

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658059

研究課題名(和文)植物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 to reduce boron nutrient requirement in plants

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：食糧・植物バイオマスの持続的な増産には、肥沃度の低い土壌環境で少ない肥料の投入で高い生産性をもつ植物の開発が必要である。本研究では植物の生育に必須なホウ素の必要量を低下させる遺伝子を同定することを目的とした。体内ホウ素濃度が低いにも関わらず高い生育量を示す複数のシロイヌナズナ変異株を単離したところ、ホウ素の作用点である細胞壁合成に関与する遺伝子への変異が原因であると考えられた。ホウ素必要量を低下させる新たな遺伝子資源の同定に成功し、必須ミネラル要求量を低下させる新たな方法論を示した成果である。

研究成果の概要(英文)：To increase the productivity of food and plant biomass in infertile soils, one effective solution is to develop plants which have high yields with little fertilizer input. The present research aimed to identify novel genes to reduce the requirement of boron, one of essential elements for plant growth. Multiple lines of Arabidopsis thaliana mutants were isolated, which exhibited better growth even though the boron concentrations in shoot tissues were decreased. Through genetic analysis, mutations were found in the genes for synthesis of cell wall polysaccharides, a boron binding site. This study demonstrates a novel strategy to identify genetic resources useful for reduction of nutrient requirement of plant growth for sustainable plant production.

研究分野：植物分子栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学 植物栄養学・土壌学

キーワード：シロイヌナズナ ホウ素 要求量 変異株 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

食糧・植物バイオマスの持続的な増産には、肥沃度の低い土壌環境で少ない肥料投入で高生産する植物の開発が必要である。そのためには、単に貧栄養の環境で生存できるというだけでなく、植物の生育量に対して必要な必須元素量が低い(栄養効率が良い)ことが、重要である。これまで、低栄養環境に耐性を付与する遺伝子は複数同定されているが、植物個体の生育量に対する必須元素の必要量を低下させた例は知られていない。

ホウ素(B)は植物の微量必須元素のひとつであり、欠乏症の発生は日本を含む世界80か国以上で報告されている。ホウ素は至適濃度範囲の狭い元素として知られており、ホウ素欠乏耐性を含め、幅広いホウ素濃度の土壌に適応した作物品種の開発が望まれている。

これまで、タバコ培養細胞BY-II(Matoh et al., 2000)やギンドロ培養細胞(Kakegawa et al., 2005)で低濃度のホウ素培地に馴化した細胞が作成された。しかし、これら低ホウ素馴化細胞の知見を基にした低ホウ素耐性の植物の作出は報告されていない。また、ホウ素輸送体BOR1の発現上昇により、低ホウ素環境下でのシロイヌナズナの生育改善が報告された(Miwa et al., 2006)。しかしながら、この生育改善は根から地上部へのホウ素輸送を強化したものであり、環境中からのホウ素の収奪量には変わりがなく、真のホウ素欠乏耐性とは言えないものであった。

2. 研究の目的

本研究では、植物の必須ミネラル要求量を低下させる新規遺伝子変異の同定を目標とした。植物の微量必須元素のホウ素を対象として、植物個体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と原因遺伝子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホウ素要求量が低下した変異株の探索
シロイヌナズナホウ素輸送体BOR1は低ホウ素環境での根から地上部への効率的なホウ素輸送を担う。BOR1の機能欠損株であるシロイヌナズナ変異株*bor1-1*は、広い範囲の低ホウ素環境(欠乏条件)で地上部のホウ素濃度が著しく低下し、そのため地上部の生育が抑制される。この*bor1-1*変異株をもとにさらにEMSによる変異原処理を行い、低ホウ素環境で地上部ホウ素濃度が低下したままでも関わらず地上部生育量が回復した抑圧変異株を単離した。抑圧変異株は地上部ホウ素濃度が低下しているものの地上部生育量が回復したことから、親株である*bor1-1*や野生型株と比較して、生育に必要なホウ素の要求量が低下した株と考えられた。

(2) *bor1-1*変異と地上部全ホウ素濃度の確認
候補株の単離後、野生型株の混入を排除し、地上部ホウ素濃度上昇による生育改善の株を除くため、(i)*bor1-1*の変異の存在と(ii)地上部全ホウ素濃度が*bor1-1*と同様に低下していることを確認した。

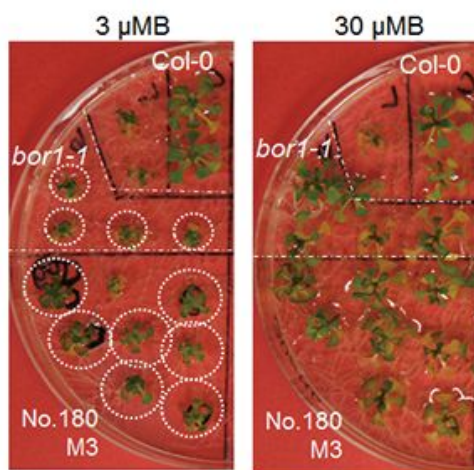
(3) 変異の原因遺伝子の解析

染色体がLerに置換されたLerバックグラウンド*bor1-1*と単離された変異株を交配し、F2種子を得て遺伝子マッピングを行い、変異の原因遺伝子が座乗する染色体部位を決定した。配列解析によって候補の原因遺伝子変異を決定した。

4. 研究成果

(1) ホウ素要求量が低下した変異株の探索
変異株の探索を実施するため、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、19,000のM1種子からM2種子を獲得した。ロックウールを用いた水耕栽培(培地ホウ素濃度0.3 μM)、固形培地での栽培(培地ホウ素濃度3 μM)で、

それぞれ 17,500 種子ずつ M2 種子を栽培し、地上部生育量や上位葉の展開が対照株よりも改善している株を選抜した。後代の M3 種子を採取し、栽培試験を行って生育改善の表現型を確認したところ、合計で独立な 11 株の変異株の単離に成功した。11 株はホウ素十分条件（培地ホウ素濃度 30 μM ）では成育に対照株と違いがなかったことから、ホウ素欠乏条件下で生育改善が引き起こされることを明らかにした。



図：対照株 *bor1-1* とホウ素要求量が低下した抑圧変異株の例（No.180）。ホウ素欠乏条件（3 μM ）と十分条件（30 μM ）で生育させた。

(2) *bor1-1* 変異と地上部全ホウ素濃度の確認
単離された 11 株を対象に *bor1-1* の変異の存在を CAPS マーカーにより確認した。また、葉の展開抑制が顕著に回復した 4 株を対象に、様々なホウ素条件下で水耕栽培をし、葉のホウ素濃度を測定したところ、対照株との違いは認められなかった。これより、これらの株の生育抑制の緩和はホウ素輸送の回復に起因するのではなく、ホウ素の要求量の低下によることが確認された。

(3) 変異の原因遺伝子の解析

遺伝子マッピングを行い、次世代シーケンサーを用いたゲノム配列解析の結果から候補の原因遺伝子を決定した。原因遺伝子を絞り込んだ 4 株については、それぞれの変異

株で異なる糖転移酵素 (glycosyl transferase) をコードすると予想される遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換が見いだされた。ホウ素は植物体内で細胞壁のペクチン質多糖ラムノガラクトツロナン II (RG-II) を架橋する機能を持つことが明らかになっている。同定されたこれらの遺伝子はホウ酸の結合部位である細胞壁ペクチン質多糖 RG-II の既知の合成酵素遺伝子群と共発現していることが明らかにされており、RG-II 合成に関与する酵素群をコードすることが考察された。

これまで植物の種間や品種間でホウ素の要求量は異なることが知られ、ホウ素の作用点である細胞壁ペクチン含量との相関が記述されていたものの、その制御をつかさどる遺伝的な基盤は明らかになっていなかった。本研究で同定された遺伝子変異は、植物体でのホウ素要求量を制御する遺伝子として初めて同定されたものであり、RG-II 量や構造を制御する遺伝子変異であると考察される。加えて、本研究においては必須ミネラル栄養の要求量を低下させる遺伝子資源を同定する新たな方法論を提唱することができたと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Fukuma, K., Fujiwara, T., Miwa, K. “A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*.” XVII. International Plant Nutrition Colloquium, Istanbul Convention and Exhibition Center (Turkey), 19-22 Aug

- 2013
2. Fukuma, K., Fujiwara, T., Miwa, K.
 "Identification of a novel gene to reduce boron requirement in *Arabidopsis thaliana*." BORON2013, Marmara Taksim Hotel (Turkey), 17-18 Aug 2013
 3. Fukuma, K., Fujiwara, T., Miwa, K.
 "Identification of a novel gene to reduce boron requirement in *Arabidopsis thaliana*." International Workshop on Plant Membrane Biology XVI, Kurashiki Geibunkan (Okayama), 26-31 Mar 2013
 4. 福間健、藤原徹、三輪 京子「植物のホウ素要求量を低下させる遺伝子の同定」第54回日本植物生理学会年会、岡山大学(岡山県)、2013年3月21日-23日
 5. 三輪京子「真の栄養欠乏耐性を目指して～栄養利用効率を制御する遺伝子同定の試み～」、日本土壌肥料学会 2012 年度鳥取大会シンポジウム、鳥取大学(鳥取県)、2012年9月6日

〔図書〕(計 2件)

1. Fukuma, K., Fujiwara, T., Miwa, K.
 (2013). "A novel strategy for identification of genes to improve boron use efficiency in *Arabidopsis thaliana*." XVII. International Plant Nutrition Colloquium and Boron Satellite Meeting Proceedings Book, pp 51-52, Sabanci University, Istanbul. ISBN 978-605-4348-62-6.
2. Fukuma, K., Fujiwara, T., Miwa, K.
 (2013). "Identification of a novel gene to reduce boron requirement in *Arabidopsis thaliana*." XVII. International Plant Nutrition Colloquium and Boron Satellite Meeting

Proceedings Book, pp 1100-1101, Sabanci University, Istanbul. ISBN 978-605-4348-62-6.

〔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