



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on improvement of tolerance to boron deficiency and toxicity in plants [an abstract of entire text]
Author(s)	船川, 寛矢
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13742号
Issue Date	2019-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76065
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroya_FUNAKAWA_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士 (環境科学)

氏 名 船川 寛矢

学 位 論 文 題 名

**Studies on improvement of tolerance
to boron deficiency and toxicity in plants**
(植物におけるホウ素欠乏・過剰耐性付与の研究)

土壌環境中の無機栄養の欠乏または過剰は植物の成長を制限する主要な要因の一つである。ホウ素は植物の微量必須元素であり、一次細胞壁に含まれるペクチン性多糖のラムノガラクトロナン II (RG-II) を架橋する。RG-II はホモガラクトロナン(HG)を主鎖として 6 つの側鎖が連結した構造を持つ。RG-II 二分子はホウ酸によって架橋され、ペクチンのネットワークが形成される。ホウ素の欠乏は植物の葉の展開抑制や根の伸長抑制、不稔を引き起こす。一方、過剰のホウ素は植物に毒性を示し、葉の壊死や不稔を引き起こす。ホウ素欠乏・過剰土壌による植物成長の抑制は自然界や農業生産において世界中で報告されている。

これまでに植物のホウ素欠乏耐性を付与する方法として、ホウ素の吸収や植物体内での移行の強化が、ホウ素欠乏条件における植物の栄養成長・生殖成長の向上に有効であることが報告された。しかし、これら輸送を強化した植物の長期利用はホウ素欠乏土壌におけるホウ素の枯渇が懸念される。欠乏土壌における持続的な作物栽培のため、成長に必要なホウ素量(ホウ素要求量)が低下した植物の作出が必要である。

また、ホウ素過剰耐性付与の方法として、細胞内または体内からのホウ素排出の強化が、シロイヌナズナやイネの過剰条件下での成長改善に効果的であることが報告された。しかし、果実を食用とする植物において、ホウ素排出の強化がホウ素過剰耐性を付与するかは明らかではない。

本研究では、ホウ素欠乏・過剰耐性植物の作出を目指し、1) 輸送強化ではない、シロイヌナズナのホウ素要求量低下による新たな欠乏耐性機構の解明、2) トマトのホウ素排出強化による過剰耐性付与の実証を目的とした。

【第 1 章】シロイヌナズナにおけるガラクトツロン酸転移酵素(*GAUT10*) 変異によるホウ素要求量低下の分子機構の解明

シロイヌナズナホウ酸輸送体 BOR1 は根から地上部へのホウ素の移行を担う。先行研究で、シロイヌナズナホウ酸輸送体機能欠損株 *bor1-1* に新規変異を導入し、地上部のホウ素濃度が低下したにもかかわらず、ホウ素欠乏条件における成長抑制が回復した、すなわち、ホウ素要求量が低下した *bor1-1* 抑圧変異株が単離された。この抑圧変異株の原因はペクチン合成への関与が推測されるガラクトツロン酸転移酵素(*GAUT*)10 の機能低下・欠損であることが、これまでに明らかにされていた。

gaut10 変異のみで植物のホウ素要求量が低下できるかを検証するため、*bor1-1* 変異を除いた *gaut10* 単独変異株をホウ素欠乏条件において栽培したところ、主根伸長及び稔実の改善が観察された。一方、ホウ素通常条件において、変異株の成長に顕著な差は観察されなかった。

GAUT10 の機能を推定するため、*GAUT10* プロモーター制御下で *GAUT10-GFP* を発現する形質転換体を作製し、根における GFP 蛍光を観察した。その結果、ペクチン合成が盛んであると考えられる分裂域および伸長領域において強い蛍光が観察された。さらに、ゴルジ体マーカータンパク質(ST-mRFP, SYP32-mCherry) を発現する形質転換体と *GAUT10-GFP* を発現する形質転換体の F1 植物を作製し、*GAUT10-GFP* の細胞内局在を観察した。*GAUT10-GFP* とゴルジ体マーカータンパク質の蛍光の共局在が観察されたため、*GAUT10* はゴルジ体に局在することが明らかになった。また、*in vitro* においてペクチンの主成分である HG へのガラクトツロン酸転移活性が検出されたことから、*GAUT10* が HG の合成に機能することが示唆された。

gaut10 変異株において、ホウ素要求量が低下する分子メカニズムを明らかにするため、

ハウ素の作用点である細胞壁に着目して解析を行った。植物をハウ素欠乏条件(0.03 μ M, 0.1 μ M) および通常条件(100 μ M, 300 μ M) において水耕栽培し、細胞壁を抽出した。細胞壁中のハウ素濃度を測定したところ、ハウ素欠乏条件および通常条件において、*gaut10* 変異株の細胞壁中のハウ素濃度は野生型株と比べて有意に低下した。ハウ素結合部位である RG-II の量の変化を検証するため、呈色反応を用いた RG-II 特異的な単糖の定量と免疫蛍光染色法による根の断面における RG-II の免疫染色を行った。RG-II 特異的な単糖の量と RG-II の免疫染色の強度が減少したことから、RG-II の減少が示唆された。最後に、RG-II 全体量に対するハウ酸架橋された RG-II の割合(架橋率)を測定した。RG-II 架橋率は、細胞壁をエンドポリガラクトナーゼ処理した後、サイズ排除クロマトグラフィーによりハウ酸架橋された二量体 RG-II と架橋されていない単量体 RG-II に分離し、そのピーク面積から求めた。RG-II 架橋率はすべてのハウ素濃度条件において、野生型株と *gaut10* 変異株の間に有意な差はなかった。

以上の結果から、GAUT10 の機能低下・欠損は HG 及び RG-II の合成を低下させ、その結果、RG-II 全体量が減少したため、より少ないハウ素量で成長に必要な RG-II 架橋率の維持が可能になったと考察された。本研究は、遺伝子改変により、植物の必須ミネラルの要求量を低下させた初めての例である。

【第2章】 トマトにおけるシロイヌナズナ *BOR4* 過剰発現によるハウ素過剰耐性付与

シロイヌナズナハウ酸輸送体 *BOR4* はハウ素過剰条件下において、ハウ素の細胞外への排出を担う。先行研究により、シロイヌナズナ *BOR4* を高発現するコンストラクトがトマト(Micro-tom) に導入され、複数の形質転換体の内、独立な 2 つの形質転換体 Ai1-3 および Ai3-3(line 8 および line 10) が、過剰のハウ酸を含む固形培地において主根伸長の改善を示すことが明らかになっていた。

本章では、*BOR4-GFP* の高発現によるトマトの過剰ハウ素耐性への影響を明らかにするため、形質転換体 line 8 をハウ素通常条件(100 μ M) と過剰条件下(1 mM) で水耕栽培し、その成長を観察した。ハウ素過剰条件下において、野生型株は葉縁部の壊死や結実の遅延が観

察されたが、形質転換体 line 8 ではそれらのホウ素過剰症が軽減された。形質転換体 line 8 の地上部および根のホウ素濃度は、ホウ素過剰条件下において、野生型株と比較して有意に減少した。これらの結果から、ホウ素過剰条件における体内のホウ素濃度が減少し、ホウ素過剰症が緩和された形質転換体 line 8 を得ることに成功した。さらに、ホウ素過剰条件で栽培した植物の果実に含まれる元素濃度を測定したところ、形質転換体 line 8 の果実のホウ素濃度は野生型株と比較して減少した。一方、測定した多くの他元素に有意な差は無かったことから、無機栄養の組成という点で、果実の質に顕著な影響は無いことが示唆された。本研究から、葉の壊死や結実の遅延の軽減を示すホウ素過剰耐性が付与された *BOR4* 過剰発現トマトを得ることに成功した。

本学位論文で、ホウ素要求量の低下によるホウ素欠乏耐性シロイヌナズナ、また、*BOR4* 過剰発現によるホウ素過剰耐性トマトの作出に成功した。本研究は、ホウ素欠乏・過剰土壌における持続的な農業生産のための基盤となる知見を提供するものである。