

1 側根形成過程

側根形成は、側根形成の位置決定、側根形成の開始、側根の成長、側根の出現の4段階に分けることができます。図は、側根形成時の根を主なステージごとに示しています。図の水色はDR5レポーターシステムによって示されたオーキシンの局在を示しています。図のオレンジは内鞘細胞を示しています。1の側根形成の位置決定では、側根創始細胞ができることで位置が決まります。

2 側根形成は内鞘細胞 (pericycle pole) から始まる

内鞘細胞は、図のPで示されるphloem poleと図のXで示されるxylem poleの2種類の細胞群から生じ、その位置関係は図のように直交するような関係です。側根は其中で、図のXで示されるxylem pole由来の内鞘細胞が分裂することによって生じます。図の青で示されているのは、GATA23プロモーター下でGUSを発現させたものです。このGATA23は側根形成開始の指標として知られています。このGATA23が発現している内鞘細胞から側根創始細胞が形成され、側根が形成されます。

3 側根形成過程

2の側根形成の開始段階は、2つの側根創始細胞の非対称分裂が始まる段階です。図の核移行領域において、

4 核移行領域では側根創始細胞で核が共通の細胞壁側に移動する

側根形成を開始する前の側根創始細胞で局所的にオーキシン応答が高まり、核が共通の細胞壁側に移動し極性が確立されます。そして、中央に2つの小さな細胞、隣接した比較的大きな細胞に非対称に分裂することで側根形成が開始されます。

5 側根形成過程

3の側根の成長段階でもオーキシン応答が関わることで細胞分裂と細胞伸長が生じます。

6 側根原基細胞が内皮、皮層、表皮細胞を押し分け出現する

4の側根の出現段階では、成長していく側根原基細胞がその外側に位置する内皮細胞、皮層細胞、表皮細胞を押し分けるように側根が出現します。

7 PINタンパク質は2種類に分けられる

PINタンパク質は、図のbの赤矢印で示される親水性ループの長さからロングPINとショートPINに分類されており、その系統樹は図のaで示しています。ロングPINはPIN1,2,3,4,7の5つが知られ、それぞれ細胞膜に局在し、細胞内のオーキシンを細胞外へ排出する機能を持ちます。ショートPINは

PIN5,6,8 の 3 つが知られ、細胞膜または ER に局在し、その局在は発現する細胞の種類により異なり、細胞内のオーキシンの恒常性維持に機能しています。

8 本研究における目的

胚発生におけるロング PIN の役割は研究が進んでいるもののショート PIN の研究は進んでいません。そこで著者らは、側根形成において PIN8 は機能するのか？機能するのならば、側根形成のどのステージで PIN8 は機能するのか？、側根形成において PIN8 はどのような機能を果たすのか？、側根形成において PIN8 はどの細胞で機能するのか？を研究しました。

9 PIN8 は側根形成に機能している

PIN8 が側根形成に関わるのかを調べるために、9 日齢の野生型と pin8 機能欠損変異体、pin8 機能欠損変異体背景に PIN8-GFP を導入した系統の側根を観察しました。側根 1cm あたりの側根の数を相対側根密度として側根形成の指標として用いました。その結果、野生型と比較し pin8 機能欠損変異体の相対側根密度は有意に低下しました。また、pin8 変異体背景に PIN8-GFP を導入した系統の側根密度は野生型と同程度まで回復しました。つまり、pin8 機能欠損変異体の相対側根密度が低下したことは、PIN8 が欠失したことによることが確かめられました。

また pin8 の機能欠損が主根の成長に影響を与えるのかを確かめるために、野生型、pin8 機能欠損変異体、pin8 機能欠損変異体背景に PIN8-GFP を導入した系統の主根の長さを計測しました。

その結果は右に示されているグラフで、これら三系統に有意差は確認されませんでした。

これらの結果から、PIN8 は主根の成長には機能せず、側根形成を促進していることがわかりました。では、PIN8 は側根形成時のどのステージで機能するのでしょうか？

10 側根形成過程において PIN8 は側根の出現時 (E) に機能する

主根の長さ 1cm あたりの側根原基数を指標にし、野生型と pin8 機能欠損変異体で比較しました。上の写真は側根原基の発生過程のステージを示しており、1-8, e まではグラフの 1-8, e と対応しています。観察の結果、グラフの E のステージ、側根が出現してくるステージにおいて野生型と比較し pin8 機能欠損変異体の主根の長さ 1cm あたりの側根原基数は有意に低下しました。

11 ここまでの結果

この結果から PIN8 は側根形成において側根が出現してくる段階で機能することがわかりました。次に、pin8 は根のどこの組織で機能しているのでしょうか。PIN8 の発現組織を調べるために、PIN8 プロモーター下で GUS を発現する系統を作出し、PIN8 の発現組織を調べました。

12 主根と側根形成時における PIN8 の発現

A は主根を、B-D は側根形成時の根を示しています。その結果主根では GUS の発現は維管束で見られました。また側根形成時には、B で示されるように比較的早いステージにおいては GUS の発現が見られず、C, D 以降で示されるステージ 8 以降においては GUS の発現が確認されました。これらの結果から、PIN8 は維管束細胞で発現しており、側根形成の比較的遅いステージで発現することが示されました。

13 ProPIN8:PIN8:GFP は篩管細胞内で発現する

次に PIN8 プロモーター下で PIN8-GFP を発現させ PIN8 の細胞内局在を確認しました。図の F のアスタリスクは原生木部の位置を、P は内鞘細胞を、やじるしは PIN8-GFP を示しています。F から、PIN8 の細胞内局在は側根形成が始まる原生木部に隣接した内鞘細胞や原生木部ではなく、篩管細胞に局在することがわかりました。図の G, H, I, J はメリステム、伸長領域、側根原基、側根出現後の PIN8 の局在を示したものです。PIN8 は側根形成の各段階において細胞内で発現していることがわかりました。

14 ここまでの結果

これまでの結果から PIN8 は側根の出現時に篩管細胞で機能し側根形成を促進することがわかりました。では、PIN8 の発現量に依存して側根形成は促進されるのでしょうか？

15 PIN8 の発現量に依存して側根形成が促進される

PIN8 の発現量に依存して側根形成が促進されるのかを検証するために、PIN8 プロモーター下で PIN8-GFP を発現する系統を 3 種類独立に用いて検証しました。

左のグラフは系統 1, 3, 4 の相対側根密度を示しています。L1 に対して L3, L4 の相対側根密度は有意に上昇しました。

では、この系統による相対側根密度の差は PIN8 の発現量の違いに依存するのかを検証するために L1, L3, L4 の GFP 蛍光を観察し定量しました。

真ん中の写真は L1, L3, L4 の GFP 蛍光を示しており、各系統の相対側根密度に依存して蛍光強度も強いように見られます。

GFP 蛍光強度を定量したものが右のグラフです。縦軸にシグナルの相対強度を、横軸に各系統を示しています。その結果 L3, L4 は L1 に対して有意差が見られ、そのシグナル強度に依存して相対側根密度も高くなっていました。これらの結果から PIN8 の発現に依存して側根形成は促進されることが示されました。

16 これまでの結果

ここまでの結果から PIN8 が発現する細胞で PIN8 の発現量依存的に側根形成が促進されることが示されました。これらの結果は PIN8 が発現する細胞内でオーキシン濃度が高くなることによって側根形成が促進されることを意味するのでしょうか？

17 PIN8 プロモーター下で各遺伝子を発現させるとその局在は変化しなかった

この可能性を検証するために PIN8 プロモーター下でオーキシン取り込みキャリアである AUX1, 細胞膜に局在しオーキシンを細胞内から細胞外へ輸送する PIN2, PIN3, PIN8 と同じく細胞内に局在する short PIN である PIN5 を発現させ、その側根形成を観察し定量しました。

まずは各系統の PIN8 プロモーター下での発現組織を GFP 蛍光を指標として観察しました。

その結果 AUX1, PIN2, PIN3 は PIN8 が発現する細胞においても細胞膜に局在し、PIN5 は細胞内に局在していることがわかりました。

18 仮説：PIN8 が発現する細胞で PIN8 が細胞内オーキシン濃度を上昇させた結果、側根形成が生じる

PIN8 が発現する細胞内でオーキシン濃度が上昇することが側根形成において重要であるのならば、pin8 機能欠損変異体背景にオーキシン取り込みキャリアである AUX1 を PIN8 プロモーター下で発現させた系統は側根形成が野生型と同定度に回復することが予想されます。

また野生型背景に PIN8 プロモーター下でオーキシン排出キャリアである PIN2, PIN3 を発現させた系統では側根形成が野生型よりも低下することが予想されます。

19 野生型背景において ProPIN8:PIN2 or PIN3 を発現させると側根形成は抑制された

結果を見てみると予想通り、左のグラフで示されるように野生型背景に PIN8 プロモーター下でオーキシン排出キャリアである PIN2, 3 を発現させた系統では相対側根密度は有意に低下しました。一方で AUX1 を発現させた系統の相対側根密度は野生型のそれと比較し有意差は見られませんでした。

20 pin8 機能欠損変異体背景において ProPIN8:AUX1 を発現させると側根形成が回復した

右のグラフから、pin8 機能欠損変異体背景に PIN8 プロモーター下でオーキシン取り込みキャリアである AUX1 を発現させた系統では相対側根密度が野生型と同程度まで回復しました。またオーキシン排出キャリアである PIN2,3 を発現させた系統の相対側根密度は pin8 機能欠損変異体と同程度で回復は

見られませんでした。これらの結果から PIN8 が発現する細胞で細胞内オーキシン濃度が上昇することが側根形成で重要であることが示唆されました。

21 PIN8 が機能する細胞内で PIN5 を発現させると側根形成が抑制された

また野生型背景と *pin8* 機能欠損変異体背景に PIN8 プロモーター下で PIN5 を発現させると、それぞれ野生型と比較し側根形成は野生型背景では低下、*pin8* 機能欠損変異体背景では回復しませんでした。

この結果から、short PIN の中でも PIN5 と PIN8 はオーキシンの移動に関して異なった働きをすることが示唆されました。

22 内鞘細胞で PIN8 を発現させると側根形成は抑制される

著者らは側根形成における PIN8 の機能をさらに調べるために、側根形成の開始に機能し、将来側根創始細胞に分化する内鞘細胞で発現する GATA23 のプロモーター下で PIN8 を発現する系統を作成し側根形成の様子を確認しました。その結果、野生型背景に GATA23 のプロモーター下で PIN8 を発現させた系統では側根形成が抑制されました。PIN8 が発現する細胞においては PIN8 は細胞内オーキシン濃度を上昇させるように機能しているように見えたにもかかわらず、今回はその結果とは逆の結果が得られました。

23 pGATA23::PINs はいずれも側根形成を抑制した

野生型と野生型背景に GATA23 プロモーター下で PIN1, PIN3, PIN5, PIN8 を発現させた系統の側根形成を比較しました。するといずれの系統の側根形成も野生型と比較し有意に低下しました。特に PIN8 を発現させた系統で顕著に側根形成が抑制されていました。

GATA23 プロモーター下では PIN8 がオーキシンを細胞外に排出するように機能していることを示唆しているのでしょうか？ GATA23 プロモーター下でこれらの PIN に GFP を導入した系統を用いてその GFP 蛍光を観察しました。その結果、PIN1, 3, 5 は通常と同じような局在を示しました。

一方で PIN8 は PIN8 プロモーター下では細胞内に局在していたのにもかかわらず、GATA23 プロモーター下では細胞膜上に局在していました。

この結果は GATA23 プロモーター下では PIN8 は細胞膜に局在しオーキシンを細胞内から細胞外へ排出していることを示唆しています。

24 ここまでのまとめ

これまでの結果から、PIN8 が発現する細胞内で PIN8 の発現量に依存して側根形成が促進されたこと。野生型背景において PIN8 プロモーター下でオーキシン排出キャリアを発現させると側根形成が抑制されたこと。*pin8* 変異体背景において PIN8 プロモーター下でオーキシン取り込みキャリアを発現させると側根形成が回復したこと。から、PIN8 が発現する細胞内でオーキシン応答が生じることが側根形成で必要であることが示唆されます。そのため、PIN8 プロモーター下でオーキシン応答を阻害する

遺伝子を発現させると側根形成は阻害されるはずです。

25 オーキシシン応答の模式図

図はオーキシシン応答の模式図です。赤は Aux/IAA で転写因子である ARF に結合することでオーキシシン応答を抑制します。

図の紫と水色で示されているのは ARF という転写因子でこれらが機能することでオーキシシン応答が生じます。オーキシシン濃度が低いと、左の図の Aux/IAA が ARF と結合することで ARF は抑制され転写調節を行うことができません。

オーキシシン濃度が十分高まると右の図で示されるように、Aux/IAA は分解されることで ARF が転写調節を行うことができるようになります。

26 AXR2-1 発現時のオーキシシン応答の模式図

そこで著者らはオーキシシンリプレッサーである Aux/IAA の機能獲得変異遺伝子である AXR2-1 を用いました。これは本来ならばオーキシシン存在下では分解される Aux/IAA がオーキシシン存在下でも分解されない機能を持った変異遺伝子です。つまり、この遺伝子が発現している細胞ではオーキシシンが存在している状態でも常に図で示されるようにオーキシシン応答は抑制されてしまいます。

27 PIN8 プロモーター下で AXR2-1 を発現させると側根形成は抑制された

PIN8 プロモーター下で AXR2-1-GFP を発現させ細胞内局在を確認しました。GFP 蛍光は PIN8 が発現している篩管細胞で発現していることが示されました。

右のグラフから、PIN8 プロモーター下で AXR2-1 を発現した系統は野生型と比較し有意に側根形成が抑制されました。この結果から、PIN8 が発現する篩管細胞でオーキシシン応答が生じることが側根形成に必要であることが示されました。

28 pin8 機能欠損変異体ではオーキシシン関連遺伝子、側根形成に関わる遺伝子の発現が有意に低下した

次に PIN8 が側根形成に関連したオーキシシン信号伝達に影響を与えるのかを調べるために、野生型と pin8 機能欠損変異体のオーキシシン信号伝達と側根形成に関連した遺伝子の発現解析を行いました。

pin8 機能欠損変異体では GATA23 遺伝子やオーキシシン取り込みキャリアである LAX3、側根形成に機能する LBD18, 29、細胞壁の緩みに機能するエクспанシン EXPA14, 17 の発現が野生型と比較し有意に低下しました。この結果も、PIN8 がオーキシシン応答を引き起こすために重要であることを支持しています。

29 本研究のまとめ

本研究から、側根形成時に PIN8 は側根の出現時に主に機能し、細胞内のオーキシンの恒常性を維持し、篩管細胞で発現し、そこでオーキシン応答が生じることが側根形成に必要であることが示されました。