

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06187

研究課題名(和文)植物体内のホウ素要求量を低下させる分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying reduced boron requirement in plants

研究代表者

三輪 京子(MIWA, Kyoko)

北海道大学・地球環境科学研究所・准教授

研究者番号：50570587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：今後の持続的な食料の生産には、ミネラル栄養が少ないやせた土壤に耐える植物の開発が必要である。本研究では植物の微量必須元素のひとつであるホウ素に注目し、植物のホウ素要求量低下を通じたホウ素欠乏耐性を付与する遺伝子の同定を目指した。葉のホウ素濃度は低下したものの成長が改善したシロイヌナズナ変異体の解析の結果、ホウ素の結合部位である細胞壁ペクチン合成や翻訳に関わる因子の変異によってホウ素要求量が低下することを明らかにした。本研究は植物のホウ素要求量を減少させる遺伝子資源を発見し、ホウ素欠乏耐性の分子機構を提唱する成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホウ素は植物の微量必須元素のひとつであり、細胞壁の構成成分として働く。これまで植物種間や品種間でのホウ素要求量の違いは記述されてきたが、要求量を決定する遺伝子や分子機構は明らかではなかった。本研究では、植物のホウ素要求量を低下させ、ホウ素欠乏耐性を付与する遺伝子変異を複数同定し、植物の成長に必要な栄養量を変化させる分子機構の新たな知見を得た。

また、ホウ素欠乏による農業生産被害は日本を含めて世界で報告されている。本研究の知見はホウ素欠乏耐性品種の効率的な選抜や開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：For sustainable food and plant biomass production, it is necessary to develop plant cultivars tolerant to mineral nutrient deficiency in soil. Boron is an essential micronutrient for plants and this research aimed to identify genes to confer low-boron tolerance through reduction of boron requirement in plants. Arabidopsis thaliana mutants were characterized, which showed reduction in boron concentration in leaves but increase in leaf expansion. It was revealed that the responsible mutations were present in the genes required for synthesis of cell wall pectin, a boron binding site, and translation process. This research successfully identified the genetic resources to reduce boron requirement and proposed molecular mechanisms underlying low-boron tolerance in plants.

研究分野：植物栄養学

キーワード：ホウ素 シロイヌナズナ 欠乏耐性 細胞壁 変異体 遺伝子 要求量

1. 研究開始当初の背景

現代の食料・植物バイオマスの高い生産性は、大量の外部エネルギーの投入に依存している。特に、生産に必要なエネルギーの3分1以上は化学肥料の施用にかかるものと計算されている。肥料価格は資源価格や石油価格と連動し、近年の生産コスト上昇のひとつの要因となっている。今後の環境調和型かつ持続的な食料・植物バイオマスの増産には、少ない肥料投入で高生産する作物品種の開発が必須である。これには、単に貧栄養環境で生存できるというだけでなく、ミネラル量あたりの生育・収穫量が多いという、成長に必要な必須ミネラル量(要求量)が低いことが、貧栄養環境での持続的な生産には必要である。

ホウ素(B)は植物の微量必須元素のひとつであり、植物細胞壁のペクチン質多糖ラムノガラクトナン II (RG-II) を架橋する機能を持つ。ホウ素欠乏の障害は成長点に現れ、農作物の収量・品質を低下させる。欠乏症の発生は日本を含めて世界80か国以上で報告され、微量必須元素では鉄と並んで欠乏症の発生が多く、低ホウ素耐性品種の開発が課題となっている。

これまでの研究で、植物に低ミネラル栄養環境に対する耐性を付与する遺伝子は複数報告されてきた。ホウ素欠乏では、ホウ酸輸送体 BOR1 や NIP5;1 の発現上昇によるホウ素欠乏耐性の付与が報告されていた。しかし、これまで報告された低ミネラル栄養耐性は、いずれの場合も環境中から植物体へのミネラル吸収が強化されたものであった。貧栄養環境での長期的な栽培という視点からは植物体内の利用効率の上昇、すなわち栄養要求量の低下が重要であると考えられた。しかし、植物の栄養要求量を低下させる遺伝子やその分子機構は明らかにされていなかった。

$$\text{栄養利用効率} = \text{(1) 吸収効率} \times \text{(2) 体内利用効率}$$

環境中からどのくらいミネラルを吸収できるか

単位ミネラルあたりのどのくらい生育できるか

2. 研究の目的

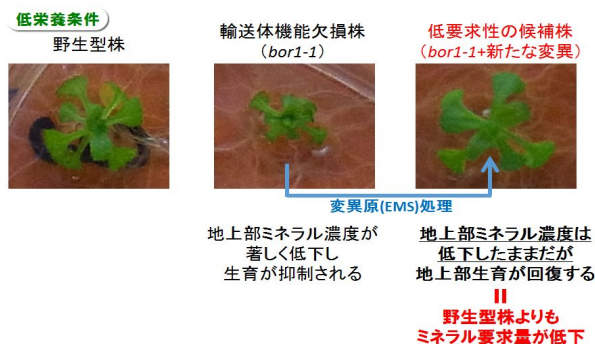
本研究では、植物の必須ミネラルのなかでホウ素を対象として、植物体内のホウ素要求量を低下させる新規遺伝子の同定を目的とした。先行研究により、「地上部ホウ素濃度は低下したにも関わらず成長が改善した」体内のホウ素要求量が低下したシロイヌナズナ変異株の探索を行い、候補の変異株をすでに獲得していた。本研究では、これらの変異株の変異の原因遺伝子を同定し、ホウ素要求量低下の分子機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ホウ素要求量が低下したシロイヌナズナ変異株の生理学的な解析と原因遺伝子の同定

先行研究において、「地上部のホウ素濃度は低下したままであるが、地上部成長量が回復した」体内のホウ素要求量の低下したシロイヌナズナ変異株を探索した。シロイヌナズナホウ素輸送体機能欠損株 *bor1-1* に塩基置換を誘発する EMS 処理を行い、低濃度ホウ素条件下で地上部成長量や上位葉の展開が *bor1-1* と比較して改善した *bor1-1* 抑圧変異株が 11 株選抜されていた。

本研究ではこれらの変異株の確立を行い、特に葉の展開改善が顕著な 7 株を主な対象として固形培地および水耕栽培を用いて異なるホウ素栄養条件において生理学的な解析を行った。また、遺伝学的な解析を進め、変異の原因遺伝子の同定を行った。複数の独立な T-DNA 挿入株の解析や野生型遺伝子断片の導入による相補試験を通じて、変異の原因遺伝子の証明を行った。さらに *bor1-1* 変異を除いた野生型背景の一重変異体を作成し、単一変異によって低濃度ホウ素条件下での葉の成長改善が認められるかを調べ、原因変異の影響を評価した。



(2) ホウ素要求量低下の分子機構の解明

ホウ素要求量低下の分子機構を探索するため、各変異株の性質の解析を行った。原因変異が細胞壁ペクチン合成に関わる遺伝子の変異体においては、細胞壁の解析を行った。植物体を水耕栽培で低濃度ホウ素条件および通常ホウ素条件で栽培し、葉および根から細胞壁を抽出した。細胞壁ホウ素濃度、RG-II 特異的な糖量、RG-II のホウ酸架橋率を調べ、細胞壁における変化を評価した。

遺伝子発現における翻訳過程に関与する遺伝子の変異体においては、翻訳量の変化をゲノムワイドに明らかにするため、リボソームプロファイリングを低濃度ホウ素条件および通常ホウ素条件で行い、翻訳量変化が引き起こされた遺伝子群を明らかにした。

4. 研究成果

(1)細胞壁ペクチン質多糖 RG-II 減少によるホウ素要求量の低下

ホウ素要求量が低下した *bor1-1* 抑圧変異体のひとつはペクチン主鎖を合成するガラクトシロン酸転移酵素遺伝子の変異が原因であることを既に明らかにしていた。*bor1-1* 変異を除いた野生型背景の変異体においても、低濃度ホウ素条件下で野生型株と比較して根の伸長や稔実性の向上が認められた。本研究において細胞壁を分析したところ、ホウ素濃度条件に関わらず葉および根の細胞壁でホウ素濃度の 20-30%低下が観察され、ホウ素要求量の低下と一致していると考えられた。細胞壁の RG-II 特異的な糖を測定したところ、同様の低下が認められた。ホウ酸による RG-II の相対的な架橋率には有意な違いは認められなかった。これより、ホウ素の結合部位である RG-II の 20-30%の低下がホウ素要求量の低下につながることを推察された。

bor1-1 抑圧変異体(#101)の遺伝学的解析を行ったところ、原因変異が機能未知の糖転移酵素遺伝子の非同義置換であることを、野生型遺伝子断片を導入した形質転換体の作出によって明らかにした。本遺伝子の T-DNA 挿入のホモ接合体は取得できず、成長に必須な遺伝子であることが示された。#101 は *bor1-1* 背景、野生型背景ともに、低濃度ホウ素条件下において葉の著しい展開改善を示した。また、野生型背景#101 では低ホウ素条件下で稔実性の改善を示し、生殖成長期においてもホウ素欠乏耐性の向上が観察された。一方、ホウ素通常条件下において主根伸長の抑制および花茎の伸長抑制が観察された。ホウ素通常条件下での成長抑制は本遺伝子が正常な成長に必須であることと一致していると考えられた。野生型背景植物の細胞壁の解析を行ったところ、ホウ素の結合部位である RG-II における特異的な糖の減少、ホウ素十分条件下での細胞壁ホウ素濃度の減少が認められた。これは、上記のガラクトシロン酸転移酵素遺伝子の変異体と同様の傾向であり、RG-II の減少がホウ素要求量の減少につながることを支持していると考えられた。また、本糖転移酵素遺伝子の機能はこれまで未解明であったが、非同義置換をもつ#101 変異体が取得できたことにより、RG-II 合成に関与することが示唆された。

bor1-1 抑圧変異体(#175, 180)では、T-DNA 挿入変異体が同様の表現型を示したことにより、#101 とは異なる機能未知の糖転移酵素遺伝子のナンセンス変異が原因変異であることを明らかにした。#175、#180 の原因変異は野生型背景で、単独の変異で低濃度ホウ素条件下での葉の展開改善や花茎の伸長を引き起こす効果を示したが、葉の展開改善は#101 と比較すると増加の程度は小さかった。一方、#175、#180 では通常ホウ素条件下で顕著な成長抑制は認められなかった。#175、#180 の野生型背景の変異体では細胞壁のホウ素濃度には有意な差が観察されなかったが、RG-II 特異的な糖は減少傾向を示した。#175、#180 の原因遺伝子の糖転移酵素は#101 の原因遺伝子の糖転移酵素と共発現していることが報告されており、本研究より#175、#185 の原因遺伝子も RG-II 合成に関与していることが示唆された。

さらに、抑圧変異体#186 の原因はゴルジ体内でヌクレオチド代謝に働くことが予想される酵素遺伝子の変異であることを明らかにした。細胞壁ペクチンはゴルジ体内で糖ヌクレオチドを基質として合成されるため、ヌクレオチド代謝を通じた細胞壁変化が推測された。

加えて、低ホウ素条件下において野生型株と比較して主根伸長抑制が緩和された変異体として単離された *TMN1* 変異体を解析したところ、細胞壁ホウ素濃度の低下、細胞壁 RG-II 量の低下が糖分析および免疫染色で明らかにされた。この変異体においても低濃度ホウ素条件下における主根伸長抑制の緩和は RG-II 減少が主要な要因であると考えられた。

これらの変異体の共通性より、ホウ素要求量の低下のひとつのしくみはホウ素の結合部位である RG-II の減少であることが考察された。これまで、異なる植物種間および品種間において植物のホウ素量と細胞壁 RG-II 量は相関することが報告されており、本研究の結果を支持するものと考えられた。RG-II は細胞壁ペクチン質多糖として必須な成分であり、その劇的な減少は細胞壁の異常、結果として成長の抑制を引き起こすと想定される。しかし、20-30%の低下は細胞壁機能を維持しつつ、ホウ素要求量を低下させ、ホウ素欠乏耐性を付与する可能性があると考えられた。また、応用にあたっては、異なる組織によって RG-II 低下の程度を制御することができれば、深刻なトレードオフが回避できる可能性も考察された。

(2)翻訳量変化によるホウ素要求量の低下

bor1-1 抑圧変異体#55 では原因変異が翻訳伸長因子の活性化酵素遺伝子の非同義置換であることを、野生型遺伝子断片を導入することにより明らかにした。変異体#55 は低濃度ホウ素条件下では葉の展開改善を示すのに対し、通常ホウ素条件下では葉の展開抑制を示した。T-DNA 挿入による遺伝子破壊は植物個体の深刻な成長抑制および稔実性の低下を引き起こすことから、本遺伝子が正常な成長に必須であることも明らかとなった。変異体#55 で翻訳量が変化している遺伝子を明らかにするため、低濃度ホウ素条件および十分条件下での網羅的な翻訳量解析(リボソームプロファイリング)を行った。その結果、細胞壁合成関連遺伝子や、ホウ素欠乏耐性への関与が報告されているホウ酸輸送体遺伝子の翻訳量には違いが認められず、#55 の要求量低下のしくみが既知の細胞壁変化や局所的な輸送強化ではない可能性が示唆された。環境応答や生物ストレス応答に関係する遺伝子群において翻訳量変化が認められ、低濃度ホウ素条件下でのストレス応答遺伝子の翻訳量抑制が成長改善に結びついた可能性が考察された。この結果より、細胞壁 RG-II 量の変化とは異なるホウ素要求量低下の機構の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroguchi A., Sakamoto S., Mitsuda N., Miwa K.	4. 巻 72
2. 論文標題 Golgi-localized membrane protein AtTMN1/EMP12 functions in the deposition of rhamnogalacturonan II and I for cell growth in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 3611 ~ 3629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erab065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Miwa K.
2. 発表標題 Boron-dependent translation of a boron transporter and control of boron requirement in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Onuh A. F., Miwa K.
2. 発表標題 Reduced function of AVP2;1 confers low-boron tolerance in Arabidopsis thaliana
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 Miwa K.
2. 発表標題 Boron-dependent translation of a borate transporter BOR1 and its significance for adaptation to boron nutrient availability
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 岩佐 尚樹、三輪 京子
2. 発表標題 成長促進因子であるRAPTOR1B の機能欠損は低ホウ素条件での植物の主根伸長抑制を緩和する
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 野崎佑斗、船川寛矢、相原いづみ、三輪京子
2. 発表標題 糖転移酵素の点変異はラムノガラクトツロナンIIの減少を通じてホウ素要求量を低下させる
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 船川寛矢、福間健、三輪京子
2. 発表標題 ホウ素要求量の低下したガラクトツロン酸転移酵素10変異株のペクチン質多糖の変化
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2018年度大会（神奈川大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Funakawa H., Fukuma K., Miwa K.
2. 発表標題 Identification of novel genetic mutations to reduce boron requirement in pectin in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 The 6th International Conference on Plant Cell Wall Biology (PCWB2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Funakawa H., Fukuma K., Miwa K.
2. 発表標題 Galacturonosyltransferase mutations reduce boron requirement by maintenance of rhamnogalacturonan II crosslinking rate in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 Taiwan Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miwa K.
2. 発表標題 Development of low-nutrient stress tolerant plants through identification of novel genes to improve nutrient use efficiency in <i>Arabidopsis thaliana</i>
3. 学会等名 Japan-China Young Women Scientists Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野崎佑斗、船川寛矢、相原いづみ、三輪京子
2. 発表標題 ホウ素要求量が低下したシロイヌナズナbor1-1 抑圧変異株#101の原因遺伝子の同定
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川瀬誠喜、三輪京子
2. 発表標題 シロイヌナズナのガラクトロン酸転移酵素遺伝子群の変異はホウ素要求量を低下させる
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣口寛彦、坂本真吾、光田展隆、三輪京子
2. 発表標題 ペクチン合成に必須な役割を担う機能未知の膜タンパク質TMN1
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船川寛矢
2. 発表標題 ガラクトシロン酸転移酵素 GAUT10変異はシロイヌナズナのハウ素要求量を低下させる
3. 学会等名 2017年度北海道植物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣口寛彦、坂本真吾、光田展隆、三輪京子
2. 発表標題 機能未知の膜タンパク質TMN1がペクチン合成に必須である
3. 学会等名 第11回 細胞壁研究者ネットワーク定例研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船川寛矢、野崎佑斗、相原いづみ、三輪京子
2. 発表標題 植物体内のハウ素要求量を低下させる遺伝子変異の探索
3. 学会等名 日本土壤肥料学会2017年度仙台大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miwa K.
2. 発表標題 A novel strategy to identify genetic mutations to improve boron use efficiency in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 Japan-China Joint workshop on soil-microbe-plant interaction (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Funakawa H., Fukuma K., Miwa K.
2. 発表標題 Galacturonosyltransferase (GAUT) mutations confer low-boron tolerance by reduction of boron requirement in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conference on Latest Advances in Plant Development & Environmental Responses (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三輪京子
2. 発表標題 体内の無機栄養の要求量低下による栄養欠乏耐性の向上
3. 学会等名 農学中手の会第2回研究集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 船川寛矢、三輪京子
2. 発表標題 シロイヌナズナのガラクトuron酸転移酵素GAUT10変異株におけるRG-II架橋率の維持によるホウ素要求量の低下
3. 学会等名 第10回細胞壁ネットワーク定例研究会/平成28年度新学術領域若手ワークショップ
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 野崎佑斗、三輪京子
2. 発表標題 体内のホウ素利用効率が上昇した新規bor1-1抑圧変異株の解析
3. 学会等名 第10回細胞壁ネットワーク定例研究会/平成28年度新学術領域若手ワークショップ
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 船川寛矢、三輪京子
2. 発表標題 ガラクトシロン酸転移酵素GAUT10変異はRG-II架橋率を維持することによりシロイヌナズナのホウ素要求量を低下させる
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2016年度佐賀大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三輪京子
2. 発表標題 植物体内のホウ素要求量を低下させる遺伝子資源の探索
3. 学会等名 第2回植物の栄養研究会
4. 発表年 2016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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	University of Georgia			