

	たけうちあつこ
氏名（本籍地）	竹内敦子
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第14号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	UVBによるイネ生葉の葉緑体タンパク質（Rubisco, LHCII）の量的変動に関する研究 —核と葉緑体におけるDNA損傷の生成と光回復からの解析—
博士論文審査委員	（主査）教授 熊谷 忠 教授 南澤 究 教授 高橋 秀幸 助教授 日出間 純

論文内容の要旨

[はじめに]

紫外線 B(UVB;290-320 nm)の増加は植物の生育に重要な影響を及ぼす。イネにおいては UVB の増加は、①光合成活性を低下させ、②草丈や分けつ、収量を低下させ、③玄米を小型化させ、タンパク質含量の増加を引き起こす。この UVB の効果に対する反応はイネの生態型、品種により異なる。育種の過程がよく知られ、草型がよく似た日本型栽培イネ品種グループのうち、近縁関係にあるにもかかわらず、ササニシキ（東北地方の代表的なイネ）は UVB 抵抗性を示すのに対し、その先祖である農林 1 号は感受性を示す。この 2 品種において見られる UVB 感受性に関して、①生育時に付加した UVB によって、葉内可溶性タンパク質の約 40%を占める葉緑体タンパク質 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)含量が感受性品種において著しく低下すること、②集光性クロロフィルタンパク質 light harvesting chlorophyll a/b-binding protein of PS II (LHCII)含量は、両品種でともに UVB の影響を受けにくいこと、③UVB によるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) の生成頻度は両品種で差が見られないが、CPD 光回復酵素の活性は感受性品種で著しく低いことが知られている。これらの知見は、一定期間生育した後の一定のエージに達した個体を用いて得られた結果である。葉は葉齢の進行に伴って葉の大きさのみならず葉内のタンパク質含量、さらにタンパク質の合成と分解のバランスが大きく変化している。そのようなエージが進行しつつある葉における葉内タンパク質の蓄積あるいはタンパク質合成に及ぼす影響については明らかにされていない。私は、イネの UVB 感受性の違いには、光合成のキー酵素である Rubisco の合成が付加 UVB により低下すること、それを引き起こす要因のひとつとして DNA 損傷 (CPD) の光回復酵素活性の違いが密接に関係しており、その関係を明らかにすることによって、イネの UVB 耐性機構の解明に迫ることができると考え、本研究を行った。

[第 1 章] 生育時の付加 UVB が葉内の ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) と light harvesting chlorophyll a/b-binding protein of PS II (LHCII) の蓄積に及ぼす影響の解析

UVB 抵抗性ササニシキと感受性農林 1 号を、可視光に UVB (1.4 W/m²) を付加した条件下で生育させ、UVB 付加が葉齢の進行に伴って葉内の Rubisco と LHCII 含量にどのような影響を及ぼすのかを調べた。水耕栽培により実験植物を UVB を付加しない条件下、¹⁵N フリー

の培養液を用いて生育させ、第 8 葉の抽出直後に UVB を付加した条件、しない条件で ^{15}N を用いてトレーサー実験を行い、各タンパク質の合成と分解を経時的に解析した。その結果、①出葉後完全展開するまでの間、感受性品種の Rubisco 合成は著しく低下し、完全展開直後の分解が一時的に促進されていた。これに対し、抵抗性品種の Rubisco の合成に及ぼす付加 UVB の影響は小さかった。LHCII の合成及び分解は両品種ともに影響は小さかった。

次に、付加 UVB による Rubisco の遺伝子 *rbcS*, *rbcL* と LHCII の遺伝子 *cab* の発現量に及ぼす影響について調べた。出葉後 3 日目頃までの間、各遺伝子の発現は増加し、完全展開する前、タンパク質合成がピークに達するより前にピークに達し、その後低下した。この遺伝子発現の変動パターンは、各遺伝子間で差は見られたが、一様に付加 UVB により抑制された。その程度は感受性品種で顕著であった。従って、農林 1 号で認められた Rubisco 含量の顕著な低下は、付加 UVB により転写過程及び転写後の制御によるものであることがわかった。

「はじめに」で記したように、イネ品種の UVB 感受性は、UVB により生成する CPD の光回復能、すなわち CPD の蓄積によって左右され、このことがタンパク質合成を阻害する可能性を考えた。ところで、葉緑体のストロマに局在する Rubisco は、8 個のラージサブユニット (LSU) と 8 個の小サブユニット (SSU) からなる 16 量体のタンパク質であり、LSU の遺伝子 *rbcL* は葉緑体ゲノムに、SSU の遺伝子 *rbcS* は核ゲノムにそれぞれコードされている。一方チラコイド膜に局在している LHCII の遺伝子 *cab* は核ゲノムにコードされている。UVB が Rubisco、LHCII の転写に及ぼす UVB の影響を明らかにするには、各オルガネラにおける DNA 損傷の生成と光回復能を解析する必要がある。次章では核及び葉緑体ゲノムにおける CPD の生成量の違いと各オルガネラにおける光回復酵素活性の違いについて解析した。

[第 2 章] 生葉の核、葉緑体における UVB 誘導シクロブタン型ピリミジン二量体の生成と光回復酵素活性の比較

光回復酵素活性の高いササニシキを、UVB を付加しない条件で生育させ、完全展開した直後の第 4 葉を切除して、種々異なる時間 UVB (10 W/m^2) を照射し、照射した葉からショ糖密度勾配遠心法によりイネ葉から葉緑体画分及び核画分を単離した。葉緑体の指標としてクロロフィル量と NADP-G3P-dehydrogenase 活性、*rbcL* 量、核の指標として DNA 量、*rbcS* 量、ミトコンドリアの指標として cytochrome c oxidase 活性と *cytb* 量を用いた。その後単

離した各オルガネラゲノムの CPD 量を測定したところ、図 1 に示したように、核及び葉緑体ゲノムの両方に CPD が生成したが、生成量は葉緑体ゲノムに比較して核ゲノムで多かった。また、イネ葉から単離した核と葉緑体に UVB を照射した際の CPD の生成速度に関しては、葉緑体ゲノムよりも核ゲノムで大きいことがわかった。次に、第 4 葉に予め UVB を照射して CPD を生成させ、その後様々な時間青色光を照射したときの核、葉緑体における光回復による CPD 量の変化を図 2 に示した。核では CPD 量が青色光照射により短時間で減少したが、葉緑体では 24 時間後も変化しなかった。また、核及び葉緑体自身の光回復酵素活性の有無を調べるため、核及び葉緑体から調製した粗酵素液を用いた *in vitro* の実験を行ったところ、光回復酵素活性は核で認められ、葉緑体では検出できなかった。これらの結果、CPD 光回復酵素は核にのみ局在することが分かった。

[第 3 章] 核、葉緑体ゲノムの異なったサイトにコードされている遺伝子における DNA 損傷の生成とその光回復の解析

第 3 章では、核、葉緑体のゲノム上の遺伝子間での UVB 誘導 DNA 損傷の生成速度、さらには DNA 損傷の光回復速度に違いがあるか否かについて解析を行

った。第 4 葉に UVB を照射した場合に、核にコードされる遺伝子 *rbcS*, *cab* と葉緑体にコードされる遺伝子 *rbcL*, *atpB* 上に生成する DNA 損傷とその修復量を、定量 PCR 法を用いて解析した。定量 PCR 法による測定は、増幅しようとする領域内に DNA 損傷があると PCR 反応が停止し、PCR 産物が低下するために、無傷の DNA を鋳型にした場合と比較することで、特定の遺伝子上の DNA 損傷量を比較する方法である。本方法は CPD に特異的な定量方法ではないが、UVB により生成する DNA 損傷の約 70-80% が CPD であるため、得られる結果は CPD の生成速度及び CPD の光回復速度を十分に反映したものであると考えた。

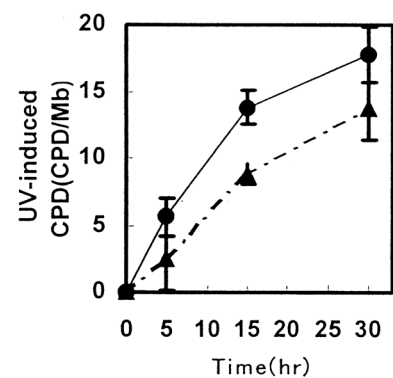


図 1 葉に様々な時間 UVB(10 W/m²)を照射した場合に核及び葉緑体に生成する CPDs の経時変化
 (●)核ゲノム上の CPD 量
 (▲)葉緑体ゲノム上に生成した CPD 量

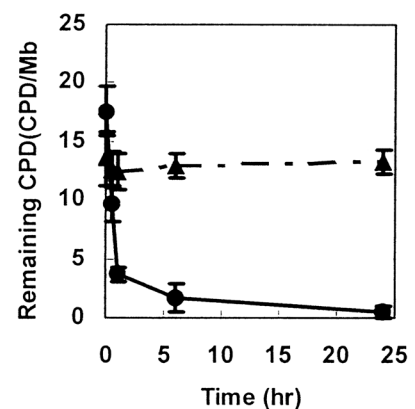


図 2 UVB を照射した葉に生成した CPDs の核、葉緑体における光回復による量的変化
 (●)核ゲノム上の CPD 量
 (▲)葉緑体ゲノム上の CPD 量

図3は、ササニシキの第4葉にUVBを5 W/m²の強度で様々な時間照射したときの *rbcS*, *cab*, *rbcL*, *atpB* 上に生成したDNA損傷量を示したものである。この結果、核にコードされている *rbcS*, *cab*の方が葉緑体にコードされる *rbcL*, *atpB* よりも多くDNA損傷が蓄積し、同じ核または葉緑体にコードされる遺伝子であっても、DNA損傷量は遺伝子によって異なることがわかった。図4には、また予め第4葉にUVBを照射して *rbcS*, *cab*, *rbcL*, *atpB* 上にDNA損傷を生成させた後、青色光の下に移して経時的にサンプリングして、各遺伝子上での光回復性を示した。その結果、核にコードされる遺伝子 (*rbcS*, *cab*) のみで光回復が認められた。しかし *rbcS*, *cab* の間での光回復速度に有意な差は認められなかった。

[おわりに]

以上の解析により、UVB照射によりイネ葉内の核と葉緑体両方のゲノム上にCPDが生成されるが、その生成頻度は核のほうが葉緑体と比較して明らかに大きかったこと、またさらに同じゲノム上にコードされる遺伝子間でも異なっていることが分かった。その理由としては、各オルガネラのゲノム構造やゲノムサイズ、細胞内における各オルガネラの配置の違いなどが影響していることが推測された。また、光回復酵素活性は核に局在し、葉緑体には局在しないことが明らかとなった。付加UVBによる感受性品種のRubisco含量の著しい低下の要因のひとつとして、感受性品種の核における光回復酵素活性が抵抗性品種よりも低いために、*rbcS*の転写がより阻害され、mRNAの蓄積量が低下するためである可能性が考えられた。したがって、生育時のイネ葉におけるRubiscoタンパク質の合成阻害の程度には、核におけるCPDの生成量と修復能力が深く関与していることが示唆された。

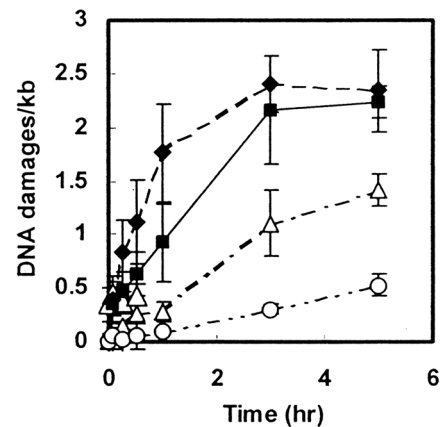


図3 葉に様々な時間UVB(5 W/m²)を照射した場合に *rbcS* (■), *cab* (◆), *rbcL* (△), *atpB* (○)上に生成するDNA損傷量の経時変化

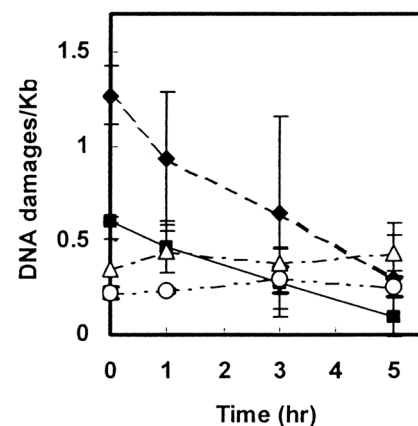


図4 UVBを照射した葉に生成したDNA損傷の *rbcS* (■), *cab* (◆), *rbcL* (△), *atpB* (○)上における光回復による量的変化

論文審査結果の内容

紫外線 B(UVB)の増加はイネの光合成活性を低下し、分けつや草丈の伸長などの生長、収量を低下させる。これら UVB の効果に対し、イネは品種によって異なった反応を示す。日本型栽培イネ品種のうち、ササニシキは UVB 抵抗性であるが、ササニシキと近縁な関係にある農林 1 号は感受性である。この 2 品種を用いた解析により、①付加 UVB により、感受性品種の光合成のキー酵素である Rubisco 含量は抵抗性品種にくらべ著しく低下するが、Rubisco 同様葉緑体に局在する集光性クロロフィルタンパク質 LHCII 含量は両品種とともに影響を受けにくいこと、②感受性品種のシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)光回復酵素活性は抵抗性品種に比べ著しく低いことが分かっている。本研究では付加 UVB がタンパク質合成、DNA 損傷の動態に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、①生育しつつある葉を用いて、付加 UVB が Rubisco、LHCII 含量の変動に及ぼす影響についての¹⁵N を用いたトレーサー-試験により解析し、②葉緑体にコードされている Rubisco の Large subunit 遺伝子 *rbcL*、核にコードされている Small subunit 遺伝子 *rbcS* および LHC II の遺伝子 *cab* の発現およびタンパク質合成が、これらの遺伝子がコードされているオルガネラの違いにより異なるのか、また、核と葉緑体における CPD の生成量とその光回復酵素活性の違いを解析した。

その結果、①Rubisco の合成は葉が抽出し、完全展開するまでの発育段階で、UVB 照射により阻害されること、その阻害の程度は感受性品種において顕著であること、②タンパク質合成の阻害は、とくに転写阻害によること、③UVB 照射による CPD の生成量は葉緑体ゲノムに比べて核ゲノムで大きく、同じゲノム上にコードされる遺伝子間でも異なること、④CPD 光回復酵素は核には局在するが、葉緑体には存在しないことを世界に先駆けて明らかにした。

このように当該研究者は植物生理生化学的、分子生物学的思考と技術をもとに、植物の紫外線耐性機構について新しい知見を見いだした。これらの研究は自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。従って、審査員一同は、竹内敦子氏が提出した論文は博士（生命科学）の博士論文に十分に値するものと判断し、認めることにした。