

ホウ酸毒性および耐性の分子機構

無細胞生命科学工学研究センター 野澤彰

Key words: スプライシング, ホウ酸毒性, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*

要旨

ホウ素は植物にとって必須の元素であるが、過剰量のホウ素は植物の生育を阻害する。このホウ素の毒性機構を調べるために、酵母にホウ酸耐性を付与するシロイヌナズナ遺伝子の探索を試みた。スクリーニングの結果、*AtRBP47c'* などのスプライシングへの関与が考えられる遺伝子が単離された。そこで酵母においてスプライシングに対するホウ酸の影響を RT-PCR 法により解析した。その結果、いくつかの遺伝子でホウ酸による阻害効果が観察された。また、*AtRBP47c'* を発現させた酵母では、ホウ酸によるスプライシング阻害が緩和されていた。これらの結果より、酵母におけるホウ酸毒性機構の一つはスプライシングを阻害することであり、またその阻害を緩和することで耐性を付与することができると考えられる。

序論

ホウ素は植物や動物の生育に必須な元素ですが、過剰量の摂取は毒性を示すことが知られています (Nable et al., 1997)。ホウ素過剰の土壌は世界に広く分布しており、それらの地域では作物の収量や品質の低下に悩まされています。高濃度のホウ酸による作物被害は、農業政策上の重要な課題の一つといえるでしょう。

ホウ酸の毒性が認識されるようになって約半世紀が経とうとしています。この間に数多くの植物や動物において、高濃度ホウ酸の示す毒性の症状が報告されています。しかしながら、これらの毒性症状を導くホウ酸毒性の分子機構については、これまで全く報告がありませんでした。

そこで、私たちはホウ酸毒性および耐性の分子機構を調べるために、ホウ酸耐性に関与する遺伝子の単離を試みました。単離された遺伝子の解析から推測されるホウ酸の毒性機構とそれに対する耐性機構についてお話しします。

結果

ホウ酸耐性遺伝子を単離するために、まず、酵母の生育を阻害するホウ酸濃度を調べました。その結果、最終濃度約 80mM となるようにホウ酸を培地に添加すると酵母が生育できないことがわかりました。そこで、この条件で酵母にシロイヌナズナの発現ライブラリーを導入し、生育してくる酵母を単離しました。それらの酵母からプラスミドを抽出し、再度酵母に導入し再現性の確認を行いました。このスクリーニングの結果、ホウ酸耐性付与遺伝子として、*AtPAB2*、*AtMYB13*、*AtMYB68*、*AtRPS20*、*AtRBP47c'* の 5 つの遺伝子を取得しました。これら 5 つの遺伝子の中で、今回は *AtRBP47c'* について解析を行いました。

シロイヌナズナのゲノム配列を調べた結果、*AtRBP47c'* に相同な配列を持つ遺伝子が 11 個存在す

ることが明らかになりました (Figure 1)。これらの中で 6 つの遺伝子 (*AtRBP45a*、*AtRBP47a*、*AtRBP47b*、*AtRBP47c*、*AtRBP47c'*、および *AtUBP1a*) を単離し、酵母の発現ベクターに組み込み酵母で過剰発現させました。その結果、これらの遺伝子はいずれも酵母にホウ酸耐性を付与することが明らかになりました (Figure 2)。これらのシロイヌナズナ遺伝子の機能はこれまで明らかになっていないが、タバコの相同遺伝子についてはスプライシング効率を高める働きがあることが報告されていました (Simpson et al., 2004; Lambermon et al., 2000)。そこで、次にホウ酸によりスプライシングが阻害されるのかについて、RT-PCR 法を用いて解析しました。その結果、イントロン内のブランチポイントの保存配列が非標準的である遺伝子において、高頻度でスプライシングの阻害が観察されました。さらに、これらのホウ酸によるスプライシング阻害が見られた遺伝子について、*AtRBP47c'* を発現させた酵母でのスプライシングを解析しました。その結果、すべてではありませんが、いくつかの遺伝子においてホウ酸によるスプライシング阻害が緩和されていることがわかりました。これらの結果から、酵母におけるホウ酸毒性の分子機構の一つはスプライシングを阻害することであり、*AtRBP47c'* はそのスプライシング阻害を緩和することで耐性を付与していると考えられます。

考察

今回の実験において初めて、ホウ酸耐性に関与する遺伝子を単離することができました。単離された遺伝子とその酵母ホモログの共通点を探してみると、多くの遺伝子が RNA 結合タンパク質や、スプライシング因子をコードしていることがわかりました。そこで、ホウ酸毒性は RNA の関係するなんらかの機構に対するものなのではないか、その中でもスプライシングのいずれかのステップに効いているのでは

ないかと考えました。

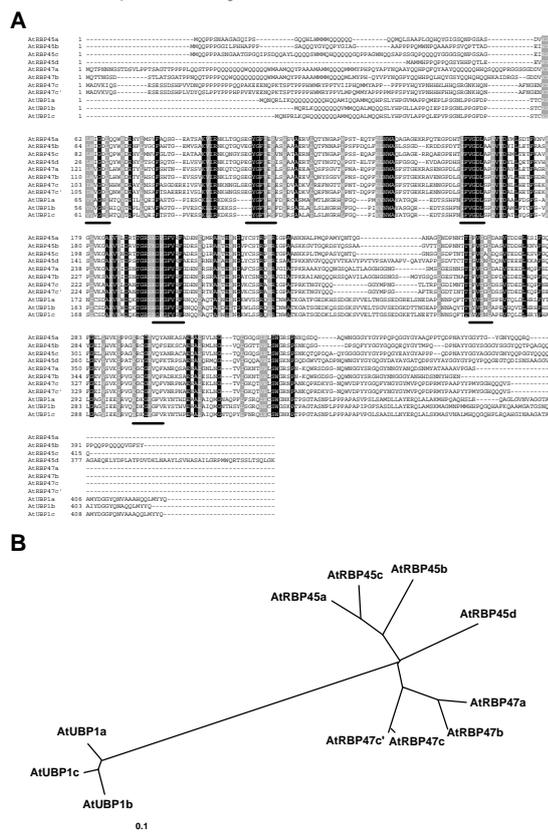


Figure 1. Amino acid sequences and phylogenetic tree of AtRBP47c'-related family proteins. **A**, Amino acid sequence alignment of AtRBP47c'-related family proteins. The alignment was generated with Clustal W using default parameters. RNP2 (6 amino acids) and RNP1 (8 amino acids) motifs of RNA recognition motif are underlined. Residues with a black background and a gray background are identical amino acids and similar amino acids, respectively, in all AtRBP47c'-related family proteins. Dashes indicate gaps to optimize the alignment. **B**, Phylogenetic tree of AtRBP47c'-related family proteins. The dendrogram indicates relative evolutionary distance among the AtRBP47c'-related family proteins and was generated by using NJ method. The bar indicates the genetic distance for 0.1 amino acid substitutions/site.

今回の実験では、RT-PCR 法により 10 個の遺伝子においてホウ酸によるスプライシング阻害が起こっていることが確かめられました。これらの遺伝子はいずれも非標準的なブランチポイント配列を持つ遺伝子であったことから、ホウ酸の毒性はこのブランチポイントの認識に関する部分に作用している可能性が考えられます。スプライシング因子を破壊した酵母のホウ酸耐性を検定した実験においても、ブランチポイントの認識に関わるタンパク質をコードする遺伝子を破壊すると高頻度でホウ酸耐性が低下するという結

果が得られました。この結果も、先の毒性作用点に関する推論をサポートする結果であるように思えます。

今回ホウ酸耐性に関与することが示された AtRBP47c' とそのホモログは (Figure 1) に示すように 3 つの RNA 結合ドメインを持っていました。最近、この RNA 結合ドメインが、タンパク質間の相互作用にも働いていることがわかってきました。今回の実験において AtRBP47c' はスプライシングエンハンサーとしての機能を持つことが示されましたが、これらのドメインがどのように働いてスプライシング効率を高めているのかも興味深い点です。ホウ酸耐性の分子機構、スプライシング効率を向上させること、を考える上でも AtRBP47c' の働きについて詳細な解析が望まれます。

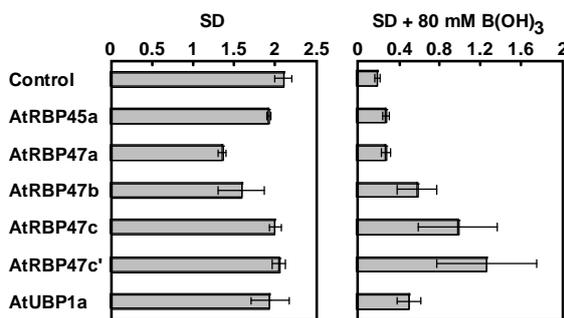


Figure 2. Boric acid tolerance of yeast Y01169 cells transformed with AtRBP47c'-related genes. Yeast cells were grown to an OD₆₀₀ of 1.0, and then diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in SD media adding 0 or 80 mM boric acid. The diluted yeast cells were cultured at 30°C and values of OD₆₀₀ at 96 h after dilution were recorded. Vertical bars represent the mean of three replicate measurements ± standard deviation of the mean.

謝辞

本研究は、東京大学生物生産工学研究センターの藤原徹先生の指導の下、私、野澤が藤原研の方々と共同で行ったものです。藤原先生をはじめ、共同研究者の方々に深謝いたします。

References

- Lambermon MH, Simpson GG, Wieczorek Kirk DA, Hemmings-Mieszczak M, Klahre U, and Filipowicz W 2000 EMBO J. 19, 1638-1649.
- Nable RO, Bañuelos GS, and Paull JG 1997 Plant Soil 193, 181-198.
- Simpson CG, Jennings SN, Clark GP, Thow G, and Brown JWS 2004 Plant J. 37, 82-91.