tissue polarity and growth. PLOS Comput Biol. 7(6):e1002071

Lee D, Polisensky DH, Braam J. (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated Arabidopsis genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. New Phytol. 165:429–44

Lockhart JA. (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. J Theor Biol. 8(2):264–

275

Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN. (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. Nature. 20;423(6853):307–11

Ortega JK. (1985) Augmented growth equation for cell wall expansion. Plant Physiol. 79(1):318–20

Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. Science 312(5779):1491–95

Pillitteri LJ, Sloan DB, Bogenschutz NL, Torii KU. (2007) Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. Nature 445: 501–505

Rerie WG, Feldmann KA, Marks MD. (1994) The GLABRA2 gene encodes a homeo domain protein required for normal trichome development in Arabidopsis. Genes Dev. 8: 1388–1399

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. Genes Dev. 17:354–358

Thitamadee S, Tuchihara K, Hashimoto T.(2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. Nature. 9;417(6885):193-196

Torii K, Kanaoka MM, Pillitteri LJ, Bogenschutz NL. (2007) Stomatal development: Three steps for cell-type differentiation. Plant Signal Behav. 2:4, 311–313

Uyttewaal M, Burian A, Alim K, Landrein B, Borowska-Wykret D, Dedieu A, Peaucelle A, Ludynia M, Traas J, Boudaoud A, Kwiatkowska D, Hamant O. (2012) Mechanical stress acts via katanin to amplify differences in growth rate between adjacent cells in Arabidopsis. Cell 149:439–451.

Wada H. (2012) Hierarchical herical order in the twisted growth of plant organs. Phys Rev Lett. 109:128104.

Zhao M, Morohashi K, Hatlestad G, Grotewold E, Lloyd A. (2008) The TTG1-bHLH-MYB complex controls trichome cell fate and patterning through direct targeting of regulatory loci. Development 135: 1991–1999

Reprinted from Journal of Theoretical Biology, Vol 365, Hayakawa Y, Tachikawa M, Mochizuki A, Mathematical study for the mechanism of vascular and spot patterns by auxin and pin dynamics in plant development, Pages No.12-22, doi:10.1016/j.jtbi.2014.09.039, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

Reprinted from Journal of Theoretical Biology, Vol 404, Hayakawa Y, Tachikawa M, Mochizuki A, Flat leaf formation realized by cell-division control and mutual recessive gene regulation, Pages No.206-214, doi:10.1016/j.jtbi.2016.06.005, Copyright (2016), with permission from Elsevier.

謝辞

本研究を行うにあたり、理論研究のバックグラウンドがなかった私を快く受け入れてくださり、懇切丁寧にご指導してくださった理化学研究所望月理論生物学研究室の望月敦史教授に深く感謝いたします。また、実質的にご指導してくださり、快く相談に乗ってくださった望月研究室の立川正志博士に深く感謝したします。議論にお付き合いくださった望月研究室の研究員の方々にも感謝いたします。学位取得のため手厚いサポートをしてくださった東京工業大学大学院の山村雅幸教授に深く感謝いたします。