

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26340034

研究課題名(和文)フラボノイドの局在場所に着目した植物ゲノム防護機構に関する研究

研究課題名(英文)Effects of flavonoid distributions on genome protection in plants

研究代表者

北村 智 (Kitamura, Satoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：80370386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フラボノイドの抗酸化能とその植物内分布に着目した研究を実施し、組織レベルでのフラボノイド分布が異なるシロイヌナズナ変異体を用いた研究で、種子全体のフラボノイド欠損のみならず、種皮のみのフラボノイド異常でもガンマ線照射による生存率の低下や染色体異常頻度の上昇が観察され、種皮フラボノイドがガンマ線感受性に関与することが分かった。また、突然変異そのものを簡便に検出する実験系を提案し、フラボノイドによるゲノム防護機構を検証できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Focusing on flavonoid distribution within plant tissues and/or plant cells, survival, growth rate, electron spin resonance, and chromosomal aberrations were investigated in Arabidopsis exposed to gamma-rays. The results suggest that seed-coat specific flavonoid mutants were more sensitive than wild type when gamma-rays were exposed to mature seeds. In additions, a new experimental system to directly visualize mutations in certain genes was established.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：フラボノイド 放射線

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドはその特徴的な分子構造から強い抗酸化能を有することが知られており、この抗酸化能を植物体内で発揮することによって、種々のストレス耐性に貢献していると考えられる。

植物組織におけるフラボノイドの分布を見てみると、植物の種子では、一般的に、外側の種皮に大量のフラボノイドが蓄積しており、これらが酸化されて強固な構造体となり、内部の胚を物理的な力から守っている。しかし、種皮フラボノイドの抗酸化能による生理機能については未解明な点が多い。一方、植物の細胞に注目すると、アントシアニンやフラボノールと言った主要フラボノイドは、細胞中の液胞に区画化されて大量に蓄積している。フラボノイドが液胞に区画化されたままの状態では抗酸化能を発揮することが、種々のストレス耐性に貢献するかどうかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、種皮に多くのフラボノイドを蓄積するシロイヌナズナの野生型種子に対して、種皮にフラボノイドを蓄積しない系統、種皮だけでなく種子内部の胚においてもフラボノイドを蓄積しない系統といった、植物組織レベルでフラボノイド分布の異なる材料とともに、フラボノイドを全く合成できない変異体、フラボノイド合成はできるが液胞への輸送・蓄積が不全な変異体といった、植物細胞レベルでフラボノイド分布の異なる材料を活用する。これらの材料に対して、フラボノイド分布に関わらず対象物全体に均一にストレス付与できる、ガンマ線を照射する。ガンマ線に関する感受性とフラボノイド分布の関係に関する知見を得る。

3. 研究の方法

植物材料

野生型シロイヌナズナの乾燥種子は、外側(種皮)にプロアントシアニジン(PA)を大量に蓄積し、内側(胚)のフラボノイド合成とは別の機構で制御される。これに対して、種皮及び胚の両方でフラボノイド合成不能な *transparent testa 4 (tt4)* 変異体、種皮のみでフラボノイド異常を示す種皮特異的 *tt* 変異体 (*tt2* 変異体及び *tt12* 変異体) を、本研究に用いた。

シロイヌナズナのフラボノイド合成は細胞質領域で進行し、その後、フラボノイドは液胞へ輸送・蓄積される。上述の *tt4* 変異体は、フラボノイドの合成能が全くない系統である。このほかに、フラボノイド合成能はあるが液胞に蓄積できない *flower flavonoid transporter (fft)* 変異体、フラボノイドが過剰に蓄積する *production of pigmentation 1-dominant (pap1-D)* 変異体を、本研究に用いた。

ガンマ線照射

フラボノイドの分布にかかわらず対象物に均一にストレス付与できるツールとして、フラボノイドに吸収されること無く、組織の厚さなどの物理的要因にも左右されないガンマ線を選択した。国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所の食品照射研究棟において、20 に制御した照射室で、⁶⁰Co ガンマ線を照射した。照射材料としては、種子保存庫(15℃、湿度30%)で十分に乾燥させたシロイヌナズナ種子、あるいは栄養培地プレートで発芽させた幼植物体を用い、それぞれ、50分あるいは10分の照射時間とした。

放射線感受性の評価

照射後一定期間中における生長量や一定期間後の生存率を調査し、ガンマ線感受性を評価した。また、照射種子から発芽してきた新鮮な根端細胞を採取し、エタノール3:酢酸1の混合溶液中で一昼夜固定した後、70%エタノール中で保存した。根端細胞をスライドグラス上で押しつぶし、DAPI染色により染色体を可視化し、蛍光顕微鏡にて観察した。1根端で200以上の細胞を調査し、染色体橋あるいは染色体断片を有する細胞を染色体異常細胞としてカウントした。

電子スピン共鳴(ESR)

フラボノイド分布の異なるシロイヌナズナの乾燥種子を各25mg用意し、ESR(日本電子、JES-X330)を用いて、ガンマ線照射した種子におけるラジカル量を調査した。非照射種子におけるESRシグナルとの比較により、照射後1週間までのラジカル減衰の程度を評価した。

酸化損傷DNAの評価

ガンマ線照射したシロイヌナズナ種子からDNAを抽出し、デオキシヌクレオシドに酵素分解した後、HPLC-ECD(電気化学検出器:昭和電工EC1)によって8オキシデオキシグアノシン(8oxo-dG)を定量した。

突然変異検出系の構築

シロイヌナズナ種皮に蓄積するPA合成の最終酵素遺伝子である *BAN* に変異が生じると、PAに代わってアントシアニンが蓄積する。アントシアニンは種子形成の初期から可視化できるため、*ban* 変異体では赤い未熟種子がさやの中に形成される。この *ban* ホモ変異を背景に *TT4* 遺伝子と *TT8* 遺伝子をヘテロに有する幼植物体に対して、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設において、AVFサイクロトロンで加速された炭素イオンビームを照射した。照射植物体が形成する未熟種子において、赤いアントシアニンが合成されないセクターを検出できるかどうか、検証した。

4. 研究成果

シロイヌナズナの野生型およびフラボノイド完全欠損変異体 *tt4* の乾燥種子に~2.5 kGy のガンマ線を照射し、その後 23 連続照明のチャンパーにて発芽させ、発芽後 3 週間における生存率を調査した。その結果、照射線量の増加に伴う生存率の低下が両系統で認められ、更に、*tt4* では、野生型に対してガンマ線感受性が高いことが示された。*tt4* 変異体はフラボノイド合成経路の最上流の酵素である CHS の欠損変異体であるため、その乾燥種子は、種皮の主要フラボノイドである PA が全く蓄積していないのに加え、胚の部分においてもあらゆるフラボノイドが存在しない。そこで、*tt4* の高いガンマ線感受性とフラボノイド分布の関係をj知るために、胚におけるフラボノイドは野生型と同等であるが、種皮におけるフラボノイドに異常を示す変異体である *tt2* 及び *tt12* を用いて、乾燥種子におけるガンマ線感受性を同様に評価した。その結果、種皮特異的なフラボノイド変異体においても野生型よりも生存率が低いことが示され、*tt4* 変異体における生存率の低下が最も顕著であることが分かった。このことから、種子全体のフラボノイド欠損のみならず、種皮のフラボノイド異常によってもガンマ線感受性が影響されるjことが分かった。

一方、野生型と *tt4* 変異体に加え、フラボノイドの液胞輸送変異体である *fft* 変異体、フラボノイドを過剰蓄積する *pap1-D* 変異体を用いて、発芽した幼植物体を用いたガンマ線感受性を評価した。これらの種子を表面殺菌して栄養プレートに無菌播種し、23 連続照明のチャンパーにて発芽・育成を行った。発芽 3 日目の幼植物体に対して、~90 Gy のガンマ線を照射し、照射後は育成チャンパーに戻して更に育成を続けた。照射後 3 日間における根の伸長を調査した結果、いずれの系統においても、照射線量の増加に伴う根の伸長抑制が観察された。しかし、調査した照射線量区においては、根の伸長について系統間で明確な差は確認できなかった。また、野生型と *tt4* においては、更に 3 週間育成させた後の新鮮重も評価したが、この指標においても系統間差異は認められなかった。

乾燥種子で見出されたガンマ線感受性の差異とフラボノイドとの関係をj知るために、ESR 法を用いて、ガンマ線照射した乾燥種子におけるラジカル量を非破壊で調査した。非照射の野生型種子では、ESR シグナルはロットによってバラツキがあった。一方、ガンマ線照射した野生型種子においては、測定を開始した照射 1 時間後で ESR シグナルはピークとなり、その後は時間経過に伴って ESR シグナルは減衰し、照射後 1 週間を経ても減衰は続くという傾向が見出された。そこで、ガンマ線非照射の ESR シグナル値を減ずることで、ガンマ線照射に由来する ESR シグナルを評価できると考え、フラボノイド各種変異体にお

けるガンマ線照射に由来する ESR シグナルの減衰を調査した。その結果、野生型で ESR シグナルの減衰が最も顕著で、*tt4* 変異体で ESR シグナルの減衰が最も弱く、種皮特異的なフラボノイドの異常を示す *tt2* や *tt12* は、野生型と *tt4* 変異体の中間を示す結果となった。これらの結果は、ガンマ線照射した種子を用いた生存率の結果と一致するものであり、ガンマ線照射で生成したラジカルの消去がガンマ線照射種子の生存率と深い関係があることが示唆された。

高い抗酸化能を有するというフラボノイドの特性を考えると、フラボノイド変異体における高いガンマ線感受性は、DNA の酸化損傷が多く蓄積していることに起因する可能性が推測された。そこで、代表的な DNA 酸化損傷である 8oxo-dG の定量を HPLC-EDC 法を用いて試みた。本手法は最も鋭敏に 8oxo-dG を検出できる手法の一つであるが、その検出感度を考慮して 5 kGy 以上のガンマ線を照射した種子の DNA を調査した。その結果、線量の増加に伴う 8oxo-dG の増加が認められた。しかしながら、最も差異があると推測された野生型と *tt4* 変異体の間においても、8oxo-dG 量に差異は認められなかった。

フラボノイド変異体種子における高いガンマ線感受性に関する更なる知見を得るために、ガンマ線照射種子から発芽してきた根端分裂細胞の染色体を観察した。本研究では、染色体橋ならびに染色体断片を染色体異常としてカウントし、染色体異常頻度を算出した。その結果、照射線量の増加に伴う染色体異常頻度が上昇することとともに、野生型と比較して、フラボノイド変異体では総じて染色体異常頻度が高いことが分かった。このことは、生存率を指標としたガンマ線感受性の結果と一致するものであった。

以上の結果から、種子中のフラボノイドはガンマ線感受性に関与しており、特に種皮特異的なフラボノイド変異のみでもガンマ線感受性に影響を及ぼすことが分かった。また、ガンマ線照射したフラボノイド変異体種子ではラジカルの減衰程度が弱いことから、ラジカルによる生体分子の損傷が大きいと考えられるものの、DNA の代表的な酸化損傷である 8oxo-dG は増加しておらず、一方で、染色体橋や染色体断片がガンマ線照射したフラボノイド変異体種子で増加していたことは興味深い。乾燥種子では水分含量が少ないために、ラジカルなどによる影響よりは放射線の直接効果が高いと推測できるが、フラボノイド変異体で染色体異常頻度が高まっている点については更なる研究が待たれる。一方、幼植物体へのガンマ線照射実験では、本研究で調査した限りでは、フラボノイド分布とガンマ線感受性についての関係性は認められなかった。植物細胞におけるフラボノイドの分布はガンマ線感受性に大きく関与しないことを示唆しているのかもしれないが、細胞中の水分含量を考慮すると、種子よりも

植物体へのガンマ線照射の方が多くのラジカルが発生すると考えられるため、更に詳細な調査が必要である。その一環として、現在、各フラボノイド変異体へ導入した変異検出マーカー遺伝子 *rpsL* を用いた突然変異解析を進めており、*rpsL* 遺伝子内に生じた突然変異スペクトラム調査によって、表現型には現れないようなゲノムへの影響に関する新しい知見が得られると考えられる。

上述は、多様なフラボノイド変異体をフラボノイド分布に関するバリエーションツールとして活用して、ガンマ線照射後の生存率やDNA損傷などを指標とした研究であるのに対し、突然変異を直接検出することでフラボノイドによるゲノム防護作用を検証する実験系の開発を試みた。ゲノム構成のシンプルなモデル植物で特定の遺伝子をヘテロに有する材料を作出して、育成条件を調整することでフラボノイドの有無を制御できれば、ヘテロ接合性の喪失 (LOH) によって変異体セクターが検出できると考えた。この場合、変異セクターについては表現型として検出しやすい形質であるほど効率の良い実験が可能のため、可視的マーカーの一つであるフラボノイド色素に注目した実験系の構築を目指した。シロイヌナズナの *TT4* 遺伝子及び *TT8* 遺伝子は、それぞれ、フラボノイド合成に係る酵素遺伝子及び転写因子であり、*tt4* 変異体及び *tt8* 変異体はともに黄色い種子 (*tt*) となる。*TT4/tt4* 且つ *TT8/tt8* を有するダブルヘテロ植物は野生型と同様の表現型を示すが、*TT4* あるいは *TT8* 遺伝子に変異が生じた場合に、その変異細胞に由来する種皮でフラボノイド (PA) が合成できなくなり、*tt* 表現型を示すと考えられる。更に、このダブルヘテロ植物に *ban* 遺伝子のホモ変異を導入すると、PA に代わって赤いアントシアニン色素が蓄積するため、種子形成が終了するまで待たずとも、さや形成時の未熟種皮においてアントシアニンの欠損として変異セクターを同定できると考えた。そこで、*tt4 ban* 二重変異体と *tt8 ban* 二重変異体を交配し、*TT4/tt4 TT8/tt8 ban/ban* を有する F1 植物を作出した。F1 種子を栄養プレートで発芽させ、幼植物体が野生型と変わらずフラボノイドを合成できることを確認した。この F1 幼植物体を変異原処理し、2 つの遺伝子座 (*TT4* 及び *TT8*) で生じた変異を、さや形成時における未熟種皮のアントシアニン欠損として検出できるかどうかを検証した。変異原には、突然変異頻度が高い炭素イオンビームを使用した。その結果、炭素イオンビーム照射植物が形成した未熟種皮においてアントシアニン欠損した変異セクターを簡便に検出できることが分かり、LOH の可視的検出を基盤とした簡便な突然変異検出系の構築に成功した。シロイヌナズナでは、ショ糖処理によってアントシアニン量が激増することが知られている。また、ショ糖濃度をできるだけ抑えることでアントシアニンがほとんど合

成されない条件を本研究で見出した。このようにしてフラボノイドの有無を制御した状態で変異原処理した F1 植物およそ 2,000 株における変異セクターをこれまでに調査しており、今後は更に調査株数を増やし、照射時のアントシアニンの有無が変異頻度を与える影響について調査することで、フラボノイドのゲノム防護機構に関する知見を簡便に得ることにつながる。

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 1 件)

「イオンビーム照射による色素蓄積が異常な植物の作出とその応用」北村智、放射線と産業、査読無、2016 年、140 巻、32-35
<http://www.rada.or.jp/radi&indu/hsmaga.html>

〔学会発表〕(計 2 件)

「植物色素合成遺伝子 *BAN*、*TT4*、*TT8* を利用した突然変異頻度を簡便に推定する実験系の構築」平田翔也、鳴海一成、北村智、佐藤勝也、大野豊、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年

「植物色素合成遺伝子に着目した遺伝子発現と変異誘発頻度の関係を探るための検出系の開発」平田翔也、北村智、佐藤勝也、鳴海一成、大野豊、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 智 (KITAMURA, Satoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員

研究者番号：80370386

(2) 研究分担者

大野 豊 (OONO, Yutaka)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員

研究者番号：30343940

(3) 連携研究者

赤松 憲 (AKAMATSU, Ken)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・関西光科学研究所 量子生命科学研究部・グループリーダー

研究者番号：70360401