

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19160

研究課題名(和文) 生物におけるホウ素の新機能の検証 - ビタミンB6代謝に対するホウ酸の役割 -

研究課題名(英文) A possible role of boron on vitamin B6 metabolism in organisms

研究代表者

三輪 京子 (MIWA, Kyoko)

北海道大学・地球環境科学研究所・准教授

研究者番号：50570587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素は植物の微量必須元素のひとつであり、植物細胞壁のペクチン質多糖の架橋が実験的に示されている生理機能である。近年、微生物や動物においてもホウ素の有用性が報告されており、植物細胞壁以外の機能が示唆されている。本研究は生物におけるホウ素の新たな機能の探索を目的とし、ビタミンB6合成・代謝に関わる遺伝子のシロイヌナズナ変異体の成長抑制が高濃度ホウ酸で回復することを明らかにした。ホウ素が植物のビタミンB6合成・代謝またはビタミンB6を必要とする過程に影響を与える可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

必須元素とは、生物のライフサイクルを完結させるために欠くことのできない元素を指す。生物の必須元素やその新たな役割を明らかにすることは、生命現象を引き起こす分子とその働きを解明することに直結する。ホウ素は植物の必須元素であり、微生物や動物においても有用性が指摘されていたものの、植物細胞壁以外の機能は不明であった。本研究では植物においてホウ素がビタミンB6合成・代謝またはビタミンB6を必要とする過程に影響を与える可能性を見出した。生物におけるホウ素の新たな生理機能の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Boron is an essential trace element for plants and one proven physiological role is crosslinking of the pectic polysaccharides in plant cell walls. Recently increasing reports have suggested that boron is also useful for microorganisms and animals, supporting another physiological function of boron than plant cell wall. This study aimed to explore a novel function of boron in organisms and revealed that application of high levels of boric acid rescued growth reduction in Arabidopsis mutants of vitamin B6 synthesis and metabolism. This result suggests a possibility that boron in plants can affect vitamin B6 synthesis and metabolism and/or the pathways that require vitamin B6.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：ホウ素 必須元素 ビタミンB6 シロイヌナズナ 酵母

1. 研究開始当初の背景

「必須元素」とは、生物のライフサイクルを完結させるために欠くことのできない元素を指す。その特徴として、(1)元素特有の機能があり、他の元素が代替できない(非代替性)、(2)元素の役割が生物の生存・成長にとって間接的ではなく直接的な影響をもつ(直接性)、(3)元素の役割は特定の生物種に限られるものではなく、あらゆる種に普遍的である(普遍性)が挙げられる。現在、ヒトにおいて必須元素は多量元素(H,O,C,N,S,K,Na,Caなど)と微量元素(Fe,Zn,Mn,Cuなど)をあわせて23元素となっている。欠乏による障害の発見や分析感度の向上が契機となり、新たな必須元素が見出されてきた。

ホウ素(B)は、これまで植物のみにおいて微量必須元素とされ、植物細胞壁の構成成分としてペクチン質多糖の架橋することが唯一実験的に明らかにされている生理機能である。植物のみに必須であることは、ホウ素の生理機能が植物細胞壁ペクチン質多糖の架橋である知見と合致していた。植物細胞でのホウ素の細胞壁画分への優先的な分配も、細胞壁での主要な役割を支持した。

しかし、近年になって細胞壁ペクチンを持たない細菌、酵母、動物(ヒトなど)でのホウ素の有用性・必須性が指摘されてきた(Nielsen et al., 2000)。これはホウ素を欠如させた培地や食餌で成長させたときに、細胞の増殖や発生過程での異常が報告されてきたことによる。また、特定の細菌において、ホウ素を含む化合物として、クオラムセンシングの情報伝達物質であるAutoinducer 2(AI-2)(Chen et al., 2002)、シデロフォア(Harris et al., 2007)が報告され、ホウ素を含む化合物が生理機能をもつことが支持されてきた。また、WHOはヒト成人のホウ素の摂取基準を1~13 mgと設定している。

微生物や動物は植物細胞壁ペクチンを持たないため、細胞内の可溶性画分に存在するホウ素に未知の生理機能がある可能性を示唆するものである。しかしながら、必須元素としての特徴である「普遍性」を満たす生物に共通なホウ素の機能は全く明らかにされてこなかった。また、植物以外の生物ではホウ素の必要量が微量であるため、ホウ素欠乏条件下での生物の培養や結合物質の生化学的な同定が困難であり、植物細胞壁以外でのホウ素の生物における役割は明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

植物をホウ素欠乏条件下で成長させた場合、植物細胞壁の異常で起こる影響と、細胞壁以外の異常で起こる影響を区別することは困難である。そこで先行研究において、細胞壁のホウ素濃度が飽和している通常の培地ホウ素濃度条件(30 μM)で成長抑制を示し、より高濃度のホウ素条件(1 mM)で成長が回復する「高ホウ酸要求性シロイヌナズナ変異体」を単離した。(ホウ素はホウ酸として与えた。)この変異体は正常な成長に多量のホウ酸を必要とする変異株であり、これらの変異体の成長は可溶性画分のホウ酸濃度に依存すると考えられた。

単離した「高ホウ酸要求性シロイヌナズナ変異体」の一つの原因遺伝子がビタミンB6活性化酵素をコードする*SOS4*であることを明らかにした。*SOS4*はビタミンB6代謝のSalvage経路でビタミンB6を活性型に変換する酵素である。*SOS4*シロイヌナズナ変異体は、通常ホウ酸条件において、野生型株と比較して顕著な成長抑制を示す。一方、過剰害が出る程度ではない高濃度のホウ酸を含む培地において、これらの*SOS4*変異株の成長抑制が根と地上部ともに回復することを見出した。ホウ酸とビタミンB6との関係はこれまで全く想定されてこなかった関係であった。

本研究では、高濃度のホウ酸が植物のビタミンB6欠乏障害を緩和する現象の解明を通じて、可溶性画分に存在するホウ素の新機能を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナにおけるビタミンB6合成・代謝の変異体に対するホウ酸の影響評価

高濃度ホウ酸による成長抑制の回復が*SOS4*変異体に特異的であるか、他のビタミンB6合成・代謝の変異体においても観察されるかを固形培地および水耕栽培において検証した。ビタミンB6の新規合成経路の酵素をコードする*PDX1.1*、*PDX1.3*を対象とし、T-DNA挿入株を確立し、異なるホウ酸濃度での成長を観察した。

高濃度ホウ酸がビタミンB6欠乏障害を緩和するという現象がビタミンB6量の変化に起因するのかを検討するため、ホウ素条件に依存したビタミンB6合成・代謝に関わる酵素遺伝子群の発現量変化を調べた。先行研究において野生型シロイヌナズナの地上部を対象として、ホウ素低濃度・通常・高濃度条件においてRNAseq、リボソームプロファイリングが実施されており(Sotta et al., 2021)、それらのデータを精査した。さらに、ホウ酸による植物体のビタミンB6含量の変化を明らかにするため、HPLCによるビタミンB6定量の測定系の改善を行った。

(2) 酵母におけるビタミン B6 合成変異体に対するホウ酸の影響評価

ホウ酸の効果の生物における普遍性を明らかにするため、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の成長に対するホウ酸の効果の検証を行った。高濃度ホウ酸がビタミン B6 欠乏障害を緩和する現象が酵母で観察されるかを明らかにするため、野生型酵母とビタミン B6 合成酵素欠損酵母 (*snz1* 株) を対象として、異なるホウ酸濃度条件における成長比較を行った。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナにおけるビタミン B6 合成・代謝の変異体に対するホウ素の影響評価

高濃度ホウ酸による成長抑制の回復が *SOS4* 変異体に特異的であるか、他のビタミン B6 合成・代謝の変異体においても観察されるかを明らかにするため、ビタミン B6 新規合成経路の酵素をコードする遺伝子 *PDX1.1* と *PDX1.3* の T-DNA 挿入変異体を固形培地で成長させ、野生型株と成長を比較した。*SOS4* 変異体と同様に *PDX1.1* 変異体は通常ホウ酸条件 (30 μ M) で成長抑制を示し、より高濃度のホウ酸条件 (1 mM) では根と地上部の成長抑制の緩和が観察された。*PDX1.3* 変異体では低ホウ酸条件 (0.3 μ M) において成長抑制が観察され、通常ホウ酸条件 (30 μ M) で成長抑制の緩和が観察された。これより、ホウ酸添加による成長抑制の回復は *SOS* 変異体に特異的ではなく、ビタミン B6 新規合成経路に働く *PDX1.1* および *PDX1.3* 変異体においても観察されることが確認された。さらに成長抑制の緩和が観察される培地ホウ酸濃度が変異体によって異なることが明らかになった。*PDX1.1* および *PDX1.3* 変異体は植物体内のビタミン B6 含量の低下が報告されているため、この結果から可溶性のホウ酸がビタミン B6 欠乏による成長抑制を回復・緩和させる機能をもつことが考察された。

次に、これらのビタミン B6 の新規合成経路および salvage 経路の酵素遺伝子の T-DNA 挿入株を様々なホウ酸濃度を含む液体培地で栽培したところ、複数の遺伝子の変異体において、培地ホウ酸濃度の上昇に伴い葉の新鮮重の増加傾向が観察された。これより、水耕栽培においてもホウ酸がビタミン B6 欠乏障害を緩和する現象が再現されると考察された。

高濃度ホウ酸がビタミン B6 欠乏障害を緩和するという現象がビタミン B6 量の変化に起因するのかを検討するため、ホウ素条件に依存したビタミン B6 合成・代謝に関わる酵素遺伝子群の野生型シロイヌナズナにおける発現量変化を既存のデータを用いて調べた。ビタミン B6 新規合成経路の *PDX1.1*、*PDX1.3*、*PDX2* および salvage 経路に働く *PLR1* は培地ホウ酸濃度の上昇に従って翻訳量の上昇傾向が観察されたが、低濃度 (0.3 μ M)、通常 (30 μ M)、高濃度 (500 μ M) ホウ酸濃度条件間の変化率は 1.5 倍未満であり、ホウ酸濃度に依存した顕著な発現量変化は見出されなかった。この結果より、植物体のホウ素濃度がビタミン B6 合成・代謝に関与する遺伝子の発現量に顕著な影響を与えている可能性は低いと推測された。さらに、ホウ酸による植物体のビタミン B6 含量の変化を明らかにするため、HPLC によるビタミン B6 定量の測定系の改善を行った。ビタミン B6 はピリドキサル、ピリドキシン、ピリドキサミンの三種類があり、リン酸誘導体が補酵素の活性型ビタミン B6 として働く。先行研究で発表された検出方法を実施したところ 6 つピタマーのピークを明確に区別することが困難であることが分かった。そこで、温度や流速を変更することで 6 つのピタマーを区別して検出する方法の最適化を進めた。

本研究で見出された現象は、ホウ素が植物細胞壁以外の機能を有することを支持するものである。ホウ酸添加が植物においてビタミン B6 合成・代謝やビタミン B6 を必要とする過程に影響を与える可能性を示している。本現象の解明は植物におけるホウ素の新たな生理機能の解明につながると思われる。

(2) 酵母におけるビタミン B6 合成変異体に対する影響評価

ビタミン B6 (ピリドキサル、ピリドキシン、ピリドキサミンおよびリン酸誘導体) は広く生物界に存在し、アミノ基転移や脱炭酸を含むアミノ酸代謝を中心として約 60 種類の反応に関与する。ビタミン B6 は全ての生物が必要とする化合物である。ホウ酸によるビタミン B6 欠乏障害の緩和の普遍性を検証するため、ビタミン B6 合成酵素欠損酵母 (*snz1* 株) を用いて成長の観察を行った。

液体培地での成長試験において、ビタミン B6 を含まない最少培地 (SD 培地) では *snz1* においてホウ酸添加区 (2 mM) ではホウ酸無添加区と比較して、対数増殖期に至るまでの時間が短縮される傾向が観察された。しかし、複数回の試験を実施したものの、必ずしも再現されず、現象の確定には至らなかった。ビタミン B6 を含まない最少完全培地 (SC 培地) を用いたところ、野生型と *snz1* とともに濁度の最終到達点がホウ酸添加区 (2 mM) で無添加区と比較して上昇する傾向が観察された。この結果は、酵母の成長、定常期での分裂停止にホウ酸が影響する可能性を示唆するものである。ホウ酸が酵母の成長に効果をもつ可能性を示唆する結果を得たものの、野生型株においてもホウ酸の効果が認められたことから、酵母の場合にはビタミン B6 合成・代謝がホウ酸の主な作用点とは限らない可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------