

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12317

研究課題名(和文)紫外線誘発DNA損傷が非照射組織であるイネ茎頂分裂組織の転写と複製に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of UV-induced DNA damage on transcription and replication in shoot apical meristem of rice

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線B(UV-B)は植物の生育を阻害するため、植物のUV-B抵抗性メカニズムを理解することは植物の生産性向上に寄与する。本研究では、植物の生産性を左右する茎頂分裂組織にUV-Bが及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、茎頂分裂組織に直接UV-Bが照射されないイネにおいては、UV-B照射により誘発されたCPDが茎頂分裂組織の細胞分裂を阻害していることが分かった。また茎頂分裂組織に直接UV-Bが照射されるシロイヌナズナにおいては、花芽形成が誘導されていない短日条件下では、CPD光回復酵素の欠損により茎頂分裂組織の分化が促進され、花芽形成が誘導されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の茎頂分裂組織は、未分化であれば葉を増やし、分化すれば花芽を形成する。そのため、茎頂分裂組織の増殖・分化の制御は、食料生産性に直結する問題である。本研究により、UV-B照射によって誘発されたDNA損傷が、イネにおいては茎頂分裂組織の細胞分裂を阻害することが分かった。シロイヌナズナにおいては生育条件によって効果が異なり、花芽形成が誘導されていない条件下では、UV-B誘発DNA損傷が茎頂分裂組織の分化を促進することが分かった。この生物種や条件による効果の違いを利用し、今後、UV-B誘発DNA損傷が茎頂分裂組織の増殖・分化を導く分子メカニズムを明らかにできると考えている。

研究成果の概要(英文)：Ultraviolet B (UV-B) is known to inhibit plant growth. Therefore, the enhancement of UV-B tolerance contributes to improving plant productivity. The effects of UV-B on the shoot apical meristems were investigated to elucidate the mechanisms of UV-B tolerance. Shoot apical meristems are not directly exposed to UV-B irradiation in rice plants. However, CPD induced by UV-B inhibits cell division. In Arabidopsis, shoot apical meristems are directly exposed to UV-B irradiation, and the floral transition was promoted under short-day conditions. These differences in effects among species and conditions provide clues to the molecular mechanisms by which UV-B-induced DNA damage leads to the proliferation and differentiation of shoot apical meristems.

研究分野：分子生物学

キーワード：紫外線UV-B イネ 紫外線抵抗性 DNA損傷 シクロブタン型ピリミジン二量体

1. 研究開始当初の背景

紫外線 B (UV-B) は植物の生育を阻害するため、UV-B が植物にどのように影響を及ぼすかを理解し UV-B 抵抗性を増強させることは、植物の生産性向上に大きく寄与する。UV-B によって誘発される DNA 損傷の中で、最も誘発量の多い損傷はシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) である。イネの UV-B 抵抗性は、CPD を修復する酵素である CPD 光回復酵素の活性に左右され、CPD 光回復酵素の発現抑制型イネでは UV-B 付加条件下における生育が大きく阻害されることを報告してきた¹⁾。しかし、CPD 光回復酵素の発現抑制型イネの UV-B 付加条件下での生育は、第 3 葉程度までは野生型と同様に生育する (図 1)。イネにおいては、第 3 葉までは種子内で既に組織形成がなされているため、CPD 光回復酵素の発現抑制型イネにおいては、UV-B 付加により新たな細胞分裂が阻害されていると考えられた。しかし、イネの茎頂分裂組織は植物体基部の内部に存在しており、UV-B が直接照射されない。このことから、直接 UV-B が茎頂分裂組織の分裂を阻害するわけではなく、UV-B 照射によって生じたシグナルが、UV-B 照射組織から離れた UV-B 非照射組織に伝達されている可能性が考えられた。

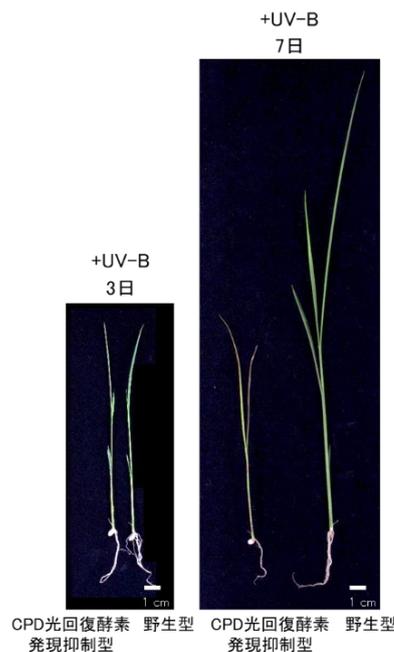


図1 UV-B照射がイネの生育に及ぼす影響
UV-B照射によりCPD光回復酵素の発現抑制型イネは、第3葉展開までは野生型と同様に生育するが(3日)、その後の成長が見られない(7日)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、植物の UV-B 抵抗性メカニズムを明らかにするため、UV-B が茎頂分裂組織に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。また、イネとは異なり茎頂分裂組織が直接 UV-B にさらされるシロイヌナズナも使い、花芽原基の形成に対する UV-B の影響を解析することで、茎頂分裂組織への UV-B の影響に関して、植物種を超えて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型イネ (ササニシキ)、CPD 光回復酵素の過剰発現型イネ¹⁾、CPD 光回復酵素の発現抑制型イネ¹⁾を給水・発芽させた後、土に播種した。生育条件は日長 12 時間、昼夜温度は 28°C/20°C とした。播種直後から UV-B を 1.0 W/m² の強度にて照射した。生育 5 日目の個体から、地上部 5mm を切り出し、外側 2 層を除き、内部組織を液体窒素にて凍結保存した。

凍結組織に TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.) と 1.5mm φ のジルコニアビーズを加え、ビーズ細胞破碎装置を用いて組織を破碎した。破碎液から total RNA を抽出した後、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型とし、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (日本ジェネティクス株式会社) を用い、リアルタイム PCR にて遺伝子発現量解析を行った。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

OSH1:

Fw: 5'-TCAAGCACCATTTGCTGAAG-3'

Rv: 5'-AGCTGTTGACGAGCATCCTT-3'

CDKB2:

Fw: 5'-GCTCGTTCCTGTCCTCTC-3'

Rv: 5'-GATGTCAACCGGAGTGGAGT-3'

Elongation Factor (EF) :

Fw: 5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3'

Rv: 5'-GACTTCCTTACGATTCATCGTAA-3'

イネ種子を除穎し、表面殺菌した後、MS 寒天培地に播種し、30°C にて 1 週間生育させた。第一葉が展開した個体に UV-B を 1.0 W/m² の強度にて 12 時間照射した。寒天培地から個体を引き抜き、1 個体ずつ 96 ウェルプレートに移した。100 μM の EdU (5-ethynil-2'-deoxyuridine) 溶液を加え、3 時間処理した。洗浄後、顕微鏡下にて茎頂分裂組織を含む部位を切り出した。さらに、中心部分を生長方向に対して縦断面に切断した。パラホルムアルデヒドにて固定後、キットに従い検出した (Click-iTTM Plus EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Thermo Fisher

Scientific)。

シロイヌナズナの野生型 (*Landsberg erecta*)、または CPD 光回復酵素欠損体 (*uvr2-1*) を長日条件下 (日長 16 時間)、もしくは短日条件下 (日長 8 時間) にて生育させた。生育温度は 23°C 一定とした。本葉展開後に UV-B 照射を開始した。UV-B 照射条件は、0.1 W/m² の UV-B を 15.5 時間 (長日条件下) もしくは 7.5 時間 (短日条件下) とした。抽苔までの日数、および開花時のロゼット葉の枚数を計測した。

4. 研究成果

イネの茎頂分裂組織から RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。OSH1 遺伝子 (Os03g0727000) は茎頂分裂組織にて発現が高いことが報告されている²⁾。そこで、葉と茎頂分裂組織それぞれから抽出した RNA を用い、EF を内部標準遺伝子とした相対発現量を解析した。その結果、OSH1 の発現量は、茎頂分裂組織では葉より 48 倍高くなっており、茎頂分裂組織の回収が出来ていると判断した。

次に、細胞周期 G2/M 期に機能することが知られる CDKB2 遺伝子 (Os08g0512600)³⁾ の発現量を解析した。UV-B 照射下と UV-B 未照射下での発現量の比 (+UV-B/-UV-B) を計算し、イネ系統間で比較したところ、野生型ササニシキは 1.0 倍であったが、CPD 光回復酵素過剰発現体イネでは 1.5 倍、CPD 光回復酵素発現抑制体イネでは 0.6 倍であった。このことから、UV-B 照射により、CPD 光回復酵素の発現量が高い系統では細胞周期が活性化しており、一方で CPD が修復されない CPD 光回復酵素の発現抑制系統では細胞周期が不活性化されている可能性が考えられた。

そこで、細胞の複製程度を検出するため、DNA 合成時に取り込まれるチミジンのアナログである EdU をイネに取り込ませ、細胞分裂を検出した。UV-B を 12 時間照射した場合、CPD 光回復酵素発現抑制型イネにおいては、CPD 光回復酵素過剰発現型イネと比較し、EdU シグナルが減少しており、細胞分裂が阻害されていることが分かった (図 2)。本研究においては、CPD 光回復酵素の発現量が異なるイネに対し、一定量の UV-B を照射量しており、系統間において異なるのは CPD 光回復酵素の活性のみであることから、UV-B によって誘発され残存する CPD 数のみが異なっていることとなる。このことから、地上部に誘発された CPD が、UV-B が直接照射されない茎頂分裂組織の細胞分裂を制御していることが示唆された。

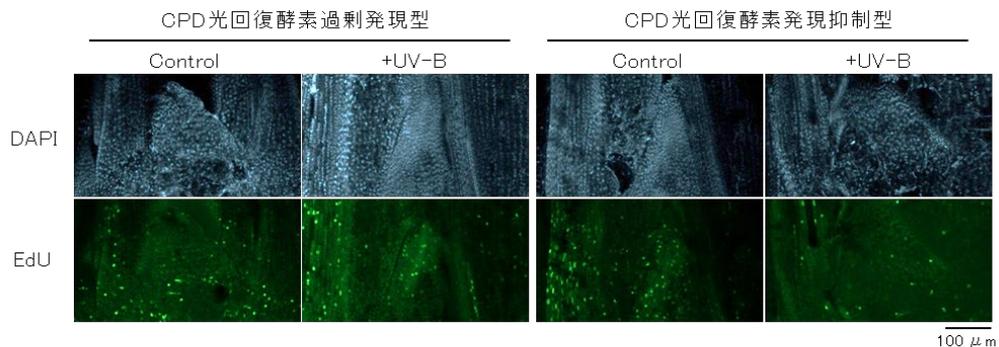


図2 EdUを用いた細胞分裂解析

CPD光回復酵素過剰発現型と発現抑制型イネに対し、UV-B未照射 (Control) または付加条件下 (+UV-B) にて12時間処理した後、EdUを3時間取り込ませ、細胞分裂程度を解析した。

次に、イネとは異なり茎頂分裂組織が UV-B にさらされるシロイヌナズナを用い、花芽原基の形成に対する UV-B の影響を解析した。野生型シロイヌナズナと CPD 光回復酵素の欠損体に対し、UV-B 照射の時間と強度を変え、抽苔までの日数と開花時のロゼット葉の枚数を計測した。

長日条件下での抽苔までの日数は、野生型シロイヌナズナにおいて、UV-B 未照射では 20.9 ± 0.6 日、UV-B 照射下では 21.4 ± 0.7 日であった。また CPD 光回復酵素の欠損体においては、UV-B 未照射では 21.5 ± 0.6 日、UV-B 照射下では 22.4 ± 1.1 日であった。このことから、長日条件下では UV-B 照射により抽苔がわずかに遅れることが分かった。ロゼット葉の枚数は、野生型シロイヌナズナにおいては 6.0 ± 0.5 枚 (未照射)、6.1 ± 0.5 枚 (+UV-B)、CPD 光回復酵素の欠損体においては 6.6 ± 0.6 枚 (未照射)、7.0 ± 0.8 枚 (+UV-B) であり、いずれも有意差は見られなかった。

短日条件下での抽苔までの日数は、野生型シロイヌナズナにおいては、UV-B 未照射では 40.1 ± 1.9 日、UV-B 照射下では 46.5 ± 2.0 日であり、UV-B 照射により抽苔までの日数が遅延することが分かった (図 3)。一方で CPD 光回復酵素の欠損体においては、UV-B 未照射では 38.6 ± 1.5 日、UV-B 照射下では 38.2 ± 1.4 日であり、野生型において見られた UV-B 照射による遅延が認められなかった (図 3)。開花時のロゼット葉の枚数は、野生型シロイヌナズナにおいては UV-B 未

照射では 51.5 ± 6.8 枚、UV-B 照射下では 62.6 ± 5.3 枚であり、UV-B 照射によって増加することが分かった。一方で、CPD 光回復酵素の欠損体においては UV-B 未照射では 50.5 ± 7.3 枚、UV-B 照射下では 19.5 ± 2.4 枚であり、UV-B 照射によって減少することが分かった。

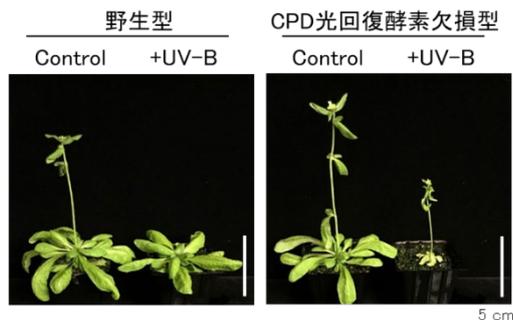


図3 UV-Bがシロイヌナズナの開花に及ぼす影響
野生型とCPD光回復酵素欠損型のシロイヌナズナを
UV-B未照射 (Control) もしくはUV-B付加条件下
(+UV-B)にて生育させた。

これらの結果より、シロイヌナズナにおいては、長日条件下と短日条件下においてはUV-B照射の影響が異なることが分かった。長日はシロイヌナズナの花芽形成を促進する条件であるが、この条件下ではUV-B照射の影響は小さく、CPD光回復酵素欠損体であっても野生型と大きな差は認められなかった。一方で短日条件下では、UV-B照射は野生型の花芽形成を遅延させるが、一方でCPD光回復酵素の欠損は、花芽形成を促進させることが分かった。これより、UV-B照射により誘発されたCPDによって茎頂分裂組織の分化が促進されたと考えられた。

本研究では、UV-Bが茎頂分裂組織に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、茎頂分裂組織に直接UV-Bが照射されないイネにおいては、UV-B照射により誘発されたCPDが茎頂分裂組織の細胞分裂を阻害していることが分かった。また茎頂分裂組織に直接UV-Bが照射されるシロイヌナズナにおいては、花芽形成が誘導されていない短日条件下では、CPD光回復酵素の欠損により茎頂分裂組織の分化が促進され、花芽形成が誘導されることが分かった。茎頂分裂組織の増殖・分化は、食料生産量に直結するため、コントロールすることが可能となれば非常に有用である。今後、UV-B誘発DNA損傷が、細胞の増殖・分化を導く分子メカニズムを明らかにすることで、UV-Bによる食料生産性制御につなげる研究を展開したいと考えている。

<引用文献>

- 1) Hidema J, Taguchi T, Ono T, Teranishi M, Yamamoto K, Kumagai T. Increase in CPD photolyase activity functions effectively to prevent growth inhibition caused by UV-B radiation. *Plant J.* 2007 Apr;50(1):70-9.
- 2) Ohmori Y, Tanaka W, Kojima M, Sakakibara H, Hirano HY. WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene FCP1 in rice. *Plant Cell.* 2013 Jan;25(1):229-41.
- 3) Endo M, Nakayama S, Umeda-Hara C, Ohtsuki N, Saika H, Umeda M, Toki S. CDKB2 is involved in mitosis and DNA damage response in rice. *Plant J.* 2012 Mar;69(6):967-77

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Ayako N., Sakamoto Tomoaki, Yokota Yuichiro, Teranishi Mika, Yoshiyama Kaoru O., Kimura Seisuke	4. 巻 5
2. 論文標題 SOG1, a plant specific master regulator of DNA damage responses, originated from nonvascular land plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gideon Sadikiel Mmbando , Mika Teranishi , Jun Hidema	4. 巻 12
2. 論文標題 Transgenic rice <i>Oryza glaberrima</i> with higher CPD photolyase activity alleviates UVB-caused growth inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 GM Crops & Food	6. 最初と最後の頁 435-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21645698.2021.19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大竹桃, 小松千春, 原遵, 寺西美佳, 愿山郁, 日出間純
2. 発表標題 CPD光回復酵素の葉緑体移行に必要なアミノ酸配列の同定
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦華子, 寺西美佳, 日出間純
2. 発表標題 イネにおける2つのUVB光受容体UVR8の機能とUVB抵抗性
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakamoto A, Sakamoto T, Yokota Y, Teranishi M, Kimura S
2. 発表標題 SOG1 homologues regulate DNA-damage responses in <i>Physcomitrella patens</i>
3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張琳、寺西美佳、佐藤修正、中込祐介、遠藤貴司、日出間純、東谷篤志
2. 発表標題 イネいもち病抵抗性遺伝子Pi54の起源とジャポニカイネにみられる消失
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋亜未、高橋有希、日出間純、寺西美佳
2. 発表標題 UV-Bストレスがシロイヌナズナの開花に与える影響
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------