

ゲッケイジュの葉脈網形成に見られた規則性

松野 享

京都府立医科大学・生物学教室

Pattern formation in laurel leaves' veins

Toru Matsuno

Biology, Kyoto Prefectural University of Medicine

ゲッケイジュ (*Laurus nobilis*) の葉脈は網状であるが、それは、1つの網目を2～4個に区切るような網目の形成が繰り返し行われることで形成されていた。そして、この形成過程はチューリングモデルでほぼ説明できることが分かった。

目的と方法

網状の葉脈の形成過程は古くから観察されている。Pray (1955) はユリノキ (*Liriodendron tulipifera*) の葉脈形成を詳細に報告したが、その報告の中で、「Schuster (1908) は、『ソラマメの葉脈網形成では、形成された網目が成長してある一定の大きさになるとその中に小さな網目が作られる』、と述べているが、ユリノキでも同様であった」と述べている。このように網状脈の形成は、網目が大きくなるとその中にまた網目が作られる、というように進行することが知られているが、それを詳しく解析した報告はない。本報告は、ゲッケイジュを用いて(1)網状の葉脈の形成過程を観察し、そこに存在する規則性を見いだす、(2)そのような規則性を説明できるモデルを考える、の2つのことを目的とした。

ところで、生物のパターン形成を説明するメカニズムとして、チューリングモデル(例えば、本多(編), 2000)がよく用いられる。チューリングモデルではパターン形成にかかわる物質が反応しながら拡散していくと考える。最近、葉脈のパターン形成にこの拡散・反応モデルが当てはまるのではないかという実験結果(Koizumi等, 2000)や、理論(遠矢, 2002)が発表されている(*1)。そこで、ゲッケイジュの網状脈形成にもチューリングモデルが当てはまるかどうかを検討した。

ゲッケイジュの葉脈は、葉をアルカリで透明化(松野, 1989)したあと全載標本にして観察した。

(*1)Koizumiは主に2次脈の、遠矢は主に1次脈と2次脈の形成に拡散・反応モデル

を考えている。本報告ではそれより高次の（4次以上の）葉脈を対象にした。

結果と考察

葉脈網形成過程に見られた規則性

葉脈網の形成過程を調べるには、発達途中の葉脈と最終的に形成される葉脈との対応がつくほうが検討しやすい。そこで葉の中でいつでもはっきり識別できる場所として、図1に示したような、2次脈の分岐点と3次脈(*1)で囲まれた領域を選んだ（この領域をテスト領域とよぶことにする。成葉のテスト領域の一例を図2に示す）(*2)。

なお、まだ仮道管などの葉脈組織は分化していないが、葉脈に分化することが決まっている部分を「初期の葉脈」と呼ぶことにする。「初期の葉脈」は、最近では、葉脈分化に関する遺伝子発現を用いて検出されることが一般的であるが（Baima等, 1995）、ここでは古典的な形態学的方法を用いた(*3)。形態的には「初期の葉脈」は、葉脈の伸びる方向に細長くなっている細胞の集合として認識される（原, 1972）(*4)。

図3はテスト領域内の葉脈の発達過程を示したものである。各図で最も次数の高い葉脈は「初期の葉脈」からできている。葉身長が4mmくらいの時に4次脈が現れ、7次脈が現れるのは葉身長が10mmくらいの時であった(*5)（参考：成葉の葉身長は70~80mm）。様々なテスト領域を観察した結果、葉脈網形成に関して一般的に次のような規則性が見られた。なお、以下では、葉脈で囲まれた内部の領域を（そこに葉脈が無いときに限り）「島」と呼ぶことにする。

- (1) 島は葉の成長とともに大きくなり、島が大きくなるとその中に新たな葉脈による仕切ができた（新しい島ができた）。このことがほぼ4回繰り返されてテスト領域の葉脈網が形成された。
- (2) 島を仕切る「初期の葉脈」は、島の縁から現れてもう一方の縁へ伸びていくとかたちで形成されなくて、（形成されるべき）葉脈上のあちこちから現れてやがてつながって全体が現れる、とかたちで形成された。
- (3) 島の形はほぼ3~4角形で、その仕切られ方は、一般的に図4のようになっていた。

なお、仕切の全く現れていない島の大きさは差し渡しがおおよそ50 μ m（細胞数にして5~6個並びの長さ）で、これより大きい島には仕切ができ始めているものが多かった。これは、差し渡しが50 μ m以上に島が大きくなると仕切ができ始め、また、仕切られてできる（新しい）島の大きさがさしわたし50 μ m位だということを示唆する。

ところで、上記の①~③の規則性はあくまで一般的なもので、例外も見られた

(*6)。たとえば、島の形に3角形や4角形以外のものも見られたし(*7)、島の仕切られ方に図4以外の場合も見られた(*8)。しかし、ここではそれらのケースについてはあくまで例外であるとして(そう仮定して)、それらは扱わないこと(今後の課題)とした。

- (*1)本報告における葉脈の次数は、Hickey (1979)を参考に、1次脈(主脈)、2次脈(側脈)、...とした(図1, 2参照)。
- (*2)成葉で調べたところ、テスト領域の大きさは様々であり、その中の葉脈網の様子も様々であった。しかし、葉身長の4~5%の大きさのテスト領域に限って調べると、そこでは葉脈の最大次数がほぼ7であるなど、葉脈網の様子は似かよっていた。また、(葉の中央付近では)テスト領域の大きさは葉の成長に比例して大きくなると考えられた(松野, 2001)。そこで(今観察している)発達途中の葉脈が、最終的にどの葉脈に対応するかの見当をつけやすくするために、ここでは葉の様々な発達段階で、(葉の中央付近にある)葉身長4~5%の大きさのテスト領域を選び、そのテスト領域に限って観察した。
- (*3)形態的に検出される「初期の葉脈」は、遺伝子的に検出されるものより少し時期的におくれるように想像しているが、比較した経験がないので、なんとも言えない。
- (*4)ゲッケイジュの葉脈に分化する細胞には、細長くなる前に葉の厚み方向に分裂する性質があることが分かった(松野, 2001)。この性質を利用すればより早い時期から「初期の葉脈」が検出できる。しかし、2次脈の走行形成を調べた時に、葉の厚み方向に分裂する細胞の分布から得られる情報が、細長い細胞の分布から得られる情報を越えることがないことが分かった(松野, 2001)。テスト領域でも同様だと仮定して、ここでは、細長い細胞のみで「初期の葉脈」を検出するに止めた。
- (*5)テスト領域は2次脈と3次脈で囲まれている。したがって、テスト領域に最初に現れる葉脈は4次脈である。また、7次脈はほぼ最終的な葉脈である。
- (*6)この報告の観察結果の中で使っている、一般的とか例外という表現はあくまで私見である。その出現確率が(正確に測定したわけではないが)ほぼ10%以下と思われるものを「例外」とした。
- (*7)5角形以上の多角形の島があったし、辺が円弧状にカーブしていて、多角形で近似できない島もあった。
- (*8)例えば4角形の島が3等分に仕切られる場合(漢字の目の字のようになる)もあった。しかし重大な「例外」として、仕切が島の隅から伸びている場合が見られたことである。図4にあげた事例では、仕切はいずれも辺の中央付近から

伸びていて、このことが後になって重要な意味を持つのだが、この「例外」はそれに対する大きな反証となる（次節の(*9)参照）。

チューリングモデルの当てはめ

前項で述べた結果をまとめなおすと、ゲッケイジュのテスト領域における葉脈網形成の特徴としてまず、

- ①葉脈網は、島が仕切られることで新しい島ができ、その島がまた仕切られることでさらに新しい島ができる、という繰り返りで形成される、
- ②仕切る葉脈は「同時に」形成される(*1)、
- ③仕切る島が一定の大きさ以上になると形成される、
ということが挙げられるが、これらは以前から言われている事柄である（例えば Pray, 1955）。ここで新たに分かったことは、その仕切られ方が、一般的に図4のようになっていた、ということである。すなわち、
- ④島の形はほぼ3～4角形である、
- ⑤島はほぼ同じ大きさの2～4個の島に仕切られる、
- ⑥島を仕切る葉脈は島の「辺」（3角形や4角形の辺）の中央付近からほぼ直角方向に出る、
ということである。

以下では、この①～⑥のような特徴を持つ仕切がチューリングモデルでシミュレートできるかを検討する。ただし、島の形を4角形に限定した(*2)。

チューリングモデルによるパターン形成では、普通2つの拡散性物質(A, B)を考え、それらの物質同士に一定の相互作用を仮定する。そして、拡散と物質同士の相互作用により2つの物質は一定の分布(パターン)を取るようになるが、そのパターンが実際の様々な形質のパターンに反映すると考える。それにならってここでは、葉脈に分化する前の細胞内に2つの物質A, Bがあり、それらの物質の細胞内の濃度(それもA, Bで表す)が、

$$A' = D_A \Delta A + pA - qB$$

$$B' = D_B \Delta B + rA$$

のように変化すると仮定した(*3)。これらの式の意味することは、(1)物質A, Bとも拡散によって周囲の細胞に移動する、(2)細胞内のAの生産は自身によって促進されるがBによって抑制される、(3)細胞内のBの生産はAによって促進される、というものである。なお、 $D_A < D_B$ (BのほうがAより速く拡散する)とした。また、島の外側(すなわち、葉脈の部分)へも拡散は起こり、島の外側ではA, Bともその濃度は常に0になると仮定した。

正方形の島でこれらの式を解いたものを図5に示す(*4)。島は成長するにつれて

大きくなるが、その時々のおおきさの島で、物質A, Bがどのような分布をとるかを示したのが図5である。

図5の(1)の図は 5×5 細胞の島で、このおほきさの島ではAの濃度は島全体で高くなつて安定した(*5)。これは $2 \times 2 \sim 4 \times 4$ 細胞の島でも同じであつた。すなわち、 5×5 細胞以下の小さな島では、島全体の細胞でAが高濃度になることが分かつた。

図5の(2)は、 6×6 細胞の島の定常状態になつたときの様子である(島内のすべての細胞のAの濃度が高い状態を初期状態とた)。島の中央部の細胞からはAがなくなつてゐる(*6)。

図5の(3)~(4)の図は $7 \times 7 \sim 8 \times 8$ 細胞の島での結果である(島の周辺部のAの濃度が高い状態を初期状態とした)。このおほきさの島では、定常状態になつたときのAの高濃度の細胞の分布は、向かい合う2辺か、4隅かに限られてくる。

島の大きさに応じてAの分布がこのようになつて変化する訳を定性的に説明すると以下のようになる。

細胞内でAはBの増加を促すが、そのBはAを減少させる→その結果、Aは普通は消えてしまう(そのようにパラメータの値を設定した)→しかし、島の隅にある細胞では、Bは(島の外の濃度0の領域に接する割合が大きいので)急速に拡散して失われる(そうなるようにBの拡散係数を大きく定めた)→したがつて、島の隅にある細胞ではAは生き残る(島の隅にある8個ほどの細胞でAが生き残るようにパラメータの値を設定した)→島が小さいときは、島全体が「隅」で覆われるので、島のすべての細胞でAは生き残る→島が大きくなるにつれ、「隅」のつながつた島の周辺部でのみAが生き残り、島がさらに大きくなると島の隅だけでAが生き残るようになる、というものである。

ここで、物質Aの無い場所に葉脈が形成されると仮定する。すると図5で、Aの濃度が「点」で表されてゐる場所に葉脈ができることになるので、次の(ア)~(ウ)のことが分かる。

(ア)島が一定のおほきさ(6×6 細胞)になると、仕切(葉脈)の形成が始まる(③クリアー:葉脈網に見られた特徴①~⑥が満たされたとき、クリアーという言葉を使う。ここでは③が満たされた)。

(イ)仕切の形成は島の中央付近から始まる(一応②クリアーとする(*7))。

(ウ)葉脈による仕切は $7 \times 7 \sim 8 \times 8$ 細胞のときに完成する。仕切によつて島は2~4つに分けられるが、新たにできる島の形は、元の島の $1/4$ 以下のおほきさの正方形か、もとの島の半分以下のおほきさの長方形である(④, ⑤, ⑥クリアーとする(*8))。

この新しくできた島のその後の変化は次の(a), (b)のようであつた。

- (a)新しくできた島が、元の1/4以下の大きさの（すなわち 5×5 細胞以下の）正方形の場合は、図5の(1)の時と同様に、すべての細胞のAは高濃度になる。
- (b)新しくできた島が長方形の場合、長方形の大きさが 8×4 細胞より小さいときは、すべての細胞でAは高濃度になった（図略）。しかし、島が成長して大きさが 10×5 細胞になったとき、Aの濃度分布は図5の(5)のようになり、長方形の島は2つの島に分かれた。この2つ島は 5×5 細胞以下の大きさなので、これ以後は(a)と同じ変化をたどる。

すなわち、新しくできる島は、最終的にはすべて図5(1)の状態になった。図5(1)以後の変化は図5の(2)~(5)であり、こうして「島の変化」は繰り返されることになる（①クリアー：これですべてクリアーしたことになる）。

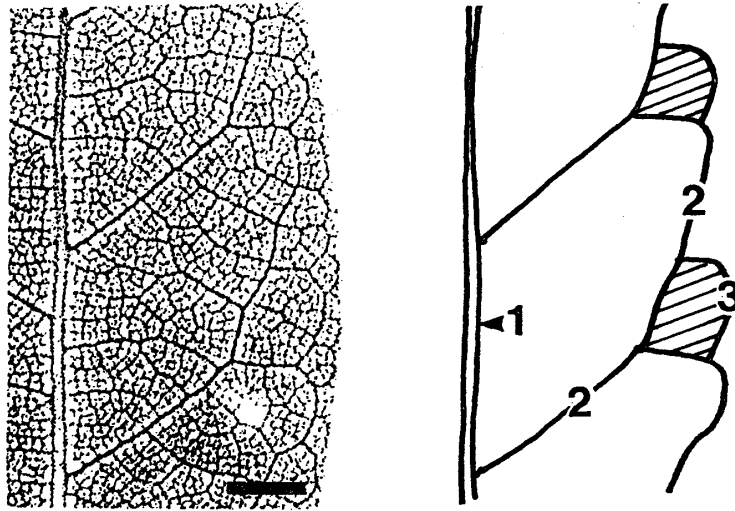
以上見たように、チューリングモデルは、実際の葉脈網の形成過程をうまくシミュレートすることが分かった(*9)。しかし、実際にそのようなメカニズムが働いているかということ、そのような実験的証拠はなにもない。物質A, Bは全くの想像である。しかし、このような単純なメカニズムで複雑な葉脈網の形成が説明できることは興味深く、チューリングモデルは葉脈網形成のメカニズムとして将来検討してみる価値があるだろうと思われる(*10)。

- (*1)「同時的」の意味は、前項の規則性の(2)の内容を言い替えた表現である。なお1次脈の形成は同時的でないと考えられている。また2次脈および最終的な（高次の）葉脈では同時的かどうか議論されている。詳しくは、原(1972)。
- (*2)3角形は今後の課題としたが、（この後で述べる）定性的な説明から分かるように、4角形と同様に満足できる結果がシミュレートできると思われる。
- (*3)' (ダッシュ) は時間微分、 D_A, D_B はそれぞれA, Bの拡散係数、 Δ はラプラシアン（拡散を表す）、 p, q, r は正の定数。
- (*4)正方形の島を縦横の格子に区切り、その格子上に細胞が並んでいるとした。個々の細胞で方程式は数値的に解いた。すなわち、ある大きさの島でA, Bの初期の分布を設定し、方程式から時間的なA, Bの変化を計算し、定常状態に十分近づいた時（このとき本文では定常状態になったとか安定した、と表現した）、それを（その大きさの島での）実際と対比されるべきA, Bの分布であると考えた。拡散は1つの細胞からその上下左右の4方向に起こるとした（斜め方向の拡散は考えなかった）。パラメータの値は $D_A=0.01, D_B=0.1, p=q=0.03, r=0.035$ とした。また、A, Bの取り得る最大濃度を100とした。
- (*5)なおBの濃度分布については、いずれの場合も特に述べるべき特徴はなかった。したがって、Bの濃度分布については今後も言及しない。

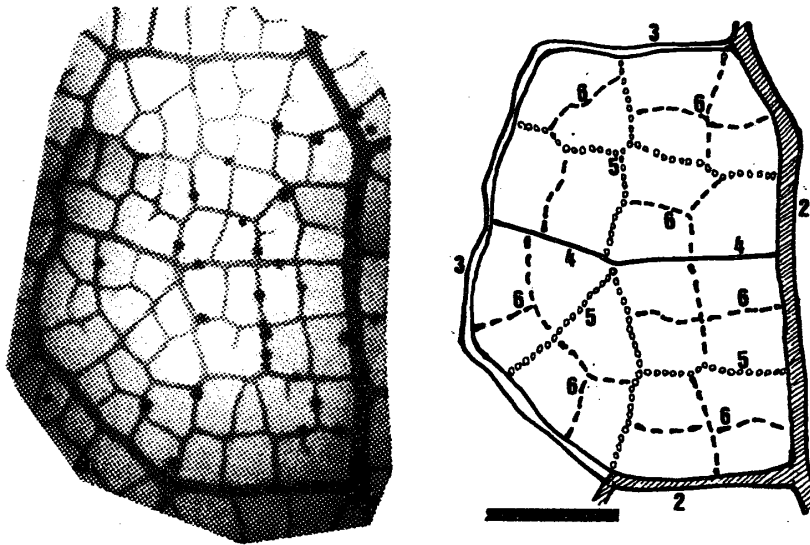
- (*6)以後、Aが無い、などの表現は、図5でAの濃度を表す円の大きさが「点」になる状態のときに使用する。この場合Aは実際に0になっていることが多いが、0とみなしてよいほどの小さな値のときもある。
- (*7)シミュレーションでは、仕切の形成は島の中央付近から始まった。これは、仕切の形成が一方の端から始まりもう一方の端へ伸びていくやりかたとは明らかに一致しない。その意味で、ここではシミュレーションの結果を「同時的」と解釈した。
- (*8)図5で、Aの存在しない場所がすべて葉脈になるとしてよいかどうかは分からない。すなわち、仕切（葉脈）の太さについてははっきりしないので、ここでは新しくできる島の大きさについては、～以下と表現した。さて、4角形の島からできる新しい島はすべて4角形だった、すなわち島はすべて4角形になるので④クリアー（いまは3角形は考えていない）。また、図5(3)～(5)より⑤クリアー。そして仕切の様子から⑥クリアー。
- (*9)うまくシミュレートできないものもある。たとえば例外だとして今回考慮しなかった前節の(*8)で述べた例（島の隅から仕切ができる）がそうである。例えば、島とその外側との間の拡散に一定の条件を付けるなどのことをすれば、そういう場合も説明できるかもしれない。しかし、そこまで説明しつくそうとするのは、あまりにも「ためにする」という感じがする。今回は観察された事柄をすべて説明しつくそうとせずに、基本になっている（と仮定した）事柄についてのみ当てはまるモデルを作るに止めた。
- (*10)生物の作るパターンにはポロノイ図的なものが多く見られる（例えば、杉原, 1996）。アメリカズカケノキの（成葉の）葉脈走行パターンもポロノイ図的であった（松野, 1993）。図4の仕切の形もポロノイ図に似ている。このことは、チューリングモデルからポロノイ図的なパターン形成の説明がきるかもしれないと思わせる。そういう意味からも、今回のようなチューリングモデルは今後も検討する価値があると思われる。

(参考文献)

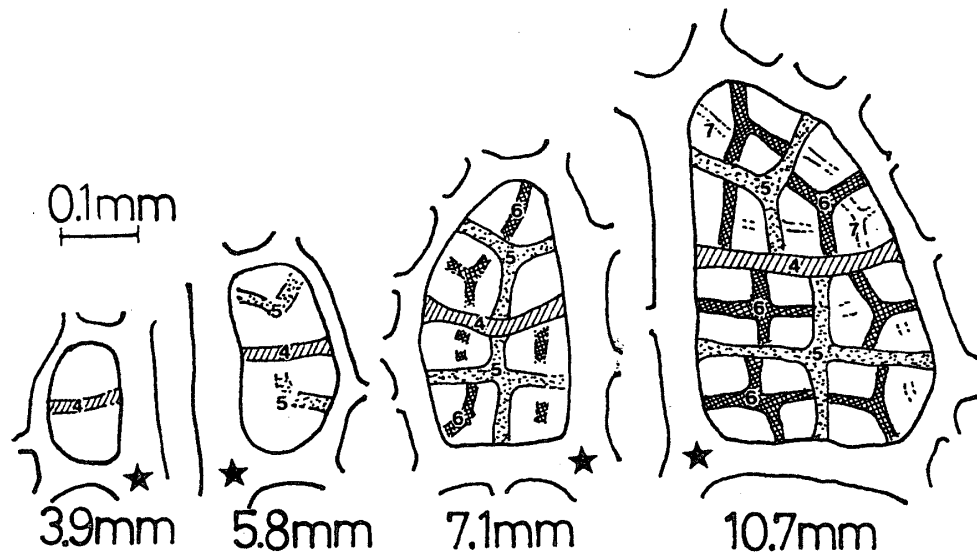
- Baima, S. et al. (1995) The expression of the *Athb-8* homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 121, 4171-4182.
- 原 襄 (1972) 植物の形態. 裳華房, 東京.
- Hickey, L. J. (1979) A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. in: *Anatomy of the dicotyledons*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.
- 本多久夫 (編) (2000) 生物の形づくりの数理と物理. 共立出版, 東京.
- Koizumi, K. et al. (2000) A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network : calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development*, 127, 3197-3204.
- 松野 享 (1989) 葉脈(2): ナンキンハゼ脈端の分岐. *Studia Humana et Naturaria*, 23, 137-140.
- 松野 享 (1993) アメリカスズカケノキの葉脈パターン. *Studia Humana et Naturaria*, 27, 39-45.
- 松野 享 (2001) ゲッケイジュ葉の2次脈(側脈)の形成過程. *Studia Humana et Naturaria*, 35, 63-78.
- Pray, T. R. (1955) Foliar venation of angiosperms. II. Histogenesis of the venation of *Liriodendron*. *Am. J. Bot.*, 42, 18-27.
- 杉原厚吉 (1996) ボロノイ図を通して見ると...(2)自然界に現れるボロノイ図. 数学セミナー, 5月号, 78-81.
- 遠矢周作 (2002) auxin消費型反応拡散モデルによる葉脈パターン形成の説明. 九大数理生物学研究室MEセミナー・レジメ, 7 Sep. 2002.



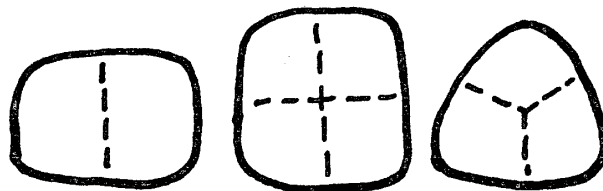
(図1) 成葉の一部(葉の右側)。右図は説明図。図の上方が葉の先端方向。数字は葉脈の次数(1次脈とは主脈、2次脈とは側脈のこと)。斜線部がテスト領域。バーは3mm。



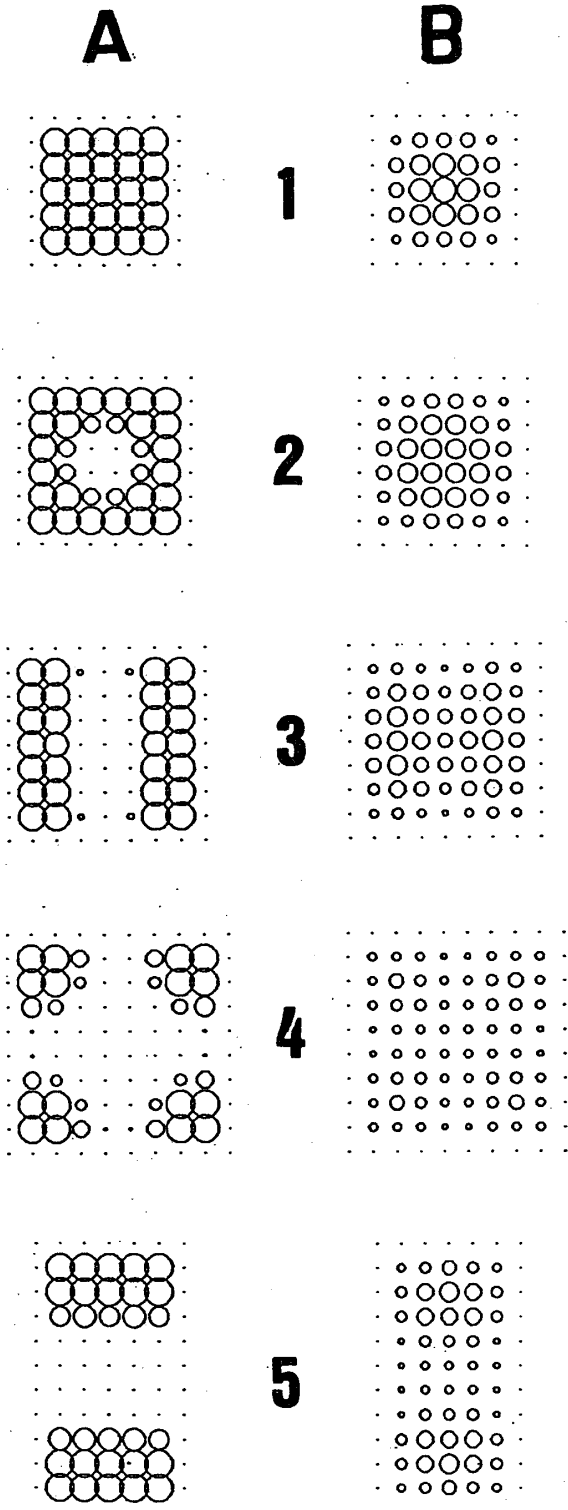
(図2) 成葉のテスト領域(葉の左側)。右図は説明図。図の上方が葉の先端方向。数字は葉脈の次数(次数ごとに模様を変えてある。また、説明図では7次脈は省略した)。このテスト領域の大きさ(縦方向の長さ)は、葉身長長の4.4%であった。なお、高次の葉脈ではその次数を一意的に決めることは困難で、この図で6次や7次とした葉脈は一部入れ代わるかもしれない。バーは1mm。



(図3) テスト領域での葉脈の発達過程。図の下の数字はそのテスト領域の存在した葉の葉身長。★は2次脈の分岐点。葉脈に付けた数字は葉脈の次数。同じ次数の葉脈は同じ模様で表した。



(図4) 葉脈で囲まれた領域(島)の一般的な仕切られ方。島は実線で、仕切(島内部に新たに作られる葉脈)は点線で示す。詳細は本文参照。



(図5) チューリングモデルによる「島の仕切のできた」のシミュレーション。丸印は個々の細胞を表し、丸印の大きさはその細胞内に含まれる物質 (A, Bの2種類ある) の濃度を表す (濃度は円の直径に比例する。左の列はA、右の列はBの濃度分布を示す)。物質濃度が0 (もしくはほとんど0) のところの細胞は (丸印でなく) 点で表されている。ただし、一番外側を一周している点の列は細胞ではなく、島の外側 (そこではA, Bの濃度は常に0と仮定した) を示す印である。(1)~(5)はそれぞれの島におけるA, Bの定常状態での分布を示す。この図で、Aの存在しないところに葉脈が形成されると仮定すると、(3)では島を縦に2分する葉脈が、(4)では島を縦横に4分する葉脈が、(5)では島を横に2分する葉脈ができることになる。