

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高野 順平

本論文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。

序章では研究の背景と目的を述べている。ホウ素は植物の生育に必須な元素の一つであり、細胞壁構成多糖ラムノガラクトソナン 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。そのため植物におけるホウ素輸送の機構を理解することが必要である。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。本研究ではホウ素輸送の分子機構を解明するためシロイヌナズナ高ホウ素要求性変異株 *bor1-1* を用いて、詳細な生理解析と *BOR1* 遺伝子の同定および解析を行った。

第 1 章では、*BOR1* が若い葉への優先的ホウ素輸送に重要であることを証明した。*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と考えられていたが、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* 遺伝子は野口によって明らかにされていた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。

第 2 章ではホウ素トランスポーター *BOR1* の同定について述べている。*bor1-1* 変異株の原因遺伝子 *BOR1* を、ポジショナルクローニング法によって同定した。*BOR1* は 10 個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質と予想され、動物の炭酸水素イオントランスポーターと相同性が認められた。*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* 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た。*BOR1* のホウ素膜輸送活性を酵母発現系によって検定した。その結果、*BOR1* およびその酵母における相同遺伝子である *YNL275w* は、酵母細胞内ホウ素濃

度を低下させることを明らかにした。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。これは生物界で初めてホウ素トランスポーターの同定となった。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。

第 3 章では、BOR1 のホウ素栄養に依存した転写後制御を明らかにしている。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、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かった。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した。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、同様に低ホウ素条件で増加が認められた。

以上本論文は、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り、シロイヌナズナ BOR1 が内鞘細胞の細胞膜ではたらく排出型のトランスポーターであること、若い部位への優先的輸送を担うこと、BOR1 はホウ素栄養状態によって転写後に制御されていることを明らかにしたものであり、学術上応用上寄与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。