

平成30年 5月10日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712007

研究課題名(和文) ホウ酸トランスセプターによるホウ素応答機構

研究課題名(英文) Mechanisms for boron sensing by borate transceptors

研究代表者

高野 順平 (TAKANO, Junpei)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70532472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は土壤中/植物体内のミネラル栄養濃度をセンシングし、輸送系を制御して変動するミネラル環境に適応している。ホウ酸は植物の生育に必須であるが過剰に蓄積すると毒ともなる。シロイヌナズナBOR1はホウ酸の細胞外への排出を促進する細胞膜局在型ホウ酸トランスポーターであり、低ホウ酸条件時にホウ酸の導管方向への輸送を担う。BOR1は高ホウ酸濃度にさらされると細胞膜から液胞に輸送されて分解される。本研究では、BOR1がレセプター(トランスセプター)としてホウ酸濃度をセンシングし自身の蓄積量を制御して適切なホウ酸輸送量を保つ可能性を強く示唆することができた。

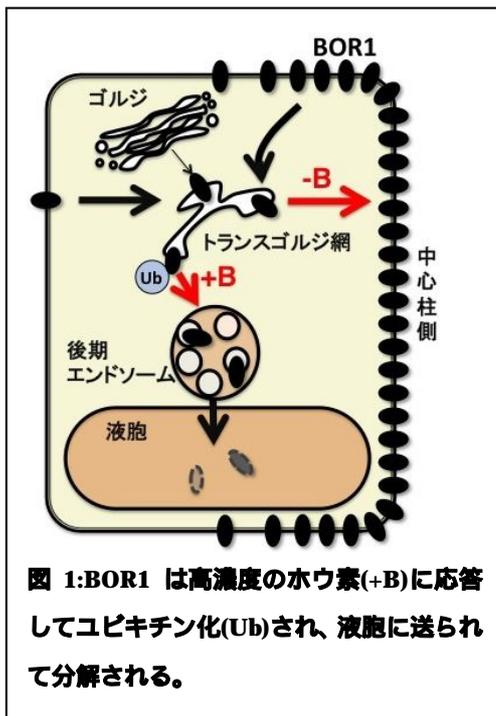
研究成果の概要(英文)：Plants sense mineral concentrations in soils or tissues and regulate membrane transport proteins to response to environmental changes. Boron is an essential element but is toxic when accumulated at high levels. Arabidopsis BOR1 is an borate exporter at the plasma membrane and responsible for boron transport toward root stele. BOR1 is transferred from the plasma membrane to the vacuole for degradation upon high-B supply to avoid boron toxicity. Our results in this study suggested that BOR1 functions as a borate/boric acid transceptor (transporter and receptor) regulating own accumulation in the plasma membrane to maintain boron homeostasis.

研究分野：植物栄養学

キーワード：植物栄養 センシング エンドサイトーシス ホウ素 細胞内輸送 タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

植物は土壤中/植物体内のミネラル栄養濃度をセンシングし、輸送系を制御して変動するミネラル環境に適応している。私たちは植物の必須ミネラルの一つであるホウ素について、輸送メカニズムとその制御機構を明らかにしてきた。ホウ素は過剰に蓄積すると毒ともなる元素であり、その土壌からの吸収と植物体内での移行は厳密に制御されている。私たちは、シロイヌナズナにおいてホウ素輸送に重要な細胞膜局在型ホウ酸輸送体を複数同定している。そのうち BOR1 はホウ素の細胞外への排出を促進する細胞膜局在型ホウ酸トランスポーターであり、低ホウ素条件時にホウ素の導管方向への輸送を担う。重要なことに、BOR1 は高ホウ素濃度にさらされるとその C 末端細胞質側領域にユビキチン化を受け、細胞膜からエンドソームを経由して液胞に輸送され、分解される(図 1)。これはホウ素の過剰輸送を防ぐ応答反応である。



私たちは、BOR1 の分解のきっかけとなるホウ素センシングのメカニズムを理解するため、BOR1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナに変異原処理を施し、分解に異常を持つ変異株を単離・解析した。その結果、

予想外であったが、BOR1 の内部の 4 つのアミノ酸置換による分解遅延を発見した。これらのアミノ酸のうち 3 つは細胞質側に大きなループを形成すると当時考えていた領域の N 末端側に集中していた。一方、研究開始当初までに、トランスポーター自体が輸送基質のレセプターとしてシグナリングに寄与する、『トランスセプター(トランスポーター+レセプター)』という概念が提唱されていた。一例として、出芽酵母のアミノ酸輸送体 Gap1 はアミノ酸濃度の上昇に応じて PKA pathway の活性化による生育促進を引き起こすとともに、自身のエンドサイトーシスと分解を促進することが知られていた。そこで BOR1 はトランスセプターとしてホウ素濃度をセンシングし、自身の蓄積量を制御して適切なホウ素輸送量を保つという仮説を設定し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

BOR1 がホウ酸トランスセプターとしてホウ酸濃度へ応答して自身の蓄積を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とした。当初は <ホウ酸の輸送とは独立したホウ酸結合部位によりホウ酸濃度をセンシングし、自己のユビキチン化と分解を起こす> という仮説を設定した。また、BOR1 の細胞内輸送経路を含め分解シグナリング系の全体像を明らかにすることを目的とした。

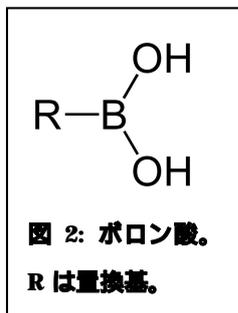
当初はホウ酸トランスポーター BOR3 についても研究対象としていたが、トランスセプターであると考えられる十分な証拠が得られず中断したため、以降では割愛する。

3. 研究の方法

(A) BOR1 へのホウ素の結合の解析

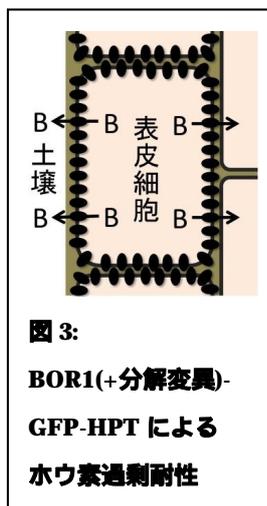
BOR1 の部分配列を精製し等温滴定型カロリーメーターによりホウ素の結合の可能性を検証した。また、BOR1 により輸送されないホウ酸アナログと考えられる各種ボロン酸(図 2)を根に与え、BOR1-GFP の分解を

誘導するかどうか (アゴニストとして働くかどうか) 検証した。さらに、ボロン酸光親和性ラベリング試薬を橋本誠博士 (北海道大学) に作成していただきホウ酸の結合サイトを探索した。



(B) 高速順遺伝学的解析による BOR1 分解シグナリングの全体像の解明

BOR1 の分解に異常を持つ変異株の高速スクリーニング系を開発し実施した。具体的には BOR1-GFP-HPT という融合タンパク質を発現する形質転換植物を変異原処理し、ホウ素過剰耐性を示す変異株を取得する方法であった。BOR1-GFP は根の細胞の細胞膜で中心柱よりの偏在性(図 1)を示すが、未知の理由で BOR1-GFP-HPT は偏在性を持たない。BOR1-GFP-HPT に変異を導入して分解性を失わせると、高濃度のホウ酸存在下でホウ酸を根の外に排出する活性が生まれ、ホウ素過剰耐性を植物に付与する(図 3)。本研究ではホウ素過剰耐性株を分離し、共焦点蛍光顕微鏡による GFP 観察を行い、BOR1 の分解に異常を持つ変異株を単離した。



(C) BOR1 のホウ酸輸送機能とセンシング機能の関係

研究開始までに重要性を確認していた A315,G356,P359,P362 に加え、それらの周辺にアミノ酸置換を導入した BOR1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナを整備し

た。各アミノ酸置換が、BOR1 のホウ酸輸送活性と自己のユビキチン化および分解に与える影響を western blot および GFP イメージングにより解析した。ホウ酸輸送活性は、出芽酵母発現系において解析した。

(D) BOR1 の分解のための細胞内輸送経路の解析

BOR1-GFP のイメージングと細胞内輸送に重要な因子の逆遺伝学的な解析により BOR1 の細胞内輸送経路を解析した。

4. 研究成果

(A) BOR1 へのホウ素の結合の解析

当初、BOR1 にはホウ酸輸送とは独立したホウ酸結合サイトがあると想定し研究を展開した。BOR1 のループ領域と考えていた配列を精製し等温滴定型カロリメーターで解析したがホウ酸結合は示せなかった。一方、同精製部分タンパク質を円偏光二色性測定に供したところ、ヘリックスの存在が見出され、単純な細胞質側ループ領域ではないことが示唆された。

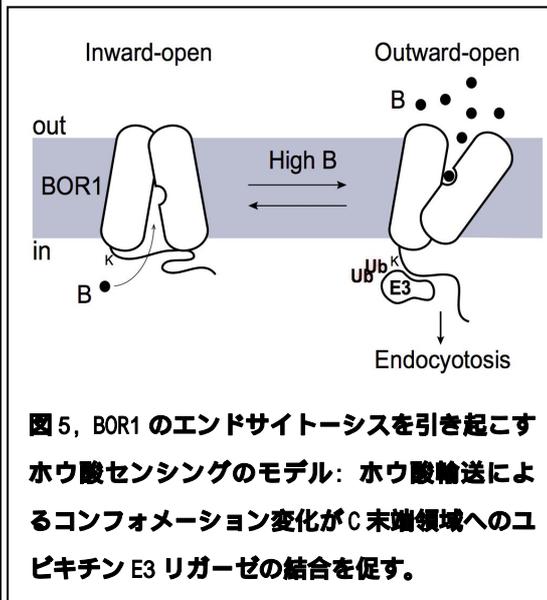
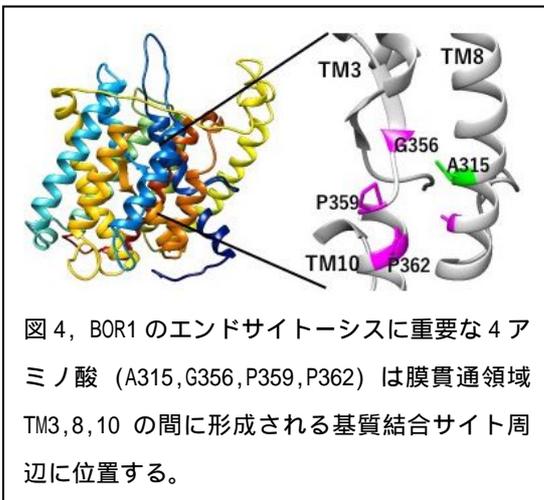
また、BOR1-GFP の分解を誘導できるボロン酸を見出し、ボロン酸光親和性ラベリング試薬を北海道大学の橋本誠博士に作成していただいた。これと LC-MS/MS を用いて BOR1 内のホウ酸の結合サイトを探索したが、非特異的結合が多く特異的な結合サイトの同定には至らなかった。

(B) 高速順遺伝学的解析による BOR1 分解シグナリングの全体像の解明

高速順遺伝学的解析についてはベースとした BOR1(K590A)-GFP-HPT がもたらすホウ酸過剰耐性機構を解析し発表した(図 3; Wakuta et al. Frontiers 2016)。スクリーニングでは新たに 1 つの BOR1 内部の重要アミノ酸を同定した。

(C) BOR1 のホウ酸輸送機能とセンシング機能の関係

本研究の中核部分である。当初は分解応答において重要な BOR1 内部の 4 つのアミノ酸残基残基について解析を進めた。これらの変異型 BOR1 では、ホウ素に応答したユビキチン化が起こらなかったことより、ホウ酸センシングおよびユビキチン化という制御の早い段階に問題が生じていることが明らかになった。また、出芽酵母においてこれらの変異型 BOR1 のうち少なくとも 3 つの輸送活性は低下していた。そのような状況の中、BOR1 およびホモログの結晶構造解析の報告 (Thurtle-Shmidt and Stroud 2016) があり、A315,G356,P359,P362 は当初予測していたような細胞質に露出するループではなく、トランスポーターの中央部に位置し基質結合サイトを形成するアミノ酸であることが明らかになった (図 4)。したがって、当初の仮説とは異なり、ホウ酸輸送とホウ酸センシングが切り離せないと考えられた。そこで、基質結合サイトの中でも保存性が高く輸送に重要と考えられるアミノ酸を選び、アラニンに置換した。特に D311A の置換により出芽酵母における輸送活性がほぼ完全に抑えられた。BOR1(D311A)-GFP は植物体において BOR1 の機能欠損を全く相補せず、またホウ素に応答した分解を全く起こさなかった。これはホウ酸輸送活性がホウ酸センシングに必要であることを示している。



以上より、BOR1 のエンドサイトーシスを引き起こすホウ酸センシングメカニズムについて、<ホウ酸を輸送し、外向きに開いたコンフォメーションが C 末端領域を細胞質に露出させ、ユビキチン化を受けやすくする > というモデルを提示する (図 5)。本モデルは、トランスポーターとユビキチンライゲースのみを必要とするシンプルな基質センシングメカニズムであり、動植物を問わず様々なトランスポーターの制御において普遍的であることが期待される。

(D) BOR1 の分解のための細胞内輸送経路の解析

BOR1 類縁タンパク質群の系統解析を通し、BOR1 分解系に関して細胞質側ループに存在するジロイシンモチーフが BOR1 の液胞輸送と細胞膜への極性輸送に重要であることを明らかにした (Wakuta et al. PCP 2015)。また、全反射蛍光顕微鏡による細胞膜上のイメージングとダイナミン様タンパク質のドミナントネガティブ変異を利用してエンドサイトーシスの解析を行った。これにより、BOR1 のエンドサイトーシスの主要な部分はクラスリン依存エンドサイトーシス (CME) によるものであることと、CME が BOR1 の偏在性と分解の両方に寄与することを明らかにした (Yoshinari

et al. PCP 2016)。さらに、BOR1およびホウ酸チャンネルNIP5;1の偏在性維持にはクラスリンアダプタータンパク質AP-2複合体が必要であるが、BOR1液胞輸送のためにはAP-2は必要とされない、すなわち未知のアダプタータンパク質が働くことを見出した (Yoshinari et al. 投稿準備中; Wang et al. Plant Cell 2017)。これらは植物の細胞膜局在トランスポーターの細胞内輸送について先駆的な知見を与えるものとなった。

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 11 件)

1, Yoshinari, A., and ***Takano, J.**

Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants. **Frontiers in Plant Science** (2017) 17.

DOI:10.3389/fpls.2017.01951 査読有

2, Wang, S., Yoshinari, A., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Mitani-Ueno, N., Ma, JF., Naito, S., ***Takano, J.**

Polar localization of the NIP5;1 boric acid channel is maintained by endocytosis and facilitates boron transport in Arabidopsis roots. **The Plant Cell** (2017) 29, 824-842.

DOI:10.1105/tpc.16.00825 査読有

3, Yoshinari, A., Fujimoto, M., Ueda, T., Inada, N., Naito, S., and ***Takano, J.**

DRP1-dependent Endocytosis is Essential for Polar Localization and Boron-induced Degradation of the Borate Transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology** (2016) 57, 1985-2000.

DOI:10.1093/pcp/pcw121 査読有

4, Wakuta, S., Fujikawa, T., Naito, S., and ***Takano, J.**

Tolerance to Excess-Boron Conditions Acquired by Stabilization of a BOR1 Variant with Weak Polarity in Arabidopsis.

Frontiers in Cell and Developmental Biology (2016) 4, 1-11.

DOI:10.3389/fcell.2016.00004 査読有

5, Wakuta, S., Mineta, K., Amano, T., Toyoda, A., Fujiwara, T., Naito, S., and ***Takano, J.**

Evolutionary Divergence of Plant Borate Exporters and Critical Amino Acid Residues for the Polar Localization and Boron-dependent Vacuolar Sorting of AtBOR1. **Plant Cell Physiology** (2015)

56(5): 852-862. DOI:10.1093/pcp/pcv011 査読有

[学会発表](計 20 件)

1, 細川卓也 The role of adaptor protein complex 4 (AP-4) in vacuolar targeting of a borate transporter AtBOR1 第59回日本植物生理学会年会 札幌 2018

2, 高野順平 ホウ酸トランスポーターの輸送活性に依存したユビキチン化と分解 第59回日本植物生理学会年会 札幌 2018

3, 高野順平 ホウ酸トランスポーターBOR1におけるホウ酸輸送活性に依存した自己制御 日本土壌肥料学会仙台大会 2017

4, 高野順平 A boron sensing mechanism regulating degradation of a borate transporter 日本農芸化学会 名城大学 2018

5, 高野順平 Development and utilization of cytosolic boric acid sensors for boron-transport studies. Boron symposium, A satellite meeting of IPNC, Copenhagen, 2017

6, 吉成晃 Dissection of vacuolar trafficking pathway of the borate transporter BOR1 in Arabidopsis thaliana 第58回日本植物生理学会年会 鹿児島 2017

7, 高野順平 Polar Localization Of Boric acid/borate Transport Proteins 第58回日本植物生理学会年会 鹿児島 2017

8, 高野順平 Polar Localization of a Boric Acid Channel NIP5;1 is Mediated by Phosphorylation and Required for Efficient Uptake of Boron in Arabidopsis thaliana 第57回日本植物生理学会年会 岩手大学 2016

9, 荻野由香 ホウ酸輸送体 BOR1 の液胞輸送制御に重要なアミノ酸残基の同定と機能解析 第57回日本植物生理学会年会 岩手大学 2016

10, 吉成晃 BOR1 の細胞膜上での偏在にはクラスリンアダプター AP2 が必須であるものの、ホウ素に応答した分解に AP2 は不要である 第57回日本植物生理学会年会 岩手

大学 2016

11, 吉成晃 シロイヌナズナにおいてクラスリンアダプタータンパク質複合体 AP2 に依存したエンドサイトーシスはホウ酸輸送体の偏在とホウ素欠乏条件下での生育に必須である 日本土壤肥料学会佐賀大会 2016

12, 高野順平 シロイヌナズナホウ酸チャネル NIP5;1 の細胞膜上偏在性は効率的なホウ酸輸送に貢献する日本土壤肥料学会佐賀大会 2016

13, 汪社亮 Phosphorylation-mediated polar localization of a boric acid channel is required for efficient uptake of boron in *Arabidopsis thaliana*. 13th ICOBTE 福岡 2015

14, 吉成晃 AP2-dependent and independent endocytosis distinctly regulate polar localization and degradation of a borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*. 13th ICOBTE 福岡 2015

15, 荻野由香 Mechanisms for boron-dependent vacuolar trafficking of a boric acid/borate transporter AtBOR1. 13th ICOBTE 福岡 2015

16, 高野順平 ホウ酸センサーによる植物組織内ホウ酸分布の解析 日本土壤肥料学会京都大会 2015

17, 荻野由香 シロイヌナズナホウ酸輸送体 BOR1 によるホウ酸センシングの可能性 日本土壤肥料学会京都大会 2015

18, 吉成晃 シロイヌナズナのホウ酸輸送体 BOR1 の分解に必要な因子の同定 日本土壤肥料学会東京大会 2014

19, 和久田真司 植物におけるホウ酸トランスポーターBOR の進化系統解析 日本土壤肥料学会東京大会 2014

20, 高野順平 Toward understanding the mechanisms of boron sensing and intracellular trafficking of boric acid/borate transporters 日本土壤肥料学会東京大会 2014

〔図書〕(計 3 件)

1, *Takano, J., Yoshinari, A., and Luu, D.T. Plant Aquaporin Trafficking. in *Plant Aquaporins*. Edited by Chaumont, F. and Tyerman, S. Springer (2017) 47-82. ブックチャプター

2, Takano, J. Plant responses to abiotic stresses - Mineral stress. in *Frontiers of Agricultural Science Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University*, (2015) SHOUKADOH KYOTO, 58-61. ブックチャプター

3, Kasai, K., Takano, J., and Fujiwara, T. Analysis of Endocytosis and Ubiquitination of the BOR1 Transporter. *Methods in Molecular Biology*, Springer (2014) 1209:203-17. ブックチャプター

〔その他〕

ホームページ

<http://saibaiseirigaku.wixsite.com/crop-ecophysiology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 順平 (Takano, Junpei)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70532472

(4) 研究協力者

吉成 晃 (YOSHINARI, Akira)

汪 社亮 (WANG, Sheliang)