

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 13 年度博士課程 進学

高野順平

指導教官 米山忠克

論文題目 Identification of an Arabidopsis boron transporter and its regulation

(和訳 シロイヌナズナホウ素トランスポーターの同定と制御機構)

本研究は生物界で初めてホウ素トランスポーターを同定し、その機能と制御を解析したものである。

ホウ素は植物の生育に必須な元素の一つであり、最近では動物における必須性も示されつつある。植物においてホウ素は、細胞壁構成多糖ラムノガラクトン II とエステル結合を形成し、細胞壁の構造維持に必須な役割をはたす。そのため、ホウ素欠乏は植物の生長を著しく抑制する。同時にホウ素は、植物に過剰害を引き起こしやすい。ホウ素の欠乏および過剰による作物生産性低下は、世界各地において報告されている。したがって、植物におけるホウ素輸送機構を理解し、適切に制御する技術の開発が望まれる。しかしながら、植物のみならず生物界においてホウ素輸送の分子機構の理解は限られ、実際にホウ素輸送を担うトランスポーターが同定されていなかった。

シロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株 *bor1-1* は低ホウ素条件下で成長抑制を受け、高濃度のホウ素供給で回復する劣性一遺伝子の変異株である (Noguchi et al 1997)。*bor1-1* 変異株では、ホウ素の根への吸収には野生型株との間に差はみられないが、野生型株の導管液にみられるホウ素の濃縮がみられない。したがって *bor1-1* 変異株はホウ素の導管への積極的な輸送機構に欠損をもち、その結果地上部へホウ素を十分に供給できないと考えられる (Noguchi et al 2001)。

本研究では、*BOR1* 遺伝子の関わるホウ素輸送の分子機構を解明するため、*bor1-1* 変異株の詳細な生理解析、*BOR1* 遺伝子の同定および解析を行った。

1. *BOR1* による若い葉への優先的ホウ素輸送

bor1-1 変異株におけるホウ素欠乏症状の観察を行った結果、成長抑制は根よりも茎葉、特に若い葉において顕著であった。若いロゼット葉は強く展開抑制を受け、その組織では細胞伸長と細胞間隙形成に抑制がみられた。一方、野生型株のホウ素欠乏症状では、茎葉

全体の成長抑制がみられたが、特に若い葉が強く生育抑制を受けることはなかった。このホウ素欠乏症状の差異は、*bor1-1* 変異株における導管へのホウ素の積極的輸送の欠損によってだけでは説明できない。そこで、若い葉と古い葉について元素濃度を分析したところ、*bor1-1* 変異株では両部位で野生型株よりも低いホウ素濃度を示したが、その低下の程度は若い葉で著しかった。よって、*bor1-1* 変異株の若い葉の展開抑制はホウ素濃度低下によるものと考えられた。さらに、安定同位体 ^{10}B を用いたトレーサー実験によって若い葉と古い葉へのホウ素の取り込みを比較した結果、野生型株は低ホウ素条件下で若い葉へ優先してホウ素を輸送し、変異株はその優先的な輸送を行っていないことが明らかになった。

これまで、ホウ素は植物体内において蒸散流によって受動的に輸送され则认为されていたが、本研究は蒸散の少ない若い部位への優先的輸送の存在を明らかにした。さらに、*BOR1* 遺伝子はホウ素の導管への積極的な輸送だけではなく、若い部位への優先的輸送をも担うことを明らかにした。

2. ホウ素トランスポーター *BOR1* の同定

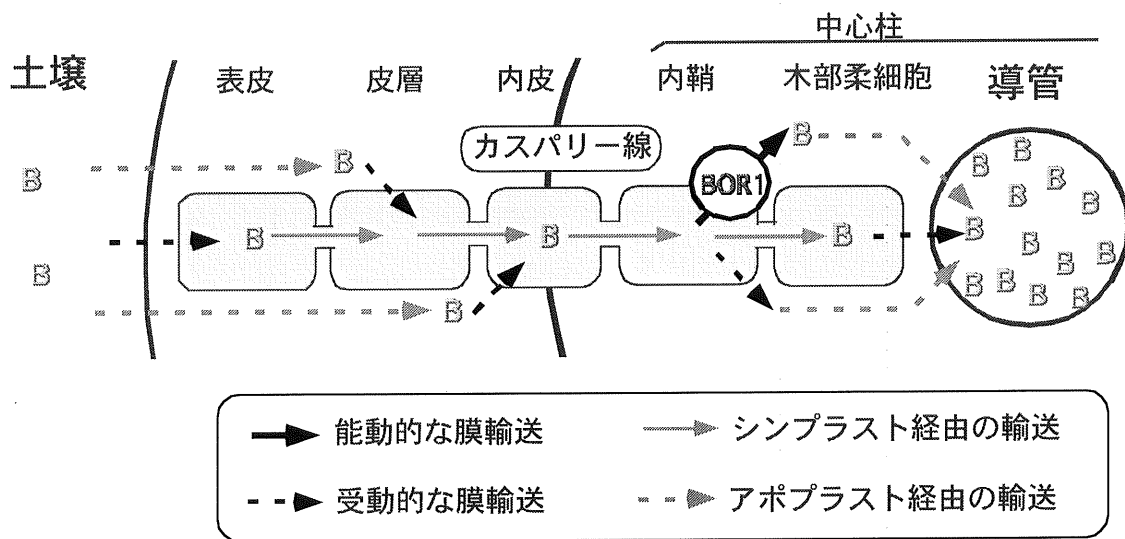
bor1-1 変異株の原因遺伝子 *BOR1* は、ポジショナルクローニング法によって同定された。アミノ酸配列より、*BOR1* 遺伝子は10個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質をコードすると予想された。また、Database 解析により、相同遺伝子はシロイヌナズナゲノムに6つ存在する他、イネ、ナタネ、トマト、カボチャなど、EST クローン的大量解析が行われている植物には例外なく存在することが明らかになった。したがって、*BOR1* は高等植物に共通の遺伝子と考えられる。動物界においては、Anion exchanger および Sodium bicarbonate co-transporter を含む炭酸水素イオントランスポーターに相同性が認められる。パン酵母にも相同遺伝子が存在する。

BOR1 の細胞内局在を調べるために、*BOR1* と Green fluorescence protein (GFP) の融合タンパク質をシロイヌナズナのプロトプラストに発現させたところ、GFP 蛍光は細胞膜に観察された。また、*BOR1* の組織局在を調べるため、*BOR1* プロモーターと GFP の融合遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを観察したところ、GFP 蛍光は根の内鞘で強く観察された。したがって、*BOR1* は主に内鞘細胞の細胞膜に発現すると考えられる。

BOR1 はトランスポーターに相同性を示したため、酵母を用いてホウ素膜輸送活性を検定した。まず、酵母の *BOR1* 相同遺伝子である *YNL275w* 遺伝子の破壊株と、野生型の酵母について、ホウ素を含む培地で培養後の菌体内ホウ素濃度を測定した。*YNL275w* 遺伝子が破壊されると、菌体内のホウ素濃度が13倍に増加した。さらに、破壊株で *BOR1* を発現させると、発現しないものに比べて菌体のホウ素濃度が約1/3に減少した。これら

の結果は、BOR1 および YNL275w が排出型のホウ素トランスポーターであることを示唆している。

以上より、BOR1 は内鞘細胞からホウ素を積極的に排出するホウ素トランスポーターであることを示した。BOR1 は低ホウ素条件下にホウ素を導管へ積極輸送し、地上部のホウ素濃度を十分に保つ役割を担うと考えられる。本研究は、生物界で初めてホウ素トランスポーターを同定したものである。また、導管への積極輸送を担うトランスポーターとしても初の発見である。



モデル図 シロイヌナズナ根におけるホウ素輸送と BOR1 の役割

土壌中のホウ素は、表皮および皮層において細胞内に取り込まれ、シンプラスト経路でカスパリー線の内側に運ばれる。BOR1 はホウ素を内鞘細胞から濃度勾配に逆らって排出する。濃縮されたホウ素はアポプラスト経路で導管に到達し、地上部へ運ばれる。

3. BOR1 のホウ素栄養に依存した転写後制御

ホウ素は植物に欠乏害と過剰害の両方を引き起こしやすい元素である。したがって、植物はホウ素栄養状態を適切に保つ必要があり、ホウ素トランスポーターを制御していると考えられる。本研究では、活性、タンパク質蓄積、RNA 蓄積の各レベルで BOR1 のホウ素栄養条件による制御を解析した。

低ホウ素条件および通常ホウ素条件で前処理した植物について安定同位体 ^{10}B を用いたトレーサー実験を行った結果、野生型植物において、低ホウ素条件の前処理によって地上部へのホウ素トレーサーの移行が増加した。*BOR1* 遺伝子破壊株においてはこの増加はみられなかった。したがって、*BOR1* による導管へのホウ素輸送は、低ホウ素条件により誘導されることが明らかになった。

しかし、定量的 RT-PCR 解析の結果、*BOR1* RNA の蓄積量はホウ素栄養条件に大きな影響を受けないことが明らかになった。一方、*BOR1* のペプチド抗体を作成し野生型株の膜画分について western 解析を行ったところ、*BOR1* タンパク質の蓄積量は低ホウ素条件で増加することが明らかになった。さらに、35S プロモーター制御下で *BOR1*-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換植物において GFP 抗体を用いた western 解析を行ったところ、同様の傾向が認められた。*BOR1*-GFP タンパク質は低ホウ素処理後 24 時間以内に増加し、ホウ素再添加後 24 時間以内に減少した。

以上より、*BOR1* がホウ素栄養状態によって転写後制御されていることが明らかになった。植物は、低ホウ素条件下に *BOR1* を発現させ地上部のホウ素欠乏害を防ぎ、ホウ素十分条件下には *BOR1* の発現を抑えホウ素の過剰な蓄積を防いでいると考えられる。ホウ素トランスポーターの制御機構の理解は、将来人為的に作物のホウ素栄養状態をコントロールする技術の開発につながるものと期待される。

Takano et al. Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the *BOR1* gene (2001) Soil Science and Plant Nutrition Vol. 47, No.2 345-357

Takano et al. Arabidopsis boron transporter for xylem loading (2002) Nature Vol. 420, No.6913 337-340