

## ホウ酸輸送体 BOR1 の液胞輸送制御に重要なアミノ酸残基の同定と機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 分子生物学 荻野 由香

### 1. 緒言

シロイヌナズナのホウ酸排出型輸送体 BOR1 は、低ホウ酸条件において根の細胞膜上で中心柱側へ偏って局在し、導管への効率的なホウ酸輸送を担う。一方、高ホウ酸条件下では、BOR1 は速やかにエンドソームへと移行し、液胞へと輸送され分解される。輸送基質であるホウ酸がどのように BOR1 の液胞輸送を誘導するのか、ホウ酸センシングから液胞輸送誘導へと至る分子機構は解明されていない。本研究では、順遺伝学およびホウ酸アナログを用いたケミカルバイオロジーによるアプローチから、BOR1 の高ホウ酸応答機構を明らかにすることを目的とした。

### 2. 方法

1) BOR1 の高ホウ酸応答に関連するタンパク質の同定を目的とした順遺伝学的スクリーニングにより、高ホウ酸条件下でも BOR1-GFP が分解されない変異株として、BOR1 自身の配列にミスセンス変異を持つ系統を複数単離した。スクリーニングで得られた R222K と A315V の置換変異に加え、R222A を導入した BOR1-GFP を BOR1 機能欠損株に発現させた形質転換植物体を作成し、それらの高ホウ酸応答を解析した。また、変異型 BOR1 を出芽酵母に発現させることでホウ酸輸送活性を測定し、R222 および A315 の基質輸送活性への寄与を調べた。

2) 複数のボロン酸から BOR1-GFP の液胞輸送を誘導できるものを探索し、その化合物をもとに光親和性ボロン酸 (PABA) を橋本誠博士、吉田卓真氏に合成していただいた。高濃度の PABA が BOR1-GFP の液胞輸送を誘導することを確認し、PABA と BOR1 の結合試験により BOR1 自身がホウ酸センシングを担う可能性を検証した。また、LC-MS/MS により PABA と特異的に結合するタンパク質の探索を行い、新規ホウ酸センサーの同定を試みた。

### 3. 結果と考察

1) R222 および A315 にアミノ酸置換変異を導入した各変異型 BOR1-GFP 形質転換植物では、BOR1 の液胞輸送に野生型よりも高濃度のホウ酸を必要とすることを明らかにした。また出芽酵母に発現させた変異型 BOR1 のホウ酸輸送活性は野生型と変わらず、基質輸送には関与しないことを示した。以上より、膜貫通ドメイン 6 および 8 の細胞質側末端にそれぞれ位置すると予測される R222 および A315 は、BOR1 の細胞内輸送ではなくホウ酸の感受性に関与するアミノ酸残基であることが示唆された。

2) 植物体から抽出した膜タンパク質のうち、一部への PABA の結合が認められた。さらに、BOR1-GFP と PABA の結合を確認することができた。しかしながら、PABA は GFP とも相互作用を示したため、本研究では BOR1 自身と PABA との結合を裏付けるには至らなかった。

### 4. 今後の課題

R222 および A315 が BOR1 におけるホウ酸センシングサイトならば、BOR1 はホウ酸の輸送とセンシングの機能の両方を担う、ホウ酸トランセプターであると言える。この仮説を検証するためには、ケミカルバイオロジーによる手法が有力であると考えられる。今後は本研究で開発した PABA を利用し、BOR1 におけるホウ酸センシングサイトの同定を目指したい。