

令和 2 年 9 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07696

研究課題名(和文) ホウ素欠乏による障害発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of injury induced by boron deficiency 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物の微量必須元素であるホウ素が欠乏すると、細胞に活性酸素分子種(ROS)が蓄積し、酸化障害や細胞死が発生する。ホウ素は細胞壁構造を安定化する因子なので、欠乏すると細胞壁が不安定化すると推定されるが、それがROS蓄積や細胞死をもたらす機構は不明である。そこで本研究では、モデル植物シロイヌナズナの根をホウ素欠除処理した際の応答を詳細に解析した。その結果、短時間のホウ素欠除処理で実際に細胞壁の強度低下が起こること、またROS蓄積には細胞壁ペルオキシダーゼが関与している可能性があること等、ホウ素欠乏による障害発生の機構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。作物のホウ素欠乏は可食部の壊死や不稔を引き起こし収量・品質を著しく低下させる。このような欠乏障害の回避や欠乏耐性品種の作出には、そもそもホウ素欠乏がなぜ・どのように植物細胞に障害をもたらすか理解することが重要である。本研究で明らかとなった、ホウ素欠乏時に実際に細胞壁の強度低下が生じていること、障害の原因物質である活性酸素分子種がペルオキシダーゼにより生成している可能性があることは、この過程の解明に資する重要な情報である。

研究成果の概要(英文)：Boron is one of the essential elements for vascular plants. Deficiency of boron causes the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which leads to oxidative damage and cell death. Since boron functions to stabilize the cell wall structure, the boron deficiency-induced damages presumably arise from the defective cell wall structure, but the precise causal relationship between the events remain largely unknown. Therefore, in this study, we analyzed the response of Arabidopsis roots to boron deprivation in detail. Major findings include: (1) mechanical strength of the root cell wall was indeed decreased by short-term boron deprivation; and (2) the cell wall peroxidase may be involved in the ROS over-accumulation in boron-deprived roots.

研究分野：植物栄養学

キーワード：植物 ホウ素 細胞壁 欠乏ストレス 活性酸素 細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホウ素は植物の微量必須元素のひとつである。植物はホウ素をホウ酸の形で土壌から吸収するが、ホウ酸は雨による溶脱等で土壌から失われやすく、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広く分布している¹⁾。ホウ素欠乏は、塊茎、塊根あるいは葉菜類の新葉のような急速に肥大・生長する組織の壊死、さらには穀類における不稔などをもたらすため、作物の収量・品質を著しく低下させる。このような欠乏障害の抑制、あるいは欠乏耐性品種の作出にあたっては、そもそもホウ素欠乏がなぜ・どのように植物細胞に障害をもたらすのか理解することが極めて重要である。

我々は過去の研究で、ホウ素が細胞壁多糖の架橋因子であり、細胞壁の構造形成に必須の役割を果たしていること(図1)を、世界に先駆けて明らかにしてきた^{2,3)}。この知見からは、ホウ素欠乏による生理障害は、細胞壁が正常に形成されないために発生すると示唆される。しかしその具体的な機作、すなわち細胞壁の構造異常がいかなる過程で組織の壊死や不稔にまで発展するのかについては、いまだ完全には理解されていない。この状況に鑑みて、我々はタバコ培養細胞・シロイヌナズナのホウ素欠乏応答を詳細に解析し、ホウ素欠乏では活性酸素分子種(ROS)の蓄積による酸化障害、またそれを直接の原因とする細胞死が発生することを明らかにしてきた^{4,5)}。更にその過程で、ホウ素欠乏に対する初期応答と病原菌感染応答が類似していることを見出し、そこから細胞のホウ素欠乏応答について図2のような仮説を立てるに至った。すなわち、植物細胞はホウ素欠乏に伴う細胞壁構造の攪乱・強度低下を、細胞壁分解を伴う病原菌の侵入と同質の事象と認識し、防御応答として過敏反応を誘導する結果、プログラム細胞死のプロセスが発動されると推定した。そしてこのモデルを検証することで植物のホウ素欠乏応答・障害発生メカニズムの全体像を解明できると考え、本研究を開始するに至った。

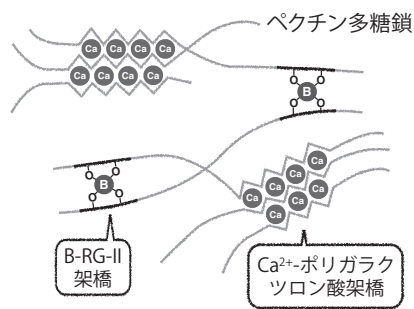


図1: ホウ素は細胞壁ペクチンを架橋する
ホウ素(ホウ酸)はペクチンのラムノガラクトナン II 領域を共有結合で架橋し(B-RG-II 架橋)、カルシウムはポリガラクトuron酸領域を静電相互作用で架橋する。ペクチンはこれらの架橋によりゲル化し細胞壁中に保持される。

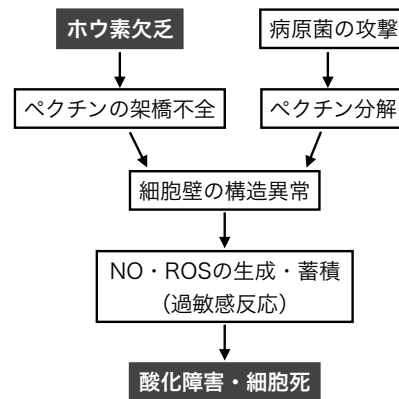


図2: ホウ素欠乏障害の発生機作に関する仮説

ホウ素欠乏に起因するペクチンの架橋不全は、病原菌の攻撃と同じく細胞壁の構造異常として細胞に知覚され、過敏反応としてプログラム細胞死を誘導する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物細胞のホウ素欠乏応答に関する仮説(図2)の妥当性検証を通じ、ホウ素欠乏が植物細胞に障害をもたらすメカニズムを具体的に明らかにすることである。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ幼植物の培地からホウ素を除去すると、1時間以内に根端伸長領域でROS蓄積と細胞死が発生する。この迅速な応答が、各種阻害剤の投与によって、あるいは関与が推定されるタンパク質遺伝子の変異株において変化するか検討することで、欠乏感知やストレスシグナル伝達に関与する分子の探索・絞り込みを試みた。また病原菌感染に伴う過敏反応に付随して生じることが知られている事象が、ホウ素欠乏応答においても見られるか検討した。更に、一連の応答の起点と推定する細胞壁の強度変化が実際に生じているか、原子間力顕微鏡を用いたインデンテーション法により調査した。ホウ素欠除処理には、我々が独自に開発した小スケールのホウ素欠除処理実験系を用いた(図3)。

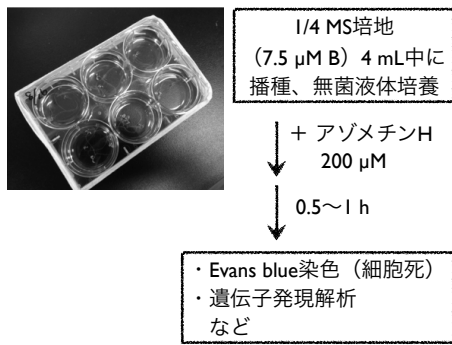


図 3: ホウ素欠除処理実験系

シロイヌナズナを 6 ウェルカルチャープレートで無菌液体培養した後、培地にホウ酸キレーターであるアゾメチン H を添加することでホウ素欠乏を誘導する。

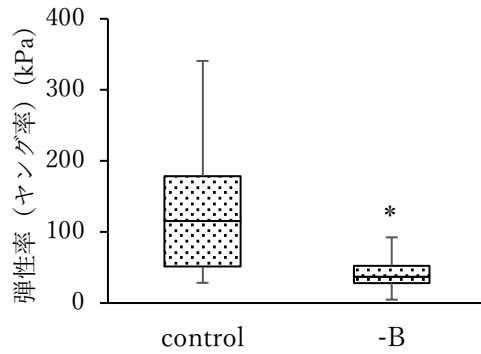


図 4: ホウ素欠除処理に伴う根端伸長領域の細胞壁の弾性率変化

ホウ素 (B) 欠除処理後 0.75 M ソルビトールを含む培地で原形質分離させたのち、弾性率を測定した。*は Student の t 検定で control 区と有意差があったことを示す ($P < 0.05$)。n=15, -B: n=16。

4. 研究成果

(1) ホウ素欠除で誘導される細胞死とプログラム細胞死の同一性に関する検討

シロイヌナズナ幼植物にホウ素欠除処理を施した際の遺伝子発現変化は、病原菌感染応答と類似している⁶⁾。またその際、根端には ROS に加え一酸化窒素 (NO) が蓄積する⁶⁾。シロイヌナズナを含む多くの植物において、病原菌感染時に ROS と NO の両方が蓄積し、過敏反応の一つである PCD の誘導に不可欠の役割を果たすことが知られている。これらの知見から、ホウ素欠除処理に伴う細胞死が PCD と共通の機構で誘導される可能性を考え、欠除処理を行ったシロイヌナズナ根端で PCD に特徴的な事象が生じるか検討した。

まず、ホウ素欠除誘導細胞死の実行に NO 蓄積が必要であるか検討した。ホウ素欠除処理と同時に NO 合成酵素阻害剤 L-NMMA あるいは NO 捕捉剤 cPTIO を添加すると細胞死は軽減された。また NO 生合成機構に変異を有する *noal* 変異株をホウ素欠除処理した場合、根端における NO 蓄積が著しく減少し、細胞死も抑制された。*noal* 株では ROS (スーパーオキシドアニオン) の蓄積も減少していた。ROS とホウ素欠除誘導細胞死の関連については、合成酵素阻害剤 DPI や捕捉剤 TMP が細胞死を効果的に抑制することをすでに明らかにしている。これらの結果・知見を併せ、ホウ素欠除で誘導される細胞死も、その実行には ROS 及び NO 両方の蓄積が必要であることが示唆された。

続いて、PCD の実行に不可欠なカスパーゼ-1 様酵素の関与について検討した。活性化したカスパーゼ-1 と不可逆的に結合する蛍光標識基質を用いたアッセイの結果、ホウ素欠除処理に伴ってこの酵素が活性化することが認められた。しかし、シロイヌナズナに 4 つ存在するカスパーゼ-1 様酵素 (VPE) の全てを欠損した多重変異株 *vpe-null* では、ホウ素欠除処理時にもカスパーゼ-1 活性はほとんど見られないにもかかわらず、細胞死は軽減されなかった。

以上の結果をまとめると、ホウ素欠除処理に伴う細胞死は、ROS、NO の両方が蓄積する必要がある点、カスパーゼ-1 様酵素の活性化を伴う点で病原菌感染応答における PCD と共通していた。この他にも、細胞死の誘導がシクロヘキシミドで抑制され新規タンパク質合成が必要と考えられる点、ペルキシナイトライトが蓄積する点でも両者は一致していた。しかしホウ素欠除に伴う細胞死では VPE が必須ではなかった。また PCD の特徴であるゲノム DNA の断片化も検出されなかった。以上の結果から、ホウ素欠除で誘導される細胞死は、自発的な細胞死の性質を有するが、病原菌感染で誘導される典型的な PCD とは異なると結論した。

(2) ホウ素欠除処理に伴う ROS 生成を担う酵素の特定

ホウ素欠除処理に伴う迅速な ROS 生成を担う酵素は特定されていない。そこで、各種の ROS 生成酵素の欠損が、ホウ素欠除処理に伴う ROS (スーパーオキシドアニオン) 蓄積量を変化させるか検討した。細胞膜 NADPH オキシダーゼ Rboh C、Rboh F および細胞壁ペルオキシダーゼ PER62、PER71 の T-DNA 挿入変異株を供試した結果、*per62* 変異株において、ホウ素欠除処理に伴う ROS 蓄積が野生型株の 50%程度まで減少することを見出した。また、ペルオキシダーゼによるスーパーオキシドアニオン生成反応の阻害剤 NaN_3 を培地に添加すると、ホウ素欠除処理に伴う ROS 蓄積は減少した。以上の結果から、ホウ素欠除に伴う迅速な ROS 生成に PER62 を含む細胞壁ペルオキシダーゼが関与することが示唆された。

(3) ホウ素欠除処理に伴う細胞壁の強度変化の解析

図2に示した仮説では、ホウ素欠乏で細胞壁の強度が低下し、それが一連の応答のトリガーとなると想定している。この仮説検証の一環として、細胞死が生じる領域において実際に細胞壁の強度が低下しているか検討した。

液体培養したシロイヌナズナ幼植物を培地中に保持し、原子間力顕微鏡を用いたインデンテーションに供した。応力-ひずみ曲線を取得してカーブフィッティングを行い、剛性を示すヤング率を算出した。ホウ素欠除処理を行うと、1時間以内に根端伸長領域の細胞壁のヤング率が低下し、ヤング率の分散も小さくなった(図4)。この結果より、ホウ素欠除処理を受けた根では、実際に1時間以内に伸長領域の細胞壁強度が低下することが確認された。

更に、ホウ素欠除処理と同時にラジカルスカベンジャーを培地に添加しROSの蓄積を抑制した場合、細胞死は抑制されたが、ヤング率の低下は抑制されなかった。このことは、ホウ素欠除に伴う細胞壁の強度低下は、ROS蓄積や細胞死に先立つ事象であることを示唆する。

(4) まとめ

本研究では、植物がホウ素欠乏で障害を受けるメカニズムの解明を目指し、我々が構築した仮説の検証を行った。シロイヌナズナ根のホウ素欠除処理は1時間以内という短時間で細胞死を誘導する。必須元素の欠乏が細胞に様々な代謝障害を誘導することは当然としても、その影響が致死的なレベルまで蓄積するには、より長い時間を要すると思われる。それゆえ、ホウ素欠除に伴ってごく短時間で細胞死が生じる理由は、ホウ素不足に起因する細胞壁構造の不安定化が細胞に自発的な死を誘導するためではないかと考え、その可能性を検証した。検討の結果、ホウ素欠除による細胞死は過敏反応に伴う典型的なPCDとは異なることが示唆されたが、新規タンパク質合成が必要であることなど、自発的な細胞死の一種であることを示唆する結果も得られた。

細胞壁の強度低下が欠乏応答の起点であるとする推測については、細胞死が生じる領域の細胞壁強度が実際に低下することが確認され、仮説が支持された。また欠除処理時にROS蓄積をもたらす酵素が細胞壁ペルオキシダーゼであることも示唆された。したがって今後は、細胞壁構造の不安定化が細胞壁ペルオキシダーゼを活性化させる機構について重点的に検討することが重要であろう。これによりホウ素欠乏から細胞死へ至る一連の事象の解明が進展し、植物におけるホウ素欠乏障害発生機構を理解できると考える。

<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) Koshiba T *et al.* (2009) *Plant Cell Physiol.* **50**: 26–36
- 5) Oiwa Y *et al.* (2013) *Soil. Sci. Plant Nutr.* **59**: 621–627
- 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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhou Ye, Kobayashi Masaru, Awano Tatsuya, Match Toru, Takabe Keiji	4. 巻 82
2. 論文標題 A new monoclonal antibody against rhamnogalacturonan II and its application to immunocytochemical detection of rhamnogalacturonan II in Arabidopsis roots	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1780 ~ 1789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1485479	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 Kobayashi Masaru, Miyamoto Maako, Match Toru, Kitajima Sakihito, Hanano Shigeru, Sumerta I Nyoman, Narise Takafumi, Suzuki Hideyuki, Sakurai Nozomu, Shibata Daisuke	4. 巻 64
2. 論文標題 Mechanism underlying rapid responses to boron deprivation in Arabidopsis roots	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 106 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1416670	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林優
2. 発表標題 ホウ素欠乏による酸化ストレスの発生機構
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2018年度神奈川大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru Kobayashi
2. 発表標題 Function of pectin in plant primary cell walls
3. 学会等名 Humanosphere Science School 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Umeki, Maako Miyamoto, Masaru Kobayashi, Toru Matoh
2. 発表標題 Mechanism of immediate cell death in Arabidopsis roots induced by boron deprivation
3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本 真亜子、小林 優、間藤 徹、北島 佐紀人、花野 滋、イ ニョマン スメルタ、櫻井 望、柴田 大輔
2. 発表標題 ホウ素欠乏に対するシロイヌナズナの初期応答の解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2017年度仙台大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaru Kobayashi, Maako Miyamoto, Toru Matoh, Sakihito Kitajima, Shigeru Hanano, I Nyoman Sumerta, Nozomu Sakurai, Daisuke Shibata
2. 発表標題 Mechanism of early responses of Arabidopsis roots to boron deprivation
3. 学会等名 Boron 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅木大輔、小林優
2. 発表標題 ホウ素欠除処理によるシロイヌナズナ根細胞壁の機械的性質の変化
3. 学会等名 第61回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田碧、大西優香、小林優
2. 発表標題 代謝変化に着目した作物のカルシウム栄養診断
3. 学会等名 日本土壌肥料学会 2019年度静岡大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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