

論文内容の要旨

UVB-driven Transcriptional Activation of the Cucumber Photolyase Gene

(B領域紫外線によるキュウリ光回復酵素遺伝子の転写誘導に関する研究)

氏名 五百城 幹英

はじめに

地上に到達する紫外線(UV)はUVA(320 - 400 nm)とUVB(290 - 320 nm)に分けられる。波長が290 nm以下の紫外線は大気中のオゾンや酸素によって吸収されるため地上には到達しない。人間活動による成層圏オゾンの破壊により地上に到達する紫外線量が増え、人間や他の動植物が障害を受けるのではないかと懸念されている。成層圏オゾンが減少して増加する紫外線は320 nm以下の波長のUVBである。290 - 320 nmは、DNA、タンパク質などの生体物質の吸収スペクトルの裾野に位置しており、UVBが増えればこれらの物質は損傷を受け、その結果、生物は深刻な影響を被ると考えられる。特にDNAの損傷は生物の基本的な機能に重大な影響を与える可能性がある。UVBにより生じるDNA損傷の大部分はシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)であることが知られている。

移動能をもたない植物は太陽光中のUVBから自身を守る仕組みを備えている。葉の表面に蓄積したクチクラや、表皮に蓄積しているフラボノイドなどの紫外線吸収物質により、葉肉細胞まで到達する紫外線量は極めて少ないと考えられる。しかしながら、わずかな紫外線が表皮を透過し、表皮細胞、葉肉細胞のDNAに損傷を引き起こす。これに対して、あらゆる生物はDNA損傷を修復する機構をもっている。様々なDNA修復機構があるが、植物では変異体の解析(Fig.1)などから特にCPD光回復酵素によるCPDの修復が重要であると考えられている。本研究では、キュウリ実生およびシロイヌナズナ組換え体を用いてキュウリCPD光回復酵素遺伝子(*CsPHR*)の転写調節機構に関する解析を行った。

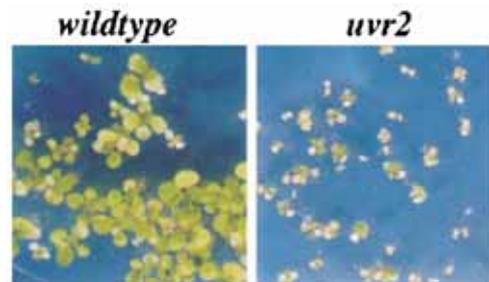
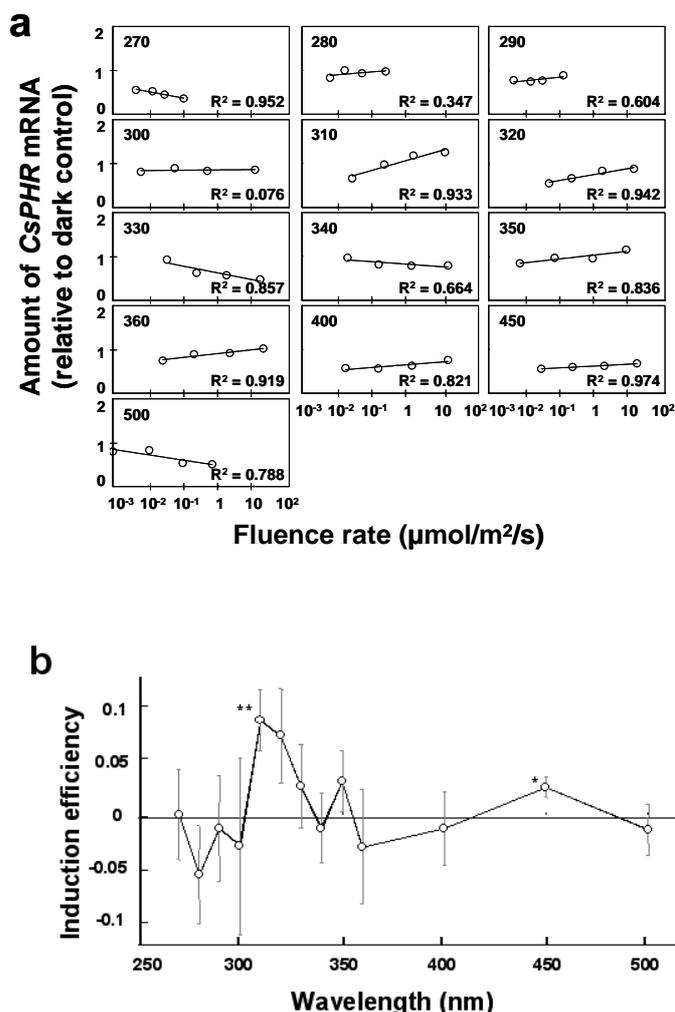


Figure 1. Phenotype of *Arabidopsis* mutant (*uvr2*) with functionally deficient CPD photolyase. Seed were germinated on nutrient agar plates; beginning on day 3 seedlings were exposed to continuous UVB and photographed 10 days later. (Landry *et al.* 1997)

第1章 *CsPHR*の転写誘導に関する光受容体に関する研究

我々の研究室で行われたキュウリのCPD光回復酵素遺伝子 (*CsPHR*) の発現解析の結果、*CsPHR*の転写は光により誘導されることが示されており、これは地上に到達するUVB量に応じた光回復酵素活性の日周変化をもたらす環境適応機構であると考えられる。本研究では、光回復酵素の発現誘導に関与している光受容体を明らかにすることを目的に、*CsPHR*の発現がどの波長の光で誘導されるのかを単色光照射実験により検証した。材料には、キュウリの実生を用いた。単色光照射は、大型の照射型分光器である基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて行った。展開を始めたばかりの第一本葉に対して4段階の異なる強度の単色光を4時間照射した後の*CsPHR*転写産物蓄積量をRT-PCR法により定量した。転写産物蓄積量を光強度に対してプロットして得られる近似直線の傾きを算出し、この傾きをそれぞれの波長での転写誘導効率の指標とした(Fig. 2a)。算出された*CsPHR*転写誘導効率を光の波長に対してプロットして作用スペクトルを得た。その結果、*CsPHR*の転写がUVB、UVAおよび青色光により誘導されることが明らかになった。中でも310 nm付近の波長をもつ長波長UVBにより転写が最も効率良く誘導された(Fig. 2b)。長波長UVBを特異的に受容する光受容体は様々な光応答反応に関与していることが示唆されているが、現在のところどの生物でも同定されていないことから、*CsPHR*の転写誘導には未同定のUVB光受容体に関与していると考えられた。

Figure 2. Wavelength-dependency of the *CsPHR* transcriptional activation. **a**, Representative set of fluence-response plots for accumulation of *CsPHR* transcripts. Cucumber seedlings with horizontally expanding first true leaves were irradiated with monochromatic light at 4 different intensities for 4 hours. Wavelength of the monochromatic light is indicated at upper left corner. *CsPHR* transcript levels in first true leaves were determined via quantitative RT-PCR. Values were normalized to the mean value for 4 dark-control plants and semilogarithmically regressed against the light intensity. Square of the correlation coefficient (R^2) is presented at bottom right corner. **b**, Action spectrum for the transcriptional activation of *CsPHR*. Regression coefficient for each wavelength was calculated from the fluence-response plot. Experiments were repeated 6 times and the mean value for the regression coefficient was plotted against wavelength as induction efficiency. Each bar indicates \pm S.E. for 6 independent experiments. Asterisks indicate significant differences at $P < 0.1$ (*) and $P < 0.05$ (**) determined by one-sample *t* test against the value zero.



第2章 *CsPHR*のプロモーター解析

第1章で得られた結果から、*CsPHR*の転写誘導にはUVBを特異的に受容し、そのシグナルを伝達する機構が関与していると考えられた。しかし、植物におけるUVB受容およびUVBシグナル伝達に関する知見は少ない。そこで本研究では、UVBによる転写誘導に関与する*cis*因子を特定するために、

キュウリのゲノムDNAライブラリーから単離した 2.5 kbpの *CsPHR*プロモーターの解析を行った。まず、*CsPHR*プロモーターをレポーター遺伝子 (β -glucuronidase遺伝子 [*GUS*]) につないでシロイヌナズナに導入した組換え体を作製し、レポーター発現が 310 nm付近のUVBにより最も強く誘導されることを確認した(Fig. 3)。続いて、UVB応答に必須なプロモーター領域を同定することを目的としてプロモーターデリレーション実験を行った。翻訳開始点上流 1132 bp、300 bp、201 bpのプロモーター領域をレポーター遺伝子 (luciferase遺伝子 [*LUC*]) に繋いでシロイヌナズナに導入した組換え体を作製し、UVB照射によりレポーター発現が誘導されるかを調べた。その結果、1132 bpおよび 300 bpのプロモーター制御下ではUVB照射によりレポーター発現が誘導されたが、201 bp のプロモーター制御下ではレポーター発現誘導は見られなかった。また、2.5 kbp のプロモーターから翻訳開始点の上流 202 - 296 bp の 95 bp の領域を除いた場合にも UVB 照射によるレポーター発現誘導は見られなかった(Fig. 4a, b, c)。したがって、翻訳開始点の上流 202 - 296 bp のプロモーター領域は *CsPHR* の UVB による転写誘導に必須であると考えられた。そこで、この 95 bp のプロモーター領域が単独で UVB 応答を引き起こすことができるかを調べるために、このプロモーター領域を *CaMV 35S* 最小プロモーターおよびレポーター遺伝子につないでシロイヌナズナに導入した組換え体を作製し、gain-of-function 実験を行った。その結果、これらの組換え体において UVB によるレポーター発現の誘導は見られず、この 95 bp のプロモーター領域は UVB 応答に必須であるが単独では UVB 応答的転写誘導を引き起こすことが出来ないことが明らかになった。したがって、この 95 bp の領域に存在する *cis* 因子と協働的に働く他の *cis* 因子が翻訳開始点の上流 201 bp 以内に存在すると考えられた。翻訳開始点上流 202 - 296 bp の領域の塩基配列について、光合成関連酵素遺伝子やフラボノイド合成関連酵素遺伝子において知られている光依存的転写誘導に關与する *cis* 因子に類似した塩基配列を探索したところ、ACGT をコア配列としてもつ DNA モチーフ (ACGT エレメント) が 3 つ存在していた(Fig. 4d)。したがって、これらが *CsPHR* の UVB による転写誘導に必須な *cis* 因子である可能性が高いと考えられた。

Figure 4. Reporter assays using transgenic *Arabidopsis* harboring the *CsPHR* promoter and its derivatives.

a, Scheme of the different promoter deletions. The full-length promoter (2500-bp-long), the truncated promoters, and the full-length promoter with the 95-bp region deleted ($\Delta 95$) were cloned upstream of the reporter gene (*GUS* or *LUC*).

b, Transgenic plants harboring the 1132-bp, 300-bp, and 201-bp promoters were irradiated with polychromatic UV for 3 h, or placed in the dark as controls. The reporter (*LUC*) expression is shown. Bar indicates \pm S.D. for 4 plants.

c, UVB-responsive expression of the reporter (*GUS*) under the control of the -2500 promoter and the $\Delta 95$ promoter was detected via histochemical staining. Bar = 2 mm.

d, Nucleotide sequence of the *CsPHR* promoter between 202 and 300 bp upstream the translational start. DNA motifs with ACGT cores (underlined) are boxed.

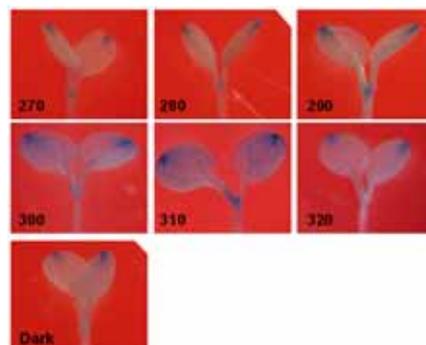
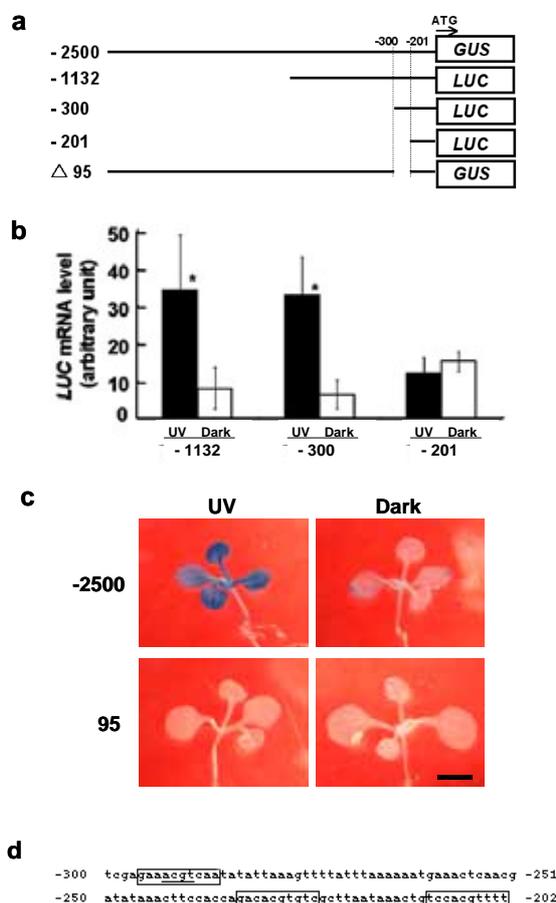


Figure 3. GUS-stained transgenic *Arabidopsis* seedlings irradiated with monochromatic light. Transgenic *Arabidopsis* expressing GUS under the control of 2.5-kbp *CsPHR* promoter was irradiated with monochromatic light (270, 280, 290, 300, 310, and 320 nm) at $1.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 3 hours. The *in situ* expression of GUS was visualized via GUS staining.



まとめ

本研究により、*CsPHR*の転写は310 nm付近の波長をもつ長波長UVBにより誘導されることが明らかになった。自然環境中での日周期の中で、長波長UVBはDNA損傷を引き起こす短波長UVBに先立って地上に到達する。したがって、植物はCPD光回復酵素を長波長UVB依存的に発現誘導し、地上に到達する短波長UVB量が多い時間帯にDNA損傷修復能を上昇させることにより放射環境に適応していると考えられた。

長波長UVBを特異的に受容する光受容体は、現在のところどの生物でも知られておらず、*CsPHR*の転写誘導に関与していると考えられるUVB光受容体の正体は不明である。しかしながら、本研究におけるレポーター遺伝子を用いた*CsPHR*のプロモーター解析の結果、翻訳開始点の上流202 - 296 bpのプロモーター領域が*CsPHR*のUVBによる転写誘導に必須であることが明らかになった。このプロモーター領域にはACGTをコア配列としてもつDNAモチーフが3つ存在しており、これらが*CsPHR*のUVBによる転写誘導に関与している可能性が高いと考えられた(Fig. 5)。今後は、より詳細なデリーション実験等によりこれらのDNAモチーフのUVB応答的転写誘導への関与を調べると共に、翻訳開始点の上流201 bp以内に存在すると考えられる*cis*因子についても明らかにしていく計画である。また、CPD光回復酵素遺伝子の発現やそのプロモーターの活性化によるレポーター発現を指標として植物におけるUVB光受容メカニズムおよびその下流のシグナル伝達機構を解明することが出来ると考えている。

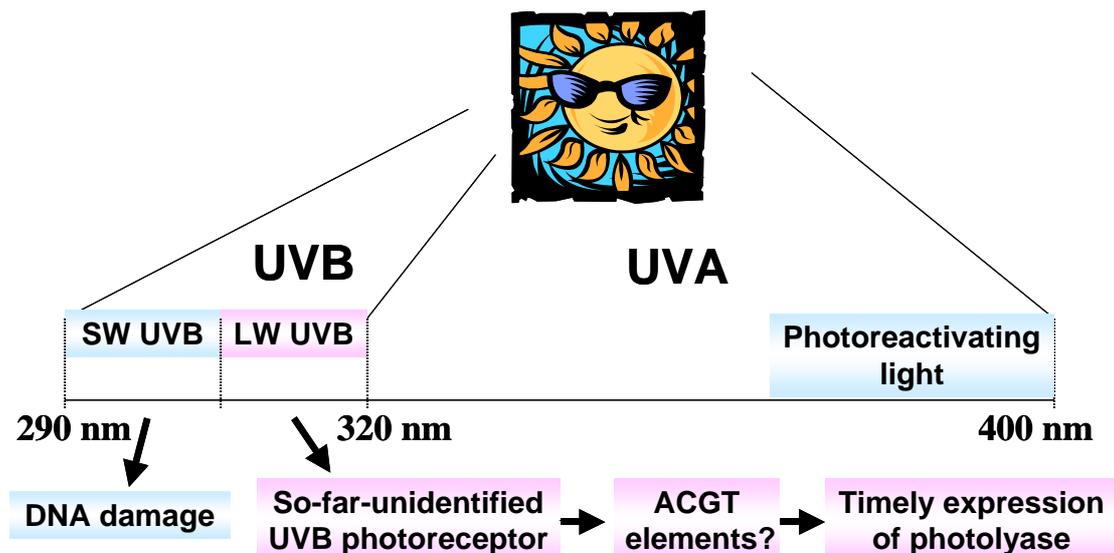


Figure 5. Inferences from the present research. The solar radiation that plants experience in the natural environment contains UVB with wavelengths longer than 290 nm. The short-wavelength UVB (290 – 300 nm) causes DNA lesions in the foliar cells, while the less-damaging long-wavelength UVB (300 – 320 nm) induces the photolyase expression. Since the long-wavelength UVB reaches the earth's surface before the short-wavelength UVB, photolyase expression in response to the long-wavelength UVB would allow plants to adapt to sunlight by timely elevating the photoreactivation activity in the midst of the day. This UVB-dependent induction of photolyase expression seemed to be mediated by the so-far-unidentified UVB photoreceptor(s) and the ACGT elements on the *CsPHR* promoter in cucumber plants.