

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26450078
研究課題名(和文)植物細胞壁におけるホウ素の生理機能解明

研究課題名(英文)Function of boron in plant cell walls

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物の必須元素ホウ素(B)は、細胞壁でペクチンを架橋しゲル化させる役割を担っている。しかしこのゲルの機能は完全には理解されていない。本研究では、ペクチン内部のB結合部位であるRG-IIの合成阻害がシロイヌナズナにもたらす影響を解析した結果、RG-IIは、それが正常に合成されなければ細胞壁全体の構築が進行しない重要な構成要素であることが明らかとなった。またRG-IIがBで架橋されない場合、細胞壁強度の低下が引き金となり、病原菌感染時の過敏反応と類似した細胞死が誘導されることが示唆され、B-RG-IIの生理的重要性が改めて示された。

研究成果の概要(英文)：Boron as an essential micronutrient for vascular plants occurs in cell walls, and cross-links pectin to form a gel. To get insights on physiological function of this gel in cell walls, we analyzed the phenotype of Arabidopsis mutant that was considered to be inhibited in biosynthesis of pectic RG-II, which is the site of borate-crosslinking. The mutant showed decreased cell division and elongation probably due to retarded formation of cell wall, but the mutant cell wall contained RG-II at a similar level to wild type, suggesting that defective cell wall without RG-II could never be formed. In addition, when RG-II was not properly cross-linked with B under B deficient condition, an cell death similar to hypersensitive cell death occurred immediately in the root elongation zone. These findings together demonstrate the physiological importance of boron-RG-II cross-linking.

研究分野：植物栄養学

キーワード：植物 ホウ素 細胞壁 ストレス ペクチン 細胞死

1. 研究開始当初の背景

ホウ素 (B) は植物の必須元素の中でも特に欠乏が発生しやすい元素であり、我が国でも様々な作物で欠乏症の発生事例が報告されている。植物体中の B は細胞壁に局在し、ペクチンのラムノガラクトナン II (RG-II) 領域を架橋することでペクチンをゲル化させ、細胞壁に保持する役割を果たしている。シロイヌナズナを B 不含培地に移し B による RG-II 領域の架橋形成を阻害すると、根端で 1 時間以内に活性酸素の蓄積と細胞死が発生する。このことは、B と RG-II の会合で形成されるペクチンゲルが生理的に極めて重要性であることを明示している。しかしそのゲルが細胞壁において実際いかなる機能を果たしているかは依然として不明であり、さらなる解析が必要であった。

2. 研究の目的

植物における B の生理機能をより良く理解することは、B 欠乏障害による作物生産の損失を防ぐ手法を開発するために不可欠である。そこで本研究では、B-RG-II 架橋構造が植物の細胞壁で果たす役割を明らかにすることを目的として、(1) B-RG-II 架橋形成の攪乱に対する植物の応答の解析、(2) B-RG-II 架橋の形成過程の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) B-RG-II 架橋形成の攪乱に対する植物の応答の解析

B の欠乏で架橋が形成できない場合の植物の応答を解析するため、無菌液体培養したシロイヌナズナを B を含まない培地に移植し、1 時間後に活性酸素蓄積、細胞死、遺伝子発現等を観察した。またその際、各種阻害剤の培地添加で細胞死が軽減されるか検討することで、この B 欠乏初期応答の発生メカニズムを推定した。

また、架橋されるべき RG-II 側の異常が及ぼす影響について検討するため、構成単糖 2-ケト-3-デオキシマンノオクトン酸 (KDO) の合成を阻害し、表現型を解析した。具体的には、KDO 合成経路を構成する酵素の一つ CTP:KDO シチジリル転移酵素 (CKS) を RNAi 法で発現抑制し、生育や細胞壁組成について解析した。

(2) B-RG-II 架橋の形成過程の解析

ペクチンの B-RG-II 架橋が細胞壁形成のどの段階で形成されるか明らかにするため、細胞分裂時に形成される構造であり細胞壁前駆体に相当する細胞板に RG-II が存在するか、免疫組織化学的手法で検討した。材料としてはタバコ培養細胞 BY-2 及びシロイヌナズナを用いた。

また B も細胞板に存在するか検出する手段として、ホウ素中性子捕捉反応の *in situ* イメージングへの適用を検討した。

4. 研究成果

(1) B 欠除処理は過敏感反応様の応答を誘導する

シロイヌナズナを B 不含培地に移植すると 1 時間以内に根端伸長領域で細胞死が発生する。このとき細胞死が生じる領域には活性酸素分子種 (ROS) が蓄積していること、また欠除処理の際に、スーパーオキシドアニオンラジカルのスカベンジャー、あるいは細胞膜 NADPH オキシダーゼの阻害剤を添加すると細胞死が抑制されたことから、この急速な B 欠乏応答に ROS が直接関与していることが確認された。また細胞膜カルシウムチャンネルブロッカーによっても細胞死は抑制され、細胞外からのカルシウム流入の関与も示唆された。B はペクチンを架橋しゲル化させる構造的役割を果たしているため、その欠乏は細胞壁の強度低下を招くと考えられる。上述のような B 欠除処理に対する即時応答に細胞壁の強度低下が関与しているか検討するため、培地にソルビトールを添加して浸透圧を高め、細胞内への水の流入を抑制して膨圧を低下させると、欠除処理に伴う細胞死は軽減された。以上の結果から、B 欠乏は細胞壁の強度低下による細胞の体積増加と細胞膜の局所的伸展をもたらし、それが伸展活性化カルシウムチャンネルを開口させることで ROS 生成を含む一連の応答が生成すると推定した。

B 欠除処理根の伸長領域では一酸化窒素 (NO) の生成の亢進が見られた。また NO 合成阻害剤、NO スカベンジャーがいずれも細胞死を効果的に抑制したことから、B 欠乏誘導細胞死には NO も必要であることが示された。NO は植物の感染応答において ROS と協調して抵抗反応を誘導・制御するシグナル分子である。したがって、B 欠除処理で 1 時間以内に誘導される細胞死は、感染応答における過敏感細胞死と共通の機構により誘導されるのではないかと考えた。

上記の推定を検証するため、RNA シークエンシングにより B 欠除処理根における遺伝子発現変化を解析した。発現量が変化した遺伝子群の機能を gene ontology 解析で推定したところ、生物学的ストレス応答に関与する遺伝子が多く含まれていた。また gene set enrichment analysis の手法を用いると、B 欠除処理で 1 時間以内に誘導される遺伝子群は、エリシターの一つであるキチン処理で誘導される遺伝子群との重複が大きいことが示された。これらの結果から、B 欠乏に対する初期応答と感染応答の類似性がより強く示唆された。

(2) RG-II の合成阻害は細胞壁全体の構築を遅延させる

RG-II の合成を阻害する目的で、RG-II の特異的構成糖である KDO の合成を抑制

しようと考えた。このために KDO 合成経路の酵素の一つ CKS を RNAi 法で発現抑制したところ、プレート培養における根の伸長抑制、液体培養における新鮮重蓄積の低下など、著しい生育阻害が見られた。この生育阻害の原因を明らかにするために根端伸長の速度論的解析を行なった結果、RNAi 株では細胞分裂および細胞伸長の双方が抑制されていた。しかし RNAi 株の細胞壁を分析すると、KDO 含量や B 含量に野生型株との有意な差は見られなかった。このことから、CKS RNAi による KDO の供給低下は細胞壁合成を律速し生育を低下させるが、KDO を欠く異常な RG-II、あるいは RG-II 領域を持たない細胞壁は合成されないことが示唆された。

(3) RG-II は細胞壁の形成初期段階から存在する

抗 RG-II ポリクローナル抗体を用いてタバコ培養細胞 BY-2 の免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、分裂中の細胞の中央部にシグナルが観察された。また免疫蛍光染色の手法を用い、そのシグナルが細胞板のマーカ分子であるカロースと近接して存在することを確認し、細胞板に RG-II が存在することを示した。シロイヌナズナ根端分裂域の細胞でも同様の結果が得られた。更に、新たに作成した抗 RG-II ウサギモノクローナル抗体でも細胞板にシグナルが検出された。このことから、RG-II は細胞壁形成の初期段階から存在する架橋要素であることが示唆された。

細胞板に検出される RG-II が B で架橋されているか解析する方法として、ホウ素中性子捕捉法による B の *in situ* 可視化法を植物組織に適用することを試みた。この方法では、組織切片を特殊なプラスチック板に貼り付けて中性子線を照射し、組織中の B 原子核が中性子を捕捉して核崩壊する際に放出される線を、プラスチック板上の痕跡として検出する。まずハツカダイコン根の凍結切片を用いて検討した結果、組織中の B に由来するシグナルを検出することができた。特に維管束周辺で強いシグナルが得られ、根の横断面の中で B の分布は均一ではなく、比較的濃度の高い組織と低い組織があることが明らかとなった。このように本法は組織レベルの B の分布を解析する手法として十分に利用可能と判断された。一方で、現状では細胞レベルでの観察には解像度が不足しており、手法の最適化が必要と考えられた。しかし中性子線照射に利用する京都大学原子炉実験所の研究炉が、定期検査のため運転を一時停止したのち、原子力規制委員会の安全審査基準の変更と適合審査の遅れにより運転再開に至らず、上記の条件検討はほとんど実施できなかった。

以上の結果をまとめると、RG-II は細胞分裂に伴って形成される最初期段階の細胞壁にすでに存在し、その形成はペクチンのみならず細胞壁全体の構築に不可欠な段階であることが示唆された。さらにその RG-II が B で架橋されなければ、細胞壁強度の低下を招き、過敏反応に類似した細胞死が誘導されることも明らかになった。これらの知見から、B と RG-II により形成されるペクチン架橋構造の生理的重要性が改めて確認された。

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 2 件)

Ye Zhou, Tatsuya Awano, Masaru Kobayashi, Toru Matoi and Keiji Takabe (2017) Immunocytochemical detection of rhamnogalacturonan II on forming cell plates in cultured tobacco cells. *Biosciences, Biotechnology, and Biochemistry* **81**: 899-905

DOI: 10.1080/09168451.2016.1270740

Masaru Kobayashi and Tadatoshi Kinouchi (2015) *In situ* visualization of boron in plants using neutron capture radiography. KURRI Progress Report 2014 p129

<http://www.rri.kyoto-u.ac.jp/PUB/report/PR/ProgRep2014/CO6.pdf>

[学会発表](計 13 件)

宮本真亜子、小林優、間藤徹、北島佐紀人、花野滋、I Nyoman Sumerta、櫻井望、柴田大輔「シロイヌナズナにおけるホウ素欠乏初期応答の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会 京都市 (2017 年 3 月)

清水寿朗、野口瑞木、小林優、間藤徹「シロイヌナズナにおける D-アラビノース-5-リン酸合成酵素候補遺伝子の発現抑制株の解析」日本植物生理学会第 58 回年会 鹿児島市 (2017 年 3 月)

小林優「植物細胞壁ペクチンは何をしているのか? 肥料学からみた植物細胞壁」生物資源・次世代農業セミナー「循環型炭素資源 — 植物細胞壁の研究」立命館大学 びわこくさつキャンパス (2017 年 1 月)

Masaru Kobayashi “Function of boron in plant cell walls” Humanosphere Science School 2016, インドネシア共和国ボゴール市 (2016 年 11 月)

Masaru Kobayashi “Early responses of Arabidopsis plants to boron deprivation” International Workshop on Soil-Plant-Microbe Interaction 岡山県倉敷

市（2016年12月）

小林優「ハウ素の結合座ラムノガラクトツロナンIIの変異株の解析」第2回植物の栄養研究会 名古屋市（2016年9月）
宮本真亜子、小林優、間藤徹「ハウ素欠除に対するシロイヌナズナ根の初期応答の生成メカニズムの解析」日本植物生理学会第57回年会 岩手県盛岡市（2016年3月）

野口瑞木、小林優、間藤徹「シロイヌナズナにおけるD-アラビノース-5-リン酸生合成酵素の候補遺伝子の解析」日本植物生理学会第57回年会 岩手県盛岡市（2016年3月）

小林優「植物のハウ素・カルシウム欠乏応答：細胞壁の異常はどう感知されるか？」第1回植物の栄養研究会 東京都（2015年9月）

原朋美、王櫻霖、小林優、間藤徹「ハウ素ラムノガラクトツロナンII複合体の機能に関する研究－特異的構成糖KDOの合成経路とその変異株の解析－」日本土壤肥料学会 2015年度京都大会 京都市（2015年9月）

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56回年会 東京都（2015年3月）

木野内忠稔、田中浩基、小野公二、小林優「中性子捕捉反応を利用した植物におけるハウ素の動態について」京都大学原子炉実験所 第49回学術講演会 大阪府泉南郡熊取町（2015年1月）

青木亮輔、小林優、間藤徹、岩元明敏、松永俊朗「ハウ素ラムノガラクトツロナンII複合体の機能に関する研究－特異的構成糖KDOの合成抑制株の解析－」日本土壤肥料学会 2014年度東京大会 東京都府中市（2014年9月）

〔図書〕(計 1 件)

石井忠 他編、弘前大学出版会、植物細胞壁実験法、2016、273（分担執筆）

〔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

(2)研究分担者

木野内 忠稔 (KINOUCHI, Tadatashi)