

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	張 哲
学位授与の日付	2025年2月28日	
論文名	The mechanisms underlying ER-Golgi trafficking of boric acid channels and the roles of a borate transporter BOR4 in the reproductive organs in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナにおけるホウ酸チャネルの小胞体 - ゴルジ体輸送メカニズムとホウ酸トランスポーター BOR4 の生殖器官におけるホウ素輸送に関する研究)	
論文審査委員	主査	高野 順平
	副査	稲田 のりこ
	副査	岡澤 敦司

論文要旨

植物の必須微量元素であるホウ素は、細胞壁の構成成分であるペクチンの架橋に働く。ホウ素欠乏は、根の伸長阻害や新葉の展開抑制、不稔などの症状を引き起こす。植物は体内のホウ素の恒常性を維持するために、ホウ酸チャネルとホウ酸トランスポーターを用いてホウ素の輸送を調節している。本研究ではシロイヌナズナを用い、ホウ酸チャネルが細胞膜で機能するために必要な小胞体（ER）からの細胞内輸送メカニズムと、ホウ酸トランスポーターBOR4の生殖器官における役割を解析した。

第一章 AtKNS3 とそのホモログはホウ酸チャネルの ER-ゴルジ体間の輸送に重要である

細胞膜に局在する膜タンパク質は、小胞体(ER)内で翻訳と同時に折り畳まれ、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク(TGN)を介して、細胞膜まで輸送される。膜タンパク質は、COPII コート複合体の SEC24 サブユニットと結合することで COPII 小胞に積み込まれ、ER からゴルジ体まで輸送される。SEC24 は新生タンパク質の細胞質領域に存在するシグナル配列を認識する。一方、シグナル配列を持たない膜タンパク質には、カーゴレセプターを介して SEC24 と結合するものが知られている。シロイヌナズナでは、ER-ゴルジ間のカーゴレセプターとして、K/HDEL レセプターERD2 を運ぶ p24 タンパク質と Glutamate Receptor-like3.3 を運ぶ CORNICHON HOMOLOG (CNIH)1 と CNIH4 の

二例が報告されている。本研究では、ホウ酸チャネルの細胞内輸送を担う新たなカーゴレセプター候補タンパク質の解析を行った。

ホウ酸チャネルである NIP5;1 は根の根冠・表皮・内皮細胞などの土壌側の細胞膜に局在し、低ホウ素条件で効率的にホウ酸を吸収する役割を担う。同じくホウ酸チャネルである NIP6;1 は地上部の若い葉の葉柄や節で発現し、節の木部から篩部にホウ素を送りこむ役割を果たしている。先行研究において、GFP-NIP5;1 形質転換シロイヌナズナの種子に突然変異を導入した集団の中から、GFP-NIP5;1 の大部分が ER に留まる変異株が単離された。これらの ER 残留型変異株について遺伝学的マッピング及び次世代シーケンス解析が実施され、*At5g58100* (*KAONASHI3*, *KNS3*) が原因遺伝子と同定された。*KNS3* の変異株において、GFP を融合した NIP6;1 は NIP5;1 と同様に ER に局在したが、近縁の NIP1;2 は細胞膜に局在した。また、シロイヌナズナにおいて *KNS3* の二つのホモログ *KNSTH1* と *KNSTH2* がみつかった。これらの変異株において GFP-NIP5;1 の大部分は ER に留まった。ベンザミアタバコの葉の表皮細胞において、*KNS3* のシグナル配列直後に mCherry を融合した mCherry-*KNS3* は、ER とゴルジ体に局在した。これら先行研究の結果から、*KNS3*, *KNSTH1*, *KNSTH2* はホウ酸チャネルの ER から細胞膜への輸送に機能していると考えられた。

本研究では *KNS3* と *KNSTH2* の細胞内局在とその制御機構をベンザミアタバコの葉の表皮細胞とシロイヌナズナの葉肉細胞由来のプロトプラストを用いて解析した。mCherry-*KNS3* はどちらの細胞においても ER とゴルジ体に局在した。一方、mCherry-*KNSTH2* はどちらの細胞でも ER のみに局在した。次に、*KNS3* と *KNSTH2* の ER-ゴルジ体間の移行に重要なアミノ酸配列を調べるため、C 末端細胞質領域のアミノ酸を一つずつアラニンに置換した変異型 mCherry-*KNS3* と mCherry-*KNSTH2* を作成した。K941, K943 と I944 の 3 つのアミノ酸残基がそれぞれ置換された mCherry-*KNS3* はプロトプラストにおいて、野生型 mCherry-*KNS3* と比較して ER マーカーとの共局在率が低下した。そのうち I944A 型 mCherry-*KNS3* ではゴルジ体マーカーとの共局在率が上昇した。これらの結果から、これら 3 アミノ酸残基は *KNS3* がゴルジ体から ER に戻るために必要であることが明らかになった。一方置換型 mCherry-*KNSTH2* は、いずれも野生型と同様に ER に局在した。続いて、*KNS3* の ER とゴルジ体間の移行に *KNS3* のホモログが関与しているかを調べた。*knsth1* と *knsth2* の変異株では、野生型株でと比べて、I944A 型 mCherry-*KNS3* の ER マーカーとの共局在率が上昇し、ゴルジ体マーカーとの共局在率が減少した。このことから *KNS3* の ER からゴルジ体までの移行には *KNSTH1* と *KNSTH2* も必要であることが明らかになった。また、*KNS3*, *KNSTH1*, *KNSTH2* のタンパク質の蓄積はいずれも他のホモログの欠損変異株において野生型株においてより減少した。この結果から、*KNS3* とその二つのホモログ間のタンパク質の蓄積量は互いに依存することが明らかになった。

以上の結果から、*KNS3* は ER においてそのホモログと複合体を形成し、ホウ酸チャネルを COPII 小胞に積み込み、ER からゴルジ体まで運ぶカーゴレセプターであるモデルを提案する。ゴルジ体において *KNS3*-*KNSTH1*-*KNSTH2* 複合体はホウ酸チャネルから分離し、COPI 小胞を介し、ER に戻ると考えられる。一方、ホウ酸チャネルは TGN を経由して、細胞膜に輸送されると考えられる。

先行研究により *kns3*, *knsth1*, *knsth2* 変異株の表現型として、花粉外壁のエキシン構造が崩れる異常が知られていた。本研究では、ホウ素栄養に依存した表現型を解析した。その結果、野生型株と比べて、*kns3* 変異株の長角果の長さが有意に短かった。*kns3* 変異株と野生型株の長角果の長さの差は低ホウ素条件で大きく、ホウ素濃度の上昇に応じて、86%程度まで回復した。しかし、*kns3* 変異株花粉のエキシン構造はホウ素十分条件でも回復しなかった。また、低ホウ素とホウ素十分条件で *kns3* 変異株の根、ロゼット葉及び花茎先端部のホウ素濃度を測定したところ、野生型株との間で差が見られなかった。これらの結果から、KNS3 は特に、葯において花粉外壁のエキシン構造の構築に必要なホウ酸チャンネルなどのタンパク質のERからの輸送に重要と考えられる。

第二章 AtBOR4 は葯における低ホウ素条件でのホウ素供給と、雌ずいにおけるホウ素過剰耐性に必要である

ホウ素欠乏と過剰は花粉の発芽や花粉管の伸長を阻害することが報告されている。シロイヌナズナではホウ酸チャンネル NIP7;1 とホウ酸トランスポーターBOR1 が葯のタペート細胞に発現し、低ホウ素時に葯室内へホウ素を輸送し、花粉の発達に重要な役割を担っていることが報告されている。BOR1 のホモログである BOR4 もタペート細胞と小孢子に発現することが遺伝子発現データで示された。BOR4 は根においてホウ素の排出により高ホウ素耐性に重要な役割を担う。本研究では、BOR4 が生殖器官におけるホウ素輸送にどのように関与しているかを解析した。

まず、*bor4* 変異株に *proBOR4:BOR4-GFP* を導入し、BOR4 の細胞内局在を解析に用いた。*BOR4-GFP* の発現は *bor4* 変異株の高ホウ素条件での生育抑制を回復させた。*BOR4-GFP* は根では側方根冠、分裂組織の表皮細胞、成熟領域の表皮及び皮層細胞に見られた。一方、花では葯においてタペート細胞の葯室側の細胞膜や小孢子の細胞膜に局在した。*BOR4-GFP* の葯における発現はホウ素条件に依存しなかった。

BOR4 の生殖過程における生理学的な役割を明らかにするため、低ホウ素と高ホウ素条件で *bor4* 変異株の花粉の生存率及び形態を調べた。その結果、低ホウ素と高ホウ素条件において、*bor4* 変異株の花粉生存率が野生型株と比較して低く、構造に異常がみられた。一方、相補株では野生型株と同様な花粉の生存率と正常な構造がみられた。以上から、BOR4 は低ホウ素と高ホウ素条件で花粉の生存と形態維持に重要であると考えられた。次に、*bor4* 変異株における花粉の異常の原因を調べるため、花茎の先端部と花粉内のホウ素含量を測定した。その結果、花茎の先端部のホウ素濃度にはどのホウ素条件においても野生型株、*bor4* 変異株及び相補株の間に有意差は見られなかった。しかし、低ホウ素と高ホウ素条件では、*bor4* 変異株の花粉内のホウ素濃度が野生型及び相補株と比較して有意に低かった。

さらに、BOR4 の欠損が稔実性及び影響を調べた結果、高ホウ素条件で *bor4* 変異株の長角果は野生型株や相補株と比較して短く、長角果あたりの種子数も少なかった。その原因を解析するため、高ホウ素条件で栽培した野生型株と *bor4* 変異株の柱頭に、正常なホウ素条件で栽培した野生型株の花粉を授粉させた。その結果、交配した *bor4* 変異株では野生型株と比較して長角果が有意に短く、長角果内の種子数も有意に少なかった。一方、正常なホウ素条件で栽培した野生型株の柱頭に、高ホウ素条件で栽培

した *bor4* 変異株の花粉を授粉させた場合、得られた長角果の長さ及び種子数は野生型株と同様であった。

以上の結果から、BOR4 は低ホウ素条件でタペート細胞から葯室へのホウ素供給を行うとともに、小胞子において花粉壁へのホウ素供給を担い、花粉の発達に寄与すると考えられる。また、高ホウ素条件で BOR4 は雌ずいへのホウ素の蓄積を軽減する役割を持つ可能性が考えられる。

審査結果の要旨

ホウ素は植物の必須微量元素であり、細胞壁ペクチンの架橋に働く。ホウ素欠乏は、根の伸長阻害や新葉の展開抑制、不稔などの症状を引き起こす。農業現場では特に不稔や可食部の品質低下が問題になっている。植物は組織のホウ素濃度を適切に保つため、細胞膜に局在するホウ酸チャネルとホウ酸トランスポーターを用いて体内のホウ素輸送を調節している。本学位申請者はシロイヌナズナを用い、ホウ酸チャネルを細胞膜に配置するため必要な小胞体からの細胞内輸送メカニズムと、生殖器官におけるホウ素輸送のメカニズムを解析した。

第一章では、ホウ酸チャネルを小胞体から運び出すカーゴレセプターを見出した。先行研究において、GFP を融合したホウ酸チャネル (GFP-NIP5;1) の大部分が小胞体に留まる変異株が単離された。これら変異株について遺伝学的解析が実施され、*KAONASHI3* (*KNS3*, At5g58100) が原因遺伝子と同定された。*KNS3* 変異株において、ホウ酸チャネルである NIP6;1 も小胞体にとどまったが、解析した他の膜タンパク質は正常に細胞膜に局在した。また、*KNS3* の 2 つのホモログ *KNSTH1* と *KNSTH2* の変異株でも同じ現象が観察された。以上から、*KNS3*、*KNSTH1*、*KNSTH2* はホウ酸チャネルの小胞体から細胞膜への輸送に機能していると考えられた。細胞膜局在の膜タンパク質は、小胞体からゴルジ体、トランスゴルジネットワーク (TGN) を介して、細胞膜まで輸送される。膜タンパク質の多くは、COPII コート複合体と結合することで COPII 小胞に積み込まれ小胞体からゴルジ体へ輸送される。一方、COPII に認識される配列を持たない膜タンパク質は、カーゴレセプターを介して COPII 小胞に積み込まれる。植物においてもカーゴレセプターの報告があるが、その普遍性、積荷特異性や作用機序についての理解は十分ではない。そこで学位申請者は、ホウ酸チャネルの細胞内輸送を担うカーゴレセプター候補として *KNS3*、*KNSTH1*、*KNSTH2* タンパク質の解析を行った。まず、シロイヌナズナ葉肉細胞由来のプロトプラストにおいて、mCherry-*KNS3* は小胞体とゴルジ体に局在することを示した。続いて、*KNS3* の C 末端細胞質領域のアミノ酸を一つずつアラニンに置換することにより、I944A 型 mCherry-*KNS3* は主にゴルジ体に局在することを示した。これらの結果から、*KNS3* は小胞体とゴルジ体の間を行き来することが明らかになった。さらに、*knsth1* と *knsth2* の変異株では、I944A 型 mCherry-*KNS3* が主に小胞体に局在した。これにより、*KNS3* の小胞体からゴルジ体までの移行には *KNSTH1*

と KNSTH2 が必要であることを示した。また、KNS3、KNSTH1、KNSTH2 のタンパク質の蓄積はいずれも他のホモログの存在に依存することを明らかにした。本学位申請者は以上の結果から、KNS3 は小胞体において KNSTH1 および KNSTH2 と複合体を形成し、ホウ酸チャネルを COPII 小胞に積み込み、小胞体からゴルジ体へ運ぶカーゴレセプターであることを提案した。KNS3-KNSTH1-KNSTH2 複合体はゴルジ体においてホウ酸チャネルから分離し、COPI 小胞を介し、小胞体に戻ると考えられる。一方、ホウ酸チャネルは TGN を経由して細胞膜に輸送されると考えられる。

第二章では、生殖器官におけるホウ素輸送のメカニズムを BOR4 の解析を通して明らかにした。シロイヌナズナではホウ酸チャネル NIP7;1 とトランスポーター BOR1 が葯のタペート細胞に発現し、低ホウ素時に葯室内へホウ素を輸送し、花粉の発達に重要な役割を担うことが報告されている。本学位申請者は、高ホウ素時に根圏へのホウ酸排出に働くホウ酸トランスポーター BOR4 が葯においても発現することに着目した。まず、BOR4 は葯においてタペート細胞の葯室側の細胞膜や小胞子の細胞膜にホウ素条件に依存せず局在することを示した。次に、低ホウ素と高ホウ素条件で *bor4* 変異株の花粉の生存率が野生型株と比較して低く、花粉の構造に異常があることを示した。また、高ホウ素条件で *bor4* 変異株の稔性は低下することと、相互交配実験によりそれは主に雌蕊側の問題であることを示した。以上の結果から、低ホウ素条件で BOR4 はタペート細胞から葯室へのホウ素供給と小胞子内から花粉壁へのホウ素供給を担い、花粉の発達に寄与することを明らかにした。高ホウ素条件での BOR4 の機能についてはさらなる解析が必要である。

以上のように、本学位申請者は、植物の膜タンパク質の小胞体からゴルジ体への輸送メカニズムと、生殖組織におけるホウ素輸送のメカニズムに新たな知見をもたらした。これらの研究成果は、植物の膜交通システムと栄養輸送システムの解明に資するものであり、応用生命科学、特に植物栄養学の発展に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。