

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

藤原 徹

東京大学生物生産工学研究センター PRESTO, JST

要 旨 : ホウ素は土壌溶液からホウ酸として吸収され地上部に送られると考えられている。シロイヌナズナ *bor1-1* 変異株の原因遺伝子として、ホウ素トランスポーターBOR1 が同定された。BOR1 を酵母で発現させると、細胞内のホウ素濃度が低下することから、BOR1 はホウ素の排出型トランスポーターであると考えられる。BOR1 は根の内鞘で発現しており、BOR1 遺伝子に変異をもつシロイヌナズナ *bor1-1* 変異株では、地上部への積極的なホウ素輸送が見られなくなることから、BOR1 は土壌からアポプラスと及びシンプラストを經由して中心柱まで輸送されてきたホウ素を、地上部への輸送のために導管へと積極的にシンプラストから排出するために必須なトランスポーターであると考えられる。BOR1 は生物界で初めて単離されたトランスポーターであり、生物のホウ素輸送の分子機構を解明するきっかけになるであろう。

キーワード : ホウ素, 内鞘, シロイヌナズナ, トランスポーター

Role of BOR1, an Arabidopsis boron transporter, in boron transport in plants - : Toru FUJIWARA (Biotechnology Research Center, The University of Tokyo; PRESTO, JST)

Abstract : Boron is considered to be taken up by plants in the form of boric acid and transported to aerial portions. A boron transporter, BOR1, was isolated with the use of *Arabidopsis thaliana* mutant *bor1-1*. Expression of BOR1 in yeast cells reduced B concentration in the cell, suggesting that BOR1 is an efflux type transporter of B. BOR1 is expressed in pericycle in the root of the wild type plants and *bor1-1* mutant plants do not exhibit active B transport to aerial portions of plants. Our physiological analysis suggested that in the roots of *Arabidopsis*, B is passively transported from soil solution to stele and transported actively in to xylem to be translocated to aerial portions of plants. BOR1 is a B-efflux transporter responsible for the active loading of B to xylem. BOR1 is the first B transporter identified in the living systems and will be a key molecule for the understanding of molecular mechanisms of B transport..

Keyword : *Arabidopsis thaliana*, Boron, Pericycle, Transporter

1. はじめに

ホウ素が植物の必須元素であることが示されたのは1923年である(Warington, 1923)。それ以来長く、植物の必須元素で動物には必須ではないと考えられてきたが、最近、ホウ素が動物にも必須であることが示された (Rowe and Eckhert, 1999)。一方、ホウ素の生物における輸送機構や輸送を担う分子についての知見は限られていた。ここでは、筆者らがシロイヌナズナから生物界ではじめて単離したホウ素トランスポーターBOR1 (Takano et al., 2002) の紹介を通じて、植物の根におけるホウ素の輸送機構を紹介したい。

2. ホウ素の分布と植物における役割

ホウ素は岩石にホウ砂 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) など

として含まれている。雨水によって、土壌や岩石から溶出され、河川水や水道水には0から0.5ppm程度の濃度で含まれており、これらのホウ素は海水中に蓄積する。海水の平均ホウ素濃度は5ppm程度である。このような性質があるため、一般に降雨量の多い地域ではホウ素が土壌から溶出しやすく、逆に乾燥地などではホウ素が土壌に蓄積しやすい。世界にはホウ素欠乏地帯と過剰地帯が広がっているが、欠乏地帯は一般に降水量が多く、過剰地帯は少ない。中国では、揚子江周辺から南部にかけて広大なホウ素欠乏地帯が広がっており、綿花やナタネの主要な収量阻害要因となっている。米国のカリフォルニアやオーストラリアにはホウ素過剰地帯が広がっている。ホウ素欠乏症や過剰症は作物の収量だけでなく品質に悪影響をもたらすの

2004年5月20日受付

*連絡先 〒113-8657 文京区弥生1-1-1 東京大学生物生産工学研究センター 植物機能工学研究室
Fax: 03-5841-2408 E-mail: atorufu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

で、農業生産にとって重要な問題である。

必須元素が「必須」であるのは生体成分の構成元素となるか、生体における必須な生化学反応の必須因子となるか、いずれかであると考えられる。ホウ素の場合、植物の生育にホウ素を与える必要があることは、長く知られていたが、どのような生体成分に含まれているかについては、1990年代になってようやく明らかにされた。ホウ素は通常状態では植物の細胞壁に局在するが、細胞壁の構成成分であるラムノガラクトソロンIIのアピオース残基と結合することが示された(4) Kobayashi et al., 1996; Ishii and Matsunaga, 1996; O' Neill et al., 1996)。また、ラムノガラクトソロンIIとホウ素の結合がシロイヌナズナの葉の正常な展開に必須であることが示されている(O' Neill et al., 2001)。

3. 植物によるホウ素の輸送機構

ホウ素は植物の必須元素の中では至適濃度範囲が比較的狭いことが知られている。欠乏症状が出るホウ素濃度と過剰症状の出るホウ素濃度の差が、他の元素に比べて小さいのである。これまで長年、ホウ素の膜輸送は受動的であり、ホウ酸の受動拡散がそのメカニズムであると考えられてきており(Marschner, 1995)。これが、ホウ素の至適濃度範囲が狭い主な原因であると考えられてきた。その一方で、植物によるホウ素の吸収量は植物種や、同じ植物主でも品種間で異なっている(Nable et al., 1997)。例えば、同一条件下で栽培した大麦の品種間ではホウ素の蓄積量に7倍の差が見られることが報告されている(Nable 1988)。これら品種間においては水利用効率の差はみられず、受動拡散で取り込まれたホウ素が蒸散流によって地上部へ移行するとするならば、受動拡散に大きな品種間での差があることになる。

1990年代の後半から、植物におけるホウ素輸送の研究が大きく進展し、ホウ素の膜輸送には三つの分子メカニズムがあると考えられるようになってきている。三つの分子メカニズムとは、ホウ酸の脂質二重層を介した拡散、Major Intrinsic Proteins (MIPs)によるホウ酸の促進的な受動輸送、および、ホウ素トランスポーターによる積極的な輸送である。以下ではこれらのうち、筆者らの発見したトランスポーターを介した輸送機構について、トランスポーター遺伝子の発見の経緯を含めて紹介したい。

4. 植物によるホウ素の積極輸送の発見

ICP-MSによるホウ素の高感度検出が可能になり、低濃度領域でのホウ素の吸収の研究が行われた結果、植物は他の必須元素と同様に、ホウ素を積極的に吸収し地上部へ輸送していることが明らかになった。Dannelら(Dannel et al., 2000)はヒマワリを用いたホウ素のトレーサー実験を行なった。低ホウ素濃度(1 μ M)の培地でホウ素欠乏処理を行った植物においては、根の水溶性画分に取り込まれたホウ素の濃度が培地中のホウ素濃度より顕著に高く、導管液のホウ素濃度は根の水溶性画分よりもさらに高かった。同様の実験を高ホウ素濃度(100 μ M)で生育させた植物で行った場合には、このような濃縮はみられなかった。従って、ヒマワリはホウ素を積極的に根に取り込み、積極的に地上部へ輸送する機構を持つこと、この機構がホウ素欠乏誘導性であることを明らかにした。

このホウ素の吸収の K_m は15 μ M程度と推定されているDannel(Dannel et al., 2001)同様な結果はシャジクモにおいても得られており(Stangoulis et al., 2001)、 K_m を約2 μ Mと推定している。これらの K_m 値は、他の必須元素イオンの高親和性輸送機構の K_m 値と同程度であり、植物にホウ素の高親和性の輸送系があることを意味している。

5. シロイヌナズナ変異株 *bor1-1* の単離

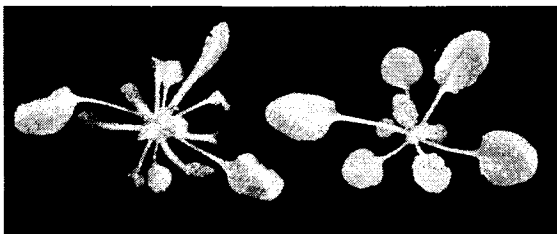
ホウ素の積極輸送はどのようなトランスポーターによって担われているのであろうか？植物のトランスポーターのほとんどは、動物や酵母のトランスポーターの知見や変異株を利用して単離されてきた。遺伝子配列の相同性に基づく推定と、酵母の輸送体遺伝子の変異株の植物遺伝子による相補実験である。しかし、ホウ素の場合にはこれまでトランスポーターは生物界を通じて同定されておらず、他の生物由来の情報を用いて植物のホウ素トランスポーターを同定することは不可能であった。

そこで考えられる手法としては、植物のホウ素吸収の変異株を同定することであった。ホウ素欠乏にさらされた植物の症状はこれまでよく研究されており、ホウ素トランスポーターに異常を持つ変異株が仮に得られた場合に、どのような表現型を示すかはある程度推測できるものの、一般に植物は特定の元素のトランスポーターを複数持っており、ある遺伝子の欠損変異株が、野生型の示す欠乏症状と似た症状を示す保証は無い。目的とするイオンに毒性のアナログがある硫酸や硝酸の場合には、アナログに対

する耐性を利用してトランスポーターに変異を持つ変異株が同定されているが(Shibagaki et al., 2002), ホウ素の場合には有効な毒性アナログは知られていない。ホウ素トランスポーターの変異株を単離するのは困難と思われたが, 以下に述べる経過でホウ素に関する変異株が発見された。

北海道大学農学部〔当時〕の内藤哲教授のグループの石川雅之助教授(現農業生物資源研究所)ではシロイヌナズナ変異株を用いて植物ウイルスに関する研究を進めていた。実験材料の一つ, PD114 という *tom1-1* 変異(Ishikawa et al., 1993)を持つ系統を栽培していたところ, ある時期を境に稔実が悪くなり実験できなくなってしまった。原因を調べたところこの時に水耕液用の微量元素を含むストック溶液が新しく作り変えられていたことがわかり, 不稔となった原因はこのストック溶液の作り間違いにあるのではないかと疑われた。内藤先生は植物栄養学の教科書などをあたり, ホウ素の欠乏がナタネに不稔を引き起こすことを知り, ストック溶液のホウ素濃度が低いことが不稔の原因では無いかと考えた。検証のため不稔となつてしまったPD114株の鉢にホウ酸の結晶を載せたところ, 不稔は回復した。このような問題が発生したのは研究室で多く栽培していた様々な系統のうち, PD114株だけであったので, PD114株はホウ素欠乏に対して感受性が高まっていることが推定された。

PD114株の持つ低ホウ素感受性を引き起こす変異は, *tom1-1* 変異とは独立の染色体2番にある単一の劣性変異であることが明らかになった。この新たに同定された変異をホウ素(boron)に関する変異株という意味で, *bor1-1* と名づけた(Noguchi et al., 1997)。この変異株(第1図)を用いてホウ素輸送体が生物界ではじめて単離された。



第1図 シロイヌナズナ *bor1-1* 変異株

ホウ酸を3 μ M含む水耕液で約4週間栽培した *bor1-1* 変異株(右)と野生型株(左)。若いロゼット葉の展開が抑制されている。(三輪京子氏の栽培と撮影による)

実は調べてみると, このとき新たに作った微量元素のストック溶液は正しく作られており, 研究室でもともと用いられていた微量元素のストック溶液のホウ素濃度が通常よりも高かった様である。その後, PD114株の持っていた *tom1-1* 変異の原因遺伝子は同定され, 植物ウイルスの複製に関与する重要な宿主因子を明らかにした(Yamanaka et al., 2000)。PD114株の持っていたもう一つの *bor1-1* 変異はホウ素の輸送体を明らかにした(Takanoら2002)。この「一粒で二度おいしい」変異株(Frommer and von Wieren, 2002)は, もしも微量元素のストック溶液のホウ素濃度が正しければ, 不稔な植物として捨て去られていたであろう。多くの偶然と内藤先生の緻密な観察力と洞察力無くしては, この変異株は発見されておらず, ホウ素のトランスポーターも未だに同定されていなかったであろう。

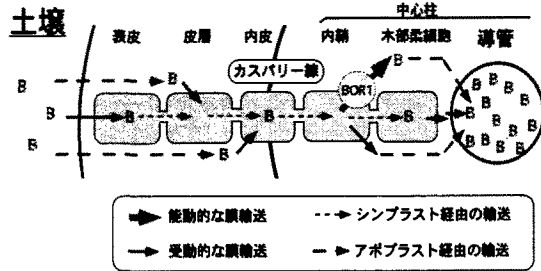
6. *bor1-1* 変異株の性質

bor1-1 変異株は弱いホウ素欠乏にさらすと, 野生型植物に比べて極端に生育が劣る。また, 地上部のホウ素濃度が野生型植物に比べて低い(Noguchi et al., 1997)。*bor1-1* 変異株と野生型植物について, 根と地上部の水溶性画分と水不溶性画分, そして導管液のホウ素濃度の分析を行った(Noguchi et al., 2000)ところ, シロイヌナズナは根から地上部への積極的なホウ素輸送機構を有しており, *bor1-1* 変異株においては, 積極的なホウ素輸送がみられないことが明らかになった。先に紹介したヒマワリの輸送機構(Dannel et al., 2000)に対応するものと考えられる。また, *bor1-1* 変異株および野生型株の地上部におけるホウ素の分配を調べたところ, 低ホウ素条件において, 野生型株ではホウ素は若い葉へ優先的に輸送されるのに対し, *bor1-1* 変異株ではそのような傾向がみられないことが明らかになった(Takano et al., 2001)。*BOR1* 遺伝子は根から地上部への積極的なホウ素輸送機構に加え, 若い部位への優先的分配機構をも担っていると考えられる。

7. 生物界初のホウ素トランスポーターBOR1

bor1-1 変異株の原因遺伝子 *BOR1* を map based cloning によって同定した。*BOR1* は10個の膜貫通領域を持つと予想されるタンパク質で, 根の内鞘で強く発現していることを確認した(Takano et al., 2002)。この遺伝子を酵母で発現させると, 酵母のホウ酸濃度を低下させることから, ホウ素の efflux タイプのトラン

スポーターであることが示唆された (Takano et al., 2002). 内鞘は導管の外側でカスパー線の内側に位置しており, BOR1 タンパク質はシンプラスミックに輸送されてきたホウ素を導管へ排出する機能を担っていると考えられる (第2図). BOR1 は生物界で初めて単離されたホウ素のトランスポーターである.



第2図 シロイヌナズナの根でのホウ素の導管への輸送機構と BOR1 タンパク質の役割

ホウ素はホウ酸として吸収されると考えられており, ホウ酸はイオンに比べると非常に膜を透過しやすいことが知られている. 土壤中のホウ素は拡散によってアポプラストに入り, カスパー線の外側のどこかで受動的に細胞膜を透過して細胞内に取り込まれる. 取り込まれたホウ素はシンプラスミクでカスパー線の内側に運ばれ, 内鞘細胞に存在する BOR1 によって能動的に細胞外に輸送され導管に濃縮され, 地上部へと運ばれると考えられる. BOR1 タンパク質の働きで導管でのホウ素濃度が高まり, 土壤中のホウ素濃度が低い条件でもホウ素が効率良く地上部へ運ばれるようになる.

8. BOR1 の相同遺伝子

BOR1 に相同な遺伝子はシロイヌナズナゲノムには BOR1 を含めて7個存在している. これらの遺伝子間の相同性は全体的に高く (第3図), これらの遺伝子産物にもホウ素輸送能がある可能性がある. これらの遺伝子のうち, 現在までに4つは cDNA クローンが単離されており発現していることが確認されている. また, トウモロコシ, カボチャ, ナタネなど cDNA の網羅的な解析が進められている植物においては BOR1 の相同遺伝子が見つかる. イネのゲノムには3つの BOR1 相同遺伝子が存在している. また, ヒメツリガネゴケにも BOR1 相同遺伝子が存在する. BOR1 相同遺伝子は植物に広く存在している.

また, BOR1 に相同な遺伝子は, 酵母や動物にも存在する. 酵母の相同遺伝子 YNL275w はホウ素輸送能を持っている. また, 動物では Anion exchanger とよばれる重炭酸イオンを輸送する一群のトランスポーターと BOR1 に相同

性が認められる. ここ数年, アフリカツメガエル, ゼブラフィッシュなどでもホウ素が正常な分化に必須であることが示されてきており (Rowe and Eckhert, 1999), BOR1 に相同な遺伝子は植物のみならず, 真核生物で一般にホウ素の輸送に関与している可能性もある.

9. まとめ

植物のホウ素輸送を担う分子として BOR1 が同定され, ホウ素輸送を分子レベルで制御する可能性が出てきた. BOR1 は植物で同定された生物界初めてのホウ素トランスポーターであり, BOR1 のホウ素輸送機構の解析や, 相同遺伝子のホウ素輸送における役割の解明等を通じて, 植物だけでなく, 生物におけるホウ素輸送制御の全体像を明らかにすることができると考えられる. このような研究を通じてホウ素栄養特性に優れた作物の作出を目指している.

引用文献

Dannel, F., Pfeffer, H., and Römheld, V. 2000. Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotopes ¹⁰B and ¹¹B. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 397-405.

Dannel, F., Pfeffer, H., Walch-Liu, P. and Römheld, V. 2001. Characteristics of boron uptake in roots of sunflower by a putative boron transporter. *In Plant nutrition - Food security and sustainability of agroecosystems.* pp162-163. Kluwer Academic Publishers

Frommer, W.B., and von Wirén, N. 2002. Plant biology: Ping-pong with boron. *Nature.* 420: 282-283.

Kobayashi, M. Matoh, T. and Azuma J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110: 1017-1020.

Ishii, T. and Matsunaga, T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr Res.* 284: 1-9.

Ishikawa, M., Naito, S. and Ohno, T. 1993. Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J. Virol.* 67: 5328-5338.

Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants* 2nd edition, Academic Press

Nable, R.O., Banuelos, G.S. and Paull, J.G. 1997. Boron toxicity. *Plant Soil.* 193: 181-198.

Noguchi, K., Yasumori, M., Imai, T., Naito, S., Matsunaga, T., Oda, H., Hayashi, H., Chino, M. and Fujiwara, T. 1997. *bor1-1*, an *Arabidopsis thaliana* mu-

tant that requires a high level of boron. *Plant Physiol.* 115: 901-906.

Noguchi, K., Dannel, F., Pfeffer, H., Römheld, V., Hayashi, H. and Fujiwara, T. 2000. Defect in root-shoot translocation of boron in *Arabidopsis thaliana* mutant *bor1-1*. *J. Plant Physiol.* 156: 751-755.

O'Neill, M.A. Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer*. *J Biol. Chem.* 271: 22923-22930.

O'Neill, M.A. Eberhard, S. Albersheim, P. and Darvill, A.G. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science.* 294: 846-849.

Rowe, R.I. and Eckhart, C.D. 1999. Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J Exp Biol.* 202: 1649-1654.

Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J.P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Davies, J.P. 2002. Selenate resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*

identify *Sultr1;2*, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J.* 29: 475-486.

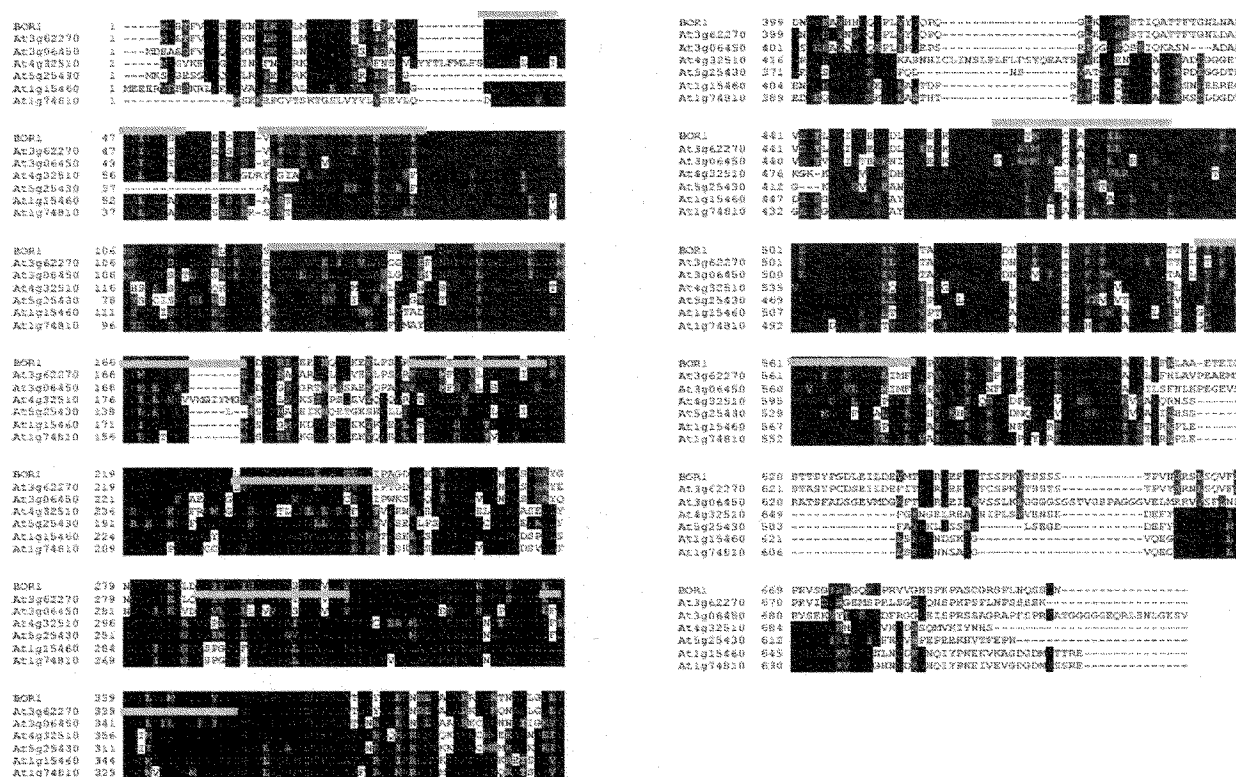
Stangoulis, J.C.R., Reid, R.J., Brown, P.H. and Graham, R.D. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *chara*. *Planta.* 213: 142-146.

Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature.* 420: 337-340.

Takano, J., Yamagami, M., Noguchi, K., Hayashi, H. and Fujiwara, T. 2001. Preferential translocation of boron to young leaves in *Arabidopsis thaliana* regulated by the *BOR1* gene. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47: 345-357.

Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. and Ishikawa, M. 2000. *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10107-10112.

Warrington, K. 1923. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann Bot.* 27:629-672.



第3図 シロイヌナズナの6つの *BOR1* 相同遺伝子と *BOR1* 遺伝子の配列の比較

シロイヌナズナの *BOR1* 相同遺伝子6つと *BOR1* の推定アミノ酸配列を CLUSTALW プログラムによって最も相同性が高くなるように並べ、同一および相同なアミノ酸を黒および灰色で示した。配列上部に灰色で示した領域は TMpred プログラムによって推定される *BOR1* の10個の膜貫通領域を示す。(三輪京子氏の解析による)