

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780294

研究課題名（和文） イネのUVB抵抗性の主要因子であるCPD光回復酵素のリン酸化修飾に関する解析

研究課題名（英文） Analysis of phosphorylation of rice CPD photolyase

研究代表者

寺西 美佳（TERANISHI MIKA）

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：10333832

研究成果の概要（和文）：イネの紫外線抵抗性を左右する主要因子である CPD 光回復酵素は、細胞周期に関連したリン酸化酵素によっておこる可能性を見出した。また CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は、イネにおいてはオルガネラ移行性に関与するが、シロイヌナズナにおいては関与しないと考えられた。CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は、イネ科の一部の植物が獲得した機構であり、これらの植物においてはオルガネラ移行性に関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase is a crucial factor for determining UVB sensitivity in rice. We found the possibility that the rice CPD photolyase was phosphorylated by cyclin-dependent kinase. Furthermore, it was thought that phosphorylation of CPD photolyase was not involved in its translocation to organelles in *Arabidopsis*. Phosphorylation of CPD photolyase was specifically detected in some of the poaceous species. In these species, phosphorylation of CPD photolyase might be involved in protein transport to specific organelles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：遺伝子資源・紫外線抵抗性植物

1. 研究開始当初の背景

太陽光に含まれるUVB (280-320 nm)は、オゾン層の破壊による地表到達量の増加が懸念されるのみならず、現在も地表に到達し続けており、太陽光下で生育する植物にとっては避けることのできない負の環境因子である。研究代表者の所属する研究グループでは、主要穀物であるイネを対象に、植物のUVB抵抗性機構に関する一連の研究を行ってきた。

その結果、UVB はイネの生育を阻害するのみならず、米粒の小型化、食味を低下させる米粒タンパク質含量の増大などを引き起こすことを明らかにした。また、イネ品種間のUVB抵抗性差異の原因を探索したところ、UVBによって誘発されるDNA損傷（cyclobutane pyrimidine dimer: CPD）を修復するCPD光回復酵素の活性差異が見出された。このCPD光回復酵素の活性の差異は、酵素遺伝子の自

然突然変異により生じていることが明らかとなった。さらに、CPD 光回復酵素を過剰発現させた形質転換体は、野生型ササニシキより強い UVB 抵抗性を示し、発現抑制させた形質転換体は著しい UVB 感受性を示した。これらの結果より、CPD 光回復酵素は、イネの UVB 抵抗性を左右する主要因子であることが明らかとなった。

CPD 光回復酵素は、青色光/UVA (320-400 nm) の光エネルギーを利用して単一酵素で CPD を修復する酵素である。CPD 光回復酵素は、哺乳類以外のほとんど全ての生物が持つ酵素であるが、アミノ酸配列の相同性からクラス I (単細胞生物型) とクラス II (高等真核生物型) に分類されている。クラス I CPD 光回復酵素の研究は国内外を通じて広く行われており、結晶構造も報告されているが、イネを含めたクラス II CPD 光回復酵素の解析はほとんど行われていない。CPD 光回復酵素は、細胞内の存在量が非常に少ない酵素であるため、クラス I の解析においても大腸菌などを用いて過剰発現させ、精製したタンパク質を用いて行われてきた。しかし研究代表者は、CPD 光回復酵素を効率良く精製する方法を確立し、イネ葉から CPD 光回復酵素を精製することに成功した。その結果、イネから精製した CPD 光回復酵素は、大腸菌発現タンパク質には見られないリン酸化修飾を受けていることを明らかにした。また、イネにおいて核の 1 つの遺伝子にコードされた CPD 光回復酵素は、DNA を含む全ての細胞内器官 (核・葉緑体・ミトコンドリア) に移行して活性を示し、核と葉緑体にはリン酸化型が、ミトコンドリアには非リン酸化型が主に含まれていることが見出されたことから、イネの細胞内において、リン酸化修飾によって酵素の機能部位が制御されている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

研究代表者は、CPD 光回復酵素のリン酸化修飾が、酵素機能にどのような影響を与えるのか、どのようなシグナルにより起こるのかを明らかにすることを目的とする。さらに、CPD 光回復酵素のリン酸化修飾が植物の UVB 抵抗性に与える影響と、イネ以外の植物における CPD 光回復酵素のリン酸化修飾の有無を明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。

- (1) CPD 光回復酵素はリン酸化修飾により酵素機能が変化するのか
- (2) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は細胞内器官への移行性を制御するか
- (3) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾を行うシグナル経路の同定
- (4) 他の植物での CPD 光回復酵素のリン酸化修飾の有無の解析

3. 研究の方法

(1) CPD 光回復酵素はリン酸化修飾により酵素機能が変化するのか

日本型栽培イネ品種ササニシキ (*Oryza sativa* L.) の第 4 葉を切除し、粗酵素抽出液 [80 mM リン酸カリウム (pH 7.2)、5 mM EDTA、2 mM DTT、10% (v/v) グリセロール] を加え、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。磨砕液を遠心分離し、上清を回収し、粗酵素液とした。

チミン塩基が連続した配列を 1 箇所持つ 42 塩基のオリゴヌクレオチドに対し、UVC を照射し、CPD を誘発した。次に、この配列と相補的であり、かつ 5' 末端がビオチン標識されたオリゴヌクレオチドと混合した。混合液を煮沸した後、室温まで穏やかに温度を下げることで、オリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、二本鎖 DNA とした。この DNA を、表面がアビジンにてコートされた磁気ビーズと混合することで、CPD 誘導 DNA 結合磁気ビーズとした。

この磁気ビーズと粗酵素液を混合し、CPD 部位に CPD 光回復酵素を結合させた。混合液を含むチューブを磁気スタンドに静置し、上清を除いた後、洗浄液 [50 mM リン酸カリウム (pH 7.2)、10 mM EDTA、2 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、80 mM NaCl] を加え混合することで、ビーズを洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、溶出液 [50 mM リン酸カリウム (pH 7.2)、10 mM EDTA、2 mM DTT、10% (v/v) グリセロール、1 M NaCl] を加えて混合し、CPD 光回復酵素を含む溶液を回収した。この溶液を洗浄液に対して透析することで、精製 CPD 光回復酵素とした。

この精製酵素に対し、Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs) を加えて反応させることで、CPD 光回復酵素の脱リン酸化を行い、非リン酸化型 CPD 光回復酵素とした。また、TALON PMAC Phosphoprotein Enrichment Kit (Clontech Laboratories, Inc.) に対し、精製 CPD 光回復酵素を加え、結合した画分を得ることで、リン酸化型 CPD 光回復酵素とした。

これらの画分を、UVC を照射することで CPD を誘発させた λ DNA と混合し、青色光を照射することで修復反応を行わせた。CPD 部位を特異的に切断する UV エンドヌクレアーゼを反応させた後、アガロースゲルを用い、アルカリ条件下で電気泳動を行い、CPD 数を測定することで酵素活性を測定した。

(2) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は細胞内器官への移行性を制御するか

イネ CPD 光回復酵素のリン酸化部位のセリン残基を、非リン酸化型 (アラニン)、または偽リン酸化型 (アスパラギン酸) に置換した遺伝子を作製した。作製した遺伝子をバイ

ナリーベクターに組み換えた後、CPD 光回復酵素を欠損したシロイヌナズナ (*uvr2-1*) に対して、フローラルディップ法にて導入した。目的の遺伝子が導入された系統を選抜し、後代世代を育成することで、変異型 CPD 光回復酵素遺伝子をホモに持つ T3 世代の種子を得た。

非リン酸化型、または偽リン酸化型の CPD 光回復酵素を発現するシロイヌナズナを、磨砕緩衝液 [1 M マンニトール、0.5 M EDTA、1 M MOPS、5% (w/v) BAS、0.5 M DTT] を用い、ブレンダーを用いて破砕した。破砕液をガーゼで濾過し、細胞抽出液とした。異なる濃度のパーコール、もしくはスクロースを含む緩衝液からなる密度勾配を作製し、細胞抽出液を重層して遠心分離することで、細胞内のオルガネラを分離し、核、ミトコンドリア、葉緑体を単離した。

単離したオルガネラからタンパク質溶液を抽出し、SDS-PAGE を行った後、ナイロンメンブランに転写した。抗 CPD 光回復抗体を用いたウエスタンブロット解析を行うことで、各オルガネラ画分に含まれる CPD 光回復酵素のリン酸化状態を解析した。

(3) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾を行うシグナル経路の同定

イネに UVB、UVA、青色光、赤色光を照射した後、葉から CPD 光回復酵素を精製した。また、精製したイネ CPD 光回復酵素を、昆虫細胞抽出液 (Transdirect insect cell; 島津製作所) と混合し、25°C、2 時間反応させた。その際、濃度を変えたマグネシウム、マンガ、カルシウム、コバルトを反応液中に添加した。CPD 光回復酵素のリン酸化状態は、上述 (2) と同様の方法にて解析した。

(4) 他の植物での CPD 光回復酵素のリン酸化修飾の有無の解析

コムギ、オオムギ、アワ、ヒエ、トウモロコシの葉から CPD 光回復酵素を精製し、上述 (2) と同様の方法にて CPD 光回復酵素のリン酸化状態を解析した。

4. 研究成果

(1) CPD 光回復酵素はリン酸化修飾により酵素機能が変化するのか

リン酸化修飾によって CPD 光回復酵素の活性が変化するかを解析するため、イネに含まれるリン酸化型と非リン酸化型の CPD 光回復酵素を分離精製する方法を検討した。イネ葉から CPD 光回復酵素を精製し、脱リン酸化酵素を反応させることで、非リン酸化型 CPD 光回復酵素のみを含むタンパク質画分を得ることができた。また、リン酸化タンパク質特異的結合カラムを用いることで、リン酸化型 CPD 光回復酵素のみを含むタンパク質画分を

得ることができた。これらの画分を用い、*in vitro* における酵素活性を測定した結果、リン酸化型と非リン酸化型の CPD 光回復酵素の活性には差が見られなかった。

(2) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は細胞内器官への移行性を制御するか

リン酸化修飾が CPD 光回復酵素の細胞内局在性に与える影響を明らかにするため、変異型 CPD 光回復酵素を発現する組換え植物を作製した。リン酸化修飾を受けるアミノ酸残基 (セリン) を、非リン酸化型 (アラニン)、または偽リン酸化型 (アスパラギン酸) に置換した CPD 光回復酵素を発現する遺伝子を作製し、CPD 光回復酵素を欠損したシロイヌナズナ (*uvr2-1*) に対して、フローラルディップ法にて導入した。目的の遺伝子が導入された系統を選抜し、後代世代を育成することで、変異型 CPD 光回復酵素遺伝子をホモに持つ T3 世代の種子を得ることができた。

非リン酸化型、または偽リン酸化型の CPD 光回復酵素を発現するシロイヌナズナから、核、ミトコンドリア、葉緑体を単離し、CPD 光回復酵素のリン酸化修飾の有無を解析した。その結果、シロイヌナズナでは、イネとは異なり、CPD 光回復酵素のリン酸化修飾はオルガネラ移行性に影響しない可能性が考えられた

(3) CPD 光回復酵素のリン酸化修飾を行うシグナル経路の同定

青色光照射によりリン酸化されるクリプトクロムは、その配列の相同性から、CPD 光回復酵素と同じファミリーに分類される。そこで、イネ CPD 光回復酵素のリン酸化修飾を行うシグナル経路を同定するため、イネ葉に様々な波長の光 (UVB、UVA、青色光、赤色光) を照射し、CPD 光回復酵素のリン酸化状態を解析した。その結果、イネ葉に対する照射では、いずれの光によっても、CPD 光回復酵素のリン酸化修飾は変化しないことが分かった。

次に、CPD 光回復酵素がどのようなシグナル経路によってリン酸化修飾を受けるかを明らかにするため、リン酸化酵素の同定を試みた。はじめに、昆虫細胞抽出液を用いた試験管内での CPD 光回復酵素リン酸化修飾系を確立した。様々な金属イオンを用いてリン酸化活性の有無を検出したところ、CPD 光回復酵素のリン酸化酵素は、補因子としてマグネシウムを必要とすることが明らかになった。

また、リン酸化部位の周辺配列を用い、既知のリン酸化モチーフとの保存性を比較検索することで、リン酸化酵素を推定した。その結果、細胞周期依存性リン酸化酵素の関与が示唆された。そこで、試験管内リン酸化反応系を用い、各種のリン酸化酵素阻害剤が

CPD 光回復酵素のリン酸化に与える影響を解析した。これらの解析より、1種類のリン酸化酵素を候補として見出すことができた。

(4) 他の植物でのCPD光回復酵素のリン酸化修飾の有無の解析

CPD 光回復酵素の遺伝子配列が明らかになっているイネ以外の植物から、CPD 光回復酵素を精製し、リン酸化状態を解析した。その結果、CPD 光回復酵素のリン酸化状態はイネ科植物の中でも異なっており、SDS-PAGEを行った際に検出されるリン酸化修飾によるバンドシフトが、検出されない植物が存在することが分かった。

以上の結果より、イネCPD光回復酵素のリン酸化修飾は、イネ科の一部の植物が独自に獲得した機構であり、細胞周期ならびにオルガネラ移行性に関与することで、紫外線抵抗性に寄与している可能性が高いと考えられた。

今後は、本研究において見出したリン酸化修飾を受けるCPD光回復酵素を持つ植物と、リン酸化修飾を受けないCPD光回復酵素を持つ植物の紫外線抵抗性を比較することで、CPD光回復酵素のリン酸化修飾が植物の紫外線抵抗性に与える影響を明らかにすることができると考えられる。

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3件)

① Teranishi M, Taguchi T, Ono T, Hidema J, “Augmentation of CPD photolyase activity in *japonica* and *indica* rice increases their UVB resistance but still leaves the difference in their sensitivities.” *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11 (2012) 812-820. 査読有

② Hitomi K, Arvai AS, Yamamoto J, Hitomi C, Teranishi M, Hirouchi T, Yamamoto K, Iwai S, Tainer JA, Hidema J, Getzoff ED, “Eukaryotic class II CPD photolyase structure reveals a basis for improved UV-tolerance in plants.” *J. Biol. Chem.*, 287 (2011) 12060-12069. 査読有

③ Takahashi M, Teranishi M, Ishida H, Kawasaki J, Takeuchi A, Yamaya T, Watanabe M, Makino A, Hidema J, “Cyclobutane-pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA.” *Plant J.*, 66 (2011) 433-442. 査読有

[学会発表] (計11件)

① Takahashi S, Teranishi M, Takahashi F, Takahashi M, Hidema J, Analysis of sub-cellular localization of triple targeting rice CPD photolyase, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012年3月21日、奈良

② 高橋さやか、高橋正明、寺西美佳、日出間純、イネの triple-targeting CPD 光回復酵素のオルガネラ移行シグナル配列に関する解析、第53回日本植物生理学会、2012年3月17日、京都

③ 寺西美佳、高橋祐子、宗村郁子、日出間純、(6-4)光回復酵素がイネの紫外線抵抗性に与える影響、第54回日本放射線影響学会、2011年11月18日、神戸

④ Teranishi M, Nakamura K, Furukawa H, Takahashi M, Hidema J, Effect of phosphorylation on function of rice CPD photolyase, *Societas Physiologia Plantarum Scandinavica* 2011, 2011年8月23日、ノルウェー

⑤ Teranishi M, Nakamura K, Furukawa H, Takahashi M, Hidema J, Phosphorylation of rice CPD photolyase, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011年8月1日、奈良

⑥ 高橋正明、寺西美佳、石田宏幸、高橋さやか、日出間純、イネCPD光回復酵素の細胞内局在について、第52回日本植物生理学会 2011年3月20日、仙台

⑦ 中村憲太郎、寺西美佳、日出間純、植物CPD光回復酵素のリン酸化修飾に関する研究、第52回日本植物生理学会、2011年3月20日、仙台

⑧ 古川晴也、寺西美佳、日出間純、イネCPD光回復酵素のリン酸化酵素に関する解析、第52回日本植物生理学会、2011年3月20日、仙台

⑨ 寺西美佳、高橋正明、中村憲太郎、古川晴也、日出間純、植物CPD光回復酵素のリン酸化修飾、第53回日本放射線影響学会、2010年10月20日、京都

⑩ 寺西美佳、日出間純、イネCPD光回復酵素のリン酸化部位の同定、第51回日本植物生理学会、2010年3月21日、熊本

⑪ Teranishi M, Nakamura K, Takahashi M, Hidema J, CPD photolyase of rice is phosphorylated, *Plant DNA Repair and Recombination* 2010, 2010年3月2日、アメリカ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺西 美佳 (TERANISHI MIKA)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教
研究者番号：10333832