

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05767

研究課題名（和文）ホウ素欠乏による植物の障害発生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism underlying the damage to plants induced by boron deficiency

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：必須元素ホウ素の欠乏により植物細胞が障害を受ける機作を明らかにするため、液体培養したシロイヌナズナ幼植物の培地からBを除去した際の初期応答を解析した。その結果、根端伸長領域の細胞壁強度は処理後20分以内という短時間で低下することが明らかとなった。またこの処理に伴い細胞壁ペルオキシダーゼが活性化しスーパーオキシドの生成量が増加すること等、ホウ素欠乏で細胞に酸化障害が発生する機作の解明につながる知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壤に十分量のホウ素が含まれず、ホウ素欠乏が作物生産の制限要因となっている地域は世界各地に存在する。本研究では、ホウ素欠乏で細胞壁ペルオキシダーゼが活性化しスーパーオキシドが過剰生成することを示す証拠が得られた。スーパーオキシドを含む活性酸素分子種の蓄積はホウ素欠乏障害の直接の原因物質と推定される。本研究の成果はその生成機作の解明に資するものであり、ホウ素欠乏障害の回避法の開発や欠乏耐性品種の作出につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanisms by which boron (B) deficiency damages plant cells, the early responses of liquid-cultured Arabidopsis seedlings against deprivation of B were analyzed. The results showed that the cell wall strength of the root elongation zone was decreased as early as 20 minutes after B deprivation. The results also suggested that the treatment activated cell wall peroxidase to enhance superoxide production. These findings give insights into how boron deficiency causes oxidative damage to the cells.

研究分野：植物栄養学

キーワード：植物 ホウ素欠乏 栄養ストレス 細胞壁 ペクチン ペルオキシダーゼ 活性酸素分子種

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ホウ素は植物の必須元素の一つであるが、植物の健全な生育に必要な量のホウ素を供給できない土壌は世界中に広く分布し、作物においてもホウ素欠乏症がしばしば発生する¹⁾。ホウ素欠乏は成長点の壊死や不稔をもたらす、作物の収量や品質を著しく低下させる。これら作物のホウ素欠乏障害の発生回避法の開発や欠乏耐性品種の選抜・作出のためには、そもそも植物のホウ素欠乏障害がいかなる機作で発生するか理解することが重要である。

ホウ素が植物体内で果たす役割の解明は過去数十年間で大きく進展し、ホウ素は細胞壁ペクチンを特定の領域 (RG-II 領域) で分子間架橋しゲル化させる因子として、細胞壁構造の安定化に寄与することが明らかにされている (Fig. 1)^{2,3)}。この知見からは、ホウ素欠乏による障害はペクチンの架橋不全による細胞壁構造の不安定化を端緒に発生することが示唆される。しかし実際には、細胞壁の構造不安定化と栽培現場で観察されるホウ素欠乏症状の因果関係を具体的に説明する知見は乏しく、結果として植物のホウ素欠乏障害の発生機構は殆ど理解されていない状況であった。

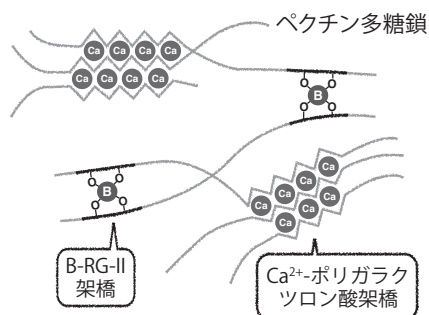


Figure 1: ホウ素は細胞壁ペクチンを架橋する

ホウ素 (B) はホウ酸エステルとしてペクチンのラムノガラクトuron II (RG-II) 領域を共有結合で架橋する (B-RG-II 架橋)。一方カルシウムはポリガラクトuron酸領域を静電相互作用で架橋する。ペクチンはこれらの架橋を通じてゲル化し、細胞壁の骨格であるセルロース繊維間を充填して細胞壁構造を安定化する。

2. 研究の目的

我々は以前の研究で、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L.) をホウ素不含培地に移植すると 1 時間以内に根端伸長領域に活性酸素分子種 (ROS) が蓄積し、酸化障害による細胞死が発生することを明らかにしている (Figure 2)⁴⁾。またホウ素欠乏に陥った作物ではしばしば組織の褐変や壊死が観察されるが、これらも酸化障害を反映したものである可能性が高い。更に、ホウ素欠乏によるタバコ培養細胞の細胞死は、培地への抗酸化剤の添加により軽減される⁵⁾。これらの知見から我々は、ホウ素欠乏による障害の直接的な要因は ROS 蓄積による酸化障害と推定した。この場合、ROS がホウ素欠乏条件下でなぜ・どのような機構で過剰生成・蓄積するのか明らかにすることが、ホウ素欠乏による障害発生機作を理解するための鍵となる。そこでここでは、(1)ホウ素欠除処理時の ROS 生成に関与する分子の同定、(2)細胞壁の不安定化と ROS 生成の関連について明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

無菌液体培養したシロイヌナズナの培地にホウ酸キレーター (アゾメチン H) を添加し、培地中のホウ素を不可給態化することでホウ素欠除処理を行った⁶⁾。処理に伴う ROS (スーパーオキシド) 生成はジヒドロエチジウム染色、細胞死はヨウ化プロピジウム染色により検出し、蛍光顕微鏡で撮影した画像におけるシグナル強度を画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて数値化することによって応答を定量的に評価した。ROS 生成に関与すると予想される酵素の変異株と野生型株 (Col-0) における応答の比較、また各種阻害剤の効果を検討することで、ホウ素欠除処理に応答して ROS が生成する機構について推定した。細胞壁の強度変化は走査型プローブ顕微鏡を用いるナノインデンテーション法で解析した。

4. 研究成果

(1) ホウ素欠除処理に伴う ROS 生成に関与する分子の同定

本研究に先立つ研究で、ホウ素欠除処理に伴ってシロイヌナズナの根端に蓄積する ROS はスーパーオキシドであることを確認していた。また細胞壁ペルオキシダーゼ (PER) の欠損変異株で

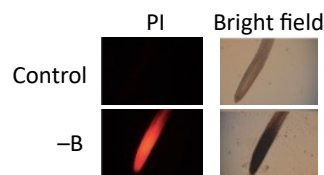


Figure 2: ホウ素欠乏によるシロイヌナズナ根端伸長領域の細胞死

無菌液体培養したシロイヌナズナ幼植物 (8 日齢) の培地にホウ酸キレーターであるアゾメチンを添加するホウ素 (B) 欠除処理を行った。1 時間以内に根の伸長領域が細胞死を呈しヨウ化プロピジウムで染色されるようになる

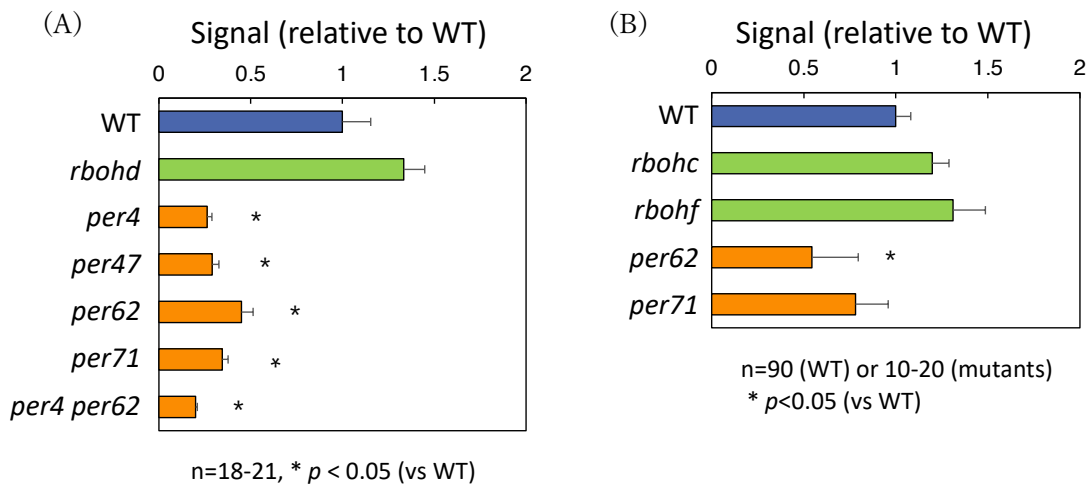


Figure 3 各種変異株におけるホウ素欠除処理誘導細胞死または ROS 蓄積
細胞膜 NADPH オキシダーゼ (アイソフォーム C あるいは D) の変異株 (*rbohC*、*rbohD*)、ペルオキシダーゼ変異株 (*per4*、*47*、*62*、*71*、二重変異株 *per4 per62*) を Figure 2 と同様にホウ素欠除処理し、細胞死を検出するヨウ化プロピジウム (A) あるいはスーパーオキシドを検出するジヒドロエチジウム (B) で染色し、蛍光強度を ImageJ で数値化した。値は野生型株 (WT) における蛍光強度に対する相対値で表示した。* は Student の t 検定で WT と有意差があったことを示す。Bar=mean ± SE。

は野生型株に比べホウ素欠除処理時のスーパーオキシド蓄積量が低下することから、細胞壁 PER がこの際のスーパーオキシド生成に関与していることを推定していた。本研究ではこの関与について引き続き検証するとともに、シロイヌナズナに多数存在する細胞壁 PER アイソフォームのいずれが応答に関与するのか絞り込むことを試みた。その結果、少なくとも PER4、47、62 および 71 の欠損変異株では、スーパーオキシドの蓄積、またはその結果生じる細胞死が野生型株より抑制される (Fig. 3) ことを確認し、これらの細胞壁 PER がホウ素欠除に伴う ROS 生成に関与している可能性が示された。

PER の関与について更に検証するため、ホウ素欠除処理した幼植物の PER 活性を測定した。その結果、可溶性画分において対照植物より高い PER 活性が検出され (Fig. 4)、細胞壁に強く結合していない PER が ROS 生成に関与していることが示唆された。また同画分をゲル電気泳動で分画し PER 活性染色を行うと、一部のバンドについてホウ素欠除処理植物でより強いシグナルが検出され (Fig. 5)、特定の PER について活性が亢進していることが裏付けられた。

以上の結果から、ホウ素欠除処理に伴う ROS の蓄積は、特定の細胞壁ペルオキシダーゼの活性が上昇し、スーパーオキシドが過剰生産されることに起因すると推定した。

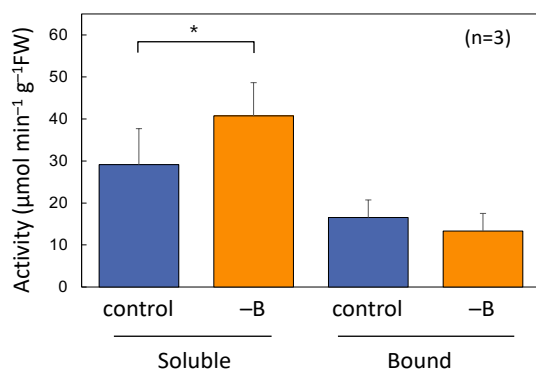


Figure 4 ホウ素欠除処理に伴う PER 活性の変化

野生型株幼植物をホウ素欠除処理したのちに緩衝液中で磨砕し、遠心して得られる上清画分 (soluble) および沈殿画分 (bound) について PER 活性を測定した。活性は、生成するスーパーオキシドがアドレナリンを酸化して有色のアドレノクロムに変化させることを利用し、スーパーオキシド生成活性として評価した。* : p < 0.05 (Student の t 検定)、Bar=mean ± SD。

(2) ホウ素欠除処理に伴う細胞壁の強度変化と ROS 生成の関連に関する検討

本研究では、ホウ素欠除に対する植物の迅速な応答は、ペクチンがホウ素により正常に架橋されないことによる細胞壁の強度低下を端緒に開始されると想定している。ホウ素欠除処理で実際に細胞壁の強度が低下することは本研究に先立つ研究で既に確認されていた。一方、その細胞壁の強度低下が ROS 生成の上流にある事象かどうかは、未だ検証が必要な状況であった。そこで、まず細胞壁の強度低下が、一連の応答の最上流と考えて矛盾しないほど短時間に起こるか検討した。細胞壁強度を走査型プローブ顕微鏡で観察するための試料調製には一定の時間がかか

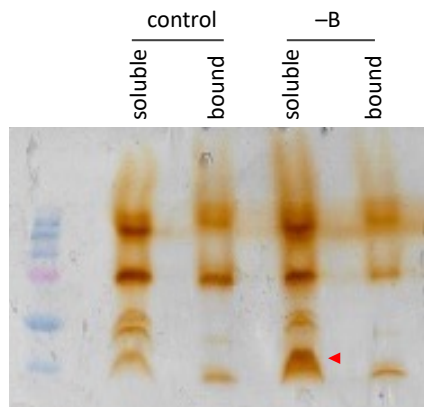


Figure 5 ホウ素欠除処理による PER 活性の変化 (2)

Figure 4 と同様にして得られる上清画分 (soluble) および沈殿画分 (bound) を電気泳動し、グアヤコール酸化活性によるゲル内活性染色を行った。赤色矢じりで示すバンドが、対照と比較してホウ素欠除処理を行った植物においてより強く検出された。

るため、今回の検討は最速で処理後 20 分の時点であったが、その時点ではすでに細胞壁の剛性 (ヤング率) は対照植物より有意に低下していた。このことからホウ素欠除処理による細胞壁の強度低下はごく短時間で生じ得ることが確認された。

続いて、PER の欠失変異株 (*per62*) について、ホウ素欠除処理に伴う細胞壁の強度低下に野生型株と差が見られるか検討した。前述のように *per62* 株ではホウ素欠除処理に伴う ROS 蓄積が低下する。しかし *per62* 株においてもホウ素欠除処理に伴って根端伸長領域の細胞壁強度は有意に低下し、その程度は野生型株と差がなかった。このことから、細胞壁の強度低下は ROS 生成の結果として起こる事象ではないと考えられ、細胞壁強度の低下が一連の応答の起点であるとの推定と矛盾しない結果が得られた。

(3) まとめ

本研究における一連の解析を通じて、ホウ素欠乏状態に陥った植物ではペクチンの架橋不全が細胞壁強度の低下を招き、それに伴って特定の細胞壁 PER が活性化されスーパーオキシドが過剰生成することで酸化障害に至ることが示唆された。直接の傷害因子である ROS を過剰生成する分子が PER と同定されたことで、今後、その活性が促進される機構の解明などを通じ、ホウ素欠乏が植物細胞に及ぼす影響が更に詳細に明らかになる可能性が高い。細胞壁 PER の活性は pH に影響されることが知られている。ホウ素欠除処理による細胞壁の不安定化は、感染応答などにおいても見られるアポプラスト pH の上昇を引き起こし、PER 活性を促進するのかもしれない。これらの点について更に解析を継続することで、ホウ素欠乏に対する植物の応答に関する理解が進展するとともに、欠乏による障害の発生を抑制する方法の開発につながることを期待される。

<引用文献>

- 1) Shorrocks VM (1997) *Plant Soil* **193**: 121-148
- 2) Kobayashi M et al. (1996) *Plant Physiol.* **110**: 1017-1020
- 3) Kobayashi M et al. (1999) *Plant Physiol.* **119**: 199-204
- 4) Oiwa Y et al. (2013) *Soil. Sci. Plant Nutr.* **59**: 621-627
- 5) Koshiha T et al. (2009) *Plant Cell Physiol.* **50**: 26-36
- 6) Kobayashi M et al. (2017) *Soil. Sci. Plant Nutr.* **64**: 106-115

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鹿内 勇佑、小林 優、神谷 岳洋	4. 巻 60
2. 論文標題 植物におけるカルシウムの機能 欠乏症と耐性機構の分子メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 651-658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.60.651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小林 優	4. 巻 92
2. 論文標題 6. 植物におけるカルシウムの吸収と輸送	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 114 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20710/dojo.92.2_114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木駿, 清水寿朗, 小林優
2. 発表標題 D-アラビノース-5-リン酸合成酵素発現抑制がシロイヌナズナにもたらす影響
3. 学会等名 細胞壁研究者ネットワーク第13回定例研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅木大輔, 澤田茉莉, 小林優
2. 発表標題 ホウ素欠除処理に伴うシロイヌナズナ根端細胞壁の強度変化
3. 学会等名 日本土壌肥科学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田茉莉, 梅木大輔, 小林優
2. 発表標題 シロイヌナズナ根のホウ素欠乏初期応答機構の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Umeki, Mako Sawada, Masaru Kobayashi
2. 発表標題 Mechanism of early responses to boron deprivation in Arabidopsis roots
3. 学会等名 The 7th International Conference on Plant Cell Wall Biology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木駿、清水寿朗、伊福健太郎、間藤徹、小林優
2. 発表標題 KDO合成の抑制がシロイヌナズナに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林優
2. 発表標題 一次細胞壁の超分子構造形成におけるミネラルの役割
3. 学会等名 第14回 木質科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤田茉莉、梅木大輔、伊福健太郎、小林優
2. 発表標題 ホウ素欠除処理に伴う活性酸素生成に関するシロイヌナズナタンパク質の同定
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 米山 忠克、長谷川 功、関本 均	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 232
3. 書名 新植物栄養・肥料学 改訂版	

〔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
---------	---------