

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04330

研究課題名(和文) CPD光回復酵素が葉緑体で機能しない植物の新たな太陽紫外線UVB適応戦略機構

研究課題名(英文) Novel solar UVB adaptation strategic mechanism in plants, which have not function of CPD photoreactivation in chloroplast.

研究代表者

日出間 純(Hidema, Jun)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20250855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネは、太陽光紫外線UVBにより核、ミトコンドリア、葉緑体DNA上に誘発されるDNA損傷を光回復酵素(PHR)により修復することでUVB抵抗性を獲得し生存している。しかしイネ科以外の植物の多くはPHRが葉緑体では機能していないことを見出した。光回復酵素が葉緑体で機能しない植物は、どのようにUVBによる障害を防御し、生存しているのか？この問いに対して、我々は変異体を用いた解析を通して、PHRが葉緑体で機能しない植物は、障害を受けた葉緑体を積極的に除去するオートファジー機能に加え、UVBを特異的に感知し、葉緑体の局在を変化させる機能が新たなUVB適応機構となっていることを実験的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、陸上に初めて進出したコケ植物から、様々な光・紫外線環境で生育する植物を対象に解析を行った。その結果、基本植物は、UVBに対する防御機構として、核とミトコンドリアは、光回復酵素により、そして葉緑体はUVB誘導性葉緑体定位運動とオートファジー機能を発達させて、UVBに対する生育障害を防御していることを見出した。本研究成果は、地上に初めて進出し、様々な光・紫外線環境で生存してきた植物の、進化過程におけるUVB適応戦略機構の獲得、生物の有する潜在的適応能力の理解といった放射線(含紫外線)生物学、植物科学分野の根幹をなす新たな概念を提唱し、学術的・社会的意義は大きく評価された。

研究成果の概要(英文)：Rice plants survive by developing UVB resistance through the repair of DNA damage, cyclobutene pyrimidine dimer (CPD), induced by solar UVB on the nucleus, mitochondria, and chloroplast DNA by photolyase (PHR). However, we found that PHR does not function in chloroplasts in many plants other than grasses. Our question is how do plants without PHR functioning in their chloroplasts defend against and survive UVB-induced damage? To address this question, we experimentally demonstrated through analysis using mutants that plants in which PHR does not function in chloroplasts have a new UVB adaptation mechanism that specifically senses UVB and alters chloroplast localization, in addition to an autophagy function that actively removes damaged chloroplasts.

研究分野：光環境植物生理学

キーワード：植物 太陽紫外線UVB DNA修復 光回復酵素 オートファジー 葉緑体定位運動 紫外線防御機構

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

太陽光を利用して生きる植物は、常に有害紫外線 UVB (280-315 nm) による障害を受けるため、動物以上に UVB による障害の修復機構、そして UVB 防御機構の保持は重要である。これまでに申請者らは、高等植物における UVB 抵抗性と UVB 環境適応戦略機構に関する一連の解析を進め、植物における UVB 抵抗性には、UVB によって誘発される DNA 損傷の 1 つである、シクロブタン型ピリミジン二量体：cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) を修復する CPD 光回復酵素 (PHR) の修復機能に加え (引用文献)、UVB によって障害を受けたオルガネラを除去するオートファジー機能の重要性を報告した。しかし、CPD 光回復酵素の細胞内局在を解析したところ、イネでは核、ミトコンドリア、葉緑体のすべての DNA を有するオルガネラに移行して機能しているものの、双子葉植物シロイヌナズナでは、核とミトコンドリアでは機能するものの、葉緑体移行シグナルペプチドの欠失により葉緑体へは移行できず、葉緑体 DNA 上に生成した CPD を修復できない (H29-31 基盤研究 B) (引用文献)。葉緑体は言うまでもなく、光合成を行う中心の器官であり、葉緑体 DNA 上には、光合成機能に関わる主要な遺伝子がコードされている。

ここで申請者らは、1. 「葉緑体 DNA の修復機構を持たないシロイヌナズナは、なぜ太陽光の下で生存出来るのか？」、2. 「PHR の葉緑体局在の欠失は、シロイヌナズナが特有なのか？それとも葉緑体でも機能することが出来るイネが特有なのか？PHR の葉緑体局在性の違いは、植物の中で広く存在するのか？」、3. 仮に PHR の葉緑体局在性に関して植物種間差が広く存在した場合、「進化の過程で植物は、どのような紫外線適応戦略機構を獲得し、生存してきているのか？」という問いが生じた。これらの問いを探究することは、植物の新たな UVB 防御機構の解明、植物の進化過程における紫外線適応戦略機構、DNA 損傷の蓄積から身を守り、ゲノム恒常性を維持し、次世代に継承するための新しい概念を提唱できると考える。ここで、上記の問いを探究するにあたり申請者は、障害を受けた葉緑体の「オートファジーによる除去機構」、および太陽光の強さを感じて、細胞内での葉緑体の配置を変化させる機能、「葉緑体定位運動」に着目する。葉緑体定位運動とは (図 1 参照)、太陽光中の青色光の量を「青色光センサータンパク質フォトリロピン」が感知し、弱光の際は光合成を効率的に行うために、細胞表面に集まり多くの光を受光する (集合反応) 一方、強光のもとでは光 (可視光) によるダメージを避けるために細胞側面に逃げる反応 (逃避反応) である。

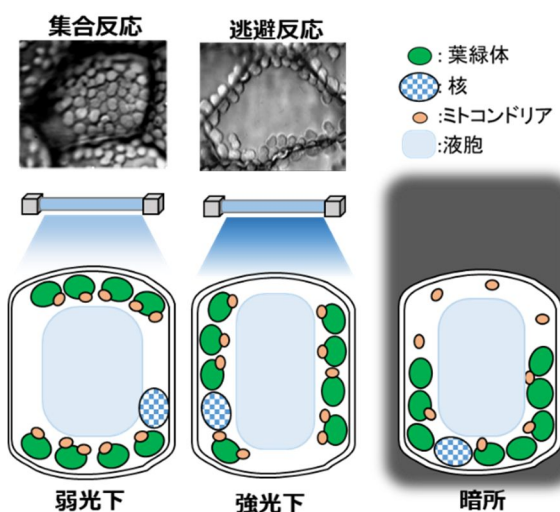


図 1. 弱光下、強光下で栽培した際の細胞内オルガネラ配置。上段は、細胞を表皮上方から撮影した写真、下段は、細胞を横から見た際の模式図。弱光下では、葉緑体は細胞表面に集合 (集合反応)、強光下では細胞側面に移動する。なお、暗黒下では、葉緑体、核は表皮側とは反対の底側に配置する。

2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナに加え、葉緑体で CPD 光回復酵素 (PHR) が機能出来ない植物種があるか否かを網羅的に探索し、葉緑体で PHR が機能出来ない植物は、UVB による葉緑体障害に対して具体的にどのような戦略で UVB 抵抗性を獲得しているのか？を、オートファジー機能と、光環境の違いによる細胞内でのオルガネラの配置に着目し、UVB 抵抗性との関連を解析する。そして、PHR の葉緑体局在の有無から見た新たな植物の太陽紫外線 UVB 防御機構、植物の進化過程における紫外線適応戦略機構に関して新たな概念を提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CPD 光回復酵素の葉緑体局在に関する植物種間差：N 末 PHR-GFP キメラタンパク質を用いた細胞内局在解析

コケ類をはじめ、シダ、裸子植物、被子植物、さらには被子植物の中でもナス科、ウリ科、マメ科、イネ科などの種から、PHR の全長 cDNA または N 末端領域およそ 50 アミノ酸配列を取得する。これらの取得した配列に GFP を連結したコンストラクトを、各植物体から調製したプロトプラストに PEG 法により一過的に発現させ、蛍光顕微鏡を用いて GFP の細胞内局在を調べ、様々な植物における PHR の葉緑体局在性を明らかにする。

(2) 細胞内の各オルガネラにおける UVB 誘発 CPD 量の蓄積と葉緑体活性、およびオートファジー活性との関係

PHR の葉緑体移行性が異なるイネとシロイヌナズナを材料に、照射 UVB 量の増加に伴う、細胞内の葉緑体、ミトコンドリア、核の各々のオルガネラに誘発される CPD の蓄積量変化(引用文献)とその CPD の蓄積量変化による PAM クロロフィル蛍光法による葉緑体活性の変化、ならびに障害を受けた葉緑体のオートファジーによる除去頻度(引用文献)の変化を解析する。

(3) 光環境の違いによる細胞内でのオルガネラの配置から見た葉緑体 PHR 局在性と UVB 抵抗性との関係

葉緑体定位運動を欠失し、様々なオルガネラ配置のパターンを示すシロイヌナズナ変異体 (*phot2-1*, *chup1-3*, *jac1-5* 変異体、九州大学和田正三名誉教授より供与、引用文献) ならびに UVB 強度と可視光強度のバランスを種々組み合わせ、様々な自然界での光環境を模擬した環境で栽培することで細胞内のオルガネラ配置が異なった状態のシロイヌナズナとイネを材料に、細胞内の各オルガネラにおける UVB 誘発 CPD 量、オートファジー活性を植物間で比較解析する。

4. 研究成果

(1) ゼニゴケ、およびイネ科の一部の植物(イネ、コムギ、オオムギ等)のみ、CPD 光回復酵素(PHR)は葉緑体に局在するものの、他の多くの植物では、PHR は葉緑体に局在していないことを見出した。また、イネ PHR の葉緑体移行のメカニズムを解析した結果、イネ PHR は翻訳後、小胞体を経由した経路(endoplasmic reticulum (ER)-Golgi system)で葉緑体輸送されていることを、小胞体輸送の阻害剤である brefeldin A (BFA)を用いた解析から明らかにした。また、イネ PHR の 7 番目セリン、および 8、9 番目のプロリンは、イネ PHR が小胞体を経由するにあたり、N 末端領域の疎水性を維持するために必要であった。なお、イネ科以外の植物では、この葉緑体移行に重要な配列を欠失しており、進化の過程で新たに獲得した配列であった。

(2) PHR が葉緑体に移行しないシロイヌナズナでは、紫外線 UVB に応答して細胞内での葉緑体配置を、UVB が細胞内の入射する方向に変化させる現象を見出した。この反応は、これまで青色光依存的に反応する葉緑体定位運動と似た現象であり、この反応が UVB に対しても特異的に応答することを見出した。また、UVB により誘導される葉緑体の集合反応は、細胞内への UVB 入射を防御し、核 DNA 上での CPD 蓄積を防御していることを見出した。一方、UVB の細胞内への入射を防御した葉緑体は、重篤な障害を受け、機能できなくなるものの、これら障害を受けた葉緑体は、速やかにオートファジーにより、液胞へと排除していることも見出した。一方、イネなどのように葉緑体に PHR が移行する植物では、オートファジー、さらには葉緑体定位運動が活発でないことがわかった。

(3) UVB 誘導性の葉緑体集合反応の分子機構を解析するために、葉緑体定位運動を示さないシロイヌナズナ変異体(常に細胞表面に集合反応をしている *phot2-1* 変異体、および細胞側面に逃避反応をしている *phot1-5* 変異体)を用いて解析を進めた。その結果、UVB 誘導性の葉緑体集合反応は、青色光受容体フォトロピンを介して応答であった。また *phot2-1* 変異体では、細胞表面の葉緑体は *phot1-5* 変異体よりも重篤な障害をうけるものの、紫外線 UVB に対して明らかな抵抗性を示すことを見出し、葉緑体集合反応が UVB 抵抗性に重要な働きをしているという新たな事実を見出した。

< 引用文献 >

Hidema J., Taguchi T. Ono T. Teranishi M., Yamamoto T. and Kumagai T. (2007) Increase in CPD photolyase activity functions effectively for preventing ultraviolet-B-caused growth inhibition in rice plant. *The Plant J.* **50**: 70-79.

Takahashi M, Teranishi M., Ishida H, Kawasaki J, Takeuchi A, Yamaya T, Watanabe M, Makino A, Hidema J. (2011) CPD photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in all DNA-containing organelles in rice. *The Plant J.* **66**, 433-442.

Takahashi S, Teranishi M., Izumi M, Takahashi M, Takahashi F, Hidema J. (2014) Transport of rice cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase into mitochondria relies on a targeting sequence located in its C-terminal internal region. *Plant J.* **79**: 951-963.

Hidema J., Kumagai T, and Sutherland BM (2000): UV-sensitive Norin 1 rice contains defective cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *The Plant Cell* **12**: 1569-1578.

Izumi M, Ishida H, Nakamura S, Hidema J. (2107) Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. *The Plant Cell* **29**: 377-394.

Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420:829–832

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Otake Momo, Okamoto Yoshiyama Kaoru, Yamaguchi Hiroko, Hidema Jun	4. 巻 20
2. 論文標題 222 nm ultraviolet radiation C causes more severe damage to guard cells and epidermal cells of Arabidopsis plants than does 254 nm ultraviolet radiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1675-1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-021-00123-w	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 MMBANDO Gideon Sadikiel, HIDE MA Jun	4. 巻 45
2. 論文標題 The trade-off between UVB sensitivity and tolerance against other stresses in African rice species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 TURKISH JOURNAL OF BOTANY	6. 最初と最後の頁 601-612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3906/bot-2109-38	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 Mmbando Gideon Sadikiel, Teranishi Mika, Hidema Jun	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) 10.1080/21645698.2021.1977068	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 Dundar Gonul, Teranishi Mika, Hidema Jun	4. 巻 19
2. 論文標題 Autophagy-deficient Arabidopsis mutant atg5, which shows ultraviolet-B sensitivity, cannot remove ultraviolet-B-induced fragmented mitochondria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1717-1729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9PP00479C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Sakuya, Hagihara Shinya, Otomo Kohei, Ishida Hiroyuki, Hidema Jun, Nemoto Tomomi, Izumi Masanori	4. 巻 62
2. 論文標題 Autophagy Contributes to the Quality Control of Leaf Mitochondria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 229-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa162	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 S. Mmbando, Sugihiro Ando, Hideki Takahashi and Jun Hidema	4. 巻 22
2. 論文標題 High ultraviolet-B sensitivity due to lower CPD photolyase activity is needed for biotic stress response to the rice blast fungus, Magnaporthe oryzae.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43630-023-00379-4	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7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 愿山郁;坂本智昭;木村成介;日出間純
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるDNA損傷応答機構
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 前田 奈穂子;高橋 昭久;吉田 由香里;池田裕 子;山之内 佐久也;日出間 純
2. 発表標題 紫外線UVBおよび放射線(X線・炭素線)がゼニゴケの生育に及ぼす影響
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大竹桃, 末次憲之, 寺西美佳, 愿山郁, 和田正三, 日出間純
2. 発表標題 葉緑体でCPD光回復酵素が機能しない植物の葉緑体配置とUVB抵抗性
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅井美沙希, 三浦華子, 寺西美佳, 日出間純
2. 発表標題 イネの種子形成におけるUV-B光受容体UVR8の役割に関する研究
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井崇広, 小川裕雅, 三岡周子, 寺西美佳, 日出間純
2. 発表標題 ゼニゴケ光回復酵素 (MpPHR) の光による遺伝子発現制御と細胞内局在
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学大学院生命科学研究科分子遺伝生理分野HP http://www.ige.tohoku.ac.jp/genome/MGP/index.htm 東北大学大学院生命科学研究科 プレスリリース https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/date/detail---id-50394.html</p>

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
研究分担者	寺西 美佳 (Teranishi Mika) (10333832)	東北大学・生命科学研究科・助教 (11301)	
研究分担者	佐藤 修正 (Sato Shusei) (70370921)	東北大学・生命科学研究科・教授 (11301)	

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
---------	---------