

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580062

研究課題名（和文）ホウ素欠乏応答の分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of boron-deficiency stress signaling in plants

研究代表者

小林 優 (KOBAYASHI MASARU)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60281101

研究成果の概要（和文）：ホウ素は植物の生育に不可欠の元素であり、欠乏すると組織の壊死や不稔など多様な生理障害が発生する。しかしホウ素が不足することでそれら障害が発生するメカニズムは明らかでない。このメカニズムを解明するため、植物の培地からホウ素を除去したときに生じる応答を詳細に解析した。その結果ホウ素が欠乏すると細胞に活性酸素が蓄積し、それが原因で細胞死に至ることが明らかとなった。また植物細胞は培地からのホウ素消失を直ちに感知することも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Boron is an essential micronutrient for plants. Boron deficiency is one of the major constraints in crop production worldwide. However, it remains unclear how boron deficiency causes various metabolic disorders and cell death. To understand the mechanism, we analyzed the physiological changes in cultured tobacco cells and Arabidopsis plants upon boron deprivation. We found that reactive oxygen species (ROS) accumulated in the cells deprived of boron, and oxidative damages caused by this ROS accumulation was the major and direct cause of cell death. We also found that plant cells could perceive the disappearance of boron from their external medium immediately after the deprivation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：植物栄養代謝、ホウ素、細胞壁、ペクチン、欠乏障害、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ホウ素は植物の微量必須元素の中でも欠乏が発生しやすい元素である。ホウ素の必須性が確認された1920年代以降、ホウ素欠乏による生理障害の報告は80カ国、130種類以上の作物に及んでいる。ホウ素が欠乏すると、個体レベルでは急速に成長・肥大する組織の壊死や不稔が発生し、作物生産の著しい低下

をもたらす。また細胞レベルでは膜の脱分極、呼吸低下、細胞壁の構造異常、フェノール様物質の蓄積など多様な変化が生じる。しかしホウ素の生理機能は必須性が確認された後も長く不明のままであり、欠乏による障害の発生機作も明らかではなかった。

このような状況に対し、京都大学植物栄養学研究室では植物におけるホウ素の存在形

態が研究され、植物細胞のホウ素は細胞壁に局在しペクチンのラムノガラクトナン II (RG-II) 領域と特異的に結合していることが明らかとなった。このホウ素は 1:2 型ホウ酸エステルとして 2 つの RG-II 領域を架橋し、それによりペクチンをゲル化させ細胞壁内に保持する役割を果していた。この発見に続く国内外の研究により、この B-RG-II 架橋構造が植物の正常な成長・発達に必須であることも実証された。その結果現在では、ホウ素とは多糖の高次構造形成因子であり、超分子集合体である細胞壁を構築するために不可欠との考えが広く認められるに至っている。

以上のようにホウ素は細胞壁の構築に必須なので、欠乏障害は細胞壁構造の異常を端緒に発生すると推定された。しかしホウ素が欠乏しペクチンが架橋されないとなぜ前述のように多様な生理障害が発生するのか、その具体的な因果関係は当時の知見だけでは説明できない状況であった。

2. 研究の目的

ホウ素欠乏に対する植物の応答や障害発生メカニズムを明らかにすることは、植物におけるホウ素の生理作用のより深い理解に貢献し、また作物のホウ素欠乏による生理障害発生を防止する方法の開発や栄養診断にも役立つ。そこで、ホウ素欠乏状態にさらされた植物における代謝変化や生理応答を分子・細胞レベルで解析し、ホウ素欠乏から細胞死に至る一連の過程を明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

タバコ培養細胞 BY-2 株は通常ホウ酸 90 μM を含む培地で培養されている。この細胞をナイロンメッシュ上に濾集し、ホウ素を含まない培地で洗浄した後、同じくホウ素を含まない培地に移植し培養を続けた。同じ操作をホウ素を含む通常培地で行ったものを対照とした。

シロイヌナズナについては、ホウ酸 30 μM を含む水耕液 (MGRL 培地) に浮べたスチレンボードを支持体として生育させた。この植物体を、ホウ素を含まない培地にボードごと移動させることで根を洗浄し、同じくホウ素を含まない培地に移して欠除処理とした。通常の MGRL 培地で同様の操作を行ったものを対照とした。

(2) 欠乏による障害の評価

細胞の生死を二酢酸フルオレセイン/ヨウ化プロピジウム二重染色法 (タバコ)、エバンスブルー法 (シロイヌナズナ) で判定した。

(3) 遺伝子発現解析

欠除処理/対照サンプルから抽出した RNA を用い、各種のストレス応答遺伝子の発現変化をノザンハイブリダイゼーション、RT-PCR またはマイクロアレイ法で解析した。

(4) カルシウム流入解析

カルシウムと結合して発光するタンパク質エクオリンを細胞質に発現させたタバコ培養細胞 BY-2 株を用いた。マイクロプレートウェル内に分注した細胞を数回の培地交換で洗浄した。この洗浄にはホウ素 0 または 90 μM 、カルシウム 20 μM を含む培地を用いた。この処理でカルシウムチャンネルが開いたかどうかを、外部カルシウム濃度を 3 mM に上昇させたとき、どれだけのカルシウムが流入するか (即ち、どれだけのエクオリン発光が生じるか) により評価した。

4. 研究成果

(1) ホウ素欠乏による細胞死過程の解析

タバコ培養細胞 BY-2 株をホウ素欠除処理すると処理後 24 時間ごろから死細胞が顕在化しはじめ、48 時間までに細胞の生存率は 30% まで低下した。死細胞は細胞質が凝集する特異な形態を示し、細胞壁の部分的な変形も観察された。欠除処理細胞には活性酸素および過酸化脂質が蓄積していた。脂溶性抗酸化物質であるブチルヒドロキシアニソール、トコフェロールを培地に添加すると細胞死は顕著に抑制された。これらの結果は、ホウ素欠乏で細胞死が発生すること、その細胞死の直接の原因は酸化障害であることを示す。この知見は、ホウ素欠乏細胞で観察される膜輸送活性や呼吸の低下、フェノール物質の蓄積等は欠乏の直接の効果ではなく、活性酸素の生成と蓄積による二次的な影響であることを示唆する。これによりホウ素欠乏で生じる細胞レベルの応答の大部分について、その発生機作を説明することが可能となった。

抗酸化物質を培地に投与することでホウ素欠乏による細胞死が抑制できたという結果は、内在性の抗酸化活性を高めることが低ホウ素耐性の向上につながる可能性を示唆する。今後はこの可能性を検証するため、各種抗酸化酵素の発現量を高めた形質転換植物を作成し、低ホウ素耐性を試験する予定である。

(2) ホウ素欠乏シグナル伝達機構の解析

① タバコ培養細胞を用いた解析

ホウ素欠除処理に伴うタバコ培養細胞の遺伝子発現変化を解析した。この結果、処理後 30 分以内に様々なストレス応答遺伝子の発現が上昇することを見出し、細胞は外部ホウ素の消失をごく短時間のうちに知覚し得ることを明らかにした。その際に培地からカルシウムを除去、あるいは培地にカルシウム

チャンネルブロッカー (La^{3+} または Gd^{3+}) を添加すると、ホウ素欠除処理に伴うストレス応答遺伝子の発現は著しく抑制された。このことはホウ素欠乏の知覚から遺伝子発現に至るストレスシグナルの伝達に外部カルシウムの流入が関与することを示唆する。そこで細胞質にエクオリンを発現する遺伝子組換え細胞を用いて細胞質カルシウム濃度の測定を行ったところ、ホウ素欠除処理後7分の細胞でも対照細胞に比べ約2倍のカルシウムが流入することが確認された。この欠除処理に伴うカルシウム流入は、ROS 発生装置である細胞膜 NADPH オキシダーゼの阻害剤 DPI の存在下では著しく抑制された。これらの結果は、外部ホウ素が消失すると数分以内に細胞膜カルシウムチャンネルが開くこと、またそのチャンネルの活性化には ROS が関与していることを示す。ホウ素欠除処理後数分という極めて短時間でチャンネルが開くことから、欠乏シグナルは細胞内におけるプールサイズの変化等ではなく、アポプラストで発生するより直接的な変化を介して生成・感知されると推測した。以上の知見を基に、ホウ素欠乏シグナルの生成・伝達機構に関して図1に示す作業モデルを構築した。すなわち、ホウ素欠乏によるペクチン RG-II 領域の架橋不全は細胞壁強度を低下させ、細胞体積の増加（吸水膨張）をもたらす。この際に細胞膜が伸展することで膜上の機械刺激受容型カルシウムチャンネルが開き、流入したカルシウムイオンが NADPH オキシダーゼなどの ROS 生成系を活性化する。生成した ROS や、それによりフィードバック増幅されたカルシウム流入はホウ素欠乏ストレスへの適応応答を活性化する。しかしホウ素欠乏状態そのものは解消し得ないため、継続的に生成する ROS が細胞のレドックスバランスを攪乱し、酸化障害、更には細胞死に至ると考えた。

② シロイヌナズナを用いた解析

上記のモデルを検証するため、機械刺激受容型カルシウムチャンネル、NADPH オキシダーゼ等ホウ素欠乏シグナル伝達への関与が推定される分子について、欠損変異株でホウ素欠乏応答が変化するか検討することを考えた。このような実験にはゲノム配列が既知で分子遺伝学的な実験が容易なシロイヌナズナを用いることが有効である。そこでシロイヌナズナを用いてホウ素欠乏応答を観察する実験系の構築を行った。水耕栽培したシロイヌナズナをホウ素欠除培地に移すと、1時間以内に根の伸長領域で特異的に ROS の蓄積・細胞死が観察された。このことは、ホウ素欠乏に対する感受性は伸長中の細胞で特に高いことを示す。またホウ素欠除に伴う遺伝子発現変化を RT-PCR およびマイクロアレイを用いて解析した結果、タバコ培養細胞

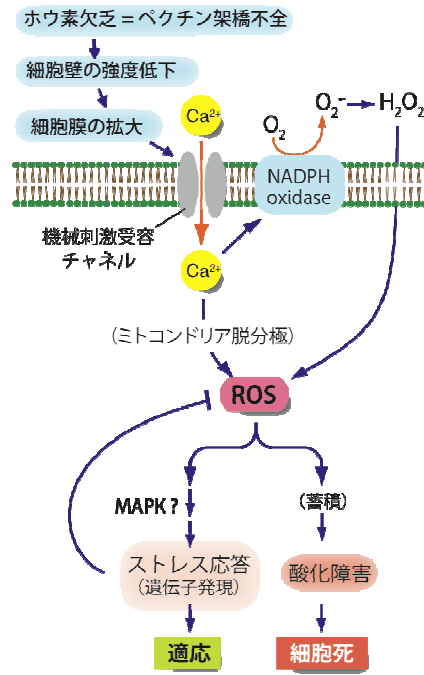


図1 ホウ素欠乏応答に関する作業仮説

と同じく1時間以内にストレス応答遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。今後、根伸長領域の細胞死およびストレス応答遺伝子の発現変化を指標として各種変異株におけるホウ素欠乏応答の解析を行い、欠乏ストレスシグナルの伝達に関わる因子の同定を進めていく予定である。

(3) まとめ

ホウ素は細胞壁構築に必要な元素である。本研究ではこの元素が欠乏すると酸化障害による細胞死が生じることを明らかにした。これはホウ素欠乏から細胞死に至る一連の過程の最終段階に相当する。一方欠乏応答の最初期段階については、外部ホウ素の消失は数分以内にカルシウムチャンネルの開きをもたらすことを明らかにした。これは、現在までに知られている中で最も速いホウ素欠乏応答である。これを含め本研究で明らかにしたホウ素欠乏初期応答をシロイヌナズナ変異株の実験系で解析することにより、今後ホウ素欠乏ストレスシグナルの生成・伝達機構が明らかになるものと期待できる。この知見はホウ素の生理機能の理解に資するのみならず、植物の生命活動における細胞壁の重要性、細胞壁と細胞質の相互作用メカニズムの解明にもつながる可能性がある。

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 3 件)

- ① Koshihara, T., Kobayashi, M., Ishihara, A., Matoh, T. (2010) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. *Plant & Cell Physiology*, **51**: 323-327. (査読有)
- ② Koshihara, T., Kobayashi, M., Matoh, T. (2009) Boron deficiency: how does the defect in cell wall damage the cells. *Plant Signaling & Behavior*, **4**: 557-558. (査読有)
- ③ Koshihara, T., Kobayashi, M., Matoh, T. (2009) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. V. Oxidative damage is the major cause of cell death induced by boron deprivation. *Plant & Cell Physiology*, **50**: 26-36. (査読有)

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① 大岩優貴、小柴太一、小林優、間藤徹「シロイヌナズナにおけるホウ素欠乏初期応答の解析」日本植物生理学会 第52回年会、2011. 3. 11 (要旨公開による年会成立日) 東北地方太平洋沖地震のため東北大学での口頭発表は中止
- ② 小西由起、小林優、間藤徹「ホウ素ラムノガラクトロナン II 複合体の機能に関する研究: 特異的構成糖 KDO の欠損株を用いた解析」日本植物生理学会 第52回年会、2011. 3. 11 (要旨公開による年会成立日) 東北地方太平洋沖地震のため東北大学での口頭発表は中止
- ③ 小林 優「細胞壁構築におけるホウ素の機能と欠乏障害」第164回 生存圏シンポジウム「リグノセルロースの超分子構造をどうやって見るか」(招待講演) 2011. 2. 17、京都大学化学研究所 (京都府宇治市)
- ④ 小柴太一、小林優、間藤徹「タバコ培養細胞 BY-2 株のホウ素欠乏に対する応答」植物細胞壁研究者ネットワーク 2010 年度定例会、2010. 11. 27、関西セミナーハウス (京都市)
- ⑤ 大岩優貴、小柴太一、小林優、間藤徹「ペクチン架橋因子ホウ素の欠乏に対するシロイヌナズナの応答の解析」植物細胞壁研究者ネットワーク 2010 年度定例会、2010. 11. 27、関西セミナーハウス (京都市)
- ⑥ 小林優、小西由起、王櫻霖、間藤徹「ホウ素ラムノガラクトロナン II 複合体の機能に関する研究: 複合体の特異的構成糖 KDO 欠損株の解析」日本土壤肥料学会 2009 年度大会、2010. 9. 9、北海道大学 (札幌市)
- ⑦ 小柴太一、小林優、間藤徹「タバコ培養細胞 BY-2 株のホウ素欠乏に対する初期応答」日本植物生理学会 2010 年度年会、2010. 3. 18、熊本大学 (熊本市)
- ⑧ 小柴太一、小林優、間藤徹「タバコ培養細胞におけるホウ素欠乏初期応答の解析」日本農芸化学会関西支部 第463回講演会、

2010. 2. 6、京大会館 (京都市)

- ⑨ 小西由起、小林優、間藤徹「ホウ素ラムノガラクトロナン II 複合体の機能に関する研究: 複合体の特異的構成糖 KDO 欠損株の解析」日本土壤肥料学会 2009 年度京都大会、2009. 9. 15、京都大学 (京都市)
- ⑩ 小柴太一、小林優、間藤徹「タバコ培養細胞 BY-2 株のホウ素欠乏に対する初期応答」日本植物生理学会 2009 年度年会、2009. 3. 22、名古屋大学 (名古屋市)
- ⑪ 小松直貴、藤田智史、深井恒太郎、高田美絵、小林優、間藤徹「タバコ細胞壁結合型キナーゼ様タンパク質のクローニングと生化学的解析」日本植物生理学会 2009 年度年会、2009. 3. 22、名古屋大学 (名古屋市)
- ⑫ 小林優、小柴太一、間藤徹「ホウ素ラムノガラクトロナン II 複合体の機能に関する研究: 特異的構成糖 KDO の欠損株を用いた検討」日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会、2008. 9. 9、名古屋市立大学 (名古屋市)
- ⑬ 小柴太一、小林優、間藤徹「タバコ培養細胞のホウ素欠乏に対する応答」日本土壤肥料学会 2008 年度愛知大会、2008. 9. 9、名古屋市立大学 (名古屋市)

〔図書〕 (計 1 件)

小林優「ホウ素」(分担執筆)「植物栄養学 第2版」間藤徹・馬建鋒・藤原徹 編、pp164-171、文永堂出版、2010

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.npk.kais.kyoto-u.ac.jp>

招待講義

Boron deficiency stress in plant cells: damages, responses, and signaling.

於 台湾國立成功大学生命科学系 (台南市) 2010.12.14

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 優 (KOBAYASHI MASARU)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 60281101

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号: