

平成 22 年 3 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19710055
 研究課題名（和文）
 FOXハンティングシステムを利用した紫外線耐性付与遺伝子の探索と解析
 研究課題名（英文）
 Isolation and analysis of UV-resistant mutants using FOX hunting system
 研究代表者
 近藤 陽一 (Kondou Youichi)
 独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能研究チーム・特別研究員
 研究者番号：00391954

研究成果の概要（和文）：

紫外線耐性に関わる遺伝子の単離を目的として新奇のスクリーニング法を開発し、シロイヌナズナのFOXラインより紫外線吸収色素が野生型よりも高蓄積する変異体の単離に成功した。幾つかの解析の結果から変異体の紫外線耐性の原因は、紫外線を吸収する二次代謝産物の蓄積に関わる合成酵素遺伝子の転写量が、野生型よりも多い事であった。この事は、変異体の表現型の原因遺伝子が、紫外線照射による色素量の増加を転写レベルで制御し、紫外線に対する防御応答の一端を担っている因子である事を示している。

研究成果の概要（英文）：

We isolated a mutant showing UV-resistance from Arabidopsis FOX lines by using novel method for screening such mutants. UV resistance of the mutant was caused by more accumulation of UV-absorbing compounds. Interestingly, levels of transcription of genes coding synthesis enzymes for secondary metabolite were increased in the mutant. These results suggest that the gene, which causes UV resistance to Arabidopsis, regulate defense response against UV irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

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：紫外線耐性、紫外線応答、二次代謝産物

1. 研究開始当初の背景

植物は生存するために太陽光が必要であり、また移動する事が出来ないため、常に紫外線にさらされている。そのため植物は紫外線に対す

る防御機構が動物や細菌などに比べると特に発達している。この防御機構は、主に光回復酵素を中心としたDNA修復機構と、有害紫外線(UV-B)を吸収する二次代謝産物の表皮細胞中への蓄積誘導機構とに

分類される。DNA 修復機構は近年多くの知見の蓄積により、かなり理解が進んできている。しかし二次代謝産物の蓄積を誘導するための細胞内情報伝達経路については解っていない事が多い。またこの情報伝達経路の有害紫外線に対する入力部分として、未知の紫外線受容分子の存在も示唆されている。紫外線受容分子については近年、光形態形成の細胞内情報伝達経路に重要な働きをしている HY5 が、紫外線の細胞内情報伝達機構とその防御反応の一翼を担っている事が解り、その存在が注目を浴び始めている。有害紫外線を吸収する二次代謝産物は、主に無色のフラボノイドとシナピン酸エステルの二種類が知られており、特にシナピン酸エステルは植物の紫外線耐性に大きく寄与するという報告がなされている。

2. 研究の目的

申請代表者の所属しているグループでは、シロイヌナズナの FOX ハンティングシステム用変異体ラインを約一万五千系統作出し、申請代表者も作出に関与している。FOX ハンティングシステムとは、完全長 cDNA をシロイヌナズナでランダムに過剰発現させた FOX ラインから、変異体を選抜してくるシステムの総称である。FOX ラインはある遺伝子の機能が增強された変異体のプールであり、ここから得られる変異体は優性の表現型を示すので選抜に有利であると共に、植物に機能付加型の変異をもたらす、特に環境に対する耐性をもたらす遺伝子の探索に適していると考えられる。申請代表者はこの様なシステムの優位点から、紫外線耐性をもたらす遺伝子の探索に適していると考え、シロイヌナズナ FOX ラインから紫外線耐性変異体を単離する事を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

紫外線防御機構に関与する遺伝子群の単離を目的として、高効率な紫外線耐性変異体の選

抜方法を開発した。シナピン酸エステルの合成酵素欠損変異体は野生株と比較して紫外線に弱く、その本葉は紫外線照射時の緑色蛍光をほとんど発しない事が解っている。またシナピン酸エステルの蓄積量が増加する変異体では、野生株よりも紫外線に対する耐性が高まり、シナピン酸エステルの蓄積量と紫外線耐性とに相関があると考えられている。そこでシナピン酸エステルの蓄積量の変化を反映している本葉からの緑色蛍光の強度をレポーターとして、シナピン酸エステルの蓄積量が増加している変異体を選抜し、紫外線耐性変異体の選抜を行った。

具体的にはまず 96 穴のプレートの各穴に寒天培地を注入し、そこにシロイヌナズナ FOX ラインの種子を一系統ずつ播種していく。これを 14 日間ほど通常条件下で育成させる。この状態のプレートを、各穴の蛍光を高速で連続測定可能なプレートリーダーで直接測定を行う。蛍光測定のための励起光は 350nm に設定し、緑色蛍光 (510nm に設定) の強度を測定する。この時同時に葉緑体クロロフィル由来の赤色蛍光 (660nm に設定) の強度を測定しておく。その後、測定された緑色蛍光の強度を、プレートの各穴の植物体の表面積を平均化するために、赤色蛍光の強度で割った値を求める。この値は各穴で育成している変異体系統のシナピン酸エステル蓄積量に比例する。そこで、この値が上昇する変異体系統、即ちシナピン酸エステルが高蓄積している変異体系統の選抜を目指した。

得られた変異体については、まず導入されている cDNA を決定し、その挿入変異体を取り寄せ紫外線耐性に影響が観察出来るか確認を行う。紫外線耐性に影響が観察された系統について、過剰発現体と挿入変異体を利用して更に詳細な解析を行う。

4. 研究成果

本スクリーニング法を用いて、紫外線吸収色素が野生型よりも高蓄積する変異体の単離に成功した。当該の変異体は紫外線照射による光合成量子収率の低下が野生型よりも遅く、DNA にシクロブタン・ピリミジンダイマーが産生される頻度も低いなど、紫外線耐

性の表現型を示した。また紫外線照射に対する紫外線吸収色素量の変化を確認したところ、野生型よりも変異体の色素増加量が多い事が判明した。そこで代表的なフラボノイドなど二次代謝産物の合成酵素遺伝子の転写量を確認したところ、*CHS*、*PAL1*、*CAH*、*CHI*で紫外線照射後の転写産物量が野生型よりも多かった。これらの事から、前述した変異体の表現型の原因遺伝子は、紫外線照射による色素量の増加を転写レベルで制御し、紫外線に対する防御応答の一端を担っている因子であると考えられる。この変異体の原因遺伝子の同定を試みたが、導入cDNAを決定する事が出来なかった。しかしながら表現型の原因が完全長cDNAの導入によるものではなく、通常の機能欠損変異である事が解ったので、変異遺伝子の決定のためにマッピングを行った。その結果、2番染色体内の0.5Mbpの範囲にまで変異遺伝子を絞り込む事に成功した。

また紫外線耐性に関わる因子の探索の一貫として、紫外線応答に関わる因子の探索を目指し、弱紫外線応答が野生型より異なる変異体をイネFOXラインより単離した。イネFOXラインはイネの完全長cDNAをシロイヌナズナで過剰発現させた変異体のプールである。イネFOXラインを使用した理由は、紫外線耐性についてより応用を目的とした遺伝子の単離を目指したからである。1変異体がこのスクリーニングで単離され、微弱紫外線で野生型よりも胚軸が極端に短くなる表現型を示した。この変異体に導入されていたイネcDNAは、TPRドメインとU-boxドメインを有していた。この遺伝子をシロイヌナズナに再導入したところ、過剰発現体において同様の表現型を示した。この事から、上述の遺伝子の過剰発現が紫外線応答に関わる表現型を引き起こしている事が示された。本遺伝子は興味深い事にイネ特異的タンパク質であった。そこでシロイヌナズナにおけるこの遺伝子の作用機構を調査するために、酵母two-hybridシステムを利用して、イ

ネFOX系統内で相互作用しているタンパク質の単離を目指した。その結果、100以上の候補クローンを得る事に成功した。加えて単離したcDNAのイネ過剰発現体の作成を試み、10以上の形質転換体を得た。

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5件)

査読有

1. Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M.
Phenome Analysis in Plant Species Using Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutants. *Plant Cell Physiology* 50(7): 1215-1231, 2009.
2. Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, Matsui M.
RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiology* 147(4): 1924-35, 2008.

査読無

1. Kondou Y, Higuchi M, Matsui M.
High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function technology. *Annual review of Plant Biology*, in press.
2. Kondou Y, Higuchi M, Matsui M.
Application of full-length cDNA resources to gain-of-function technology for characterization of plant gene function. *Methods in Molecular Biology*, in press.
3. Higuchi M, Kondou Y, Matsui M.
Full-length cDNA overexpressor gene hunting system (FOX hunting system). *Plant Reverse Genetics*, in press.

[学会発表] (計 5 件)

1. 近藤陽一 (代表者)、Establishments of novel gain-of-function resource for functional analysis of transcription factors and analysis of novel transcription factor related with hypocotyl growth under light condition. The 20th International Conference on Arabidopsis Research、2009 年 7 月 2 日、エジンバラ (イギリス)
2. 近藤陽一 (代表者)、機能誘導系を利用した新規転写因子過剰発現系統より単離した光応答に異常を示す変異体の解析、第 52 回日本植物生理学会年会、平成 22 年 3 月 20 日、鹿児島
3. 近藤陽一 (代表者)、機能誘導系を利用した新規転写因子過剰発現系統の作出と光低感受性変異体の単離と解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21 日、名古屋大学
4. 近藤陽一 (代表者)、イネFOXラインからの色素高蓄積変異体の単離と解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 12 日、横浜
5. 近藤陽一 (代表者)、Isolation of rice cDNAs for higher accumulation of pigments from rice FOX lines、The 18th International Conference on Arabidopsis Research、2007 年 6 月 21 日、北京 (中国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 陽一 (Kondou Youichi)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能
研究チーム・特別研究員

研究者番号：00391954