

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688005

研究課題名(和文)植物細胞壁ペクチン質多糖のホウ酸による架橋に必要な分子の同定

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for borate crosslinking of pectic polysaccharides in plant cell walls

研究代表者

三輪 京子(Miwa, Kyoko)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：50570587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,800,000円、(間接経費) 6,240,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素は植物の必須元素であり、その欠乏は植物生産に重大な影響を与える。ホウ酸は植物細胞壁の特定の多糖間を架橋する成分として必要であることが知られているが、細胞壁でホウ酸が架橋を形成する分子レベルでのしくみは不明であった。本研究では、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、ホウ素欠乏条件においてホウ素を細胞壁に効率的に供給する輸送体分子の同定を始め、ホウ素が細胞壁で架橋をつくるための反応に関連する分子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Boron is one of essential elements for plants and boron deficiency reduces plant productivity. It has been already established that one major physiological role of boron is borate crosslinking of the specific polysaccharides in cell walls. However, molecular mechanisms underlying formation of this borate crosslinking in cell walls remains unknown. In the present study, molecules related to borate crosslinking of cell walls were identified in Arabidopsis, including a boron transporter which preferentially transports boron for efficient formation of borate cross-linked cell walls under low boron conditions.

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養・土壌学

キーワード：シロイヌナズナ ホウ素 植物細胞壁 ペクチン 変異株 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ホウ素 (B) は植物の微量必須元素のひとつであり、ホウ素欠乏は若い組織の生育抑制や不稔を引き起こす。作物でのホウ素欠乏症による品質や収量の低下は日本を含む 80 カ国以上で報告され、ホウ素欠乏耐性品種やホウ素栄養診断法の開発が望まれている。

植物体におけるホウ素の主な役割は細胞壁を構成することである。ホウ素は優先的に細胞壁に分配され、細胞壁を構成するペクチン質多糖のうちラムノガラクトン II (RG-II) とよばれる特定の分子間の 90% 以上にホウ酸エステルを形成している。RG-II はガラクトン酸が連なったペクチン主鎖に対して 4 種類の側鎖 (A-D) が連結した複雑な多糖構造である。このホウ酸による RG-II 架橋がペクチン質多糖のネットワークを形成し、セルロース繊維間の接着に必須であると考えられている。

これまで RG-II 合成酵素として、単糖合成酵素や糖転移酵素の機能解析の報告がされているが、合成過程の全体像は明らかではない。また、RG-II とホウ酸の反応については、反応の細胞内部位や関与する分子は不明であり、その反応の分子機構は全く未解明であった。

植物は生育に必須なホウ素を、ホウ酸 B(OH)₃ の形態で土壌から吸収して利用している。ホウ酸は無電荷であるため脂質膜を通過しやすく、蒸散流に従って受動吸収され分配される。ただし、土壌中のホウ酸濃度が低い環境では、タンパク質を介した効率的な輸送機構の存在がシロイヌナズナで明らかにされている。即ち、ホウ酸チャネル NIP5;1 が土壌から根の細胞へのホウ酸の取り込みを促進し、排出型輸送体 BOR1 が導管に排出する。植物体個体としての土壌から根・葉へのホウ酸の輸送機構は解明されつつあるものの、体内に取り込まれたホウ酸が優先的に細胞壁に分配されて利用されるしくみは不明であった。

2. 研究の目的

ペクチン質多糖 RG-II のホウ酸による架橋形成の分子機構を解明するため、ホウ酸による RG-II 架橋を制御する分子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホウ酸による RG-II 架橋を促進する分子の存在の検証

ホウ酸と RG-II 架橋反応を促進する分子 (酵素) の存在を生化学的に検証するため、単離した RG-II を用いた試験管内での架橋形成の再構成実験を行い、細胞抽出液の有無での架橋形成の違いを検討した。さらに、糖鎖結合ビーズを用いた RG-II 結合タンパク質の探索を行った。

(2) ホウ素栄養特性が変化したシロイヌナズ

ナの単離と解析

高ホウ素要求性シロイヌナズナ変異株の単離と原因遺伝子の解析

低濃度でのホウ酸存在下において RG-II との架橋反応を促進する分子の存在を想定すると、この分子の機能が低下した場合、通常の細胞内のホウ酸濃度では RG-II の架橋がうまく起きないと予想される。一方、過剰のホウ酸を加えた条件では反応基質が過剰となり、ある程度 RG-II の架橋が回復すると考えられる。そこで、ホウ素通常条件では生育抑制を示すが、過剰ホウ素によって生育が回復する「高ホウ素要求性シロイヌナズナ変異株」を単離し、原因遺伝子の解析を行った。

ホウ素輸送体 BOR2 の RG-II 架橋における機能解析

シロイヌナズナ存在するホウ酸輸送体 BOR1 と最も相同性の高い BOR2 を対象として、遺伝子破壊株を用いて、根でのホウ酸 RG-II 架橋における機能解析を行った。

低ホウ素馴化細胞の作出と解析

ホウ酸による RG-II 架橋の低下が与える影響を細胞レベルで明らかにするため、シロイヌナズナ MM2d 培養細胞を用いて低ホウ素馴化細胞を作出し、特性解析を行った。

4. 研究成果

(1) ホウ酸による RG-II 架橋を促進する分子の存在の検証

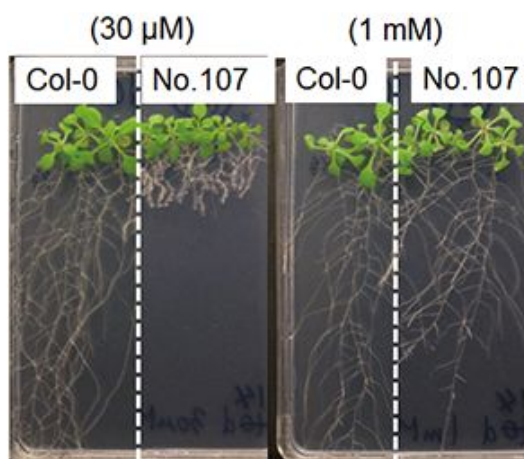
シロイヌナズナ培養細胞から抽出した細胞抽出液の添加によって、試験管内における RG-II 架橋形成率が上昇するかを検討したところ、上昇が観察された実験回もあり、架橋形成を促進する因子の存在が推察された。しかしながら、差が認められない実験回もあり、再構成率の値が実験によって大きく異なるなど結果の再現性が乏しいという課題が見出された。さらに、糖鎖結合ビーズを用いて RG-II 結合タンパク質の探索をした。ビーズへの RG-II の結合の有無によってビーズに吸着するタンパク質のパターンが異なることが明らかとなり、RG-II と相互作用するタンパク質の存在が示唆された。

(2) ホウ素栄養特性が変化したシロイヌナズナの単離と解析

高ホウ素要求性シロイヌナズナ変異株の単離と原因遺伝子の解析

シロイヌナズナ野生型株 Col-0 に対して EMS 塩基置換誘発を行い、M2 種子を獲得した。ロゼット葉の展開を指標として 14,000 株の M2 から 26 株、根の伸長を指標として 18,000 株の M2 から 5 株の高ホウ素要求性変異株を単離した。原因遺伝子を同定するため Ler 株との交配による遺伝子マッピングと次世代シーケンサーによるゲノム配列解析を行った。各変異株において糖転移酵素や糖加水分解酵素、ウリジン合成酵素をコードすると予

想される遺伝子に原因の変異がそれぞれ見出された。これらの変異株の解析より、RG-II合成やハウ酸とRG-IIの架橋に關与する可能性の高い新規遺伝子の同定に成功した。さらに、ストレス応答の遺伝子発現誘導を抑制する因子群やその他、アミノ酸代謝に關連する酵素をコードする遺伝子の変異を原因とする変異株が含まれ、ハウ酸が細胞壁とは異なる新規の生理作用をもつ可能性が見出された。



図：根を指標とした高ホウ素要求性変異株例高ホウ素要求性変異株(No.107)では野生型株 Col-0 と比較して、ホウ素通常条件(培地ホウ素濃度 30 μM)では根の伸長が顕著に抑制されるが、高濃度のホウ素存在下(1 mM)では伸長抑制が緩和された。

ホウ素輸送体 BOR2 の RG-II 架橋における機能解析

シロイヌナズナホウ素輸送体 BOR2 が低ホウ素条件下の根での RG-II 架橋に必須な分子であることを明らかにした。BOR2 機能欠損株では低ホウ素条件下において、根の全ホウ素濃度には違いがないのに対し、RG-II の架橋率が低下しており、BOR2 がハウ酸を RG-II へ優先的に分配する働きをもつことが示唆された。この結果より、低ホウ素条件下で細胞壁に利用されるハウ酸が輸送タンパク質を介して積極的に分配されるしくみが明らかとなった。さらに、BOR2 は細胞膜および分泌小胞に局在しており、RG-II 架橋が細胞外(アポプラスト)ではなく、分泌小胞内で起こる可能性が示された。

低ホウ素馴化細胞の作出と解析

シロイヌナズナ培養細胞 MM2d の培地ホウ素濃度を段階的に低下させ、野生型株が増殖できない低ホウ素濃度においても増殖が維持される馴化細胞を獲得した。馴化細胞は RG-II の架橋率が低下しており、マイクロアレイ解析を行ったところ、様々な細胞壁關連遺伝子の発現量が変化していることを見出した。これらの結果より、ハウ酸による RG-II 架橋が低下したときに引き起こされる変化を細胞レベルで明らかにした。

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 4 件)

1. Miwa, K., Aibara, I., Fujiwara T. (2014). "Arabidopsis thaliana BOR4 is upregulated under high boron conditions and confers tolerance to high boron." Soil Science and Plant Nutrition (in press) (査読有)
2. Miwa, K., Wakuta, S., Takada, S., Ide, K., Takano, J., Naito, S., Omori, H., Matsunaga, T., Fujiwara, T. (2013). "Roles of BOR2, an efflux-type boron transporter, in crosslinking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in Arabidopsis thaliana." Plant Physiology 163, 4, 1699-1709. (査読有)
3. Miwa, K., Fujiwara, T. (2011). "Role of overexpressed BOR4, a boron exporter, in tolerance to high level of boron in shoots." Soil Science and Plant Nutrition 57, 558-565. (査読有)
4. Miwa, K., Fujiwara, T. (2010). "Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters." Annals of Botany 105, 1103-1108. (査読有)

[学会発表](計 14 件)

1. 船川寛矢、三輪京子「ラムノガラクトナン II のハウ酸架橋形成が低下したシロイヌナズナ変異株の探索」第 55 回日本植物生理学会年会、富山大学(富山市)、2014 年 3 月 18 日
2. Miwa, K. "Generation of nutrient-stress tolerant plants ~ through identification of novel genes to improve nutrient efficiency in Arabidopsis thaliana~" Joint Symposium on Environmental Science 2013 - Bridging Finland and Japan -, ヘルシンキ大学(フィンランド), 27 Nov 2013
3. Miwa, K. "Formation of pectic networks by borate - identification of novel genes to regulate boron demand and supply for plant cell walls." International Symposium on Cell Wall Integrity, 東京大学(東京都), 30 Oct 2013
4. 三輪京子「トランスポーターを用いた栄養欠乏および過剰耐性植物の作出」日本土壌肥料学会 2013 年度名古屋大会、名古屋大学(名古屋市) 2013 年 9 月 11 日
5. Chiba, M., Miwa, K. "Identification of a low-boron tolerant accession N13 in Arabidopsis thaliana." International

- Workshop on Plant Membrane BiologyXVI, 倉敷芸文館(倉敷市), 26-31 Mar 2013
6. Miwa, K. "5'UTR mediates boron-dependent translation of boron transporter in *Arabidopsis thaliana*" International Workshop for Plant Response to Mineral Stress, 北海道大学(札幌市), 7 Dec 2012
 7. 千葉美恵、平井優美、三輪京子「シロイヌナズナ低ホウ素馴化細胞の解析」平成24年度日本農芸化学会、京都女子大学(京都市) 2012年3月23日-25日
 8. 三輪京子「ミネラル輸送体分子から見た、植物の栄養環境への応答」第31回北海道若手生態学研究会、北海道大学(札幌市) 2012年2月25日
 9. Hirai, T., Aibara, I., Miwa, K. "Boron-dependent translation of a boron transporter and generation of plants tolerant to high boron stress." Japan-Australia Symposium on Plant Sciences For Agriculture, 北海道大学(札幌市), 20 Jan 2012
 10. 三輪京子「植物のホウ酸輸送体の機能分化と栄養ストレス耐性植物の作出」日本農芸化学会北海道支部会、北海道大学(札幌市) 2011年11月4日
 11. Miwa, K. "BOR2, a boron exporter, is required for efficient dimerization of rhamnogalacturonan-II under B limitation in *Arabidopsis thaliana*." Fourth Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall, 淡路夢舞台(兵庫県), Japan, 3 Oct 2011
 12. 三輪京子「植物のホウ酸輸送体の細胞内極性とストレス耐性植物の作出」日本バイオイメージング学会第20回大会、千歳科学技術大学(千歳市) 2011年9月1日
 13. Miwa, K. "Roles of 5' UTR in B-dependent translation of boron transporter in *Arabidopsis thaliana*." The third Japan-China Plant Nutrition Workshop, 倉敷芸文館(倉敷市), 28 Mar 2011
 14. Miwa, K., Fujiwara, T. "Distinct functions of BOR1 family in boron transport in *A. thaliana*." 21st International Conference on Arabidopsis Research, パシフィコ横浜(横浜市), 7 June, 2010

〔図書〕(計 3件)

1. 三輪京子(2011)「第5章6 ミネラル輸送系強化による不良栄養土壌環境でのバイオマス生産」植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術 - 地球を救う超環境適応・自然調和型システム - P.255-261、シーエムシー出版
2. 藤原徹、三輪京子(2011)「第13章 食

- 品生産におけるトランスポーター」栄養・食品機能とトランスポーター P.265-285、建帛社
3. Miwa, K., Tanaka, M., Kamiya, T., Fujiwara, T. (2010) "Molecular mechanisms of boron transport in plants: involvement of Arabidopsis NIP5;1 and NIP6;1." MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids, Advances in Experimental Medicine and Biology 679, 83-96. Landes Bioscience Publishers.

〔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
<http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/miwalab/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
三輪 京子(MIWA KYOKO)
北海道大学・創成研究機構・特任助教
研究者番号：50570587

(2)研究分担者

(3)連携研究者