

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 安森美帆

高等植物にとってホウ素（B）は必須元素である。Bの欠乏や過剰は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。Bの生理作用について1990年代中ごろから研究が進み、B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uronan II と結合し、その2分子を架橋することが明らかにされた。B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。しかし最近、ヒマワリを用いた実験で、低B濃度の培地条件下では、Bが積極的に吸収されていることが示唆された。植物栄養・肥料学研究室ではこれまでシロイヌナズナ高B要求性変異株 *bor1-1* を用いてBの機能に関する研究を進めてきた。この変異株 *bor1-1* は、野生型株が正常に生育する3 μM Bでは生長が著しく抑制され、100 μM 以上のBを与えると野生型株と同様に正常に生育する。*bor1-1* はBの根から地上部への移行に障害があると考えられた。本研究では、B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た。まず、高B要求性を示す変異株の単離を行い、*bor1-1* とアレリックな *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。

序文では、本研究の背景、意義、目的について概説している。

第一章では新規高ホウ素（B）要求性変異株の単離について述べている。シロイヌナズナの野生型株は3 μM Bでは見掛け上欠乏症がおこらないが、B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変異株をスクリーニングした。Ethyl methanesulfonate (EMS)によって突然変異を誘起させた Col-0 のM2種子2万粒を播種し3 μM Bの水耕液で4週間栽培した。花が咲き結実した植物は取り除き、欠乏症を示す植物に、300 μM Bの水耕液を与えて成育させた。この処理によって結実した333個体から種子を採取した。同様の方法で二次スクリーニングを行ったところ23系統が残り、さらに、三次スクリーニングで3 μM Bでは著しく矮性となり、30 μM Bでは花が咲くが不稔となり、150 μM B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、F 1 世代では全て野生型の表現型を示し、F 2 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。次にアレイズムを調べる目的で、*bor1-1* と交配させたところ F 1 世代及び F 2 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。

次に *bor1-2* 変異株、*bor1-1* 変異株、野生型株を 0~3000 μM B までの数段階で水耕栽培し、30 日目に地上部の成長量と地上部 B 濃度を測定した。その結果、成長量は 3 μM 以下の低 B 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が、*bor1-2* 変異株と *bor1-1* 変異株の間で差はなかった。また、植物体中の B 濃度も *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。

第二章では原因遺伝子の同定について述べている。*bor1-2* 変異の同定を行なうためにまず、*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、雑種第二世代 F 2 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 *BOR1* は第 2 染色体下腕上にあることが判明した。次に F 2 で *bor1-1* 表現型を示す植物約 100 個体を選び DNA を抽出し、第 2 染色体上にある Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) 及び Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 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 *BOR1* 遺伝子は第 2 染色体の下方、RI map (Lister and Dean 1993) で約 82 cM 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、F 2 約 800 個体から、*BOR1* 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ところ、*BOR1* を約 155 kb 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、*BOR1* を約 15 kb 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 open reading frame (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みつかったことから、この ORF を *BOR1* 遺伝子と同定した。*BOR1* 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の膜貫通領域と予想される領域に存在していた。

総合考察では成果をまとめ、成果の意義と今後の研究の展開について考察した。

以上本論文は、生物界ではじめてのホウ素輸送体蛋白質の同定について述べたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。