

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	植物におけるミネラル輸送体の蓄積/偏在メカニズムの解明と利用による作物生産性の向上
研究機関・部局・職名	北海道大学・大学院農学研究院・助教
氏名	高野 順平

**【研究目的】**

本研究課題は、課題担当者らによる、植物にとって必須元素であるホウ素のトランスポーターBOR1 ならびにホウ素チャネル NIP1;5 の発見を起点としている。ホウ素は植物の細胞壁においてペクチン質多糖ラムノガラクトン II を架橋し、細胞壁の構造、ひいては植物の生育に必須の役割を果たす。ホウ素は過剰に蓄積すると毒ともなる元素であり、その土壌からの吸収と植物体内での移行は非常に厳密に制御されている。課題担当者らは、植物におけるホウ素輸送に重要な細胞膜局在型ホウ酸輸送体を複数同定している (Takano et al. 2002; 2006; Miwa, Takano et al. 2007)。シロイヌナズナ NIP5;1 は細胞へのホウ素の吸収を促進する細胞膜局在型ホウ酸チャネルであり、低ホウ素条件時にホウ素の根への吸収を担う (Takano et al. 2006)。一方、BOR1 はホウ素の細胞外への排出を促進する細胞膜局在型ホウ酸トランスポーターであり、低ホウ素条件時にホウ素の導管への輸送を担う (Takano et al. 2002)。これらの発見は、特定の必須ミネラルの輸送体を生物界で初めて発見しただけでなく、植物の根におけるミネラルの輸送経路を示したものである。BOR1 は高ホウ素濃度にさらされると細胞膜からエンドソームを経由して液胞に輸送され、分解される (Takano et al. 2005; Takano et al. 2010) ことを明らかにし、これは、植物の細胞膜局在タンパク質について環境に応答したエンドサイトーシス系分解制御を報告した最初の例となった。ホウ素に限らず多くのミネラルは過剰に蓄積すると毒となるが、輸送体のミネラル濃度に依存したエンドサイトーシス系分解は、ミネラルの過剰輸送を抑制するために重要なメカニズムであると考えられる。さらに、NIP5;1 は根の表皮細胞において遠心側 (土壌側) の細胞膜に、BOR1 は根の様々な細胞において求基側 (中心柱側) の細胞膜にそれぞれ偏って局在する (Takano et al. 2010, 図1) ことも明らかにしている。これらホウ素輸送体の偏在はホウ素の土壌から中心柱へ向かう輸送において重要な役割を果たすものと考えられる。このような細胞内小胞輸送系によるミネラル輸送体の蓄積と局在の制御は、ミ

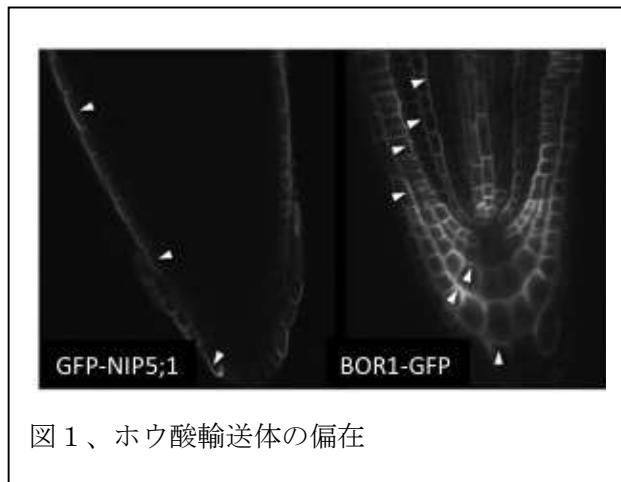


図1、ホウ酸輸送体の偏在

このように細胞内小胞輸送系によるミネラル輸送体の蓄積と局在の制御は、ミ

ネラル輸送の量と方向性を決定する普遍的なメカニズムに違いがないと考えられる。

本課題では、シロイヌナズナをモデルとして用い、ミネラル輸送体の蓄積、局在のメカニズムを理解し、植物のミネラル吸収・移行を適切にコントロールする技術の開発に応用することを目指している。具体的には、ホウ素濃度が認識され小胞輸送系を介してホウ素輸送体の蓄積量が適切に調節されるメカニズムと、ホウ素輸送体が細胞膜において偏在するメカニズムを解明する。続いて、これらの細胞内局在制御メカニズムが多数のミネラル輸送体において普遍性を持つかどうか検討する。そして、得られた知見を利用し、ミネラル輸送体を特定の条件時に、特定の細胞の、特定の膜領域に局在させ、ミネラル利用効率の高い形質転換シロイヌナズナ植物を作出する。

達成目標として、下記の6つの項目を掲げて研究を展開している。

- (A) BOR1 の蓄積制御メカニズムの順遺伝学的解析
- (B) ホウ素濃度センサー候補である Cell wall-associated kinase の逆遺伝学的解析
- (C) NIP5;1 および BOR1 の偏在の順遺伝学的解析
- (D) NIP5;1 および BOR1 と結合するタンパク質の探索
- (E) ミネラル輸送体の蓄積／偏在の制御に重要な因子の解析と改変
- (F) ミネラル輸送体の偏在に重要なアミノ酸配列の同定と改変

### 【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

### 【所見】

#### ① 総合所見

植物にとって必須元素であるホウ素のトランスポーターBOR1 ならびにホウ素チャンネルNIP1;5の発見を起点として、これらの輸送体の蓄積、偏在のメカニズムの解明し、人為的な調節を通して、作物生産性を向上させる基盤の構築を目指した研究で、注目すべき成果をあげている。ホウ素の輸送体の蓄積、局在と機能を明確にしつつあることは、無機元素のホメオスタシス理解への展開も期待され、その意義は大きい。BOR1の分解や局在にかかわる要因の解明では、分解を制御するBOR1内の複数のアミノ酸配列を同定するなどの発見に加え、輸送体BOR1自体がホウ素センサーとして機能する可能性も示した。さらに、NIP5:1のN末端領域が偏在性にかかわることを新規に明らかにし、この領域を用いて様々な輸送体に人為的に偏在性を付与する道を開いた。変異および大型のタンパク質融合により偏在性と分解性を失ったBOR1をユビキチン10プロモーター制御下で恒常的に発現させ、ホウ酸過剰条件での根外へのホウ酸排出活性が上昇し生育が改善したシロイヌナズナ株を得た。また、BOR2の発現を増強した形質転換シロイヌナズナを作出し、低ホウ素条件での生育が改善した株を得ており、これらの成果は応用への展開を期待させる。ホウ素に関連した濃度制御型の養分吸収メカニズムの解明は、実際の農業技術にも将来的につながることを期待できる知見である。

輸送体の分解にからむ制御機構はインパクトのある成果であり、より詳細な解明とその制御手法の開発の一層の加速が求められる。

本研究で得られた成果は、他のミネラルについても同様なメカニズムが働いていると推察させるもので、今後の応用展開を視野に入れたミネラル輸送研究分野に大きなインパクトを与えると期待される。

## ② 目的の達成状況

・所期の目的が

(全て達成された ・ 一部達成された ・ 達成されなかった)

所期の目的が全て十分に達成されたとは言い難いが、上記項目の中で優れた成果を上げたものもあり、また、当初の仮説を証明できなかったものの一定の結論を得た項目もある。さらに、いくつかの項目については、植物におけるミネラル輸送研究における重要な基礎的知見となる成果、当初予期しなかった優れた成果も得られている。ホウ素レセプターの特長など残された課題もあるが、おおむね目標を達成したと評価する。

### (A) BOR1 の蓄積制御メカニズムの順遺伝学的解析

ホウ素蓄積制御メカニズムの全容が解明されたとはいえないまでも、重要な知見が得られており、おおむね目的を達成していると評価できる。BOR1-GFP 形質転換シロイヌナズナを用いて BOR1 の液胞輸送が起こらない変異株を複数取得し、責任遺伝子を絞り込み、その一つについては、*APG10* と呼ばれる遺伝子でほぼ間違いないとの結果を得ている。また、BOR1 の液胞輸送を抑制する BOR1 内部のアミノ酸変異も複数発見し、これらの変異を導入した BOR1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナ (*bor1* 変異株背景) を確立して解析し、これらの変異型 BOR1-GFP はユビキチン化されず、ホウ酸に応答した液胞輸送が認められないことを明らかにした。さらに、BOR1 輸送体そのものがホウ酸濃度のセンサーとして働く可能性を示唆する結果も得ていると見受けられる。

### (B) ホウ素濃度センサー候補である Cell wall-associated kinase の逆遺伝学的解析

WAK がホウ素レセプターとして働く可能性を支持する結果は得られなかった。一方、各 WAK の GFP 融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナ系統を整備し、細胞壁からの情報伝達にかかわることが期待される WAK の詳細な局在解析を可能にするとともに、WAK が、新たな偏在モデルタンパク質となることを示した。

### (C) NIP5;1 および BOR1 の偏在の順遺伝学的解析

NIP5;1 が細胞内の凝集構造に蓄積する変異株を用いて、その責任遺伝子を同定し、細胞内膜系の維持に D-ガラクトースが必要なことを示し論文発表した (Uehara et al. 2014)。NIP5;1 が小胞体や液胞膜に局在する変異株についても、責任遺伝子の絞り込みを進め、液胞膜局在に関しては、多胞体形成において限界膜から内に向けた出芽に重要な ESCRTIII 複合体のサブユニットに異常がある可能性が高いことを明らかにした。BOR1 についても、偏在に異常のある変異株のスクリーニングを進め、少なくとも一株を単離したほか、BOR1 内部のアミノ酸変異を同定しており、その偏在の機構解明に向けた基盤が整った。NIP5;1, BOR1 のいずれについても、今後、組み換え体を用いるなどの確認作業が残されているが、目的達成に向けて、おおむね順調に進捗していると見受けられる。

#### (D) NIP5;1 および BOR1 と結合するタンパク質の探索

現時点での達成状況は十分とは言えない。特に有望なタンパク質として、NIP5;1 についてはリン酸化酵素、BOR1 については小胞輸送を制御する ARF-GAP や Exocyst component が見つかっているが、未だ NIP5;1 と BOR1 の特徴的な局在へのこれらの因子の重要性の証明には至っていない。各候補タンパク質について遺伝子欠損変異株の整備等を進めており、今後の進展にかかっている。

#### (E) ミネラル輸送体の蓄積／偏在の制御に重要な因子の解析と改変

おおむね目標を達成していると判断される。BOR1 のエンドサイトーシスにおいて重要と予測されたダイナミン DRP1A とアダプタータンパク質複合体 (AP) について、逆遺伝学的解析や共局在解析を進め、遺伝子欠損変異株やドミナントネガティブ効果を持つ形質転換植物の作出により、DRP1A が BOR1 の偏在および液胞輸送の両方において重要であることを示した。また、これらの分子と BOR1 の細胞膜上での共局在を、全反射顕微鏡を用いて一分子レベルで解析し、BOR1 が Clathrin coated pit に入り (DRP1A と共局在し)、エンドサイトーシスされる様子をとらえた。特に偏在形成に関して、エンドサイトーシスとリサイクリングの重要性を明確に示す新たな発見をした。

さらに、各種化合物を用いて BOR1 の偏在性について解析し、合成オーキシシンによって偏在形成が阻害されることを明らかにした。得られた知見を統合して、土壌側から中心柱側の細胞膜へ向かう小胞輸送メカニズム (トランスサイトーシス) によって BOR1 の中心柱側への偏在性が維持される可能性を示唆するなど、興味深い知見を得ている。

#### (F) ミネラル輸送体の偏在に重要なアミノ酸配列の同定と改変

変異および大型のタンパク質融合により偏在性と分解性を失った BOR1 をユビキチン 10 プロモーター制御下で恒常的に発現させ、ホウ酸過剰条件での根外へのホウ酸排出活性が上昇し生育が改善したシロイヌナズナ株を得た。偏在性と分解性の改変により輸送体に本来とは全く別の機能を発揮させるという、予期せぬ興味深い成果も得た。また、偏在性を持たない NIP1;2 を発見するとともに、NIP5;1 と NIP1;2 のドメインスワッピングおよび NIP5;1 の配列欠失解析を行い、NIP5;1 の偏在性に N 末端領域が必要なことを明らかにした。さらに、この N 末端領域は NIP1;2 の N 末端領域と取り替えると、NIP1;2 を偏在させる能力を有することを示した。続いて、シロイヌナズナにおいて主要な水チャネルである PIP2;1 の N 末端領域を NIP5;1 のそれと取り替えて水チャネルに偏在性を持たせることもできた。目標を達成するとともに、輸送体の偏在性を人為的に制御する道が開けた。

### ③ 研究の成果

・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(  ある ・  ない )

・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(  創出された ・  創出されなかった )

・当初の目的の他に得られた成果が (  ある ・  ない )

#### (A) BOR1 の蓄積制御メカニズムの順遺伝学的解析

BOR1-GFP 形質転換シロイヌナズナを用いて BOR1 の液胞輸送が起こらない変異株を複数獲得し、次世代シーケンサーを用いて責任遺伝子を絞り込んだ。ポジショナル

クローニングを進め、その一つは *APG10* と呼ばれる遺伝子でほぼ間違いないと考えられる結果を得た。また、BOR1 の液胞輸送を抑制する BOR1 内部のアミノ酸変異も複数発見し、これらの変異を導入した BOR1-GFP を発現する形質転換シロイヌナズナ (*bor1* 変異株背景) を新たに確立し、解析した。その結果、これらの変異型 BOR1-GFP はホウ酸に応答して液胞に輸送されないだけでなく、その前段階と考えられるユビキチン化もされないことが明らかになった。現在は BOR1 輸送体そのものがホウ酸濃度のセンサーとして働く可能性が高いと考えている。

#### (B) ホウ素濃度センサー候補である Cell wall-associated kinase (WAK) の逆遺伝学的解析

WAK がホウ素レセプターとして働く可能性を支持する結果は得られず、解析を終了した。しかしながら、各 WAK の GFP 融合タンパク質を発現する形質転換シロイヌナズナ系統を整備したことにより、細胞壁の様々な情報を細胞内に伝えると期待される WAK の詳細な局在解析が可能になった。WAK のうちいくつかは細胞膜上で土壌側に偏った局在を見せたことより、新たな偏在モデルタンパク質となった。

#### (C) NIP5;1 および BOR1 の偏在の順遺伝学的解析

GFP-NIP5;1 が細胞内膜に局在する複数の変異株を同定し、マッピングと次世代シーケンサーによる解析を進めた。NIP5;1 が細胞内の凝集構造に蓄積する変異株については責任遺伝子を同定し、細胞内膜系の維持に D-ガラクトースが必要なことを示し論文発表した (Uehara et al. 2014)。NIP5;1 が小胞体や液胞膜に局在する変異株についても、責任遺伝子の絞り込みを進めた。液胞膜局在に関しては、多胞体形成において限界膜から内に向けた出芽に重要な ESCRTIII 複合体のサブユニットに異常がある可能性が高い。変異株では多胞体の限界膜から NIP5;1 が移動できないため、液胞内ではなく液胞膜に誤輸送されるものと考えられる。BOR1 についても、偏在に異常のある変異株のスクリーニングを進め、少なくとも一株を単離したほか、BOR1 内部のアミノ酸変異を同定した。

#### (D) NIP5;1 および BOR1 と結合するタンパク質の探索

NIP5;1 および BOR1 と複合体を形成するタンパク質の同定を行うため、酵母 two-hybrid 解析や免疫沈降-質量分析等を行った。特に有望なタンパク質として、NIP5;1 についてはリン酸化酵素、BOR1 については小胞輸送を制御する ARF-GAP や Exocyst component が見つかっている。現在までには NIP5;1 と BOR1 の特徴的な局在への重要性の証明には至っていないが、各候補タンパク質について遺伝子欠損変異株の整備等を進めた。

#### (E) ミネラル輸送体の蓄積/偏在の制御に重要な因子の解析と改変

BOR1 のエンドサイトーシスにおいて重要と予測されたダイナミン DRP1A とアダプタータンパク質複合体 (AP) について、逆遺伝学的解析や共局在解析を進めた。遺伝子欠損変異株や誘導プロモーターによるドミナントネガティブ効果を持つ形質転換植物の作出により、DRP1A が BOR1 の偏在および液胞輸送の両方において重要であることを示した。また、これらの分子と BOR1 の細胞膜上での共局在を全反射顕微鏡を用いて一分子レベルで解析し、BOR1 が Clathrin coated pit に入り (DRP1A と共局在し)、エンドサイトーシスされる (焦点面から消える) 様子をとらえた。特に偏在形

成に関して、エンドサイトーシスとリサイクリングの重要性を明確に示す新たな発見となった。

また、ホウ酸トランスポーターBOR1 の偏在性について各種化合物を用いて解析したところ、合成オーキシンによって偏在形成が阻害されることが明らかになった。根の表皮細胞において BOR1 は合成オーキシン存在下で細胞膜直下の異常エンドソームに蓄積した。上記のダイナミンおよび AP2 の解析結果と合わせ、土壌側から中心柱側の細胞膜へ向かう小胞輸送メカニズム（トランスサイトーシス）によって BOR1 の中心柱側への偏在性が維持される可能性を示唆した。

#### (F) ミネラル輸送体の偏在に重要なアミノ酸配列の同定と改変

変異および大型のタンパク質融合により偏在性と分解性を失った BOR1 をユビキチン 10 プロモーター制御下で恒常的に発現させた。その結果、ホウ酸過剰条件での根外へのホウ酸排出活性が上昇し生育が改善したシロイヌナズナ株が得られた。本成果は偶然によるが、偏在性と分解性の改変により輸送体に本来とは全く別の機能を発揮させることができた。

BOR1 に配列的によく似た BOR2 について GFP 融合タンパク質を用いて解析したところ、細胞型によって BOR1 とは異なった偏在性や分解性を示した。これらについては、三輪京子氏らの生理学的な解析結果と合わせて論文発表した (Miwa et al. 2013)。また、35S-BOR2 キメラプロモーターを用いて BOR2 の発現を増強した形質転換植物を作出したところ、低ホウ素条件での生育が改善したシロイヌナズナ株が得られ、論文発表した (Takada et al. 2014)。

BOR3 は BOR1 のホモログのひとつであるが、局在解析により偏在性や分解性を持たないことを明らかにした。また、変異株の表現型の詳細な解析を進め、BOR3 は低ホウ素条件下での積極的な主根伸長抑制に働くことを示唆する結果を得た。BOR3 はトランスポーターとしてだけでなくホウ酸センサーとして働くことが期待される。

NIP5;1 の偏在メカニズムを理解するため、近縁の NIP タンパク質の局在を解析した結果、偏在性を持たない NIP1;2 を発見した。NIP5;1 と NIP1;2 のドメインスワッピングおよび NIP5;1 の配列欠失解析の結果、NIP5;1 の偏在性に N 末端領域が必要なことを明らかにした。また、この N 末端領域は NIP1;2 の N 末端領域と取り替えると、NIP1;2 を偏在させる能力を有することを示した (図 2)。さらに、シロイヌナズナにおいて主要な水チャネルである PIP2;1 の N 末端領域を NIP5;1 のそれと取り替えることにより、水チャネルに偏在性を持たせることもできた。これにより、輸送体の偏在性を人為的に制御する道が開けた。現在、より詳細にアミノ酸領域を狭めるとともに、メカニズムの解明を目指して解析を進めている。

ホウ素輸送体を用いて得られた知見を他のミネラル輸送体に一般化して応用に結びつけるため、カリウム輸送体 HAK5 の局在解析を進めた。GFP 融合タンパク質やペプチド抗体を作成して用いたところ、HAK5 は高濃度のカリウムに応答して細胞膜から細胞内へ移動することが示唆された。また、C 末端領域にあるジロイシンモチーフと呼ばれる配列を欠失させると細胞膜に留まる傾向が得られたことから、これを利用してカリウムやセシウムの輸送能を強化できる可能性を見いだした。

#### 先進性・優位性・ブレークスルーと呼べる成果

ホウ素輸送体量の制御メカニズムに関与する複数の変異体、細胞内での偏在性に関する変異体も獲得している。それらの解析から、輸送体の分解や、偏在性に関与する遺伝子領域を明らかにし、その偏在性を制御可能なことを示した。植物の膜タンパク質研究において他に例をみない成果であり、当該分野で先駆的でありブレークスルーと言える成果である。補助事業者らの優位性が認められる。このメカニズムの詳細が明らかにされれば、その他の類縁のミネラルにおいても同じようなメカニズムが働いて、植物のミネラル輸送が制御されていると期待される。

#### 予期せぬ成果

当初の御目的外の成果として、変異および大型のタンパク質融合により偏在性と分解性を失った BOR1 をユビキチン 10 プロモーター制御下で恒常的に発現させ、ホウ酸過剰条件下での根外へのホウ酸排出活性が上昇し生育が改善したシロイヌナズナ株を得た。偏在性と分解性の改変により輸送体に本来とは全く別の機能を発揮させるという、予期せぬ興味深い成果得た。

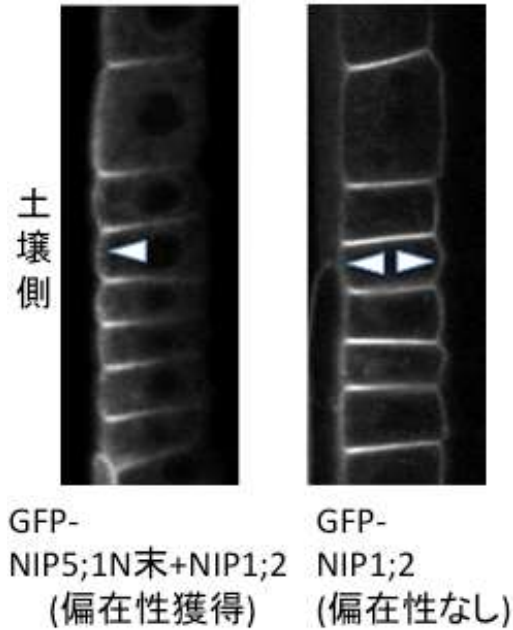


図2、NIP5;1 の N 末端領域は、偏在性を持たない NIP1;2 を偏在させる。

#### ④ 研究成果の効果

- ・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(■見込まれる ・ □見込まれない)
- ・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(■見込まれる ・ □見込まれない)

植物の栄養応答機構と膜タンパク質の細胞内輸送研究において新たな知見を提示したことは植物栄養学的、細胞生物学的に価値が高い。特に遠心側-求基側偏在性のメカニズムについてはこれまでほとんど知見がなかったところ、一端を明らかにすることができたことは意義深く、関連分野への波及効果が見込まれる。

ホウ素に関する知見を基礎として植物のその他の必須元素、非必須元素への応用

が期待できるため、関連する研究分野に大きな貢献が期待される。特定の元素の吸収制御、体内での移行分配制御にまで将来的につながることを期待される。カリウム輸送体 HAK5 についても研究し、高濃度のカリウムに応答して細胞膜から液胞に移行して分解する可能性を示した。これはホウ素の研究から応用した成果である。カリウムに類似した性質を持つセシウムの植物への吸収、輸送、蓄積に新しい方向性を示唆する可能性がある。さらに、他のミネラル吸収利用機構との比較を行うことにより、これらの制御メカニズムが普遍的であるのか否かも含めて植物の養分吸収における全く新しい学説になる可能性がある。

この課題はメカニズム的な研究が中心であるが、成果が将来貧栄養耐性作物やミネラル過剰耐性作物の作出に応用できる。その一端が本研究の中で示された意義は大きく、社会的、経済的な課題への貢献も期待できる。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

研究目的をおおむね達成するとともに、優れた成果も得られており、研究計画、実施体制は適切であったと言える。また、研究マネジメントについても、大学院生、ポスドクも適切に配置され、緊密に議論して、的確に指示して研究を展開したと見受けられ、また指摘事項について誠実に対応しており、適切であった。

助成金の活用については、スクリーニングの効率化を意識して、必要な機械の購入に適切に使われている。

成果の公表については、下記のとおりである。雑誌論文がやや少ないが、本課題のような研究の論文の発表には時間がかかるので、やむを得ない一面もある。確実にデータを取れているので、今後いい論文が期待できる。学会発表は国内外で活発に行われていた。一般社会への発信については、北海道大学創成研究機構研究支援室の支援を得て、適切に行われている。

雑誌論文：合計 10 件（査読有 9 件、査読無 1 件）

会議発表：合計 47 件。

図書：0 件

知的財産権：0 件

新聞、一般雑誌への掲載：合計 2 件

国民との科学技術対話：合計 8 件（高校生向け講座 7 件、一般向け講座 1 件）

その他、Web (<http://or.research.hokudai.ac.jp/next/>) でも成果を公開している。