

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11912

研究課題名(和文)植物におけるシクロブタンピリミジン二量体の修復と宇宙放射線耐性に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of the repair of cyclobutane pyrimidine dimer and radiation tolerance in plants.

研究代表者

寺西 美佳 (Teranishi, Mika)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10333832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線によって植物に誘発されるDNA損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)を特異的に修復するCPD光回復酵素のリン酸化修飾とそのオルガネラ移行性、さらにそのオルガネラ移行性が紫外線耐性に及ぼす影響に関して解析した。CPD光回復酵素タンパク質のN末端配列が葉緑体移行シグナルとして機能し、そのN末端領域に付加されるリン酸化修飾によって葉緑体移行性が制御されていると考えられた。またシロイヌナズナにおいては、核DNAを修復することが紫外線耐性に重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宇宙空間の厳しい環境条件下においても栽培できる植物を作り出すことは、地球上でも利用可能な環境ストレスに強い植物を作り出すことを可能にする。本研究では、主に紫外線によって誘発されるDNA損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)の修復酵素であるCPD光回復酵素の機能制御機構と植物の紫外線耐性の関連性を解析した。核DNAに誘発されたCPDの修復が植物の紫外線耐性に重要であること、CPD光回復酵素の改変により機能を変化させられる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) is a major type of DNA damage induced by UV radiation. In plants, CPD is mainly repaired by CPD photolyase. In this study, we determined whether phosphorylation of CPD photolyase regulates its translocation to DNA containing organelle, nuclear/mitochondrial/chloroplast. In addition, we investigated the relationship between the repair activity of CPD in each organelle and UV-sensitivity of Arabidopsis thaliana. As a result, phosphorylation at serine-7 in the N-terminal region of CPD photolyase might affect its translocation to the chloroplast. Furthermore, it was shown that repair of CPD which was induced in nuclear DNA was necessary for tolerance enhancement to UV in Arabidopsis.

研究分野：放射線生物学

キーワード：宇宙放射線 植物 シクロブタン型ピリミジン二量体 DNA損傷 放射線耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

宇宙における植物栽培は、二酸化炭素の酸素への変換に機能し、食料ともなり、さらに育て眺める行為が人の心を癒すため、長期の有人宇宙活動計画において必須である。しかしながら宇宙空間には、地上と異なる様々なストレス(宇宙放射線、微小重力、低圧力など)が存在するため、植物栽培は容易ではない。中でも宇宙放射線は、生物の根幹をなす DNA に損傷を誘発し変異を生み出すことから、生命機能の維持と安定した種の継続の妨げとなるため大きな問題であるが、放射線が植物に与える影響については未解明な点が多い。放射線によって誘発される DNA 損傷の中で、シクロブタン型ピリミジン二量体(cyclobutane pyrimidine dimer: CPD)は紫外線(UV)によって誘発される主な DNA 損傷として知られるが、UV 以外の放射線によっても誘発されることを見出しつつある。そのため、宇宙放射線が植物に与える影響を解析する上で、CPD は重要なターゲットであると考えられる。

CPD を特異的に修復する CPD 光回復酵素は、大腸菌から植物まで多くの生物が有する酵素であり、光エネルギーを利用し単一酵素により CPD を修復することが可能である。これまでに我々は、CPD 光回復酵素はイネの UV 耐性を左右する主要因子であること(引用文献)、DNA を有するオルガネラである核・ミトコンドリア・葉緑体に移行して機能する triple targeting proteinであることを報告してきた(引用文献)。ミトコンドリアと葉緑体の DNA にも生存に必須な遺伝子が多数コードされており、その修復も植物の放射線耐性に重要であると考えられるが、その寄与程度は不明である。また、イネ CPD 光回復酵素の N 末端部位はリン酸化修飾を受けており(引用文献)、そのリン酸化修飾が CPD 光回復酵素のオルガネラ移行性に影響を及ぼす可能性が見出されている。

2. 研究の目的

本研究では、宇宙環境で栽培可能な植物を創り出すため、放射線によって植物に誘発される CPD とその修復機構を明らかにすることを目的とする。そのために、(1) UV 以外の放射線により誘発される CPD が植物に与える影響、(2) CPD 光回復酵素の配列とリン酸化修飾の植物種間差が酵素のオルガネラ移行に与える影響、(3) オルガネラ DNA の CPD 修復活性が植物の放射線耐性に与える影響に関して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) UV 以外の放射線により誘発される CPD が植物に与える影響

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)では、野生型(*Landsberg erecta*)と CPD 光回復酵素の欠損系統(*uvr2-1*)を解析に用いた。またゼニゴケ(*Marchantia polymorpha* L.)では、野生型(*Tak-1*)と CPD 光回復酵素の欠損系統(*GT169*)を解析に用いた。それぞれ通常条件にて生育させた後、0~200Gy の X 線を照射した。照射後の個体を CPD 光回復酵素が機能する光を含む可視光下にて生育させ、個体のサイズを経時的に計測した。

(2) CPD 光回復酵素の配列とリン酸化修飾の植物種間差が酵素のオルガネラ移行に与える影響:ゼニゴケ CPD 光回復酵素の全長 597 アミノ酸残基、または 118-597 番目のアミノ酸残基と Citrine 蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、野生型ゼニゴケに対して形質転換を行った。また、イネ CPD 光回復酵素の 1-47 アミノ酸残基と Citrine 蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製し、野生型イネに対して形質転換を行った。さらに、イネ CPD 光回復酵素(*OsPHR*)のリン酸化部位である 7 番目のセリン残基をアラニンに置換した非リン酸化型(*S7A-OsPHR*)、またはアスパラギン酸に置換した偽リン酸化型(*S7D-OsPHR*)を発現するコンストラクトを作製し、野生型イネに対して形質転換を行った。作製・選抜した組換え個体を用い、Citrine 蛍光タンパク質の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

(3) オルガネラ DNA の CPD 修復活性が植物の放射線耐性に与える影響:イネ CPD 光回復酵素(全長 506 アミノ酸残基)の 487-489 アミノ酸残基に存在する核移行シグナルをアラニンに置換することで、核移行機能欠失型イネ CPD 光回復酵素を発現するコンストラクトを作製した。さらに、核移行機能欠失型イネ CPD 光回復酵素の N 末端に、SV40 large T 抗原の核移行シグナル配列を付加(Nc 系統)、ATP 合成酵素のサブユニットのミトコンドリア移行シグナル配列を付加(Mt 系統)、リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼの小サブユニットの葉緑体移行シグナル配列を付加(Cp 系統)した融合タンパク質を発現するコンストラクトをそれぞれ作製した。また、Mt 系統と Cp 系統のコンストラクトには、C 末端に核排出シグナル配列も付加した。これらのコンストラクトを、CPD 光回復酵素を欠損したシロイヌナズナ系統(*uvr2-1*)に導入し、組換え体を作製した。選抜の結果、それぞれから Nc1-5、Mt1-7、Cp4-2 系統を選抜した。

それぞれの系統を発芽させ、10 日間通常条件下にて栽培を行った後(16 時間日長)UVB 照射を開始した。UVB はランプからの距離を変えることで 0.05 W/m² から 0.2 W/m² の強度にて線量を変え、16 時間日長と同じタイミングで UVB 付加照射を行った。個体のサイズを経時的に計測し、UVB 照射開始 10 日後には地上部の新鮮重と乾燥重を測定した。

4. 研究成果

(1) UV 以外の放射線により誘発される CPD が植物に与える影響：シロイヌナズナとゼニゴケの野生型と CPD 光回復酵素欠損型を用い、CPD 光回復酵素の活性の有無が X 線耐性に与える影響を解析した。その結果、CPD 光回復酵素の活性の有無によって X 線耐性に有意な差は見られず、CPD 光回復酵素の有無と X 線耐性の間には、関連性は認められなかった。

(2) CPD 光回復酵素の配列とリン酸化修飾の植物種間差が酵素のオルガネラ移行に与える影響：ゼニゴケ CPD 光回復酵素の全長配列と蛍光タンパク質の融合タンパク質をゼニゴケに発現させたところ、葉緑体に蛍光が観察された。

また N 末端配列を欠損させたゼニゴケ CPD 光回復酵素を用い、同様の解析を行ったところ、葉緑体特異的な蛍光は見られなかった。これらのことから、ゼニゴケ CPD 光回復酵素の N 末端に葉緑体移行に関わる配列が存在すると考えられた。さらに、イネ CPD 光回復酵素の N 末端配列の一部を蛍光タンパク質に融合させ、イネに発現させたところ、葉緑体に蛍光が観察された。このことから、イネとゼニゴケの CPD 光回復酵素の N 末端配列に相同性は見られないが、いずれも葉緑体移行シグナルとして機能すると考えられた。

また、イネの CPD 光回復酵素の N 末端側に存在するリン酸化修飾部位に、人工的に変異を導入することで非リン酸化型または偽リン酸化型とした CPD 光回復酵素と、蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現するイネを用い、各オルガネラへの CPD 光回復酵素の移行性を解析した。その結果、非リン酸化型では葉緑体への局在が観察されたが、偽リン酸化型ではその局在が観察されなかったことから (図 1) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は、酵素タンパク質の葉緑体への移行を阻害している可能性が示された。

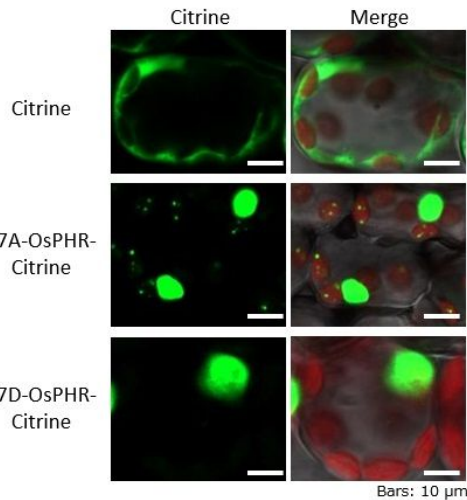


図1 非リン酸化型 (S7A) または偽リン酸化型 (S7D) のイネ CPD光回復酵素 (OsPHR) と蛍光タンパク質 (Citrine) の融合タンパク質を発現する組換え体イネを用い、Citrine蛍光のオルガネラ局在性を解析した。Merge画像の赤色蛍光は葉緑体の自家蛍光を示す。S7A-OsPHR-Citrineでは、葉緑体内にシグナルが観察された。

(3) オルガネラ DNA の CPD 修復活性が植物の放射線耐性に与える影響：各オルガネラでの CPD 修復活性の異なるシロイヌナズナ組換え体を用い、各オルガネラ DNA 特異的な遺伝子配列を用い、サザンブロット法にて各オルガネラにおける CPD 修復活性を測定した。その結果、Nc1-5 系統では、核・ミトコンドリア・葉緑体における CPD 修復活性が野生型よりも亢進していた。一方で Mt1-7, Cp4-2 系統では、ミトコンドリアと葉緑体における CPD 修復活性が野生型よりも亢進していたが、核における CPD 修復活性は検出されなかった。Mt1-7 と Cp4-2 において、それぞれ、ミトコンドリアまたは葉緑体の CPD 修復活性のみを亢進させることを意図して作製した系統であったが、いずれもミトコンドリアと葉緑体双方の CPD 修復活性が亢進した系統であった。これは、ミトコンドリア移行シグナル部位は酵素活性に必須なアミノ酸を含んでいることから、現時点では活性に影響せずミトコンドリア移行性のみを欠損させるアミノ酸変異を見出していな

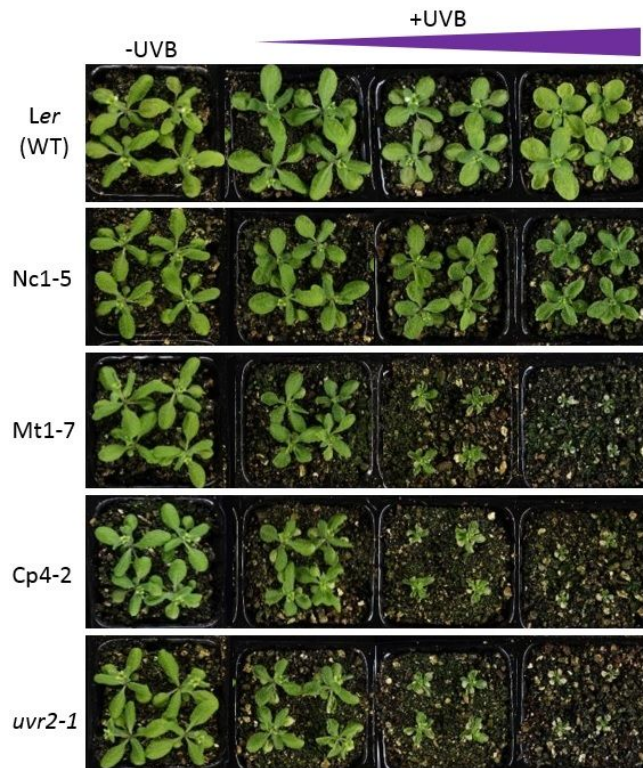


図2 野生型シロイヌナズナ(Ler)、核・ミトコンドリア・葉緑体におけるCPD修復活性が野生型よりも亢進したシロイヌナズナ系統(Nc1-5)、ミトコンドリアと葉緑体におけるCPD修復活性は野生型よりも亢進しているが、核におけるCPD修復活性は検出されないシロイヌナズナ系統 (Mt1-7, Cp4-2)、およびCPD光回復酵素欠損型のシロイヌナズナ(uvr2-1)を10日間通常条件下で生育させた後、線量の異なるUVB付加条件下にて10日間生育させた。

いため、ミトコンドリア移行シグナルには変異を導入していないこと、また本解析開始時には葉緑体移行シグナルは未同定であったことから、葉緑体移行シグナルにも変異を導入していないことが原因として考えられる。しかしながら、Mt1-7 と Cp4-2 は核における CPD 修復活性が検出限界以下であることから、核 DNA に生じた CPD 修復の重要性を解析するには十分な系統であると判断した。そこで、核 DNA に生じた CPD が修復される系統 (Nc1-5)、核 DNA に生じた CPD が修復されない系統 (Mt-7, Cp4-2)、いずれのオルガネラ DNA に生じた CPD も光回復によっては修復されない系統 (*uvr2-1*) を用い、UVB 付加条件下での生育検定を行った。

UVB ランプからの距離を変えることにより照射線量を変えて UVB を照射し、生育程度を比較したところ、Mt1-7 と Cp4-2 は *uvr2-1* と同程度の UVB 耐性を示した (図 2)。Mt1-7 と Cp4-2 は、いずれもミトコンドリアと葉緑体双方の CPD 修復活性が亢進した系統であるが、その UVB 耐性は全てのオルガネラ DNA の CPD 修復活性が欠損した系統と同程度であったことから、シロイヌナズナの UVB 耐性においては、ミトコンドリアと葉緑体 DNA の CPD 修復のみでは UVB 耐性を付与することは出来ず、核 DNA に誘発された CPD を修復することが耐性に大きな影響を与えると考えられた。

それでは、植物にとって葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA に生じた CPD の修復は必要ないのであろうか。上記 (2) に述べたように、イネ CPD 光回復酵素はリン酸化修飾の有無によって葉緑体移行性がコントロールされていると考えられた。このことから、CPD 光回復酵素の葉緑体移行が必要な現象であること、つまり葉緑体 DNA に生じた CPD は修復される必要があると考えられる。本解析においては、ミトコンドリアと葉緑体 DNA の CPD 修復を分離することができなかった。今後、葉緑体と核 DNA に生じた CPD のみが修復できる系統、またはミトコンドリアと核 DNA に生じた CPD のみが修復できる系統などを作出することができれば、各オルガネラ DNA に生じた CPD 修復が UV 耐性に与える影響をより詳細に明らかにできると考えられる。また、CPD 光回復酵素の N 末端配列は植物種によって大きく異なることから、CPD 光回復酵素のオルガネラ移行の必要性にも植物種間差がある可能性が考えられる。これらの植物種間差を明らかにし、応用することで、様々な植物に UV 耐性を付与することにつながると考えられる。

< 引用文献 >

J Hidema et al., The Plant Journal, Vol 43, 2005, pp. 57-67.

M Takahashi et al., The Plant Journal, Vol 66, 2011, pp. 433-442.

M Teranishi et al., Plant Physiology, Vol 146, 2008, pp. 1941-1951.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

寺西 美佳、太陽光下で進化した植物がもつ紫外線適応戦略、放射線と産業、査読無、Vol 143, 2017, pp. 6-10.

Nan Li, Mika Teranishi, Hiroko Yamaguchi, Tomonao Matsushita, Masaaki K Watahiki, Tomohiko Tsuge, Shao-Shan Li, Jun Hidema, UV-B-induced CPD photolyase gene expression is regulated by UVR8-dependent and -independent pathways in Arabidopsis, Plant & Cell Physiology, 査読有、Vol 56, No. 10, 2015, pp. 2014-2023.
doi:10.1093/pcp/pcv121

[学会発表] (計 4 件)

寺西 美佳、小松 千春、原 遵、山口 弘子、日出間 純、イネ CPD 光回復酵素のリン酸化修飾と葉緑体移行性、第 60 回日本植物生理学会年会、2019 年

寺西 美佳、高橋 有希、高橋 育弥、山口 弘子、日出間 純、紫外線により核・ミトコンドリア・葉緑体 DNA に誘発された CPD がシロイヌナズナの生育に及ぼす影響、日本宇宙生物科学会第 31 回大会、2017 年

寺西 美佳、山口 弘子、高橋 祐子、日出間 純、イネにおける太陽紫外線誘発ピリミジン二量体の定量と生育に及ぼす影響、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年

Mika Teranishi, Hiroko Yamaguchi, Ayako N Sakamoto, Jun Hidema, Analysis of DNA damage induced by ion beam, gamma ray and UV-B radiation in Arabidopsis, 15th International Congress of Radiation Research, 2015

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：日出間 純

ローマ字氏名：(HIDEMA, jun)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院生命科学研究所

職名：准教授

研究者番号：20250855

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。