

博士論文の要旨

応用生命化学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏名 安森美帆

指導教官 米山忠克

論文題目 シロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株 *bor1-2* の単離と原因遺伝子の同定

はじめに

高等植物にとってホウ素は必須元素である。珪藻や一部の鞭毛藻類にも必須性が示されているが、細菌、菌類、緑藻類、ほ乳動物では必須性がこれまでには証明されていない。ホウ素の欠乏や過剰はありふれた微量元素障害として世界の様々な地域で農業作物に被害を与えており、主な症状としてはセロリーの茎割れ、大根の芯腐れ、ミカンのコルク化などが挙げられる (Marschner 1995)。このような障害を避ける目的で植物におけるホウ素の生理機能について研究がなされてきている (Loomis and Drust, 1992)。これらの研究のほとんどは欠乏や過剰の症状を示す植物の解析に基づくもので、ホウ素の直接の生理作用についての知見は数年前まで知られていなかった。1990年代中ごろから、低ホウ素条件で育てた植物においては、ホウ素は細胞壁に局在し、細胞壁多糖の一つであるラムノガラクトナン II と結合し、その2分子を架橋することが、日本やアメリカのグループによって示された (Kobayashi et al. 1996, Ishii and Matsunaga 1996; O'Neill et al. 1996)。これらの研究から、細胞壁のペクチンの架橋による細胞壁の構造維持がホウ素の機能の一つであると考えられている。一方で、ホウ酸は細胞膜と作用し透過性を変化させることも知られており、ホウ素には他の生理機能があることも十分考えられる。

ホウ素の植物による吸収は、これまで長く受動拡散によるものと考えられてきた (Marschner 1995)。ホウ酸は中性水溶液中で電荷をもっておらず、膜透過係数が高いこと (Loomis and Drust, 1992) が、受動拡散による吸収の根拠と考えられてきた。最近では脂質組成を変化させることで、ホウ酸の受動拡散による吸収の速度が変化し、植物における吸収速度と相関が見られることが示されている (Dordas and Brown, 2001)。その一方で、ヒマワリを用いた

実験によると、低ホウ素濃度条件下ではホウ酸の吸収速度は培地中のホウ素濃度に比例せず、低濃度条件下での速度が相対的に高いことがしめされ (Dannel et al., 2000) , ホウ素が積極的に吸収されていることが示唆されている。しかしながら、上記のホウ素の生理作用や吸収移行に直結する遺伝子は単離されていない。

植物栄養・肥料学研究室ではこれまでシロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株 *bor1-1* を用いてホウ素の機能に関する研究を進めてきた。この変異株については、1) 野生型株が正常に生育する $3\mu\text{M}$ ホウ酸濃度 (以下 B と略) では生長が著しく抑制される、2) $30\mu\text{M}$ B では成長が回復するが雌性不稔になる、3) $100\mu\text{M}$ B 以上のホウ素を与えると野生株と同様に正常に生育する、4) 地上部のホウ素含量が低い、という特徴がある (Noguchi et al., 1997)。また ^{11}B を用いたトレーサー実験によってホウ素の吸収移行を調べたところ地上部への移行が抑制されていた (Noguchi et al., 2000) ことから *bor1-1* はホウ素の根から地上部への移行に障害があると考えられている。また葉の部位別の吸収実験によると、野生型株では若い葉に優先的にホウ素が取り込まれたが *bor1-1* ではその傾向が見られなかった (Takano et al., 2001) ことから、BOR1 遺伝子が若い部位に優先的にホウ素を取り込む過程に関与していると考えられている。

本研究では、ホウ素の機能や吸収機構の解明のために、分子遺伝学的手法を用いることとした。まず、高濃度のホウ素要求性を示す変異株の単離を行ない、*bor1-1* と allelic な *bor1-2* 変異株を単離し、生理解析を行った。さらにこれらの変異株を用いて BOR1 遺伝子のマッピングを行い、*bor1-2* 変異株における変異の同定を行った。

新規高ホウ素要求性変異株の単離

シロイヌナズナの野生型株は $3\mu\text{M}$ B では見掛け上欠乏症がおこらないが、ホウ素の利用効率が落ちていたり、吸収効率の低下した植物は欠乏症を起こし不稔になる可能性が考えられる。この性質を利用してホウ素欠乏条件で不稔となり、ホウ素が充足されると稔性が回復するような変異株をスクリーニングした。この方法を用いることで、単に生育障害を起こした変異株と、ホウ素に特異的な異常を示す変異株を区別することができる考えた。

EMS(Ethyl methanesulfonate)によって突然変異を誘起させた M2 種子 2

万粒を播種し $3\mu\text{MB}$ の水耕液で4週間程度栽培した。花が咲き結実した植物は、欠乏症が現れてない野生型の表現型を持っているものと考えて取り除いた。欠乏症を示す植物に、 $300\mu\text{MB}$ の水耕液を与えて成育させた。この処理によって不稔が回復して結実した 333 個体の植物から個々に種子を採取した。一次スクリーニングで残った 333 株由来の種子を、各 16 粒ずつロックウールに播き、同様の方法でスクリーニングを行ったところ 23 系統が残った。

さらに、二次スクリーニングで残った 23 系統を 3, 30, $150\mu\text{MB}$ で栽培し各区における生育の違いを観察したところ $3\mu\text{MB}$ では著しく矮性となり、 $30\mu\text{MB}$ では花が咲くが不稔となり、 $150\mu\text{MB}$ では結実する系統が一株得られた。

この植物を野生型株と掛け合わせたところ、F1 世代では全て野生型の表現型を示し、F2 世代では野生型と変異型が 3 : 1 の比で現れた。この結果から、この変異株の表現型は一遺伝子におこった劣性変異によるものと判断した。

次に allelism を調べる目的で、*bor1-1* と交配させたところ F1 世代及び F2 世代では表現型の回復がみられなかった。このことからここで得られた新規な変異株は *bor1-1* とアレリックな変異をもつと判断し、*bor1-2* と名付けた。

次ぎに *bor1-2* 変異株を *bor1-1* 変異株及び野生型株と共に、ホウ素欠乏から過剰条件にあたる $0\sim 3000\mu\text{MB}$ までの数段階(0, 0.3, 1, 3, 10, 20, 30, 100, 300, 1000, 3000)のホウ素濃度区で水耕栽培し、30 日目に地上部の成長量と地上部ホウ素濃度を測定した。その結果、成長量は $3\mu\text{M}$ 以下の低ホウ素濃度区において *bor1-2* 変異株は *bor1-1* 変異株と同様に野生型株より有意に低かった。全てのホウ素濃度区において *bor1-2* 変異株と *bor1-1* 変異株の間で成長量に有意な差はなかった。また、植物体中のホウ素濃度に関しても *bor1-2* 変異株は *bor1-1* 変異株と同じく、野生型株よりも低い傾向がみられた。このことからホウ素栄養に対して *bor1-2* は *bor1-1* と同じ性質を示すものと考えられた。

これらの成果を Yasumori et al., 1999 に発表した。

原因遺伝子の同定

次に *bor1-2* 変異の同定を行なった。そのためにまず、*bor1* locus の詳細なマッピングを行った。

bor1-1 (Col-0 バックグラウンド) を Ler と交配した。雑種第二世代(F2)から

DNA を抽出し約 50 個体について、シロイヌナズナの 5 対の染色体においてそれぞれ 2 つのマーカーで連鎖を調べた。その結果 *BOR 1* は第二染色体下腕上にあることが判明した。次に F₂ で *bor1-1* 表現型を示す植物約 100 個体を選び DNA を抽出し、第二染色体上にある SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) 及び CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) マーカーを用いて変異遺伝子とマーカーとの連鎖を調べたところ *BOR 1* 遺伝子は第二染色体の下方、RI map (Lister and Dean, 1993) で約 82cM 付近にあることが推定された。

さらに詳細なマッピングのために、F₂ 約 800 個体から、*BOR 1* 遺伝子近傍に組換えのある個体を選抜し、得られた組換え体についてさらに遺伝子近傍のマーカーで組換え点を調べた。その結果約 155Kb の範囲に特定することができた。この後、本研究室の高野らの作成したマーカーを用いた解析によって、*BOR 1* を約 15Kb の範囲に特定した。この領域の全長の塩基配列決定を *bor1-2* 変異株について行なったところ、T3D7 上の ORF に一塩基の置換を発見した。この ORF 内には *bor1-1* 変異株においても異なる位置に塩基置換変異が見つかったことから、この ORF を *BOR 1* 遺伝子と同定した。*BOR 1* 遺伝子は anion exchange protein と相同性を示す膜蛋白質であった。*bor1-1*, *bor1-2* 変異はともに二つ目に膜貫通領域と予想される領域に存在していた。さらに、変異が実際にエクソン上にあることを確認する目的で、*bor1-1*, *bor1-2* 変異株からの cDNA のクローニングを RT-PCR 法を用いて行い、塩基配列決定を行ったところ、ゲノム上の変異と同じ位置に同じ変異が cDNA でも見つかった。これによって、変異がエクソンに存在することを実証した。

まとめ

本研究によって、生物界ではじめてのホウ素輸送体蛋白質の同定に成功した。植物におけるホウ素の吸収移行の分子レベルでの理解に道を開いた。

参考文献

YASUMORI M, NOGUCHI K, CHINO M, HAYASHI H, NAITO S and FUJIWARA T: Isolation and physiological analysis of a novel *Arabidopsis thaliana* mutant that requires a high level of boron. *in* Plant Nutrition: Molecular Biology and Genetics, Gissel-Nielsen and Jensen eds, Kluwer academic publishers b.v. pp269-275