

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18510047

研究課題名 (和文) 遺伝子修復能力増強による紫外線耐性植物の作出と紫外線傷害修復における光回復の役割

研究課題名 (英文) Enhanced tolerance of higher plants to UV by an increased copy number of the gene for DNA repair and the role of photoreactivation in the repair of DNA damage caused by UV

研究代表者

滝本 晃一 (TAKIMOTO KOICHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：00115875

研究成果の概要：紫外線は遺伝子に傷をつけ植物の生育を抑制するなど有害な作用を有する。紫外線による作物の生育抑制の克服は食料生産の増加につながる。植物には光回復という DNA の紫外線傷害を修復するシステムが備わっている。ホウレンソウやシロイヌナズナから単離した光回復遺伝子をシロイヌナズナに入れたところ、紫外線耐性の増強が見られた。また、この遺伝子を働かないようにしたところ紫外線に弱くなった。光回復は植物の紫外線耐性に重要な働きをしていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,600,000	0	2,600,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	360,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：植物、真核生物、紫外線、DNA 修復、光回復、変異、塩基置換、塩基配列、

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の紫外線耐性と DNA 傷害及び修復を関連させた研究は極めて限られていた。光回復については、その遺伝子のクローニングはシロイヌナズナ、コメ、ホウレンソウ、キュウリなどで行われていた。紫外線耐性との関係については、変異株や紫外線感受性株との比較からその重要性は示唆されていたが、遺伝子を増やす、あるいは不活性化するなどの直接的証明はみられなかった。紫外線による DNA 傷害の生物影響の研究は CPD (シクロブタン

リジン2量体)について行われてきているが、(6-4)光産物については研究例は多くなかった。

(2) 電離放射線や紫外線は DNA に傷害を与え突然変異を誘発する。植物に関しては遺伝子レベルで変異を解析する適当なシステムがほとんどなかったため、我々はすでにシロイヌナズナに標的遺伝子を組み込んだ系を開発した。しかし、変異原によっては用いにくいことや植物生育に長時間を要する問題があった。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子変異の研究は、その生物の遺伝的特性を明らかにする上で有用な情報を与えてくれる。微生物や動物では解析システムがすでに確立されており、変異の特性として塩基配列レベルでの情報が集積されている。高等植物では、従来から優良品種の作出など品種改良が行われているが、遺伝子レベルでどのような変化が起こっているのかについては、あまり知られていない。変異は、変異原に対する応答の様式、DNA 傷害、DNA 合成系や DNA 修復系を反映していると考えられ、変異の分子レベルでの詳細な研究はその生物の生理的特性を明らかにする方途の一つである。

(2) 紫外線は生物にとって有害であり、特に遺伝毒性が問題である。ピリジン 2 量体は紫外線特有の DNA 傷害であり、致死や変異の原因となり、ヒトでは皮膚がんを引き起こす。植物は光合成のために太陽光が不可欠であるが、同時に紫外線も浴び続けることになる。光回復は太陽紫外線による DNA 傷害を太陽光で修復するもので、植物にとっては都合がよい。植物の紫外線防御における光回復の役割については変異株を用いて調べられているが十分ではない。本研究ではシロイヌナズナ型ピリジン 2 量体と (6-4) 光産物の光回復についてそれぞれの役割を検討した。

(3) 食料安定供給は、近未来の地球の最重要課題であり、全ての食料の根幹をなす作物の増産は必須条件である。作物収量は、病害虫、乾燥、冠水、塩害や自然災害によって、本来の収穫量よりも著しく低いレベルといわれる。紫外線は植物の生育を抑制することがある。大気圏オゾン層の減少は今後長期間にわたって回復することなく、生物は多くの紫外線を浴びることを余儀なくされる。紫外線を除去することで生育改善のみられる植物がある。植物に紫外線耐性を付与することは食料増産につながる。本研究ではその可能性について光回復という DNA 修復能に焦点を絞って検討する。

3. 研究の方法

- (1) 植物材料：シロイヌナズナ
 遺伝子導入：アグロバクテリウム法
 栽培培養条件：23-25°C、14h 明/10h 暗
 変異解析：標的遺伝子として大腸菌リボソームタンパク大サブユニット(rpsL)遺伝子(九大・中津博士)を組み込んだシロイヌナズナ
- (2) X線照射：250kV, 15mA, 32.6Gy/min
 紫外線照射：20W UV-B ランプ
 光回復：白色光 (40W 蛍光灯)

4. 研究成果

- (1) シロイヌナズナの遺伝子突然変異

乾燥種子に 300 Gy の X 線 (京都大学放射線生物研究センター、Radioflex350, Rigaku) を照射し、B5 培地に播種して発芽 2-3 週間生育後 DNA を回収した。制限酵素処理をして rpsL 遺伝子をプラスミドとして回収し、アッセイ用大腸菌でストレプトマイシン耐性を指標に変異を検出した。大腸菌 DH10B/pFSE101 はストレプトマイシン耐性であるが、正常 rpsL 遺伝子が導入されると、ストレプトマイシン感受性となり、ストレプトマイシン含有培地で生育できない。従って、変異で機能を失った rpsL 遺伝子のみを検出できる。塩基配列解析の結果、未照射種子では塩基置換や欠失など様々な型の変異が検出されたが、照射種子では変異の 8 割以上がフレームシフトであった (表 1)。

表 1

	X-ray-induced mutation in <i>A. thaliana</i>		
	number of mutation (%)		
	<i>A. thaliana</i>	<i>E. coli</i> ⁽¹⁾	mouse ⁽²⁾
base change	4(5.7)	74(80.4)	15(40.6)
GC to AT	2	56	0
AT to GC	2	1	1
GC to TA	0	10	3
GC to CG	0	7	1
AT to CG	0	0	1
AT to TA	0	0	9
frameshifts	63(88.6)	18(19.6)	9(24.3)
deletion	4(5.7)	0	13(35.1)
total	71(100)	92(100)	37(100)

⁽¹⁾Takimoto, K. et al., (1991) Mutat. Res. 254, 199-206.

⁽²⁾fibroblasts, Kimura, H. et al., (1993) Radiat. Res. 134, 202-208.

対数期まで生育させたシロイヌナズナ培養細胞 (理研) を Φ90mm プラスチックシャーレに少量入れ、UV-B を 7.8J/m²/s の線量率で攪拌しながら 28.1kJ/m² 照射した。照射後

表 2

	UV-B-induced mutation in <i>A. thaliana</i>		
	number of mutation (%)		
	未照射	細胞/rpsL ⁽¹⁾	plant/rpsL ⁽²⁾
base change	2(50)	16(55.2)	13(68.2)
GC to AT	0	8	4
AT to GC	0	1	3
GC to TA	0	0	1
GC to CG	0	0	1
AT to CG	1	1	1
AT to TA	1	6	3
frameshifts	2(50)	13(44.8)	3(15.9)
deletion	0	0	3(15.9)
total	4(100)	29(100)	19(100)

⁽¹⁾シロイヌナズナ培養細胞

⁽²⁾シロイヌナズナ植物体 Yoshihara, R. et al., (2008) Genes & Environ. 30, 53-61

約3週間培養したのち、X線誘発変異の場合と同様に解析した。変異の約半分が塩基置換で、紫外線特有のG:C to A:T以外にA:T to T:Aが多くみられた。残り半分はフレームシフトであった(表2)。

フレームシフトは同じ塩基が多数並んでいる部位でみられた。この変異は他生物でも観察されているが、植物ではDNA複製時にDNAポリメラーゼの読み飛ばしが多いのかもしれない。

(2) 紫外線防御における光回復の意義

光合成を行うために太陽光を必要とする植物は、同時に紫外線も浴びる。

太陽光によって生じる傷害を、太陽光によって修復する光回復は、植物にとって紫外線の脅威から身を守る有効なDNA修復系と推測される。

紫外線によるDNA傷害は、その大部分が紫外線のエネルギーによって隣接ピリミジン塩基が共有結合を形成してしまうピリミジン2量体であり、主としてシクロブタンピリミジン2量体(CPD)と(6-4)光産物に分けられる。

① シクロブタンピリミジン2量体(CPD)

紫外線によるDNA傷害の主なものである。CPD photolyase遺伝子を導入して遺伝子増幅、あるいは発現抑制した場合の紫外線感受性の違いを調べた。ホウレンソウCPD photolyase遺伝子を導入、及びRNAi法によりジーンサイレンシング株を作製し、発芽種子の幼根にUV-Bを照射して、その後の伸長を野生型と比較した(root bending assay)。7.8J/m²/sの線量率で14kJ/m²sを根に照射した。野生型では伸長が40%程度抑制される線量である。遺伝子増幅株では伸長抑制の著しい緩和は見られなかった。植物が本来もっているCPD光回復酵素が十分に機能しているものと考えられる。一方、サイレンシング株では著しい感受性増大がみられ、根の伸長は野生型では未照射コントロールの60%であったのに対して20%程度であった。紫外線による主なDNA傷害であるCPDの光回復は植物にとって重要な紫外線防御機構であることが示唆された(図1)。

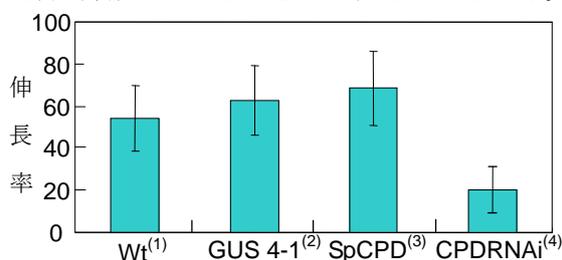


図1. CPD光回復遺伝子を増幅⁽³⁾あるいは発現抑制⁽⁴⁾したシロイヌナズナのUV-B感受性 UV-B未照射の根の伸長に対する割合 ⁽¹⁾野生型、⁽²⁾ベクターのみ導入 ⁽³⁾増幅、⁽⁴⁾ジーンサイレンシング

② (6-4)光産物

紫外線によるDNA傷害の2-3割は、CPDとは構造の異なる(6-4)光産物である。植物などは(6-4)光産物修復のための特異的光回復酵素をもっているが、紫外線防御における役割は明らかにされていない。

(i)シロイヌナズナの(6-4) photolyase遺伝子を導入してコピー数を増幅したシロイヌナズナを作製した。(6-4) photolyase遺伝子の発現をreal-time PCRで調べたところ、地上部及び根において有意な発現増加がみられた(図2)。

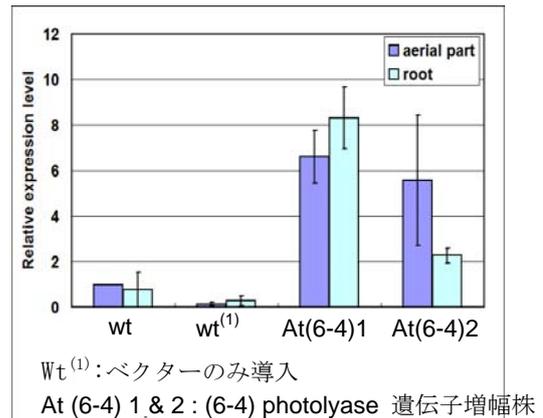


図2 (6-4) photolyase geneを導入したシロイヌナズナの遺伝子発現

遺伝子増幅した株の(6-4)光産物の光回復を調べた。2時間UV-B照射(56kJ/m²)後6時間白色光照射での残存(6-4)光産物は、野生型で光回復前の60%余りに対して、増幅株では40%であった。導入した(6-4) photolyase遺伝子が機能していることが示されたが、UV-B照射→光回復処理をした幼植物の生重量では、野生型と比べて有意な違いは認められなかった。

(6-4) photolyase遺伝子を増幅した株の紫外線感受性を、root bending assayにより調べた。発芽後4-5日の種子に28kJ/m²のUV-Bを照射後、さらに3日間14h-light/10h-darkの光サイクル下で培養して、幼根の伸張程度を比較した。遺伝子導入しない対象区では、UV-B照射区の伸張が未照射の60%程度であったのに対して、導入区では70-80%であった。(6-4) photolyase遺伝子を増やして(6-4)光産物の除去を早めることによって、紫外線傷害の若干の緩和がみられた。地上部と違って根には光を吸収する色素が少ないので、光回復の効果がより明確になったものと考えられる。

ii) (6-4)光回復遺伝子を増幅、あるいはRNAi法によりジーンサイレンシングしたシロイヌナズナ培養細胞を作製し、遺伝子発現、(6-4)光産物の除去、及び紫外線感受性

を調べた。

サイレンシング株の(6-4)photolyase 遺伝子の発現量は、野生型の約20%であった。一方、導入株では5-9倍の発現量増加がみられた。

光回復光の存在下でUV-Bの線量を変えて照射し、(6-4)光産物の除去の程度を調べた。140kJ/m²では残存光産物の量は野生型の約半分、遺伝子増幅により、傷害修復効率の上昇が認められた。なお、この増幅株はCPDの除去には全く影響しなかった。従って、この増幅株は(6-4)光産物特異的である。

(6-4)photolyase 遺伝子の増幅株及びサイレンシング株のUV-Bに対する生存率を調べ、紫外線感受性を比較した。0, 28, 56, 84, 140 kJ/m²を照射した後、16h明-8h暗の光サイクルで3日間光回復を行った。細胞の生死はエバンスブルー染色により判定した。増幅株では若干の生存の上昇がみられた。一方、サイレンシング株では感受性の著しい増大が観察され、140kJ/m²では野生型の30%程度であった(図3)。

(6-4)光産物は、DNAの紫外線傷害の代表であるCPDに比べると生成量は少ないが、植物の紫外線感受性の重要な要因である。

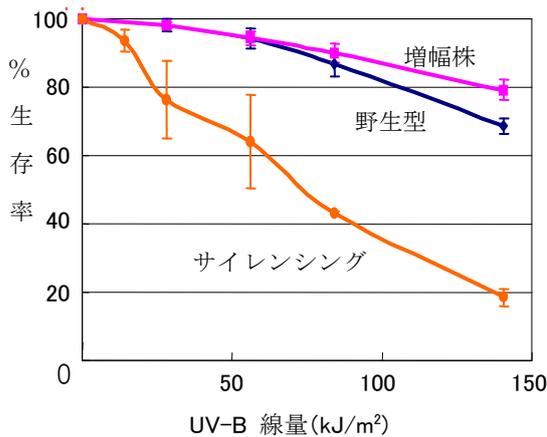


図3. (6-4)photolyase 遺伝子を増幅株及びサイレンシング株の紫外線(UV-B)感受性。紫外線照射後16h明-8h暗の光サイクルで3日間光回復を行った。

③ ピリミジン2量体の消失速度

UV-B照射(56kJ/m²)後光回復光下でのCPD及び(6-4)光産物の経時的消失を培養細胞を用いて調べた。CPDは時間とともにほぼ直線的に減少し、24時間で光回復光照射前の20%であった。一方、(6-4)光産物は最初の3時間程度で急激な減少(約60%)がみられ、その後は緩やかに減少していった。(6-4)photolyase 遺伝子の増幅株では、最初の3時間で当初の80%が消失した。このような消失パターンの違いが何に起因しているのかは不明だが、生成量は少ないが、遺伝毒性あるいは細胞毒性

は(6-4)光産物の方が大きいために、早急に取り除く必要があるためかもしれない。

④ 光回復の誘導

光回復は白色光などで誘導されると言われている。シロイヌナズナ植物体について、CPD photolyase 及び(6-4)photolyase の誘導の有無を明らかにするために、それぞれのmRNAをreal-time PCRで測定した。

あらかじめ10時間暗所処理したシロイヌナズナに白色光を3, 6, 9時間照射した。CPD photolyase は白色光で有意な誘導がみられ、照射6時間が誘導のピークであった。一方、(6-4)photolyase に関しては有意な誘導はみられなかった。本研究において、UV-BによってもCPD photolyase が誘導され、誘導の経時的パターンは白色光の場合と異なることが示唆された。なお、これがUV-Bによって生成されたDNAによるものかどうかは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- (1) Ryouhei Yoshihara, Chiyoko Nakane, Ryohei Sato, Ai Yasuda, Koichi Takimoto Silencing of CPD photolyase makes *Arabidopsis* hypersensitive and hypermutable in response to UV-B radiation. *Genes & Environment* 30, 53-61 (2008) 査読有
- (2) Ryouhei Yoshihara, Chiyoko Nakane, Koichi Takimoto A new system for detecting mutations in *Arabidopsis thaliana* and the mutational spectra resulting from ethylmethanesulfonate treatment. *Journal of Radiation Research* 47, 223-228 (2006) 査読有
- (3) 吉原亮平、滝本晃一 高等植物における突然変異スペクトル解析システムの現状. *放射線生物研究* 41, 61-76 (2006) 査読有
- (4) Jun'ichi Mano, Takeshi Nakahara, Yoshimitsu Torii, Hideki Hirose, Junji Miyakoshi, Koichi Takimoto. Seed deterioration due to high humidity and high temperature is suppressed by extremely low frequency magnetic field. *Seed Science & Technology* 34, 189-192 (2006) 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 吉原亮平、長谷純宏、滝本晃一、鳴海一成
シロイヌナズナ乾燥種子および幼植物における放射線誘発突然変異の解析 日本放射線影響学会 2008 年 11 月 19-21 日 北九州
- (2) 滝本晃一 高等植物における紫外線防御機構としての光回復と紫外線誘発突然変異 環境紫外線による生物影響に関する研究会 2007 年 10 月 11-12 日 岡崎
- (3) 佐藤良平、安田 愛、吉原亮平、滝本晃一
植物の紫外線防御における光回復の意義と紫外線誘発突然変異 日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会 2007 年 9 月 14-15 日 山口
- (4) 吉原亮平、中根千陽子、佐藤良平、安田愛、滝本晃一 シロイヌナズナにおける紫外線誘発遺伝子突然変異の特異性 日本植物生理学会 2007 年 3 月 28-30 日 松山
- (5) 吉原亮平、滝本晃一 シロイヌナズナにおける EMS 誘発突然変異 日本放射線影響学会 2006 年 9 月 6-8 日 札幌
- (6) 中根千陽子、吉原亮平、滝本晃一 CPD 光回復遺伝子導入によるシロイヌナズナの紫外線生育抑制の改善 日本放射線影響学会 2006 年 9 月 6-8 日 札幌
- (7) 中根千陽子、吉原亮平、福村雄介、滝本晃一
光回復遺伝子導入による紫外線耐性シロイヌナズナ作出の試み 日本農芸化学会中四国支部大会 2006 年 5 月 13 日 松江

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝本 晃一 (TAKIMOTO KOICHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号 : 00115875

(2) 研究分担者

松井 健二 (MATSUI KENJI) 2006-2007 年度

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 90199729

(3) 連携研究者

松井 健二 (MATSUI KENJI) 2008 年度

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 90199729