HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Boron-dependent posttranscriptional regulation of a borate transporter BOR1 and its physiological significance in Arabidopsis thaliana [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	相原, いづみ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13310号
Issue Date	2018-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71947
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Izumi_AIBARA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名 相原 いづみ

学 位 論 文 題 名

Boron-dependent posttranscriptional regulation of a borate transporter *BOR1*
and its physiological significance in *Arabidopsis thaliana*
（シロイヌナズナにおけるホウ酸輸送体*BOR1*のホウ素濃度依存的な転写後制御とその生理的意義）

【背景】

植物は土壌中の変動する無機栄養環境に適応することが必要である。ホウ素は植物の微量必須元素であり、また、過剰に存在すると毒性を示す。そのため、植物は体内のホウ素濃度を過不足のない範囲に厳密に調節する必要がある。シロイヌナズナのホウ酸排出型輸送体であるBOR1は、低濃度ホウ素条件において根から地上部へのホウ素の移行に貢献する。*BOR1* のmRNA量は環境中のホウ素濃度によって変化しないが、BOR1タンパク質は低濃度ホウ素条件で根において蓄積し、ホウ素が十分存在する環境では蓄積量が減少する。このホウ素濃度依存的な発現の分子機構として、通常ホウ素条件におけるBOR1の選択的なタンパク質分解が示されていた。しかし一方で、それ以外の制御の存在も示唆されていた。本学位論文では（1）選択的タンパク質分解とは異なる*BOR1* のホウ素濃度依存的な発現制御の機構を明らかにし、（2）これらの発現制御のホウ素環境への適応における意義を示すことを目的とした。

【1. *BOR1* のホウ素濃度依存的な発現制御の分子機構】

選択的タンパク質分解とは異なる発現制御機構を明らかにするため、翻訳に注目した。真核生物では一般的に、mRNAの上流配列である5′ 非翻訳領域（5′-UTR）が翻訳効率に関わることが知られている。*In vivo* と *in vitro* のレポーターアッセイから、*BOR1* の5′-UTR (356 nt) がホウ素濃度依存的な翻訳抑制に必要かつ十分であることが示された。

BOR1 の5′-UTRには四つの upstream open reading frame (uORF) が含まれる。uORFとは5′-UTRに含まれるORFを指し、しばしば翻訳装置であるリボソームを解離または停滞させることで下流のORFの翻訳を抑制する。そのため、uORFの存在が高濃度ホウ素条件で翻訳を抑制していると予想した。

BOR1 5′-UTRの翻訳制御に関わる配列を決定するため、配列の欠損または点変異を導入した変異型5′-UTRシリーズを作製し、シロイヌナズナの培養細胞と形質転換植物体でレポーターアッセイを行った。四つ全てのuORFを破壊した場合、ホウ素濃度依存的な発現パターンが失われたことから、*BOR1* 5′-UTRによるホウ素濃度依存的な発現抑制にuORFが必要であることが示された。また、いずれのuORFも単独では野生型5′-UTRと同程度の発現抑制を誘導しなかったが、2、3、4番目の三つのuORFを同時に持つコンストラクトでは野生型と変わらないホウ素濃度依存的な発現パターンが 観察され、これら三つのuORFの存在がホウ素濃度依存的な発現抑制に十分であることが示された。

uORFによるホウ素濃度依存的な翻訳抑制の分子機構を明らかにするため、高濃度ホウ素条件に おける(i)リボソームの停滞、(ii) uORFの翻訳の上昇、(iii) uORF翻訳後の再翻訳頻度の変化、の三つの仮説を、リボソームの挙動を調べるトープリント試験と変異型*BOR1* 5′-UTRを用いたレポーターアッセイで検証した。その結果、(iii) uORF翻訳後の再翻訳が低濃度ホウ素条件における*BOR1* のORFの翻訳に必要であり、高濃度ホウ素条件において再翻訳の頻度が低下することが示唆された。

異なる植物の*BOR1*相同遺伝子の5′-UTRにはuORFが複数存在することから、ここで示したuORFを介したホウ素濃度依存的な翻訳制御機構が幅広い植物種に保存されていると考察された。

【2. ホウ素濃度依存的な発現制御の生理的意義】

BOR1 の選択的タンパク質分解と翻訳制御の二つの転写後制御を区別し、それぞれの生理的な異議を解明するため、いずれか一方の制御または両方の制御を失った*BOR1-GFP*を発現する形質転換体を作製した。翻訳制御は配列欠損型の5′-UTRを用いることで、分解制御は制御に必要なリジン残基をアラニンに置換することで破壊した。

二つの転写後制御のホウ素濃度依存性を調べるため、これらの形質転換体を異なるホウ素濃度で生育させ、根におけるBOR1-GFPタンパク質の蓄積をウェスタンブロットで検出した。両方の制御を失った植物体ではBOR1-GFPはホウ素濃度に関わらず常に蓄積し、*BOR1*の発現を高ホウ素濃度で減少させる機構が本コンストラクトではこの二つの制御のみであることが示された。また、いずれか一方の制御のみを持つ植物体における観察から、分解制御が通常ホウ素条件（100 μM）以上で誘導されることに対し、翻訳制御は通常ホウ素条件では誘導されず高濃度ホウ素条件（1 mM）で誘導され、二つの制御が異なるホウ素濃度依存性を持つことを明らかにした。

また、二つの転写後制御の時間依存性を調べるため、制御を失った形質転換体を低濃度ホウ素条件から高濃度ホウ素条件に移植し、BOR1-GFPの蛍光シグナルの減少を経時的に観察した。分解制御を持つ植物体では過去の報告と一致して5時間以内に蛍光シグナルが減少した。一方で、翻訳制御のみを持つ植物体ではより緩やかな減少が観察された。

二つの制御の植物の生存における意義を調べるため、異なるホウ素濃度条件で水耕栽培を行った。高濃度ホウ素条件において、分解制御を失った植物体で生育阻害が観察された。ここで、分解制御のみを失った植物体と比べて両方の制御を失った植物体がより高濃度のホウ素を地上部に蓄積し、著しい生育阻害を示した。これは翻訳制御の寄与を示すと考えられる。よって、分解制御と翻訳制御の両方が高ホウ素濃度条件での過剰なホウ素の取り込みを防ぐ上で重要であることが示された。

以上の結果から、*BOR1* の二段階の制御は、通常ホウ素条件においては迅速な輸送の制御のためにタンパク質分解での制御を行い、より高濃度のホウ素過剰条件下では翻訳制御によりタンパク質の合成を抑制するという効率的な制御であると考察された。

【結論】

本学位論文で私は、植物が幅広いホウ素環境に適応するために濃度依存的、時間依存的に異なる二段階の発現制御機構を用いてホウ酸輸送体の量を調節することを明らかにした。これは植物が環境適応のために無機栄養輸送の緻密な調節機構を獲得してきたことを示す一例である。また、今までに植物の無機栄養輸送体の翻訳段階での発現制御はほとんど報告がなく、本研究は植物の無機栄養環境への適応に関して新たな知見を与えるものである。