

研究課題別評価

1 研究課題名:ホウ素の輸送を利用した生物制御と環境浄化

2 研究者氏名:藤原 徹

研究員:野澤 彰 (研究期間 平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月)

研究員:横井裕子 (研究期間 平成 15 年 5 月～平成 18 年 3 月)

研究員:Fangsen Xu (研究期間 平成 17 年 4 月～平成 17 年 9 月)

3 研究のねらい:

ホウ素は環境中に比較的多く存在する元素である。ホウ素は植物の必須元素であるが、ホウ酸は容易に溶脱するため、世界の多雨地域ではホウ素欠乏傾向が、乾燥地では過剰集積がおこりやすく植物の生育を阻害する。このような問題を解決する方法として、生物によるホウ素の吸収や蓄積を制御することが考えられる。ホウ素の輸送を制御することなどによって、ホウ素が少なくとも多くても生育する作物を開発したり、ホウ素を集積する生物を得ることができれば、環境からのホウ素の除去が可能となると考えられる。本研究ではホウ素輸送体 BOR1 やその相同遺伝子、あるいは他の輸送タンパク質を用いて、生物におけるホウ素の環境からの取り込み、生体内での移動機構を理解し、人為的に制御する技術を開発することを目的とした。

4 研究成果:

①BOR1 遺伝子の真核細胞での発現などによるホウ素輸送の分子機構の解析

BOR1cDNA を酵母で発現させ、培地のホウ素濃度を様々に変化させ、ホウ素輸送能を検討した。広い範囲のホウ素濃度で BOR1 は酵母細胞内のホウ素濃度を低下させる能力があることが明らかになった。また、BOR1 を発現する酵母細胞はホウ素を多く含む培地での増殖が、BOR1 を発現させない細胞に比べて改善することが明らかになった。これはホウ素の輸送を制御することで細胞の増殖を制御した初めての例である。酵母だけでなくほかの生物にも応用できる可能性が考えられる。

②BOR1 に相同な遺伝子の解析

シロイヌナズナのゲノムには BOR1 に相同な遺伝子が6個存在している。これらの遺伝子はアミノ酸配列の相同性が高く、これらの遺伝子もホウ素輸送体としてシロイヌナズナのホウ素の取り込みや体内輸送に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、これらの相同遺伝子について植物体における発現場所、ホウ素輸送活性、遺伝子破壊株の生育解析を行なった。

発現に関しては、それぞれの遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子であるβ-グルクロニダーゼ(GUS)や緑色蛍光タンパク質(GFP)に結合してシロイヌナズナに導入し、GUS や GFP の発現場所を指標にどの組織や細胞で発現しているかを解析した。活性は酵母を用いて検討した。

その結果、6 つの相同遺伝子の発現する組織は異なっていること、6つの遺伝子産物はいずれもホウ素輸送活性を持つこと、6つの遺伝子のうち BOR1にもっと配列が似ている BOR2は根の細胞壁へのホウ素輸送に重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得た。

③BOR1 遺伝子の発現制御機構

植物の無機元素トランスポーターは、そのトランスポーターが輸送する基質(イオン)の環境中の濃度によって発現制御を受けることが多い。このような制御は環境中のイオン濃度に応じて適当量(必要量)のイオンを取り込むために重要な仕組みであると考えられている。

BOR1 の場合、ホウ素栄養条件を変化させても BOR1 mRNA の蓄積量に違いは見られなかったが、タンパク質の蓄積量はホウ素栄養条件に応じて変化しており、ホウ素欠乏にさらされた植物では多くの BOR1 が蓄積していたのに対し、ホウ素を十分に与えられた植物では BOR1 の

蓄積が観察されなかった。このことは、BOR1 タンパク質の蓄積はホウ素栄養によって制御されており、その制御は mRNA の蓄積よりも後の段階(タンパク質の合成など)で制御されていることを意味している。

この現象を、さらに解析するために、BOR1 に緑色蛍光タンパク質(GFP)を連結し、形質転換シロイヌナズナで発現させ、そのホウ素栄養に応じた挙動を観察した。BOR1-GFP 融合タンパク質も BOR1 同様に環境中のホウ素濃度に応じた蓄積制御を受け、ホウ素欠乏条件では細胞膜に蓄積が見られるが、ホウ素を与えると2時間程度ですみやかに分解されること、また、分解の過程でBOR1-GFP を含むベシクル(膜で囲まれた小体)があらわれることが明らかになった。阻害剤等を用いた実験によって、この分解の過程はエンドサイトーシスの過程であり、最終的には液胞に運ばれて BOR1 タンパク質が分解されていることを示すことができた。

これは植物の細胞膜タンパク質の分解過程を明らかにした最初の例である。

④ *BOR1* 遺伝子の発現による植物の生育改善

前述の様に、*BOR1* 遺伝子を酵母で発現させると、ホウ酸の過剰に対して耐性を示すようになる。植物でも同様の改善が見られるかどうか試すために、BOR1 を過剰に発現する形質転換シロイヌナズナを作成した。得られたシロイヌナズナのホウ素過剰に対する耐性を検討したが、耐性は得られなかった。これはおそらく、ホウ素が環境中に多く存在すると BOR1 タンパク質が分解してしまうためであると考えられる。

しかし、予想に反して、得られた形質転換植物はホウ素欠乏条件での生育や結実が野生型の植物に比べて明らかに改善していた。形質転換植物のホウ素輸送を解析したところ、野生型植物に比べて、根へのホウ素の取り込みには大きな違いが見られなかったが、根から地上部へのホウ素輸送能力が高まっていることが明らかになった。このため、培地のホウ素濃度が低くても、ある程度の生育を維持できるようになったものと考えられる。

この成果は、ホウ素輸送の人為的な制御によって、植物の生育を改善させることができることを実証した画期的な成果である。

⑤ 動物の *BOR1* 相同遺伝子のホウ素輸送能の解析

BOR1 遺伝子と相同な遺伝子を10種類程度入手し、酵母で発現させ、BOR1 と同様のホウ素輸送活性を示すかどうか検討した。BOR1 に比べると活性は弱いものの、発現させることによって酵母のホウ素濃度を有意に変化させる動物の相同遺伝子があることが明らかになった。

⑥ ホウ素耐性微生物の単離

ホウ素は中性水溶液中では主に電荷を持たないホウ酸として存在するため、高い膜透過性を持っている。ホウ素のトランスポーターを利用してホウ素輸送をある程度制御できても、膜自体に透過性がある限りは、制御できる範囲には限界があるであろう。

そこで、より多様性に富むと考えられる細菌類にホウ素に対する透過性を持つものがあると考え、高いホウ素濃度でも生育できる細菌を、土壌から単離することにした。土壌由来の細菌の懸濁液を高いホウ素濃度の培地に塗布し、生育する菌を数種単離した。これらの菌の中には 300mM という飽和濃度に近いホウ酸にも耐性を示すものや、ホウ素が含まれている培地の方が生育が良い菌株などが含まれていた。また、16S rRNA 配列などを用いて菌の同定を行ったところ、新種と思われる菌が含まれていた。

このような高いホウ素濃度に耐える菌はこれまで単離されたことがなく、これらの菌の性質を調べることを通じて、これまででないホウ素の生物学を切り開くことができるのではないかと期待している。

⑦ ホウ素の毒性機構の解析

ホウ素過剰に対する耐性を持つ生物を作出するには、ホウ素輸送を制御する方法のほかに、ホウ素の生物に対する毒性の発現機構を明らかにし、それに対処する、という方法が考えられる。そこで、酵母を用いて、高濃度のホウ酸に対する耐性を付与するような遺伝子を検索した。

シロイヌナズナ由来の cDNA を用いたところ、数種の遺伝子を同定することができ、これらの遺伝子にはスプライシングに関与すると思われるタンパク質が含まれていた。そこで、ホウ酸の毒性発現機構はスプライシングの阻害にあるのではないかと考え、酵母のイントロンを含む遺伝子のスプライシングがホウ素によって阻害されるかどうか調べたところ、一部の遺伝子のスプライシングがホウ酸によって阻害されること、この阻害が酵母の増殖抑制の原因であること、スプライシングに関与する遺伝子の過剰発現によって、ホウ酸によるスプライシング阻害が緩和されることを見いだした。

この一連の研究は、ホウ素の過剰毒性の機構を分子レベルで明らかにした最初の例である。おそらく真核生物においては共通にホウ酸によるスプライシング阻害がおこるものと考えられる。一方、原核生物に対してもホウ酸は毒性を持っていることから、スプライシング以外にも高濃度のホウ酸によって阻害を受ける過程があることは明らかであり、このような過程を明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

⑧ホウ素の効率的な吸収に必須な輸送体の単離

BOR1 やその相同遺伝子は全て排出形のホウ素トランスポーターをコードしている。すなわち、これらのトランスポーターは細胞内のホウ素を細胞外へ排出する活性を持っている。細胞内へホウ素を取り込む時に機能するトランスポーターは同定されていなかった。

シロイヌナズナの根においてホウ素欠乏によって mRNA の蓄積量が変動する遺伝子をマイクロアレイ実験によって検索したところ、*NIP5.1* 遺伝子の RNA 蓄積量がホウ素欠乏で10倍以上に高まることが明らかになった。*NIP* 遺伝子はアクアポリンに相同性があり、ホウ素のような電荷を持たない分子の透過性を高める働きを持っている可能性が考えられた。

そこで、酵母を用いて *NIP5.1* のホウ酸透過性を調べたところ、*NIP5.1* の発現によってホウ酸の膜透過性が高まることが確認された。また、*NIP5.1* 遺伝子に変異を持つシロイヌナズナはホウ素欠乏条件での生育が野生形植物に比べて極端に劣ることを見いだした。これらの結果は *NIP5.1* がホウ素欠乏条件での細胞膜のホウ酸透過性を高め、植物のホウ素吸収に重要な役割を持つ膜タンパク質であることを意味している。

これまで知られていなかった、植物の細胞内にホウ素を取り込むことに関与する遺伝子を世界にさががけて同定することができた。

⑨モリブデン輸送体の単離

ホウ素に関する変異株の解析の過程で、シロイヌナズナの系統によって、モリブデンの含量が数倍違っていることが明らかになった。この違いを引き起こす遺伝的な原因を調べたところ、原因となる遺伝子は一つであり、硫酸トランスポーターに似た膜タンパク質をコードする遺伝子であることが明らかになった。

この遺伝子を酵母で発現させると、酵母におけるモリブデン吸収が10倍以上に増加し、また、この遺伝子に変異を持つシロイヌナズナは葉のモリブデン濃度が低下し、モリブデン欠乏条件での生育が極端に劣ることを見いだした。

この遺伝子は、真核生物で初めて同定されたモリブデントランスポーターである。モリブデンは酸化還元反応を司る複数の酵素の補酵素であり、その代表例として硝酸還元酵素を挙げることができる。ここで得られたモリブデンのトランスポーターを用いると、植物のモリブデンに対する栄養特性や窒素代謝の人為的な制御が可能になる可能性が考えられる。

5 自己評価:

本研究では生物界で初めて同定したホウ素のトランスポーターを起点として、ホウ素の輸送の制御だけでなく、輸送の制御を通じた生物の成長制御を提案した。*BOR1* の発現制御機構の解明、*BOR1* の相同遺伝子の解析、新たなホウ素輸送体の同定、ホウ素毒性と耐性機構の解明、ホウ素耐性微生物の単離と同定、さらには、ホウ素欠乏耐性植物の作出まで達成でき、全体としては研究をうまくすすめられたと考えている。また、モリブデンの輸送体を同定できたことは、新たな研究領域を広げるきっかけをつかめたと思う。その一方で、*BOR1* の活性の強化で

あるとか、動物のホウ素輸送体の研究については、当初の計画ほどの成果を挙げることはできなかったと反省している。今後は、今回の研究で得られた成果をさらに発展させるとともに、十分に達成できなかった部分については、今後さらに研究を進めていきたいと考えている。

本研究はさきがけ制度なくしては達成できなかった。ここに改めて御支援に感謝すると共に、研究者の自由な発想に基づく広い提案が可能なさきがけ研究を今後も推進して頂けるよう強くお願い致します。

6 研究総括の見解:

植物の必須元素であるホウ素について、その生物体内での輸送を司るトランスポーターを同定し、それをもとに研究を展開しており大きな成果を得ている。BOR1 の挙動の解明からホウ素の新たな輸送体を同定し、ホウ素毒性と耐性機構を解明し、さらにホウ素耐性微生物の単離・同定、ホウ素欠乏耐性植物の作出まで成功している点は高く評価できる。これもホウ素トランスポーターの同定で研究の中心的手段を独自にもち得たためともいえ、独自の手段をもつことの重要性を現実に立証しているといえよう。さらに研究途上での注意深い観察からモリブデンのトランスポーターの同定にも成功している。モリブデンは窒素代謝に重要な役割をもつなどいくつかの酵素で補酵素として機能しており、新たな研究分野をひらく可能性をもっている。このように全体として順調な研究の発展がみられているが、新しい分野の展開で常につきまとう予想外の展開に対して迷路に入ることなく研究をすすめられるよう他分野との接触とスコープの拡大を心がけてほしい。

7 主な論文等:

論文(国際 10 件)

- Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T. and Saito, K. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10205–10210 (2004)
- Ohkama-Ohtsu, N., Kasajima, I., Fujiwara, T. and Naito, S. Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates *O*-Acetyl-L-Ser. *Plant Physiol.* 136: 3209–3222 (2004)
- Aoki, N., Noguchi, K., Hayashi, H. and Fujiwara, T. Isolation and Characterization of a Novel *Arabidopsis thaliana* Mutant That Requires a High Concentration of Boron. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1183–1185 (2004)
- Nozawa, A., Takano, J., Miwa, K., Nakagawa, Y., Fujiwara, T. Cloning of cDNAs encoding isopropylmalate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* and accumulation patterns of their transcripts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 806–810 (2005)
- Takano, J., Miwa, L., Yuan, L., von Wirén, N., Fujiwara, T. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 34,12276–12281 (2005)

特許(国際 3 件、国内 4 件)

- 藤原徹 三輪京子 ホウ素トランスポーター及びその遺伝子(2004)
- 藤原 徹、野沢彰 ホウ酸耐性付与タンパク質及びその遺伝子(2004)
- 藤原 徹 戸松 創、高野順平モリブデントランスポーター及びその遺伝子(2005)
- 藤原 徹、和田素子、高野順平 ホウ素吸収促進遺伝子(2005)

受賞

日本植物生理学会奨励賞(2004)

口頭発表(国際 26 件、国内 34 件)

- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T Boron transporter for xylem loading from *Arabidopsis* International Plant Molecular Biology Meeting (2003)
- 野澤 彰、藤原 徹 酵母にホウ酸耐性を付与するシロイヌナズナ遺伝子の探索 日本植物生理学会 2004 年年会
- Nakagawa-Yokoi Y, Kobayashi M, Takashima K, Shunli Z, Fujiwara T. Roles of rice *BOR1-like genes* in boron transport BORON2005 meeting, Wuhan, China (2005)
- K. Miwa, J. Takano, T. Fujiwara Roles of *BOR1* paralogs in boron transport in *Arabidopsis thaliana* International Plant Nutrition Colloquium (2005)
- 三輪京子、高野順平、藤原 徹シロイヌナズナのホウ素輸送体 BOR1 遺伝子群の機能解析と応用 イネ・シロイヌナズナワークショップ 2005(奈良)

その他の出版等(国内 7 件)

- 三輪 京子, 高野 順平, 藤原 徹 ホウ素トランスポーター植物細胞工学 (2003)
- 藤原 徹、野澤 彰 植物によるホウ素の吸収と移行 季刊 肥料 96号 71-76 (2003)
- 三輪 京子, 藤原 徹ホウ素トランスポーターの同定と植物のホウ素輸送における役割 BrainTechno News (2003)
- 藤原 徹シロイヌナズナのホウ素トランスポーターBOR1 のホウ素輸送における役割根の研究(2004)
- 藤原 徹、江口 享、松永 俊朗、間藤 徹作物のホウ素栄養 日本土壤肥料学雑誌(2004)

招待講演等(国際 2 件、国内 7 件)

- 藤原 徹 植物によるホウ素の吸収と輸送日本土壤肥料学会2003年シンポジウム(名古屋)
- 高野順平、藤原 徹 ホウ素輸送体 BOR1 の同定と制御 植物生体膜シンポジウム(2004)東京
- 藤原 徹 ホウ素トランスポーターの同定と解析日本植物生理学会年会日本植物生理学会奨励賞受賞講演 (2004)東京
- 藤原 徹、高野順平、三輪京子、小林正治、中川裕子、野澤 彰、和田素子生物界で初めて単離されたシロイヌナズナホウ素トランスポーターBOR1 第 77 回日本生化学会大会、シンポジウム
- Takano J, Nozawa A, Miwa K, Nakagawa-Yokoi Y, Wada M, Kasajima I, Hanaoka H, Goshio T, Fujiwara T, Regulation of gene expression in response to B availability in the environment. Boron2005, Wuhan, China, September 2005