

機関番号：12601

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005-2009

課題番号：17078004

研究課題名（和文）植物必須微量元素の輸送を司る分子とその制御

研究課題名（英文）Plant micro nutrient transporters and their regulation

研究代表者 藤原 徹

(FUJIWARA TORU)

東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80242163

研究成果の概要（和文）：植物は土壌から必須無機元素を吸収して生育する能力があり、人類に恵みをもたらしている。本研究は必須元素のうちの微量元素を対象とした。ホウ素については、これまで知られていたトランスポーターとは異なる機能を持つものを複数発見した。また、トランスポーターの発現や蓄積の制御機構の一端を明らかにした。さらにトランスポーターを用いて栄養ストレスに耐性を示す植物の作出に成功した。

研究成果の概要（英文）：Plants grow on soil by taking essential mineral nutrients from soil and human life depends on this ability of plants. In this project, we focused on essential minor mineral nutrients. Novel transporters of boron with distinct physiological function and activities are identified and characterized. Some mechanisms of regulation of transporter expression have been revealed. Nutrient stress tolerant plants were generated with the use of mineral nutrient transporters.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,800,000	0	18,800,000
2006年度	18,800,000	0	18,800,000
2007年度	18,800,000	0	18,800,000
2008年度	17,800,000	0	17,800,000
2009年度	17,800,000	0	17,800,000
総計	92,000,000	0	92,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：ホウ素、モリブデン、植物、トランスポーター、必須元素

## 1. 研究開始当初の背景

植物の必須元素はトランスポーターを介して土壌から吸収される。トランスポーターの研究は植物の生育や生産の制御に不可欠である。研究開始時点の状況としては、植物必須元素のモリブデンを除く全ての元素について少なくとも一つのトランスポーター遺伝子が同定されていたが、植物に多くあるトランスポーター遺伝子との機能分担や、吸収や植物体内での輸送機構については未解明の部分が

多かった。このような状況の中で、モリブデンについてはトランスポーターの同定が、他の元素については、吸収や体内移行の機構の解析が求められていた。また、トランスポーターの発現や活性の栄養条件による制御についてもより詳細な解析が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究はこのような状況の中で、ホウ素とモリブデンを対象にトランスポーターの同定

やトランスポーター遺伝子間での機能分担、発現制御機構の解析、栄養ストレス耐性植物の作出を目的に研究を進めた。

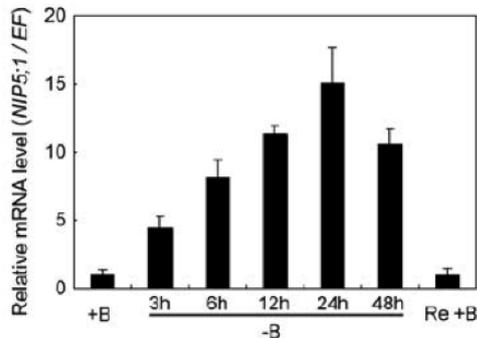
### 3. 研究の方法

研究方法としては、シロイヌナズナを基本的な材料として、変異株や変異系統を用いた遺伝的なアプローチによるトランスポーター遺伝子の同定、同定された遺伝子の発現解析、酵母や大腸菌なども利用した機能解析、相同遺伝子の発現や機能解析を中心に進めることとした。

### 4. 研究成果

(1) ホウ素吸収に重要な NIP5;1 の同定と解析

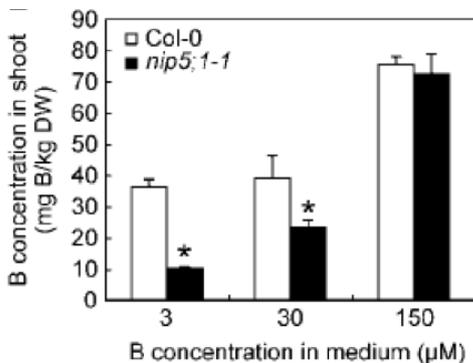
ホウ素の地上部への輸送を担う BOR1 は生物界で初めてのホウ素トランスポーターと



NIP5;1 mRNAのホウ素栄養に応じた蓄積

通常条件で育てたシロイヌナズナをホウ素欠乏培地に移し、根におけるNIP5;1 mRNAの蓄積をelongation factor(EF)の蓄積量との相対値として終時的測定したもの。ホウ素欠乏にさらすと、24時間で蓄積が24倍に増加する。また、24時間ホウ素欠乏にさらした植物をホウ素十分に戻して24時間経過したもの(Re+B)では蓄積が元のレベルに戻っている。

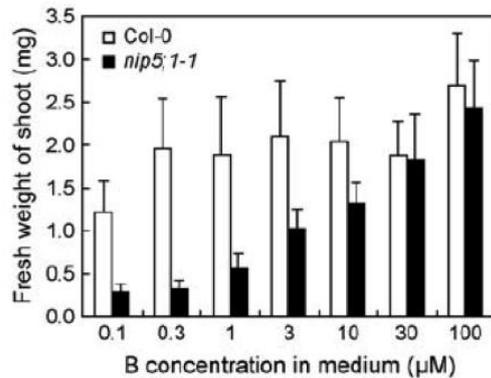
して 2002 年に同定されていたが、ホウ素の吸収を担うトランスポーターは知られていなかった。ホウ素欠乏処理したシロイヌナズナの根で発現が上昇する遺伝子をマイクロアレイで検索したところ NIP5;1 が強い誘導を受けることが明らかになった。



NIP5;1 の欠損変異株のホウ素濃度

NIP5;1 の欠損変異株(*nip5;1-1*)と野生型株(Col-0)を3, 30, 150 μMのホウ素を含む培地で栽培し地上部のホウ素濃度を測定したもの。変異株では野生型株よりも培地のホウ素濃度が低い時に葉のホウ素濃度が低下している。

NIP5;1 はアクアポリンに相同性を示すタンパク質であることが推定されていた。GFP と NIP5;1 を連結し細胞内での局在をしらべたところ、細胞膜に局在していることが明らかになった。さらに、NIP5;1 を発現するア



NIP5;1 の欠損変異株のホウ素濃度に応じた成長

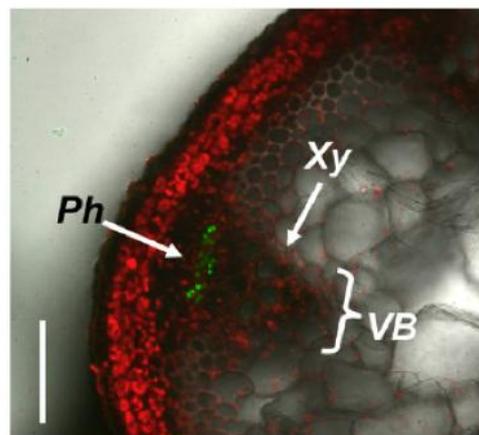
NIP5;1 の欠損変異株(*nip5;1-1*)と野生型株(Col-0)を様々な濃度のホウ素を含む培地で栽培し地上部の生育量を測定したもの。変異株では野生型株よりも培地のホウ素濃度が低い時に生育が悪くなるが、培地のホウ素濃度が高いと野生型株と同様の生育を示す。

フリカツメガエルの卵母細胞ではホウ素の吸収活性が高まることを見いだした。さらに、NIP5;1 遺伝子に欠損を持つシロイヌナズナ変異株を様々なホウ素濃度の培地で生育させたところ、植物体のホウ素濃度が低下しており、ホウ素が十分にある培地での生育は野生型と同様であったが、ホウ素欠乏条件での生育が極端に悪くなっていた。

これらのことから、NIP5;1 が植物へのホウ素の取り込みに重要なホウ素トランスポーターであることが明らかになった。

(2) 地上部のホウ素分配に重要な NIP6;1 の解析

シロイヌナズナのゲノム中には NIP5;1 に

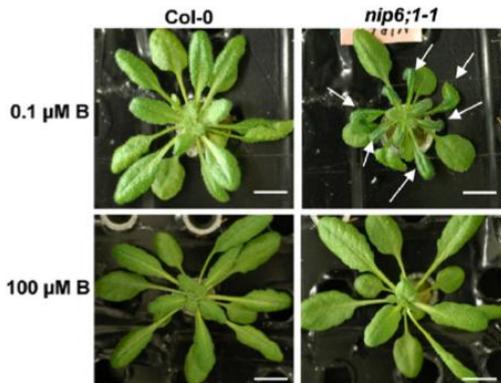


NIP6;1 の導管と篩管の間での発現

NIP6;1 遺伝子のプロモーターをGFPに連結しシロイヌナズナに導入した植物の茎の断面の蛍光顕微鏡写真。導管(Xy)と篩管(Ph)の間の細胞で蛍光が観察される NIP6;1 遺伝子は維管束(VB)の導管と篩管の間の細胞で発現していることが示唆された。

良く似た遺伝子 NIP6;1 がある。NIP6;1 もホウ素トランスポーターである可能性が考えられたので、NIP5;1 と同様にホウ素輸送活性を調べたところ、活性が認められた。NIP6;1 の発現を NIP6;1 promoter-GFP を持つ植物で観察したところ、茎の節の木部と篩部の間の細胞に発現が認められた。

また NIP6;1 を欠損する植物を入手しホウ素欠乏にさらしたところ、根の生育には異常が認められなかったが、地上部の若い葉の展開がホウ素欠乏条件で抑制されていた。さらに、欠損株ではホウ素の若い葉への輸送量が低下していることが認められた。



NIP6;1 の欠損変異株のホウ素欠乏感受性

NIP6;1 の欠損変異株 (*nip6;1-1*) と野生型株 (Col-0) を 0.1 および 100 μM のホウ素を含む培地で水耕栽培したもの。100 μM のホウ素を含む培地での生育には両者に違いが無いが、0.1 μM のホウ素の場合には、変異株においてのみ、若い葉の生育阻害 (白い矢印で示す) が見られる。

これらのことから、NIP6;1 は地上部でのホウ素の分配に関与しているトランスポーターであると結論づけられた。おそらく木部から篩部へのホウ素の移行を促進しており、これによって、根から吸収されたホウ素が篩管によって支えられている若い組織へより移行しやすくなっていると考えられる。

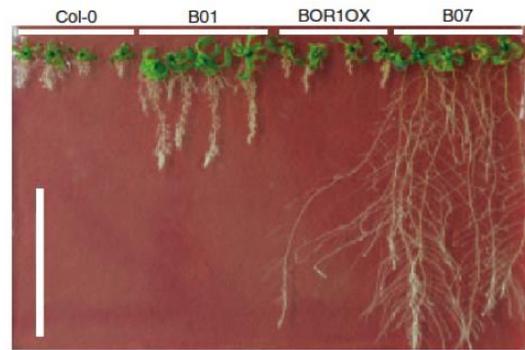
### (3) ホウ素トランスポーターBOR1 の蓄積制御機構の解明

ホウ素トランスポーターBOR1 は培地のホウ素濃度が高まると分解を受けるようになることが本研究の開始段階で明らかになっていた。このしくみの一端を明らかにするために、BOR1 に様々な変異を導入して分解に影響が出るかどうかを調べたところ、いくつかの変異によって、BOR1 の分解が野生型の BOR1 に比べて極端に遅くなることが明らかになった。これらのアミノ酸残基 (例えば 590 番目のリジン) がユビキチン化などの修飾を受けることも明らかになり、ホウ素栄養に応じた BOR1 の修飾やそれに伴った分解制御が起こっていることが明らかになった。

### (4) ホウ素栄養ストレス耐性植物の作出 ホウ素欠乏や過剰は世界に広く分布する

農業生産の阻害要因である。ホウ素トランスポーターを用いて、植物のホウ素吸収を高めることができれば、ホウ素欠乏耐性植物を作出できる可能性が考えられた。

BOR1 を過剰発現するシロイヌナズナを作成したところ、野生型植物に比べてホウ素欠乏に対する耐性が高まっていた。さらに、NIP5;1 の発現を高めることによって、よりホウ素欠乏耐性のある植物を作出することができた。



NIP5;1 の発現強化によるホウ素欠乏耐性の付与

野生型株 (Col-0) と BOR1 過剰発現株 (BOR1 OX) と、BOR1 OX にさらに NIP5;1 の発現を高めた形質転換植物 2 系統 (B01 と B07) をホウ素を加えない培地で栽培したもの。野生型株や BOR1 OX では根がほとんど伸びないが、NIP5;1 の発現を高めた形質転換植物 2 系統は根の伸びも地上部の生育も改善している。

一方、BOR1 に相同な BOR4 を発現させることで、ホウ素過剰に耐性なシロイヌナズナを作出することにも成功した。

(5) ホウ素応答に関与する転写因子の同定  
ホウ素欠乏に応じて NIP5;1 の mRNA の蓄積が変化することなどから、ホウ素栄養に応じた遺伝子の発現制御を担う転写因子の存在が考えられた。マイクロアレイ実験などを通じて WRKY6 という転写因子の関与の可能性が考えられたので、この遺伝子に異常を持つ変異株のホウ素欠乏応答を観察したところ、ホウ素欠乏での根の伸長に異常が見られた。このことから WRKY6 はホウ素欠乏に応答した遺伝子の発現制御に重要な役割を担っていることが推定された。

### (6) モリブデントランスポーターの同定と解析

モリブデンは植物の必須元素の中でそのトランスポーターが知られていない最後の元素として残されていた。ホウ素栄養の研究の中から、シロイヌナズナの実験系統間で地上部のモリブデン濃度が数倍違っていることが見いだされ、モリブデン濃度の違いを指標に原因遺伝子のマッピングを行ったところ、硫酸トランスポーターに相同性のあるタンパク質が原因遺伝子であることが明らかになった。この遺伝子が欠損すると植物のモリブデン濃度が極端に減少することが明らかになった。

かになった。また、この遺伝子を酵母で発現させると、酵母でモリブデンの集積が起こることが明らかになったことから、同定された遺伝子はモリブデントランスポーターであることが明らかになった。さらに、この遺伝子には良く似た遺伝子が一つ存在しているが、この遺伝子もモリブデン輸送を担っていることが明らかになった。また、硫酸トランスポーターの一部にもモリブデン輸送活性があることが明らかになった。

モリブデンは硝酸還元酵素の補酵素の構成金属であり、モリブデン欠乏と窒素代謝の関連は指摘されてきていたところであるが、モリブデントランスポーターを用いると、モリブデン欠乏症がより良く観察されるようになることを利用して、モリブデンと窒素代謝の関係についても、メタボローム解析などによって検討した。

これらの研究によって、植物のモリブデン輸送の分子機構の一端を明らかにすることができたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

1. Significant contribution of boron stored in seeds to initial growth of rice seedlings. Uraguchi, S. and Fujiwara, T. *Plant Soil* (2011) 340:435–442 (2011) 査読あり
- 2 *Arabidopsis thaliana* 26S Proteasome Subunits RPT2a and RPT5a Are Crucial for Zinc Deficiency-Tolerance Sakamoto, T., Kamiya, T., Sako, K., Yamaguchi, J., Yamagami, M. and Fujiwara, T. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 75: 561-567 (2011) 査読あり
3. Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/sulphur metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Ide Y, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Tomatsu H, Saito K, Hirai MY, Fujiwara T. *J Exp Bot.* 62:1483-97(2011) 査読あり
4. High boron-induced ubiquitination regulates vacuolar sorting of the BOR1 borate transporter in *Arabidopsis thaliana*. Kasai K, Takano J, Miwa K, Toyoda A, Fujiwara T. *J Biol Chem.* 286: 6175-6183 (2011) 査読あり
5. Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 17, 5220-5225 (2010) 査読あり

6. Mechanism of boron tolerance in soil bacteria. Ahmed, I. and Fujiwara, T. *Canad. J. Microbiol.* 56: 22-26 (2010) 査読あり
7. Possible involvement of ploidy in tolerance to boron deficiency in *Arabidopsis thaliana*. Kasajima, I., Yoshizumi, T., Ichikawa, T., Matsui, M. and Fujiwara, T. *Plant Biotechnology* 27: 435-445 (2010) 査読あり
8. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. Miwa, K., and Fujiwara, T. *Ann. Bot.* 105: 1103-1108 (2010) 査読あり
9. *Rhodococcus baikonurensis* BTM4c, a Boron-Tolerant Actinobacterial Strain Isolated from Soil. Yoon, J., Miwa, H., Ahmed, I., Yokota, A. and Fujiwara, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74: 178-181, (2010) 査読あり
- 10 *WRKY6* is involved in the response to low boron conditions in *Arabidopsis thaliana*. Kasajima, I., Ide, Y., Hirai-Yokota, M., Fujiwara, T. *Physiologia Plantarum* 139: 80-92 (2010) 査読あり
11. The intracellular transport of transporters: membrane trafficking of mineral transporters. Fuji, K., Miwa, K., Fujiwara, T. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 699-704 (2009) 査読あり
12. *Arabidopsis* NIP1;1 Transports Antimonite and Determines Antimonite Sensitivity. Kamiya, T., Fujiwara, T. *Plant and Cell Physiology* 50:1977-1981 (2009) 査読あり
13. Highly boron deficiency tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5;1, a boric acid channel. Kato Y, Miwa K, Takano J, Wada M, Fujiwara T. *Plant Cell Physiol.* 50:58–66 (2009) 査読あり
- 14 NIP1;1, an Aquaporin Homolog, Determines the Arsenite Sensitivity of *Arabidopsis thaliana*. Kamiya, T. and Fujiwara, T. *Journal of Biological Chemistry* 284:2114-2120 (2009) 査読あり
- 15 NIP6;1 is a Boric Acid Channel for Preferential Transport of Boron to Growing Shoot Tissues in *Arabidopsis thaliana*. Tanaka M, Wallace I, Takano J, Roberts RM, and Fujiwara T. *Plant Cell* 20:2860-2875 (2008) 査読あり
16. Plants tolerant of high boron levels. Miwa, K., Takano, J., Omori, H. Seki, M., Shonozaki, K., Fujiwara, T. *Science* 318:1417 (2007) 査読あり
17. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. Tanaka, M., Fujiwara, T. *Pflug. Arch.* 456: 671-677(2007) 査読あり
18. An *Arabidopsis thaliana* high-affinity molybdate transporter required for efficient uptake of molybdate from soil. Tomatsu, H.,

- Takano, J., Takahashi, H., Watanabe-Takahashi A., Shibagaki, N., Fujiwara, T. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104: 18807–18812 (2007) 査読あり
19. Cell-type specificity of the expression of Os BOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. Nakagawa, Y., Hanaoka, H., Kobayashi, M., Miyoshi, K., Miwa, K., Fujiwara, T. **Plant Cell** 19: 2624–2635 (2007) 査読あり
20. An efflux transporter of silicon in rice. Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Yano, M. **Nature** 448, 209-212 (2007) 査読あり
21. Identification of novel *Arabidopsis thaliana* genes which are induced by high levels of boron. Kasajima, I., Fujiwara, T. **Plant Biotechnology** 24, 355-360 (2007) 査読あり
22. *Saccharomyces cerevisiae* BOR1p is a boron exporter and a key determinant of boron tolerance. Takano, J., Kobayashi, M., Noda, Y., Fujiwara, T. **FEMS Microbiology Letters** 267: 230-235(2007) 査読あり
23. Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* Akira Nozawa, Junpei Takano, Masaharu Kobayashi, Nicolaus von Wirén, Toru Fujiwara **FEMS Microbiology Letters** 262: 216-222(2007) 査読あり
24. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. Miwa, K., Takano, J., Fujiwara, T. **Plant J.** 46: 1084-1091 (2006) 査読あり
25. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wirén, N., Fujiwara, T. **Plant Cell** 18 1498-1509 (2006) 査読あり

[学会発表] (計 80 件)

1. 藤原徹. Regulation of mRNA accumulation of NIP5;1 in response to boron. 日中植物栄養ワークショップ. 倉敷 March 30, 2011
2. 坂本卓也、乾 (辻本) 弥生、藤原徹 ホウ素過剰感受性を示すシロイヌナズナのコンデンシン II 変異体の解析—DNA 損傷の可能性. 第 51 回日本植物生理学会年会. 熊本大学 March 18, 2010
3. Koji Kasai, Junpei Takano, Atsushi Toyoda, Kyoko Miwa, Toru Fujiwara. Boron-induced degradation of the borate transporter BOR1 is regulated by ubiquitination in *Arabidopsis*. 21st International Conference on *Arabidopsis* Research 横浜, June 6, 2010
4. Mayuki Tanaka and Toru Fujiwara. Mechanisms of boron-regulated expression of NIP5;1, a boric acid channel, in *Arabidopsis*

*thaliana*. International Workshop on Plant Membrane Biology XV アデレード, オーストラリア Sept, 21, 2010

5. 藤田春佳. Roles of Sultr5;1(MOT2) and Sultr1;2 in Mo transport and distribution in *Arabidopsis thaliana*. 8th Int'l Workshop "Sulfur Metabolism in Higher Plants"メルボルン, オーストラリア Nov 22, 2010

6. 三輪京子、藤原徹 シロイヌナズナホウ酸トランスporterBOR4のホウ酸条件による発現応答. 日本土壤肥料学会年会. 京都大学 Sept 15, 2009

7. 藤原徹. ホウ素トランスporterの発現によるトマトのホウ素欠乏耐性付与. 日本土壤肥料学会 2008 年大会 名古屋 Sept 10, 2008

8. 藤原徹. Identification and characterization of *Arabidopsis molybdate* transporters. 日中植物栄養ワークショップ北京 Oct 10, 2008

9. 藤原徹. Toward comprehensive understanding of regulatory network of sulfur metabolism. 7th Workshop on Sulfur Metabolism in Plants. Warsaw, Poland May 15, 2008

10. Mayuki Tanaka, Junpei Takano, Ian S. Wallace, Daniel M. Roberts, Toru Fujiwara. Roles of *Arabidopsis thaliana* NIP6;1 for preferential transporter of boron to young leaves. XIV International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, June 25, 2007

11. Toru Fujiwara, Junpei Takano, Mayuki Tanaka, Kyoko Miwa, Hideki Hanaoka. Roles of channels and transporters in regulation of boron transport. XIV International Workshop on Plant Membrane Biology, Valencia, Spain June 25, 2007

(他 69 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原徹 (FUJIWARA TORU )

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
教授

研究者番号 : 80242163

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :