



Title	側根原基形成におけるRGF8 分泌ペプチドの役割
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101263
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	のだ みつき 野田 光希	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2年
アドバイザー教員 氏名	柿本辰男 教授	所属	理学研究科		
研究課題名	側根原基形成における RGF8 分泌ペプチドの役割				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
研究目的 <p>側根は主根の維管束の一番外側にある内鞘細胞という1層の細胞層を由来として形成される。側根の元となる側根原基の形成は植物ホルモンであるオーキシンに応答した内鞘細胞の核が互いに寄り、非対称な垂層分裂(分裂面が表皮と垂直)を起こすことで始まる。1度分裂した内鞘細胞は並層分裂(分裂面が表皮と平行)を起こして2層(stage2の側根原基)になり、その後分裂を繰り返して側根が形成される(図1)。この側根原基において RGF8 分泌性のシグナルペプチドをコードする <i>RGF8</i> が原基形成の初期から発現しており、側方抑制の役割がある可能性が先行研究で示唆された(Jourquin <i>et al.</i>, 2023)。しかし、RGF8 の下流は原基形成に必要なオーキシンの下流と大部分が重複していること(Jourquin <i>et al.</i>, 2023)、内鞘細胞で無秩序な非対称分裂を誘導すること(Fernandez <i>et al.</i>, 2020)などから側根原基形成における役割は明確ではない。本研究では RGF8 が誘導する細胞分裂の特徴に注目して、RGF8 の側根原基における役割を明らかにすることを目的とした。</p>					
研究計画 <p>RGF8分泌ペプチドを添加した場合に起こることが報告されている分裂数の増加をタイムラプスで観察し、誘導される分裂の特徴を調べる。また、オーキシンの下流で側根原基形成において重要な転写因子である <i>LBD16</i> の発現が RGF8 処理によって上昇することが知られている(Jourquin <i>et al.</i>, 2022)。これを踏まえて、<i>LBD16</i> と RGF8 の関係を、<i>LBD16</i> を過剰発現させることによって調べる。</p>					
研究方法					
使用した植物 <p>双子葉植物のモデル生物であるシロイヌナズナの Columbia(Col-0)を実験に使用した。また、実験には研究室で作成・使用されている以下のマーカーを使用した。</p> <ol style="list-style-type: none"><i>pPFA2-H2B-tdtomato</i><i>pSCR-H2B-YFP</i><i>pRGF8-H2B-sfGFP</i><i>Cytrap (pHTR2-CDT1a-RFP,pCYCB1-CYCB1-GFP)</i>					

タイムラプスの条件

種子をまいてから5日後に根端から約2mmの範囲でタイムラプスを撮影した。固体1/5GM培地で成長させ、RGF8:終濃度10 μ M、エストリオール:終濃度10 μ Mの培地へ各実験に応じて移し替えた。チャンバーにシロイヌナズナをのせ、培地をかぶせた後、切り込みを入れたセロハンテープで密閉しないように蓋をして乾燥を防いだ。撮影は24時間行い撮影している以外の時間は照明を当てた。

シロイヌナズナへの形質転換

Slice法を用いて作成したコンストラクトをエレクトロポレーションでアグロバクテリアに導入し、Floral dip法を用いてシロイヌナズナに形質転換した。T1の種子をメロペネム:終濃度25 μ g/L、ハイグロマイシン:終濃度10 μ Mの培地でセレクションを行い、エストリオール:終濃度10 μ Mを入れた培地に移して形質転換体を選抜した。

結果

RGF8は内鞘細胞の垂層分裂、並層分裂を誘導する

根端0.6~1.6mmの範囲で初めに起こった分裂から12時間以内の分裂数を計測し、一度目の分裂を追ってそれ以降の分裂でどちらの方向に割れるかを確認した。RGF8処理によって分裂数は顕著に増加した(図2)。1度目の分裂後数時間のうちにほとんどの内鞘細胞が分裂し、並層分裂は2度目の分裂以降で起こった。また、並層分裂が起こった位置を観察すると、未処理では側根原基に集中して起こったが、RGF8処理では根全体で広く起こった(図3)。これらのことから、RGF8によって誘導される分裂は並層分裂に移行できる原基の性質を持った分裂である可能性が示唆された。

RGF8は並層分裂を誘導するが、分裂した細胞はstage2の細胞の性質を持つとは言えない

側根原基が一度並層分裂して二層(stage2)になると、外側の細胞でSCRが発現する(Goh *et al.*, 2016)。RGF8によって並層分裂した細胞がstage2の細胞の性質を持つかどうかを調べるためRGF8処理した根0.6~1.6mmにおけるSCRの発現をタイムラプスで観察した。仮にRGF8によって分裂を誘導された細胞がstage2の細胞の性質を持っていれば、RGF8処理においてSCRは並層分裂の分布と同様に根全体で発現するはずである。未処理の場合には側根原基で発現が上昇したが、RGF8を処理した場合にSCRの上昇は確認できなかった(図4)。RGF8処理によって側根は形成されなくなるが、2度以上の並層分裂を起こす細胞も観察された。このことから、RGF8によって並層分裂した内鞘細胞は形としては二層になっているが、stage2の細胞の性質を獲得しているとは言えない可能性が示された。

RGF8とLBD16は相互に発現を上昇させる

側根原基形成において重要な転写因子であるLBD16がRGF8を処理した場合に内鞘細胞全体で広く発現することが分かっている(Jourquin *et al.*, 2022)。これとは逆にLBD16がRGF8の発現を上昇させるかを調べるためLBD16の過剰発現を作成した。LBD16を植物全体で誘導するとRGF8の発現が顕著に上昇した(図5)。このことから、RGF8とLBD16は相互に発現を上昇させる可能性が示唆された。

LBD16の過剰発現では内鞘細胞の分裂活性が維持される

LBD16の過剰発現における内鞘細胞の分裂を観察するため、Cytrap(SからG2までは赤、G2の終わりからM期まで緑)という細胞周期のマーカーを用いて観察した。内鞘細胞はオーキシンに応答して分裂するがその分裂活性はいつまでも維持されるわけではなく、IAA処理から24時間時点で側根原基以外の内鞘細胞では赤色のマーカーが消えS期への進行は確認できなかった(図6)。その一方でLBD16を過剰

発現させた場合には、IAA 処理から 24 時間経過後も内鞘細胞で S 期への進行を示す赤色のマーカーが確認された。このことから、LBD16 によって内鞘細胞の分裂活性が維持される可能性が示された。

考察と展望

オーキシンの下流にある *LBD16* は根端から 2 mm 程度の範囲では薄く全体に発現しており、側根原基の発達に伴って原基での発現が上昇する。一方 *RGF8* は根端および側根創始細胞で局所的に発現している。本研究から *RGF8* と *LBD16* が相互に発現を上昇させることが分かった。このことから、側根原基において *RGF8* と *LBD16* が互いに発現を上昇させることによって、*RGF8* および *LBD16* のピークが形成されている可能性が考えられる。また、*RGF8* のペプチド処理や *LBD16* の過剰発現によって内鞘細胞の分裂が誘導されていたことから、*RGF8* や *LBD16* が側根原基において強く発現することで原基における分裂活性の維持や並層分裂への移行を促進し、側根原基の形成や発達を助けている可能性がある(図7)。

しかし、本研究からは *RGF8* と *LBD16* のどちらかに分裂の活性や並層分裂を誘導するようなシグナルがあるのかという点は明らかではない。今後は、分裂や並層への移行を誘導するようなシグナルがどの分子の下流にあるのかについて研究していきたい。

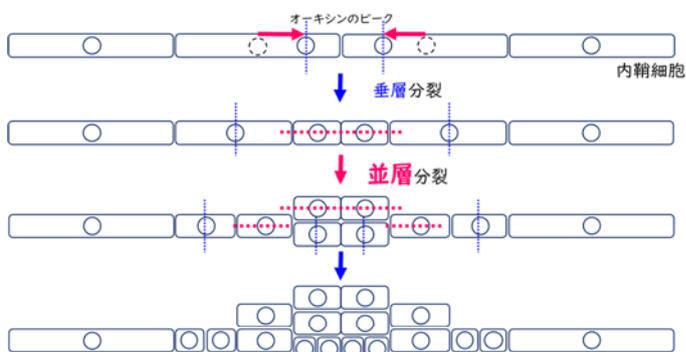


図1 側根原基形成の過程

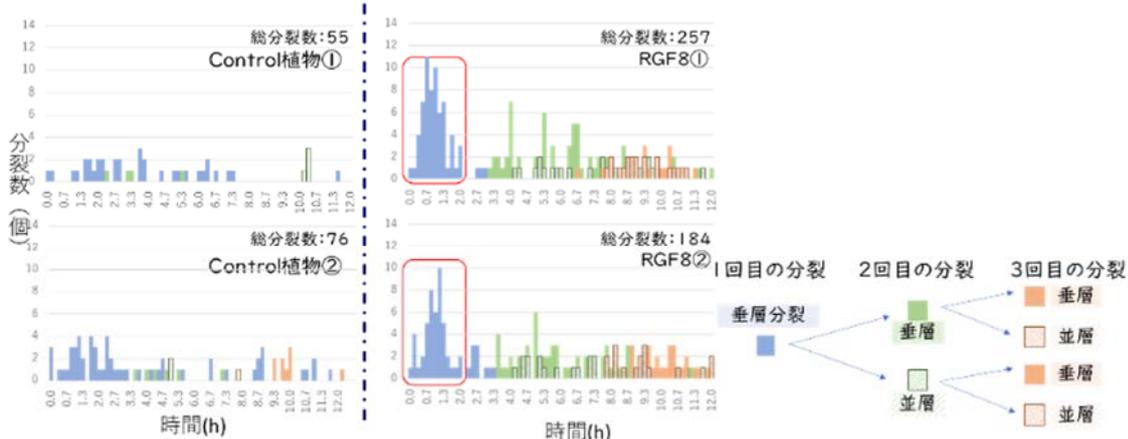


図2 RGF8によって誘導される細胞分裂

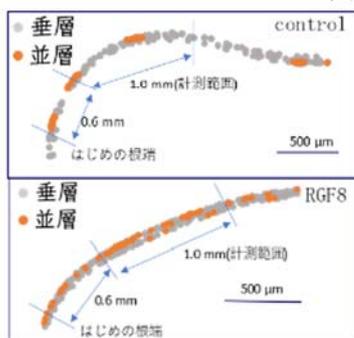


図3 並層分裂の分布

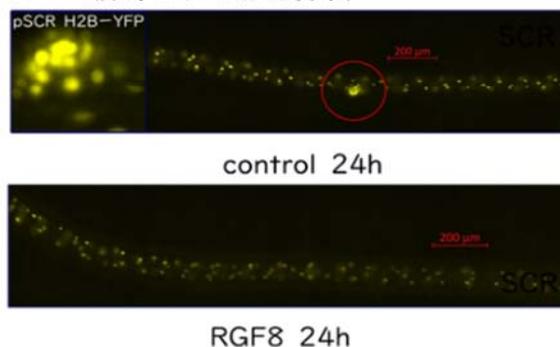


図4 RGF8処理におけるSCRの発現

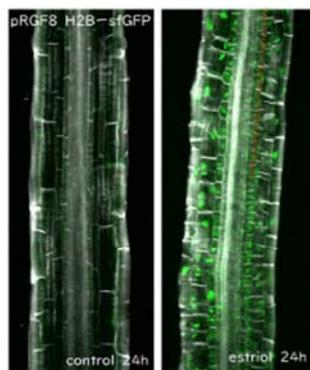
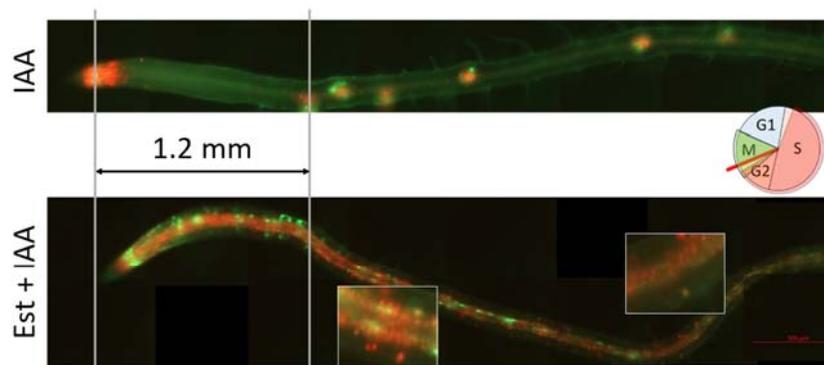
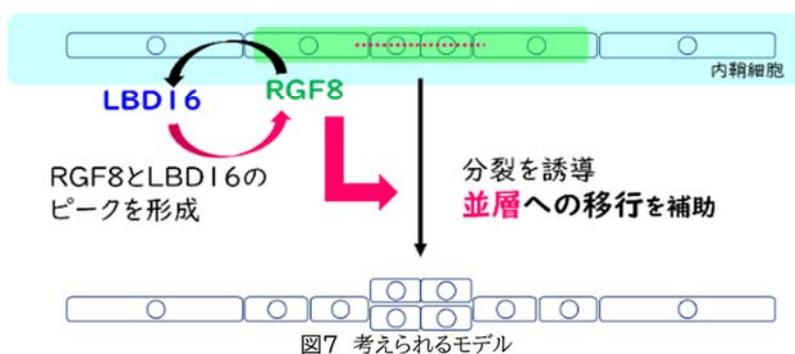
図5 *LBD16*過剰発現における*RGF8*の発現図6 *LBD16*過剰発現における内鞘細胞の分裂活性

図7 考えられるモデル

参考文献

Fernandez, A.I. *et al.* (2020) 'GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asymmetric cell division during lateral root initiation', *Nature Plants*, 6(5), pp. 533–543. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0645-z>.

Goh, T. *et al.* (2016) 'Quiescent center initiation in the Arabidopsis lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor', *Development (Cambridge)*, 143(18), pp. 3363–3371. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.135319>.

Jourquin, J. *et al.* (2022) 'Two phylogenetically unrelated peptide-receptor modules jointly regulate lateral root initiation via a partially shared signaling pathway in Arabidopsis thaliana', *New Phytologist*, 233(4), pp. 1780–1796. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.17919>.

Jourquin, J. *et al.* (2023) 'GOLVEN peptides regulate lateral root spacing as part of a negative feedback loop on the establishment of auxin maxima', *Journal of Experimental Botany*, 74(14), pp. 4031–4049. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erad123>.