

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580090

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) Analyses of plant responses to boron deprivation

研究代表者

小林 優 (Kobayashi, Masaru)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60281101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

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。そこで植物(シロイヌナズナ)のホウ素欠乏応答を詳細に解析した結果、根の先端部の急速に伸長する細胞では、ホウ素を培地から除去して1時間以内に活性酸素が蓄積し細胞死に至ることが明らかとなった。カルシウムの欠乏でも同様の応答が生じる。これらの急速な応答は細胞の成長に伴い新たに合成される細胞壁多糖ペクチンがホウ素またはカルシウムで架橋されないことで生じることが示唆され、ペクチン架橋の生理的重要性が示された。

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 Arabidopsis plants induced upon boron deprivation. The cells in root elongation zone overaccumulated reactive oxygen species and died within 1 h after boron deprivation. Similar responses could be observed under calcium deprivation. Analyses suggested that the immediate responses were triggered by a failure in cross-linking the cell wall pectic polysaccharides which were newly synthesized in elongating cells.

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：植物栄養学・土壌学

キーワード：植物 ホウ素 欠乏ストレス 細胞壁 ペクチン シグナル伝達 無機栄養 カルシウム

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。潜在的なホウ素欠乏土壌は世界各地に広く分布し、植物におけ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は 80 カ国・130 種類以上の作物で報告されている。ホウ素が欠乏すると個体レベルでは新葉の展開阻害、肥大組織の壊死や不稔、細胞レベルでは膜輸送活性の低下、呼吸低下やフェノール性物質の蓄積など多様な障害が発生する。我々は以前の研究で、植物細胞中のホウ素は細胞壁ペクチンのラムノガラクトuronan II (RG-II) 領域に特異的に結合していることを発見した。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していた。すなわちホウ素は多糖の高次構造形成因子であり、細胞壁超分子構造の構築に寄与する。我々の発見に続く国内外の研究により、この B-RG-II 二量体構造 (B-RG-II) は植物の正常な生育・発達に不可欠であることが実証され、現在では、ホウ素は細胞壁超分子構造の構築に必要な元素であるとの考えが広く認められるに至っている。

一方、欠乏障害の発生機作に関する理解はホウ素の機能が解明されて以降もほとんど進展していなかった。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る。しかしホウ素が欠乏しペクチンが架橋されないとなぜ個体や細胞に前述のごとく多様な障害が発生するのか、その具体的な機作は不明であった。このような状況において、我々はまずタバコ培養細胞に対するホウ素欠乏の影響を解析し、ホウ素欠乏は酸化障害を原因とする細胞死をもたらすことを明らかにしてきた。この知見は、ホウ素欠乏で生じる広範な細胞応答や機能障害は、酸化障害による膜損傷や抗酸化応答を反映したものであることを示唆する。したがって、ホウ素欠乏障害の発生機作を理解するためには、より初期の応答、すなわちホウ素欠乏に際してなぜ・どのように酸化障害が発生するかを明らかにする必要がある。この機作を解明するには欠乏の初期応答を分子レベルで解析することが重要である。そこで我々は、各種変異体を含めた研究リソースの作出・利用が容易なシロイヌナズナを用いた解析を進めることが有用と考え、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

植物のホウ素欠乏感知機構や、欠乏による生理障害・細胞死の発生機作の解明は、植物におけるホウ素の生理機能のより深い理解に寄与すると同時に、作物のホウ素欠乏障害の発生防止法、栄養診断法の開発にも役立つ。そこで、ホウ素欠乏状態にさらされたシロイヌナズナ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

水耕栽培したシロイヌナズナをホウ素欠除培地に移植した際に生じる初期応答を解析した。特に、その応答過程にいかなる分子が関与しているかに着目し解析を進めた。

またホウ素の機能形態である B-RG-II 複合体の *in vivo* 動態や安定性を解析する手段を開発するため、B-RG-II を特異的に認識する抗体の作成を試みた。

4. 研究成果

(1) ホウ素欠乏応答を仲介する分子の探索

シロイヌナズナをホウ素欠除培地に移植すると、1 時間以内に根の伸長領域で特異的に活性酸素分子種 (ROS) が蓄積し細胞死が発生する。このように迅速な応答がいかなる機作で生じるのか解析した。ホウ素はペクチンの架橋因子であるから、その欠乏による障害はペクチンの架橋形成の不全を通じて起こると推定される。この推定が正しければ、ホウ素と同じくペクチンの架橋因子であるカルシウムの欠乏でも類似の応答が生じる筈である。そこで水耕栽培シロイヌナズナをカルシウム欠除培地に移植し初期応答を観察した結果、ホウ素欠除の場合と同様に、1 時間以内に根の伸長領域で ROS 蓄積と細胞死が発生した。ペクチンの架橋に関与しないカリウム、マグネシウムの欠除では、このような応答は見られなかった。このことは、根伸長領域の迅速な ROS 蓄積と細胞死はどの栄養元素の欠乏でも生じる一般的な応答ではなく、ホウ素あるいはカルシウムが不足しペクチンの架橋が正常に形成されない場合に起こる現象であることを示唆する。またその応答は伸長領域すなわち新規細胞壁の合成が盛んな部位に限定されることから、既存のペクチン架橋の崩壊ではなく、新規に合成・分泌されたペクチンが架橋されないことが応答のトリガーであると結論した。ここで見出した結果は、ホウ素あるいはカルシウムの必須性を示すのみならず、細胞壁ペクチンが正常にゲル化することが植物にとって生理的にいかに重要であるかを具体的に示した例といえる。

ホウ素あるいはカルシウム欠除による根伸長領域の ROS 蓄積・細胞死は、エチレン受容体の阻害剤である銀イオンにより軽減された。この結果から、ホウ素・カルシウム欠乏ストレスシグナルの伝達において、ROS 生成の上流でエチレンが作用していることが示唆された。

ホウ素欠除処理した植物では 1 時間以内にストレス応答遺伝子の発現が誘導される。このとき、ホウ素欠除・カルシウム欠除で共通して発現誘導される遺伝子があれば、それは

両元素の欠除に共通の効果、すなわちペクチンの架橋不全に应答する遺伝子の可能性がある。そのような遺伝子を同定するため、まずカルシウム欠除应答遺伝子をマイクロアレイ解析および定量逆転写 PCR 解析で同定し、次いでその中からホウ素欠除でも誘導されるものを定量逆転写 PCR で探索した。その結果、少なくとも At1g22810 (エチレン関連転写調節因子)、At3g16120 (ダイニン軽鎖)、At4g33467 (機能未知タンパク質) の 3 遺伝子がホウ素・カルシウム欠除で共通して誘導されることを見出した。これらの遺伝子が実際にペクチンゲルの構造不全に应答して誘導されるかは今後の検討課題である。欠除処理時における At3g16120、At4g33467 の発現はエチレン受容体の阻害剤である銀イオンにより抑制された。このことは、エチレン関連転写調節因子である At1g22810 が誘導されることと併せ、ホウ素・カルシウム欠除应答のシグナル伝達にエチレンが関与するとの上記の推測を支持する。

急速な ROS 生成と細胞死の発生という応答は、植物細胞に病原菌が感染した際の過敏反応と類似している。植物病原菌は細胞壁を破壊し細胞内に侵入するので、細胞壁ペクチンゲルの構造異常をもたらすホウ素・カルシウム欠乏と感染は、共通のストレス応答を誘導する可能性もあると考えた。この仮説を検証するために、感染应答に際して発現が上昇することが知られている約 30 の遺伝子について、ホウ素・カルシウム欠除でも発現誘導されるか、定量逆転写 PCR により解析した。しかし検討した遺伝子についてはいずれもホウ素・カルシウム欠除による有意な発現変化は見られず、これら元素の欠乏应答と感染应答の類似性を実証することはできなかった。

(2) 抗 B-RG-II 抗体の作成と解析

B-RG-II の安定性については細胞壁から切り出された状態での解析は行われているものの、生理的条件、すなわち巨大分子ペクチンの部分領域として細胞壁に存在している状態での安定性は検討されてこなかった。またホウ素 (ホウ酸) による RG-II 領域の架橋が細胞内のどこで、いつ形成されるかも明らかにされていない。これらを解析するには B-RG-II を認識する特異抗体を用いた免疫組織化学が有用と考えられる。そこで RG-II に対する抗体、特にホウ素と結合した B-RG-II と、架橋されていない単量体 RG-II を区別できる抗体をファージディスプレイ法で作成することを試みた。

ファージディスプレイ法は、ランダムペプチドライブラリーをファージに発現・表面提示させ、そのファージ集団の中から固相表面に固定化した抗原と結合するクローンを選択する手法である。このためには抗原となる物質を何らかの固相表面に固定化する必要があるが、ここで抗原とする B-RG-II は比較

的低分子かつ親水性の物質であり、タンパク質のようにポリスチレンとの疎水性相互作用による物理吸着ではほとんど保持されない。そこでまず B-RG-II を固相化する方法について検討した結果、a) 共有結合を介したポリリジンとのコンジュゲートを作成し、ポリスチレン表面に物理吸着させる方法、b) 分子内のカルボキシル基を利用し、アミノ基で表面修飾したポリスチレン表面にカルボジイミドカップリングする方法、の 2 つの方法を確立した。そしてこれらの方法で B-RG-II を固定化したポリスチレンプレートを用いて B-RG-II に結合するファージのスクリーニング (バイオパニング) を行ったが、陽性クローンを得ることはできなかった。ここで用いたファージは正電荷を有する表面に非特異的に結合する傾向があり、使用した固相の正電荷 (ポリリジン由来、あるいは修飾プレートのアミノ基由来) によるバックグラウンドにより特異的結合クローンの選択が妨げられた可能性が考えられる。また、ファージに抗原提示させたペプチド長 (7mer) では安定な立体構造を取ることができず、十分なタイターを有するクローンが取得できなかったのかもしれない。

以上のようにファージディスプレイ法で B-RG-II を認識する抗体を取得することはできなかったが、開発した抗原固相化法を用いて B-RG-II を ELISA アッセイプレートに固定化することで、従来困難であった抗 RG-II 抗体の定量的キャラクタリゼーションが可能となった。B-RG-II を認識するウサギポリクローナル抗体は本研究室ですでに得られていたので、この抗体の特異性を競合 ELISA 法で検討した。その結果、この抗体はペクチンを構成する RG-II 以外の部分領域、すなわちラムノガラクトツロナン I やポリガラクトツロン酸には反応せず、十分な特異性を有した抗体であることが確認された。また B-RG-II、単量体 RG-II はいずれも認識されるが、B-RG-II に対する反応性がより高いことが明らかとなった。すなわち、ウサギが産生するイムノグロブリンの中には、単量体 RG-II と B-RG-II を区別できる分子種が存在することが示唆される。この結果に基づき、現在抗 B-RG-II ウサギモノクローナル抗体の作成を進めている。

B-RG-II 構造が細胞内のどこで、いつ形成されるかの検討の一環として、形成中の細胞板に RG-II が存在するか検討した。細胞板にペクチンが含まれることは従来から知られているが、そのペクチンに RG-II 領域が存在するかどうかは明らかにされていなかった。そこで同調培養したタバコ培養細胞 BY-2 およびシロイヌナズナ根端から超薄切片を作成し、上記のウサギポリクローナル抗 RG-II 抗体を用いた免疫電顕解析に供した結果、形成中の細胞板にシグナルが観察された。ここで用いた抗体はホウ素で架橋された B-RG-II、単量体 RG-II のいずれとも反応するので、こ

の RG-II がホウ素と結合しているかどうか現時点では明らかでないが、細胞板にも RG-II は存在し、ペクチンの架橋形成は細胞分裂以前に細胞内で起こり得ることが示された。

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3件)

Oiwa Y., Kitayama K., Kobayashi M., Matoh T. (2013) Boron deprivation immediately causes cell death in growing roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**: 621–627. (査読有)

DOI: 10.1080/00380768.2013.813382

Koshihara T., Kobayashi M., Matsuoka K., Fujiwara T., Matoh T. (2013) Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VII. Rapid induction of metabolic dysfunction in cells deprived of boron as revealed by microarray analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**: 189–194. (査読有)

DOI: 10.1080/00380768.2013.763383

Kobayashi M., Kouzu N., Inami A., Toyooka K., Konishi Y., Matsuoka K., Matoh T. (2011) Characterization of *Arabidopsis* CTP:3-deoxy-D-manno-2-octulosonate cytidyltransferase (CMP-KDO synthetase), the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **52**: 1832–1843. (査読有)

DOI: 10.1093/pcp/pcr120

[学会発表](計13件)

原朋美、王櫻霖、小林優、間藤徹「シロイヌナズナ KDO-8-フォスファターゼ候補タンパク質の解析」日本植物生理学会 第55回年会、2014年3月20日 富山大学(富山市)

Zhou Y., Awano T., Takabe K., Kobayashi M., Matoh T. “Immunocytochemical detection of rhamnogalacturonan II on forming cell plates”, 日本植物生理学会 第55回年会, 2014年3月18日 富山大学(富山市)

北山香保理、大岩優貴、小林優、間藤徹「ホウ素・カルシウム欠除に対するシロイヌナズナ初期応答の解析」日本土壌肥料学会 2013年度名古屋大会 2013年9月11日 名古屋大学(名古屋市)

Kitayama K., Oiwa Y., Kobayashi M., Matoh T. “Mechanism of early responses of plant cells to boron deprivation: possible involvement of pectic network” *Boron 2013*, 2013. 8. 17, Istanbul, Turkey

青木亮輔、小林優、岩元明敏、松永俊朗、間藤徹「RG-IIのKDO残基の合成に必要な

酵素CTP:KDOシチジリルトランスフェラーゼ発現抑制株の解析」第54回日本植物生理学会年会 2013年3月23日 岡山大学(岡山市)

Wageta M., Kobayashi M., Matoh T.

“Expression of genes involved in the synthesis of rhamnogalacturonan II-related monosaccharides in *Marchantia polymorpha*: Implications for the function of pectin gels in land plants”, *Marchantia Workshop 2012*, 2012年11月16日 ホテルグリーンピア阿蘇(熊本県阿蘇郡南阿蘇村)

小林優「細胞壁ペクチンの生理機能—ホウ素・カルシウム栄養を手がかりとして」日本土壌肥料学会シンポジウム「植物栄養の基礎研究から見てきた応用への可能性」日本土壌肥料学会 2012年度鳥取大会 2012年9月6日 鳥取大学(鳥取市)(招待講演)

Kobayashi M., Matoh T. “Boron nutrition in higher plants”, *The Seventh International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops*, 2012. 5. 22, Chanthaburi, Thailand

大岩優貴、北山香保理、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53回年会 2012年3月17日 京都産業大学(京都市)

小林優「京都大学植栄研におけるホウ素研究」ホウ素栄養研究会 2012年2月23日 北海道大学(札幌市)

Oiwa Y., Kitayama K., Koshihara T., Kobayashi M., Matoh T. “Early responses of *Arabidopsis* roots to boron deprivation”, *International Symposium “Strategies of Plants against Global Environmental Change”* 2011年12月8日 倉敷芸文館(岡山県倉敷市)

Kobayashi M., Aoki R., Konishi Y., Toyooka K., Matoh T., “Characterization of *Arabidopsis* CTP:KDO cytidyltransferase, the enzyme that activates KDO during rhamnogalacturonan II biosynthesis” 2011. 10. 3 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

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」日本土壌肥料学会 2011年つくば大会 2011年8月8日 つくば国際会議場(茨城県つくば市)

[その他]

ホームページ等

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

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