

## 論文の内容の要旨

論文題目 Studies on diurnal change in function of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and photoregulation of photolyase expression in cucumber green leaves

(キュウリ緑葉におけるシクロブタン型ピリミジン二量体光回復酵素の機能の日周変化と光制御に関する研究)

氏名 高橋 真哉

大気中に放出されたフロンガス等の人工物質による成層圏オゾン層の破壊が明らかになり、その結果生じる有害な短波長紫外線 (UV-B) の地上到達量の増加とその影響が懸念されている。UV-B 量の増加により、植物では光合成活性が低下し、その結果、成長速度が減少し、作物の収量が減少すると予想される。紫外線の深刻な影響として、DNA 損傷の生成がある。UV-B により生じる DNA 損傷の主なものに、全体の 70-80% を占めるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) と残りの大部分を占める 6-4 光産物、6-4 光産物の異性体である Dewar 型異性体がある (Fig.1)。これらは、同一鎖上の隣り合ったピリミジンが UV 照射を受けることで生じる産物であり、DNA 複製・RNA 転写を阻害して動物では癌化、細胞死、また個体死の原因となりうる。生物にはこれを回避するためのメカニズムとして損傷 DNA の光回復、除去修復などが備わっている。光回復は光回復酵素を介して UV-A ~ blue light の存在下で進行するメカニズムであり、除去修復と比較して高い修復活性を示すことが知られている。これらの研究は主に微生物、動物の分野で進められてきた。植物では DNA 損傷の生成、DNA 損傷修復系の存在は知られていたが、詳細な研究はなされていなかった。近年になり *Arabidopsis thaliana* からの CPD 光回復酵素遺伝子の単離およびその突然変異体の単離が行われたが、現在まで UV による DNA 損傷が植物の生存に与える影響についての詳細は明らかではない。我々のグループでは、UV-B に対して感受性が高いキュウリ実生を使って UV-B が生理現象に与える影響について研究を行ってきた。キュウリ第一本葉の UV-B による成長阻害の作用スペクトルと DNA 損傷 (CPD) 生成の作用スペクトルが一致することが明らかになっており、CPD の生成、修復がキュウリの成長に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。これらの背景をもとに、本研究ではキュウリ実生内の CPD 光回復酵素につい

てまず遺伝子を単離し、その生理的役割について明らかにすることを試みた。

材料としてキュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Hokushin) の実生を用いた。国立環境研究所内の自然光型人工気象室において、第一本葉の展開直前まで生育させた。その後人工光型グロースチャンパーに移して実験に用いた。

まず、キュウリ緑葉より RT-PCR にて、高等生物型 (class II) CPD 光回復酵素と高い相同性を持つ cDNA 断片を単離した。これから得られた塩基配列情報をもとに primer を設計し、5'-, 3'-RACE により 1741 bp の cDNA クローン (*CsPHR*) を得た。*CsPHR* は 489 個のアミノ酸残基より構成されるタンパク質をコードしていると推察された。このアミノ酸配列は *A. thaliana* の CPD 光回復酵素のアミノ酸配列と高い相同性を持っていた (Fig.2)。また、*CsPHR* は光回復酵素を欠損した大腸菌突然変異体 (CSR603) に導入することによりその光回復能を回復した。これらの結果は、キュウリ実生において *CsPHR* によりコードされているタンパク質が CPD 光回復酵素として機能している可能性が高いことを示している。

次に、*CsPHR* の発現解析をおこなった。northern blotting による発現解析の結果、第二本葉、第一本葉等の若い組織では他の組織に比べて発現量が多かったが、最も発現量の多い第二本葉以外では発現量は少なく、定量的な議論は困難であった。

そこで、キュウリ第一本葉から抽出した total RNA を用いて定量的 RT-PCR による *CsPHR* 転写量の定量を行った。キュウリ第一本葉の成長にしたがって *CsPHR* 転写量は減少した。このことは、*CsPHR* の発現が UV-B 防御機構の未熟な幼若な組織で重要な役割を果たしていることを示唆している。この結果をもとに、まだ *CsPHR* 転写量が検出可能でありかつ成長が活発な時期の、播種後 12~13 日目のキュウリ第一本葉を用いて以下の実験をおこなった。第一本葉における *CsPHR* の日周サイクル (明期 6:00~18:00) での転写量を 6:00 から翌日の 9:00 までの 3 時間ご

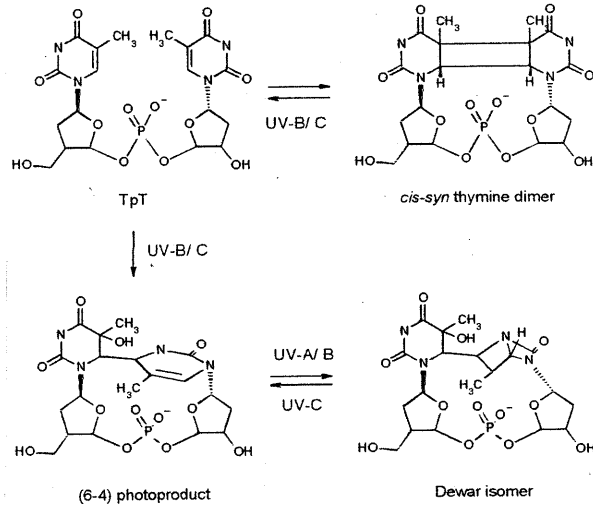


Fig. 1 UV-B 照射により生成する代表的な DNA 損傷

Cucumber	1: NASTLSNSVQPCRFVRLKDCG---S--LGPVVYVMEFDQVQRVKNWLLIHAVQANRAMVVAVAFNDFRFLGAKSRQL	75
Arabidopsis	1: NASTLYS--VQGRIRILKRGSWQSPDQTVGVVVYVMEFDQVQRVKNWLLIHAVQLAMTRAPVAVVFNDFRFLGAKSRQL	76
Cucumber	76: GPHLRGLLQQLQHDIQETLQIPFELPQGBAQTIIPNFTRECGASLLVDFEPLAEVRCRSEIQRVEESVSRVHVDAHIV	155
Arabidopsis	79: GPHLRGLRQLHAIQIDS-LQIPFELPQGDARETIIPNFTRECGASHVDFEPLAEIQRACDEVVRRTSDSLAIHVDARHV	157
Cucumber	156: VPTWVASEKLEYSARTLRGKINKKLPDYLDIYPSNVIPTRWPSAD-K-FIDWDRLLIDNMLAKGADVPELECKPGEKAA	233
Arabidopsis	158: VFNWAASKLEYSARTLRGKINKKLPDYLDIYPSNVIPTRWPSAD-K-FIDWDRLLIDNMLAKGADVPELECKPGEKAA	237
Cucumber	234: MEVLNGSKDQGLTKRLKGYAIDNNPLKPSGLSGLSPYLHFGQISAQCALARSISIKLNPAQVDVFELELIVRRELADN	313
Arabidopsis	238: IEVLNGSKDQGLTKRLKGYAIDNNPLKPSGLSGLSGLSPYLHFGQVSAQCALARSISIKLNPAQVDVFELELIVRRELADN	317
Cucumber	314: YCYQPHYDLSLGAWEHARKTLNHDHASKREYIYTRDQLEKQATADPLNAAQLNNAHGRSHGEMHMYWAKKLEWTRG	393
Arabidopsis	319: FCYQPHYDLSLGAWEHARKSLNHDHASKREHIIYSLDQLEKGLTADPLNAAQLNNAHGRSHGEMHMYWAKKLEWTRG	397
Cucumber	394: PEEALEICILYNDREYIDGRDPNGVYGVGHWISICGVHDQGWKERPEVPGKIRLNNYAGCKRKEVDVGYIAYVRLVGEIKRA	473
Arabidopsis	398: PEEALSIISILNNRYEIDGRDPSGVYGVGHWISICGVHDQGWKERPEVPGKIRLNNYAGCKRKEVDVSIYKSLVSVTRKK	477
Cucumber	474: KP-EETLEDRK--PKGIRC	489
Arabidopsis	478: RKAEQLTADSVDKRTIV	496

Fig. 2 *CsPHR* cDNA 配列から予想されるアミノ酸配列とシロイヌナズナ CPD 光回復酵素のアミノ酸配列の比較  
アミノ酸残基が一致した部位は(\*)で示した。

とに調べたところ、9:00~12:00 に転写量が最大になり、暗期では大きく低下した。明期中も暗所においた植物体では9:00にピークが見られたものの、転写量は低かった (Fig. 3)。同様の条件で CPD 光回復酵素活性を測定した。その結果、日中に活性が若干高く、明期の初めと終わり (6:00、18:00)、および暗期は活性が低く抑えられていた (Table 1)。UV-B 照射によるキュウリ第一本葉の葉面積成長阻害について UV-B 感受性の日周変化を調べたところ、明期の中央付近で UV-B を照射した場合には感受性が低く、成長阻害の程度が低くなった (Fig. 4)。この結果は CPD 光回復活性の日周変化と一致していた。これらの結果から UV-B による成長阻害の軽減に CPD 光回復酵素活性が関与している可能性が示唆された。

*CsPHR* は明所で転写量が多いことから光誘導性である可能性が考えられた。そこで、*CsPHR* の転写誘導に対する UV-B の影響について調べた。明期に白色光と同時に UV-B を照射したところ、9:00 前後の時間帯では白色光単独照射に比べて *CsPHR* の転写量が増加した。そこで次に、*CsPHR* の転写を誘導する光質について検討するために、*CsPHR* 発現誘導の作用スペクトルを調べた。作用スペクトルは、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いてキュウリ第一本葉に対し単色光照射を行い、RT-PCR 法による定量を行って作成した。その結果、270nm では誘導が阻害され、300nm では強い誘導が見られた。また 450nm でも 300nm ほどではないが誘導が見られた。一方で、290nm でも比較的強い誘導が見られたが、これは 300nm ほどではなかった (Fig. 5)。CPD の生成は 300nm の照射よりも 290nm の照射で数倍効果的であることから、CPD の生成が *CsPHR* の転写誘導の主要要因ではないことが示唆された。

光回復は植物において紫外線による DNA 損傷を修復するための主要なメカニズムである。それにも関わらず、現在までに遺伝子の単離は *A. thaliana* で行われた一例のみであり、その生理的意義に関しては不明な点が多い。本研究において、高等植物では *A. thaliana* 以外で初めてキュウリから class II CPD 光回復酵素の cDNA クローン (*CsPHR*) の単離に成功した。*CsPHR* 転写量は日周変化をしており、このことはキュウリ第一本葉成長の UV-B 感受性の日周変化に何らかの関連があるという生理的な役割を果たしている可能性を予測させた。野外では UV-B 量は日中が最大となり、朝夕は極めて少ない。よって、キュウリ植物体内では自然環境下での一日の太陽

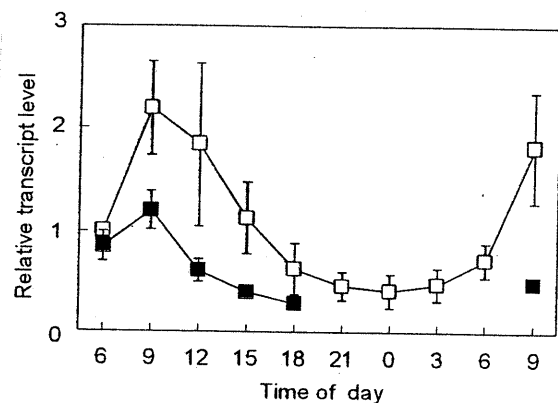


Fig. 3 *CsPHR* 転写量の日周変化 (明期中の処理、□:light, ■:dark)

Table 1. キュウリ CPD 光回復酵素活性の日周変化

Time	Photorepair activity (% / $\mu\text{g}$ protein)
06:00	7.05 $\pm$ 1.55 <sup>a,c</sup>
09:00	8.46 $\pm$ 1.38 <sup>a,b,c</sup>
12:00	10.61 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>
15:00	10.27 $\pm$ 1.18 <sup>b,c</sup>
18:00	7.43 $\pm$ 1.51 <sup>a,b,c</sup>
21:00	7.31 $\pm$ 1.18 <sup>a,c</sup>
00:00	5.60 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>

異なる文字間(a, b, c)では有為差があることを示す。

光の変化に応じて UV-B 耐性が制御されているものと思われる。光回復酵素活性はそのような UV-B 量に応じて変化する耐性機構の一つであると考えられ、その結果、植物の UV-B 感受性の日周変化を与えるものと予想された。

また、UV-B 照射、特に地上では UV-B 領域でも比較的量が多い 300nm で誘導が増幅されたことは、*CsPHR* の発現は本来ストレスと成り得る UV-B によって直接的な制御を受けていることを示している。光回復酵素の発現を誘導、増幅する要因については未だ明らかではない。しかしこれらの結果から、光回復酵素の誘導には未同定の UV-B 光受容体が関与している可能性が考えられる。今後、光回復酵素の誘導に関わる因子を探索することが、UV-B が植物に与える影響とその防御機構を解明するために重要であると考えられる。

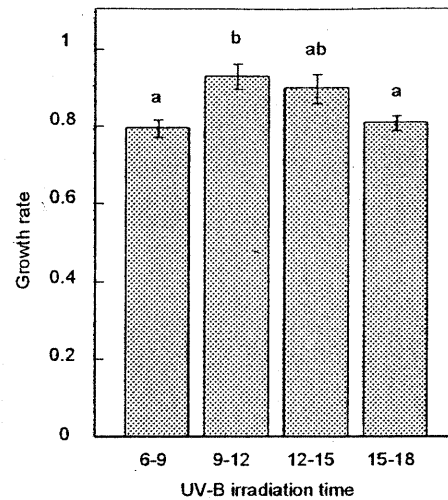


Fig.4 UV-B 照射時間帯が成長阻害に与える影響  
異なる文字間(a, b)では有為差があることを示す。

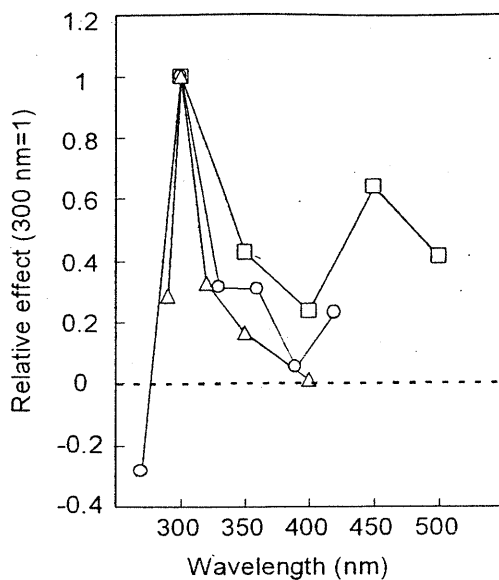


Fig.5 *CsPHR* 転写誘導の作用スペクトル  
(3回の異なる実験結果を各グラフにて示した)