

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 坂本 卓也

論文題目

Study of the molecular mechanisms of boron toxicity in plants
-Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants hypersensitive to excess boron-
(植物におけるホウ素毒性の分子機構の研究
-ホウ素過剰超感受性シロイヌナズナ変異株の解析-

ホウ素は植物に必須な微量栄養元素であるが、植物体内で過剰に存在すると毒性を示す。ホウ素過剰によって、細胞分裂や伸長の阻害、炭素・窒素固定能の低下、活性酸素種の発生に伴う酸化ストレスなどが起こり、結果として生育が阻害される。しかしながら、ホウ素過剰がもたらすこれらの負の現象がどのようにして起こり、そのプロセスにどのような遺伝子が関わっているのかは不明である。本論文は、根の生育を指標にして単離されていたホウ素過剰超感受性シロイヌナズナ変異株の解析を通じて、ホウ素毒性の分子機構を解明することを目的として研究を行ったものであり、序論と3章よりなる。

第一章では、変異株の原因遺伝子の単離と解析を行った結果、コンデンシン II と呼ばれるタンパク質複合体の *CAP-H2* 及び *CAP-G2* の 2 つのサブユニットをコードする遺伝子がホウ素過剰耐性に必須であることを明らかにしている。コンデンシン II は細胞分裂時の染色体凝集を担うほか、ヒト、ショウジョウバエや酵母などでは転写調節や DNA 損傷修復などの役割を担うことが知られている。動物などで知られている DNA 損傷修復機能に着目して、ホウ素毒性のプロセスとして、DNA 損傷の可能性について検討し、シロイヌナズナ野生株において DNA 損傷修復遺伝子の発現を調べ、ホウ素過剰によりそれらの遺伝子発現が誘導されることを明らかにした。また、コメットアッセイによる DNA 損傷の定量的解析を行い、ホウ素過剰により DNA 損傷が蓄積することを示した。これらの結果は、ホウ素過剰が DNA 損傷を引き起こすこと意味している。くわえて、コンデンシン II の変異株が DNA 損傷を起こす試薬に対して感受性を示し、さらに DNA 損傷修復遺伝子の発現量・DNA 損傷の程度とともに通常の条件でもホウ素過剰の条件でも野生型株よりも多いことを明らかにした。以上のことから、シロイヌナズナのコンデンシン II が DNA 損傷修復あるいは DNA 損傷防御の機能を持っていること、さらにそのような機能を通じてコンデンシン II はホウ素毒性を抑制していると考えられた。

第二章ではホウ素過剰耐性にプロテアソームが重要であることを示している。プロテアソームは主にポリユビキチン標識された異常タンパク質や不要なタンパク質の能動的分解を行うことで、細胞周期の調節、DNA 損傷修復など様々な生命現象を司る巨大タンパク複合体だが、これらタンパク質複合体の変異株は、他の無機ストレスである塩、カドミウムやヒ素などには感受性を示さず、コンデンシン II 及びプロテアソームの特定の変異がもたらす感受性はホウ素過剰特異的であることが示唆された。プロテアソームは真核および原核生物にも広く保存されているが、植物では特定のサブユニットに複数のパラログ分子が存在し、植物では機能に応じた様々な組み合わせのプロテアソームが形成されていると考えられている。プロテアソームを構成する 19S Regulatory Particle (RP) のサブユニットのうち少なくとも RPN2a、RPN8、RPT2a 及び RPT5a がホウ素過剰耐性に必須であることが示された。一方、これらのパラログ分子である RPN2b、RPN8b、RPT2b、RPT5b はホウ素過剰に必須ではなかった。このことから、4つのサブユニットが共通に関わるプロテアソームの機能がホウ素過剰耐性に必須であること、一方でパラログ間ではホウ素過剰における機能が異なることが示された。さらに、変異株のポリユビキチン化タンパク質の蓄積量について調査を行い、その結果、*rpt5a* ではホウ素過剰によってポリユビキチン化タンパク質がより蓄積しており、プロテアソーム活性が低下していることが示された。次に、野生型株及び *rpt5a* からポリユビキチン化タンパク質を精製し、ホウ素過剰によって量が増えるもの、*rpt5a* でのみ蓄積するあるいは量が増えるものがあるかどうかを、iTRAQ 試薬を用いた LC/MS/MS による解析を行い、22 種のタンパク質についてはホウ素過剰によってポリユビキチン化が促進されること、かつ *rpt5a* で蓄積量が多いことが示された。以上のことから、特定のサブユニットを持つプロテアソームが、ホウ素過剰によって誘導される特定のポリユビキチン化タンパク質の分解制御を行うことでホウ素過剰耐性に貢献していると考えられた。

第三章ではプロテアソーム変異株の地上部の成長が亜鉛欠乏に対して野生型株よりも感受性になることを示し、その栄養特異性について検討を行っている。

以上本研究は植物のホウ素過剰耐性機構について、4つの新規遺伝子を単離しその役割を明らかにしたものであり、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。