

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 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380205

研究課題名（和文） 核、葉緑体、ミトコンドリアへ移行するイネ CPD 光回復酵素の輸送機構と UVB 抵抗性

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of import to nuclei, mitochondria, and chloroplast, and UVB resistance in rice.

研究代表者

日出間 純 (HIDEMA JUN)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：20250855

研究成果の概要（和文）：イネの紫外線 UVB 抵抗性を決定する CPD 光回復酵素は、核、葉緑体、ミトコンドリアに移行して、CPD 修復の機能を担う、triple targeting protein であることを見出した。各オルガネラへの移行のメカニズムを解析した結果、(1)391-401 番目のアミノ酸配列 (MHGFMRMYWAK) が、ミトコンドリア移行に関与し、(2)487-489 番目の 3 アミノ酸 (KKR) は核移行に関与していることを見出した。ミトコンドリア移行シグナル配列は、これまでに見出されていない新規のシグナル配列であり、進化の過程で太陽光に常に曝される環境で生きようになった高等植物が、ミトコンドリア障害を防ぐために新たなミトコンドリア移行のメカニズムを獲得したのではないかと推察された。

研究成果の概要（英文）：Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase is major pathway for repairing CPD in plant, and CPD photolyase is a crucial factor for determining UVB sensitivity in plants. We found that CPD photolyase, which is encoded by a single-copy gene in the nuclear genome, is expressed and targeted not only to nuclei but also to mitochondria and chloroplasts. To clarify the molecular mechanisms of import to each organelle in rice, the subcellular localization analyses were performed. We found that the amino acids residues from 391 to 401 and from 487 to 489 are functional targeting signal for transport into mitochondria and nuclei, respectively. The results indicate that rice may have evolved a CPD photolyase that functions in all three organelles that contain DNA to protect cells from the harmful effects of UVB radiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：光環境植物科学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：CPD 光回復酵素・オルガネラ移行シグナル・UVB 抵抗性・植物・葉緑体・ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

近年の成層圏オゾン層の破壊に伴う UVB 量

の増加といった環境悪化は、農作物の生産性のみならず、生態系全体にも及ぼす影響が世

界的に危惧されている。研究代表者は、「高等植物の UVB 耐性機構」に関してイネを主たる材料に一連の研究を行い、UVB によるイネの生育障害の主要因は 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 (CPD) であり、この CPD を特異的に修復する CPD 光回復酵素の活性を増加させることで、イネは UVB 抵抗性を獲得できること (Hidema et al. Plant J. 2007) などを実証してきた。高等植物において CPD 光回復酵素は、核ゲノムに 1 コピーでコードされ、核にのみ局在し、CPD 修復の機能を担っていると考えられていた。しかしながら、申請者はこれまでの一連の研究過程で、イネにおいては、葉緑体、ミトコンドリアへのオルガネラ移行推定シグナル配列は認められないものの (Hirouchi et al. Mol. Gene. Genom. 2003)、イネにおいて CPD 光回復酵素は核のみならず、葉緑体、ミトコンドリアへ移行して、CPD 修復の機能を担っていることを強く示唆する結果を見出した。このように、核に 1 コピーでコードされたタンパク質が 3 つのオルガネラに移行して機能する”triple targeting protein”は、他に類を見ない。このことはまさに、太陽紫外線の下で生きるイネ等の一部の植物は、葉緑体、ミトコンドリアの機能を維持するために獲得した UVB 適応戦略と考えられる。また、CPD 光回復酵素が葉緑体・ミトコンドリアへ移行しないアラビドプシスは、イネと比較して明らかな UVB 感受性を示す。これらの事実を考慮すると、オルガネラでの CPD 光回復酵素活性の有無は、植物の UVB 抵抗性にも強く関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これら申請者が見出した新事実に着目し、①様々な植物の葉緑体、ミトコンドリアへの CPD 光回復酵素の移行の実態と輸送のメカニズムを解明し、②各オルガネラでの CPD 光回復機能の有無と UVB 抵抗性との関係を解明することで、植物の全オルガネラでの DNA 損傷修復機能の獲得、すなわち太陽紫外線に対するオルガネラの機能維持と個体レベルでの UVB 環境適応戦略を明らかにすることを目的とする。具体的には、以下に示す課題を遂行する。

【課題 1】種々の植物・生物種における CPD 光回復酵素の各オルガネラへの移行の実態を明らかにする

イネにおいて見出された、CPD 光回復酵素の核、葉緑体、ミトコンドリアの全てのオルガネラへの移行が、イネに特有の現象であるのか否か明らかにする。

【課題 2】イネ CPD 光回復酵素の核、葉緑体、ミトコンドリアへの移行に関わるシグナル

配列を同定し、各オルガネラへの輸送のメカニズムを解明する

各オルガネラへの移行シグナル配列を同定する。次に、核ゲノムに 1 コピーでコードされた CPD 光回復酵素が、どのようにそれぞれのオルガネラへ輸送されるのか？そのメカニズムを解明する。

【課題 3】各オルガネラでの DNA 損傷 (CPD) が、生育に及ぼす影響を解析し、CPD 光回復酵素の細胞内局在と UVB 抵抗性との関係を明らかにする

核、葉緑体、またはミトコンドリアのみで CPD 光回復酵素が機能し得る組換え体植物を材料に、それぞれのオルガネラ DNA 上にできた CPD 損傷が、植物の生育にどのような影響を及ぼすのかに関して生理生化学的解析を行い、各オルガネラでの CPD 光回復機能の有無と UVB 抵抗性との関係を明らかにする。

本研究成果は、①高等植物における CPD 光回復酵素の生体内における新たな機能、②タンパク質のオルガネラ輸送に関わる新たなシグナル配列、輸送機構の発見は勿論のこと、オルガネラでの CPD 修復能力の有無と UVB 抵抗性を植物種間、生物種間で比較することで、生物の多様性の獲得、生活環境に適応した進化の過程も推察できるものとする。また申請者は、核以外のオルガネラで CPD 光回復酵素活性を持たない植物 (ホウレンソウやアラビドプシス) に着目し、各オルガネラでの CPD の生成が植物の生育にどのような影響を及ぼすのかを実験的に明らかにすることで、将来的には「CPD 光回復酵素の細胞内局在の改変による UVB 耐性植物の創出」も可能であるとする。

3. 研究の方法

【課題 1】種々の植物・生物種における CPD 光回復酵素の各オルガネラへの移行の実態に関する解析

本課題では、種々の植物 (オオムギ、コムギ、トウモロコシ、ホウレンソウ、キュウリ等) や酵母、藍藻などの単細胞生物を材料に、各オルガネラでの CPD 回復酵素活性を生化学的、分子生物学的解析により、イネにおいて見出された、CPD 光回復酵素の核、葉緑体、ミトコンドリアの全てのオルガネラへの移行が、イネに特有の現象であるのか否か明らかにする。

【課題 2】イネ CPD 光回復酵素の核、葉緑体、ミトコンドリアへの移行に関わるシグナル配列の同定、ならびにオルガネラ輸送のメカニズムに関する解析

GFP を利用したディレクション解析、ならびに免疫組織化学的解析により、イネ CPD 光回復酵素の各オルガネラへの移行に関わるシグナル配列を同定する。さらに、核ゲノムに 1 コピーでコードされた CPD 光回復酵素が、

どのようにそれぞれのオルガネラへ輸送されるのか？その輸送メカニズムに関して解析を行う。

【課題3】各オルガネラでのDNA損傷(CPD)が生育に及ぼす影響解析、ならびに、CPD光回復酵素の細胞内局在とUVB抵抗性に関する解析

核、葉緑体、またはミトコンドリアのみでCPD光回復酵素が機能し得る組換え体植物を作製する。それぞれのオルガネラDNA上にできたCPD損傷が、植物の生育にどのような影響を及ぼすのかに関して生理生化学的解析を行い、各オルガネラでのCPD光回復機能の有無とUVB抵抗性との関係を解析する。

4. 研究成果

【課題1】種々の植物・生物種におけるCPD光回復酵素の各オルガネラへの移行の実態に関する解析

種々の植物(オオムギ、コムギ、トウモロコシ、シロイヌナズナ)や酵母を材料に、CPD光回復酵素の各オルガネラへの移行の実態を、オルガネラ分画、生化学的手法により調査した。その結果、大変興味深いことに、イネ、トウモロコシにおいては全てのオルガネラでの局在が確認されたが、他のコムギ、オオムギ、シロイヌナズナでは検出されなかった。すなわち、CPD光回復酵素の局在には植物種間差がある可能性が示唆された。また、酵母ではミトコンドリアへの移行が確認された。

【課題2-1】イネCPD光回復酵素の核、葉緑体、ミトコンドリアへの移行に関わるシグナル配列の同定、ならびにオルガネラ輸送のメカニズムに関する解析

CPD光回復酵素の部分配列にGFPを連結したコンストラクトをパーティクルガン法によるディレクション解析を行った結果、イネCPD光回復酵素(全長506アミノ酸)のC末端領域385-506番目のアミノ酸配列とGFPの融合タンパク質においては、核とミトコンドリアへのGFPの局在が観察された。さらにより範囲を限定して解析したところ、(1)391-401番目のアミノ酸配列(MHGFMRMYWAK)が、ミトコンドリア移行に関与し、(2)487-489番目の3アミノ酸(KKR)は核移行に関与していることが示唆された。そこで、ミトコンドリア移行に関わるシグナル配列に関して、イネ以外の生物が有するCPD光回復酵素のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、課題1の解析から、ミトコンドリアでの活性が検出されなかったシロイヌナズナ、オオムギ、コムギ、ホウレンソウ等においても本シグナル配列を有しており、ミトコンドリアへ移行している可能性が考えられた。そこで、シロイヌナズナのミトコンドリアにおいて活性が検出出来なかったのは、移行しているタンパク

質が少なく、活性が極めて低かったためではないかと考え、シロイヌナズナのCPD光回復酵素を過剰発現させた組換え体を作製し、ミトコンドリアでの活性を測定した。その結果、ミトコンドリアにおいても活性が検出され、高等植物においては、ミトコンドリアへも移行して機能している可能性が高いことが示唆された。さらに本配列は、ショウジョウバエも有しているものの、同じClass II型に属する酵母においては、本配列は有せず、別な配列を利用してミトコンドリアへ移行していることが明らかとなった。以上の結果から、進化の過程で太陽光に常に曝される環境で生きようになった高等生物は、ミトコンドリア障害を防ぐために新たなミトコンドリア移行のメカニズムを獲得したのではないかと推察された。

【課題2-2】CPD光回復酵素の葉緑体への移行に関わるシグナル配列の同定

葉緑体移行配列を解析するための一過的発現解析条件検討を行った。その結果、吸水後5日目のイネ第1葉を用いることで、イネCPD光回復酵素の全長のC末端にGFPを融合したタンパク質の発現が、核、ミトコンドリア、葉緑体で確認することが出来た。そこで、イネ幼植物第1葉を材料に、CPD光回復酵素遺伝子の全長、または部分配列にGFPを連結したコンストラクトをパーティクルガン法によるディレクション解析に葉緑体への移行シグナル配列の同定を試みた。その結果、CPD光回復酵素の全長にGFPを連結したコンストラクトでは葉緑体への移行が確認できるものの、部分配列では葉緑体への移行が確認できず、移行シグナル配列の同定には至らなかった。しかしCPD光回復酵素-GFPをシロイヌナズナに導入した組換え体を作製し、葉緑体への移行について観察したところ、葉緑体に青色光またはUVA光を照射すると、葉緑体にCPD光回復酵素が蓄積してくる、すなわち葉緑体への移行には光が必要であるという新たな事実を見出した。

【課題3】各オルガネラでのDNA損傷(CPD)が生育に及ぼす影響解析、ならびに、CPD光回復酵素の細胞内局在とUVB抵抗性に関する解析

各オルガネラでのCPDの蓄積が生育、すなわちUVB抵抗性にどの程度影響を及ぼすのかを解析するために、課題2で得られた結果を基に、核、ミトコンドリア移行シグナルのアミノ酸配列の一部を変換したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナCPD光回復酵素欠損株 *uvr2* に導入し、核またはミトコンドリアにCPD光回復酵素が移行出来ない組換え体の作製を試みた。現在、T3世代の種子の獲得に成功し、UVB抵抗性試験を行っている。結果は、学会、

学術雑誌等を通して報告する。

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 10 件)

- ①Teranishi 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.* 11:812-820, 2012, 査読有
- ②Hitomi 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: 12060-9 2012, 査読有
- ③Takahashi M, Teranishi M, Ishida H, Kawasaki J, Takeuchi A, Yamaya T, Watanabe M, Makino A, Hidema J. CPD photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *Plant J.* 66: 433-442. 2011, 査読有
- ④Fedina I. Hidema J. Velitchkova M. Georgieva K. Nedeva D. UV-B induced stress responses in three rice cultivars. *Biologia Plantarum.* 54:571-574. 2010, 査読有
- ⑤Sudo E. Teranishi M. Hidema J. Taniuchi T. Visualization of flavonol distribution in the abaxial epidermis of onion scales via detection of its autofluorescence in the absence of chemical processes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* 73:2107-2109. 2009, 査読有
- ⑥Hidema J. Betsy and photolyase. *Biol. Sci. Space.* 23: 221-222. 2009, 査読有
- ⑦Okafuji A., Biskup T., Hitomi K. GetzoffED., Kaiser G., Bacher A., Hidema J., Teranishi M., Yamamoto K., Schleicher E., Weber S. Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *DNA Repair* 9:495-505. 2009, 査読有

[学会発表] (計 26 件)

- ①T. Hirose, F. Takahashi, M. Teranishi, N. Takano, and J. Hidema Light-Regulated Gene Expression of Rice CPD Photolyase, The 1st International Symposium on Plant Environmental

- Sensing, March, 21, 2012, Nara Japan.
- ②廣澤孝奈, 高橋文雄, 寺西美佳, 高野成央, 日出間純, イネ CPD 光回復酵素遺伝子の発現誘導機構に関する研究、第 53 回日本植物生理学会、2012 年 3 月 16 日~18 日 京都
- ③庄司光平、山岸朋香、寺西美佳、高野成央、日出間純、CPD 光回復酵素部分置換系統・遺伝子組換えイネを用いた太陽紫外線影響評価試験、第 53 回日本植物生理学会、2012 年 3 月 16 日~18 日 京都
- ④山田道子、寺西美佳、日出間純、イネにおけるクロマチン構造と紫外線誘発 DNA 損傷に関する研究、第 53 回日本植物生理学会、2012 年 3 月 16 日~18 日 京都
- ⑤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 16 日~18 日 京都
- ⑥日出間純 高等植物におけるオルガネラ DNA 修復と UVB 抵抗性-CPD 光回復酵素の細胞内局在、第 14 回植物オルガネラワークショップ-植物オルガネラ研究のマイルストーン、2012 年 3 月 15 日、京都
- ⑦M. Takahashi, S. Takahashi, M. Teranishi, H. and J. Hidema, CPD photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in rice chloroplast and mitochondrial DNA. *Societas Physiologia Plantarum Scandinavica* 2011, Aug, 23, 2011, Stavanger, Norway.
- ⑧ Jun Hidema, UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in all DNA-containing organelles in plant are repaired by CPD photolyase, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011, Aug. 1-2, Nara. Japan.
- ⑨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~22 日 仙台
- ⑩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~22 日 仙台
- ⑪高橋さやか、高橋正明、寺西美佳、日出間純、イネ 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 52 回日本植物生理学会、2011 年 3 月 20 日~22 日 仙台
- ⑫高橋さやか、高橋正明、寺西美佳、日出間純、イネ CPD 光回復酵素の核・ミトコンドリア移行シグナル配列の同定、日本放射線影響学会 第 53 回大会、2010 年 10 月 20 日~22 日 京都
- ⑬高橋正明、寺西美佳、石田宏幸、高橋さや

か、日出間純、CPD 光回復酵素は、核、葉緑体、ミトコンドリアへ移行し、CPD 修復の機能を担っている、日本宇宙生物科学会第 24 回大会、2010 年 9 月 17-18 日、仙台

- ⑭高橋さやか、高橋正明、寺西美佳、日出間純、イネ CPD 光回復酵素の核・ミトコンドリア移行シグナル配列に関する解析、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18 日～21 日 熊本
- ⑮M. Teranishi, K. Nakamura, M. Takahashi, J. Hidema, CPD photolyase of rice is phosphorylated, Plant DNA Repair and Recombination 2010, 2010, March 2-5, Asilomar Conference Center, CA, USA.
- ⑯M. Takahashi, S. Takahashi, M. Teranishi, H. Ishida, J. Kawasaki, A. Takeuchi and J. Hidema, CPD photolyase functions in all DNA-containing organelles in rice, Plant DNA Repair and Recombination 2010, 2010, March 2-5, Asilomar Conference Center, CA, USA.
- ⑰M. Takahashi, S. Takahashi, M. Teranishi, H. and J. Hidema, CPD photolyase repairs ultraviolet-B-induced CPDs in all DNA-containing organelles in plant, Memorial Symposium for 25th international Prize for Biology, Dec. 2-4, 2009, Kyoto, Japan.

[図書] (計 1 件)

日出間 純、「からだど光の辞典」朝倉書店 2011 年、総ページ 432

[その他]

ホームページ等

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/genome/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日出間 純 (HIDEMA JUN)

東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：20250855

(2) 研究分担者

宮沢 豊 (MIYAZAWA YUTAKA)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：00342858

(H22→H23：連携研究者)