

# ホウ素の輸送を利用した生物制御と環境浄化

「変換と制御」領域 藤原 徹

## 要 旨

本研究はホウ素輸送体の研究を通じて、生物におけるホウ素輸送を制御することを目的として行った。ホウ素栄養条件によってホウ素輸送体の蓄積が制御されていること、ホウ素輸送に関与する新たな輸送体を複数同定したこと、ホウ素輸送体発現を人為的に調節することによって、ホウ素欠乏条件での植物の生育の改善に成功した。また、これらの研究を通じて、真核生物ではじめてのモリブデンの輸送体の同定に成功した。

## 1 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。ホウ素は水溶性のホウ酸として生物に吸収される。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、ホウ素欠乏地帯は多雨地域を中心に世界に広がっている。乾燥地では、逆にホウ酸の過剰集積が問題となる。また、発電所の焼却灰にはホウ素が高濃度で含まれ、環境問題となったり、地域によっては飲用水からホウ素の除去が必要である場合がある。

このような問題を解決するには、生物によるホウ素の吸収や蓄積を制御することができればよい。ホウ素が少なくても多くても生育する作物を開発したり、環境水中のホウ素を吸収し集積する生物を得ることができれば、ホウ素の除去が可能となる。

しかし、生物界ではホウ素のトランスポーターは同定されていなかったため、生物のホウ素吸収や輸送を制御することは不可能であった。私たちは本研究開始時点までにシロイヌナズナのホウ素要求性変異株(図1)を用いて *BOR* 遺伝子を単離した。*BOR1*は10個の膜間通領域を持つ膜タンパク質であり、ホウ素の積極的な輸送活性を持つことを明らかにしてきている。*BOR1*は生物界で初めて単離されたホウ素輸送体であり、相同遺伝子は植物だけでなく、微生物、動物を含めた真核生物に広く存在している。

本研究は生物界ではじめて同定されたホウ素輸送タンパク質 *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。このような技術の

開発によって、植物の生産性を高めたり、微生物を用いて、ホウ酸の除去を行なうなどの効果が期待される。本研究では、これらの目的に対して以下に述べるような一定の成果を挙げることができたと考えている。



図1 シロイヌナズナの *bor1-1* 変異株 (左) 野生型のシロイヌナズナ (右) を低ホウ素条件で栽培したもの。変異株は地上部の生育が劣っている。ホウ素を十分に与えると、両者は同様の生育を示すようになる。

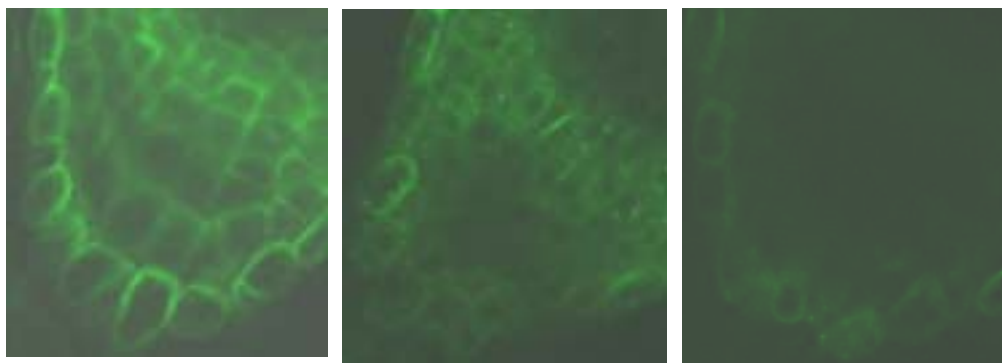


図2 BOR1-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナをホウ素欠乏にさらした後、ホウ素を与え、根端の GFP 傾向を経時的に観察したもの。ホウ素欠乏にさらすと (左) 蛍光は細胞の周辺に観察されるが、ホウ素を与えて1時間後 (中) には、細胞の周辺の蛍光が弱まり、細胞内にドット状のオルガネラが現れるようになる。2時間経つと (右) 蛍光はほとんど観察されなくなる。

## 2 研究成果

### BOR1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

*BOR1*cDNA 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。

電気生理学的な実験によく用いられるアフリカツメガエルの卵母細胞で *BOR1* を発現させ、各種条件で電流が観察されるようになるかどうかを検討したが、現時点までには電流を観察することができていない。*BOR1* のホウ素輸送がホウ酸という電荷のない物質のみを輸送する性質をもっていたり、陰電荷を持つホウ酸アニオンを輸送していても、同時にプロトンなどを輸送していれば、全体としては電流が観察されない。結論づけることはできないが、*BOR1* の輸送はこのようなくみによっているのかもしれない。

### BOR1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  $\beta$ -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。

その結果、6つの相同遺伝子は異なる組織で発現していること、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* に最も配列が似ている *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。

また、イネについても *BOR1* 相同遺伝子の解析を行い、*BOR1* に最も相同性の高い遺伝子がイネのホウ素輸送を担っており、ホウ素欠乏条件での生育に重要な役割を担っていることを明らかにした。

### BOR1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 タンパク質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 タンパク質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（図 2）。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。

### 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（図 3）。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。

#### 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。

本研究の過程で、アメリカのグループがヒトの *BOR1* 相同遺伝子がホウ素輸送活性を持つことを発表した。*BOR1* の相同遺伝子は植物や真菌類だけでなく、動物においてもホウ素輸送活性を持つことが明らかになりつつある。

#### 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(図4)。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、これまでに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。

#### 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探索した。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、



図3 BOR1 を過剰発現するシロイヌナズナはホウ素欠乏での生育が改善する。野生型のシロイヌナズナ（左）と BOR1 を過剰発現する形質転換シロイヌナズナ（右）を低ホウ素条件（0.5 μM のホウ酸）で水耕栽培したもの。左の野生型のシロイヌナズナでは結実がみられないが、右の過剰発現体では結実している。

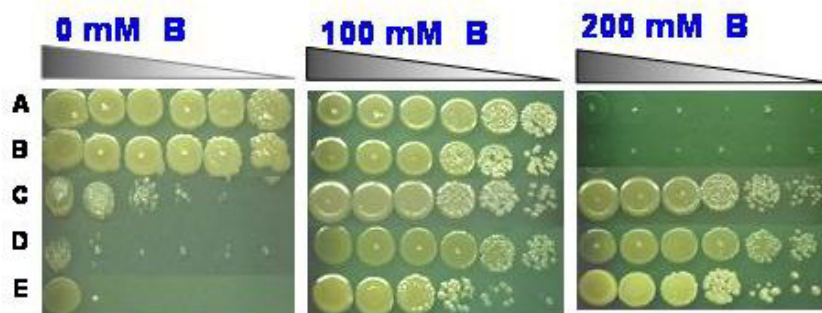


図4 ホウ素過剰耐性やホウ素要求性を示す各種菌株  
 土壌より採取したホウ素過剰耐性を持つ5種の単離系統について、ホウ素耐性や要求性を見たもの。図に示す濃度のホウ素を含む培地に5種類の系統を細胞密度を変えて（左が高く右が低い）培養したもの。200mMのホウ酸に耐え、かつホウ酸がある程度存在したときの方が生育が良い菌株が3種類得られた。

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。

#### 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 の蓄積量に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著しく（10倍以上）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* タンパク質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りかけて同定することができた。

#### 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。

### 3 今後の展開

*BOR1*遺伝子を足がかりに、植物におけるホウ素輸送に関する新たな分子を複数同定することができたばかりでなく、その制御機構を明らかにすることができた。また、高濃度のホウ酸に耐性を示す細菌の同定やホウ素の毒性機構の一端をあきらかにできた。さらには、モリブデン輸送体の同定という予期せぬ成果も得られた。

今後はこれらの分子の改変や栄養環境に応じた発現制御機構などの研究を行い、本研究で一定の成果を得ることができたホウ素輸送体を利用した生物の成育の制御（改善）の新たな手法等を開発していきたいと考えている。

### 4 謝 辞

本研究は、東京大学生物生産工学研究センターにおいて私とともに研究を楽しんだ多くの研究員や学生の協力なくしてはなし得なかったものである。特に、本報告書は、高野順平、三輪京子、小林正治、野澤彰、横井（中川）裕子、戸松創、Iftikhar Ahmed、和田素子、田中真幸の各氏の成果を中心に記したものである。また、研究を支えて下さった河原祐子、相澤加代子、菅澤茉央の各氏にもこの場を借りて深く謝意を表したい。さらに、本研究は国内外の研究グループとの共同研究によって大きく発展したものであり、Nicolaus von Wiren 博士、Uwe Ludewig 博士に特に感謝する。また、研究材料を提供して下さいました理化学研究所やシロイヌナズナストックセンターにこの場を借りて感謝申し上げます。

### 研究成果リスト

#### （発表論文）

1. Fukuda, A., Okada, Y., Suzui, N., Fujiwara, T., Yoneyama, T. and Hayashi, H. Cloning and characterization of the gene for a phloem-specific glutathione S-transferase from rice leaves. *Physiol. Plant.* 120:595-602 (2003)
2. Tanaka, Y., Fukuda, A., Nagai, S., Fujiwara, T., Suzuki, Y., Yamaguchi, I., Yoneyama, T. and Hayashi, T. Expression of a single-chain antibody against GA19/24 in vascular tissues induces dwarf phenotype for rice plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1281-1285 (2004)
3. Kasajima, I., Ide, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. A



- Protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR Analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22:49-52. (2004)
- 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)
  - Fukuda, A., Okada, Y., Suzui, N., Fujiwara, T., Yoneyama, T. and Hayashi, H. Cloning of the Phloem-Specific Small Heat-Shock Protein from Leaves of Rice Plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1255-1262 (2004)
  - Sogawa, Y., Ohkama-Ohtsu, N., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. Independent roles of glutathione and *O*-acetyl-L-serine in regulation of sulfur-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol.* 22: 51-54 (2005)
  - 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)

#### ( 特許出願 )

- 藤原徹、三輪京子 ホウ素トランスporter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porter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)

#### ( 学会発表 )

- 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 Barcelona, June 2003
- Fujiwara, T., Takano, J., Miwa, K., Kobayashi, M., Nozawa, A., Nakagawa, Y., Boron Transport

and Boron Tolerance in *Arabidopsis thaliana* XII International Symposium on Iron Nutrition and Interaction in Plants, Tokyo, April 2004

3. Fujiwara, T., Takano, J., Miwa, K., Kobayashi, M. Identification and Characterization of Boron Transporters. HFSP meeting in Hakone, Hakone, May 2004
4. Fujiwara, T., Miwa, K., Nakagawa, Y., Kobayashi, M., Nozawa, A., Takano, J. Roles of BOR1 homologs in B transport 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, July 2004
5. Miwa, K., Takano, J., Hayashi, H., Yoneyama T, Seki M, Shinozaki K, Fujiwara, T. Roles of At3g62270, a BOR1 paralog, in boron transport in *Arabidopsis thaliana* 13<sup>th</sup> International Plant Membrane Biology Meeting, Montpellier, June 2004
6. Tomatsu, H., Takano, J., Takahashi, H., Fujiwara, T. Regulation of Mo transport in plants Gordon Conference, Molybdenum & Tungsten Enzymes, July 2005
7. Fujiwara, T., Kobayashi, M., Takano, J., Miwa, K., Nozawa, A., Nakagawa, Y., Wada, M., Goshō, T. Molecular dissection of Boron Transport in *Arabidopsis thaliana*. 15<sup>th</sup> International Plant Nutrition Colloquium, Beijing, September 2005

#### ( 受賞 )

植物生理学会奨励賞2004年

#### ( 著作物 )

1. 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)
2. 藤原 徹、野澤 彰 植物によるホウ素の吸収と移行 季刊 肥料 (2003)
3. 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)