

学 位 論 文 題 名

Physiological and molecular genetic studies  
on UV-B tolerance of paraquat-resistant mutants  
of *Arabidopsis thaliana*

（シロイヌナズナのパラコート耐性突然変異体の  
UV-B 耐性に関する生理学的、分子遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

植物は光合成のために太陽光が必須であり、そのことは同時に紫外線にさらされることを意味している。また、近年クロロフルオロカーボンなどの大気中への放出によってオゾン層が減少することが懸念されており、オゾン層の減少に伴って地表面に到達する UV-B 量が増加することが知られている。このオゾンの減少はすでに極地だけではなく、大都市が集中する北アメリカやヨーロッパで確認されている。さらに、増加した紫外線によって作物の収量が減少することも示唆されている（Teramura ら、1991）。今後の生物資源の安定した確保を考えると、紫外線に対する防御機構の解明と耐性を持った植物の作出が重要であると考えられる。

紫外線を照射された植物体は、核酸やタンパク質の構造の変化や、活性酸素の発生に伴う酸化ストレス、アポトーシスの促進などにより損傷を受ける。しかし植物はこの回避できない紫外線照射によるストレスに対抗するために、紫外域に遮蔽効果を持つ色素や、発生した活性酸素を除去する低分子化合物や酵素群、核酸に生じた変異を修復する酵素などを持っている。

パラコート（メチルビオロゲン）は除草剤として開発された物質だが、植物体に吸収されると葉緑体中で光化学系Ⅰから電子を受け取りパラコートフリーラジカルへと変化して、酸素を活性酸素の一種であるスーパーオキシドへと変化させる。また、UV-B の照射によっても葉緑体中で活性酸素が発生することが予想されるため（Renger ら、1986）、このパラコートに対して耐性を示す突然変異体を単離してその耐性獲得機構を調べるのが、同時に UV-B 照射に対する耐性機構の解明につながると考えられる。そこで、本研究ではパラコートに対して耐性を示す突然変異体を単離し、その突然変異体の耐性機構を調べ、UV-B 照射による損傷との関わりを調べることを目的とした。

パラコートを含む培地上で生育可能な突然変異体を約 12,000 系統の変異原処理した突然変異体集団よりスクリーニングし、5 系統のパラコート耐性突然変異体を得た。このうち最も強いパラコート耐性を示した系統を *pqr1* (paraquat resistant) と名付けた。*pqr1* は劣性の突然変異体で、野生型と比べて小さく、成熟時の花茎の長さが野生型の半分ほどで、特に葉柄が短かった。また、葉の色が若干濃くなっていた。色素はクロロフィル、アントシアニン、UV-B 域に吸収を持つ色素全体についてそれぞれ調べたが、これら全てについて生重量あたりの蓄積量が野生型より多かった。パラコート添加培地上で生育させたときのクロロフィル量と根の成長を測定した結果、*pqr1* は野生型の

4 ～ 5 倍のパラコート濃度に耐えられることがわかった。

UV-B 照射による傷害として、核酸の損傷や活性酸素による膜脂質の過酸化、光合成活性の低下が知られているので、これらの損傷を *pqr1* で調べた。DNA の損傷産物であるシクロブタン型ピリミジンダイマーの蓄積量は、*pqr1* では野生型より少なかった。これは *pqr1* で多く蓄積している UV-B 域に吸収を持つ色素による遮蔽効果の結果と考えられる。また、過酸化脂質の生成により膜構造が維持できなくなったことによる細胞からの電解質の漏出も野生型より少なく、光合成活性の指標となる Fv/Fm の低下も野生型より減少していた。これら 2 つの損傷は活性酸素が原因と考えられるので (Takeuchi ら、1995; Olsson ら、2000)、*pqr1* では活性酸素の除去活性が高いと考えられる。

フラボノイド合成系に変異を持つ突然変異体は UV-B の照射に対して感受性を示す (Li ら、1993)。フラボノイド化合物の代表的な物質であるアントシアニンの蓄積量は *pqr1* で多く、さらに UV-B 照射に伴う蓄積量増加の割合も *pqr1* の方が野生型より多かった。さらにフラボノイド合成系の鍵酵素となるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) やカルコン異性化酵素 (CHI)、カルコン合成酵素 (CHS) の mRNA 量を調べたところ、PAL は野生型とほぼ変わらなかったのに対して、CHI と CHS については、UV-B 照射後、*pqr1* の方が野生型より mRNA 量が増加していた。

UV-B の照射によって植物は光化学系に損傷を受け、飽和した電子が酸素と反応し葉緑体中に活性酸素を発生させる。この活性酸素の除去に関わる酵素群について mRNA 量の変化を調べてみると、*pqr1* ではストロマに局在する葉緑体型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの mRNA 量が野生型よりも多く、UV-B 照射後の mRNA 量も多いことがわかった。しかし、細胞質型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼの発現量は UV-B 照射前、後ともに野生型よりも少なかった。また、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) について電気泳動後の活性染色による酵素活性と mRNA 量を調べた。細胞質型 Cu/Zn SOD は、*pqr1* で有意な増加が見られなかったのに対して、葉緑体局在性 SOD の活性は UV-B の照射前後共に野生型より高いことがわかった。これらの結果から、*pqr1* では葉緑体で野生型より高い活性酸素除去活性を保有していて、そのために UV-B 照射によって生じた活性酸素に対して耐性になっていると考えられる。また、この葉緑体における活性酸素除去活性の増加は、同じく葉緑体中に活性酸素を発生させるパラコート処理に対する耐性獲得の原因であると考えられる。

*pqr1* についてマッピングを行い原因遺伝子の特定を行ったところ、1 番染色体上の *CEO1* 遺伝子で塩基置換が起こり、新たに終始コドンが形成されていることがわかった。*CEO1* 遺伝子は酵母中に導入すると酵母が活性酸素耐性になる遺伝子として単離され、核局在性タンパク質をコードしていて、転写因子と結合し転写の調節を行うことが報告されている (Belles-Boix ら、2000)。

*pqr1* は活性酸素の一種であるオゾンの曝露に対しては野生型よりも感受性を示した。形態的な特徴とオゾン感受性という性質は *rcd1* 突然変異体 (Overmyer ら、2000) と似ているので相補性検定を行ったところ、*PQR1* と *RCD1* は同じ遺伝子座であることがわかった。*rcd1* は外生的なオゾンやスーパーオキシド処理によって、エチレンを介してアポトーシスを引き起こすことが報告されている (Overmyer ら、2000)。

*pqr1* でオゾンの曝露によって細胞死が起こることは、ストレスの感知から応答までのシグナル経路に *PQR1* 遺伝子が関与していることを示唆している。*pqr1* ではストレスを与えていない状態でもストレスへの防御機構が構成的に発動してしまい、本来は病原菌の感染による過敏反応として起こるアポトーシスが誤作動して、オゾン感受性が生じたと考えられる。*pqr1* はこのストレス・シグナル経路の異常によって、本来ストレスが加わってから誘導が起こるフラボノイド化合物などの UV-B の遮蔽効果を持つ物質の蓄積と、活性酸素の発生源の葉緑体における活性酸素除去酵素の活性の増加が起こり、そ

の結果 UV-B 照射に対して耐性となると考えられる。本研究の結果から、高等植物の UV-B 照射に対する耐性獲得のために、UV-B の遮蔽と活性酸素の除去が有効な手段であることが結論できた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 興太朗

副 査 教 授 田 中 歩

副 査 助教授 奥 山 英登志

副 査 助教授 山 崎 健 一

副 査 教 授 竹 内 裕 一 (北海道東海大学工学部)

## 学 位 論 文 題 名

### Physiological and molecular genetic studies on UV-B tolerance of paraquat-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*

(シロイヌナズナのパラコート耐性突然変異体の  
UV-B 耐性に関する生理学的、分子遺伝学的研究)

紫外線を照射された植物は、核酸やタンパク質の構造の変化や、活性酸素の発生に伴う酸化ストレス、アポトーシスの促進などにより損傷を受ける。しかし植物はこの回避できない紫外線ストレスに対抗するために、紫外域に遮蔽効果を持つ色素や、発生した活性酸素を除去する低分子化合物や酵素群、核酸に生じた変異を修復する酵素などを持っている。

パラコート（メチルビオロゲン）は植物に吸収されて、葉緑体中で活性酸素を生じる。また、UV-B の照射によっても葉緑体中で活性酸素が発生するため、パラコートに対して耐性を示す突然変異体を単離してその耐性獲得機構を調べることが、同時に UV-B 照射に対する耐性機構の解明につながると考えられる。そこで、本研究ではパラコートに対して耐性を示す突然変異体を単離し、その変異体の耐性機構を調べ、UV-B 照射による損傷との関わりを調べた。

約 12,000 系統の突然変異体集団よりパラコート耐性突然変異体をスクリーニングし、5 系統の変異体を得た。このうち最も強い耐性を示した突然変異体 *paraquat resistant 1* (*pqr1*) について主に研究を行った。*pqr1* は劣性で、野生型と比べて小さく、葉の色が若干濃くなっていた。パラコート添加培地上での成長を調べたところ、*pqr1* は野生型の 4 ～ 5 倍パラコート耐性だった。

UV-B 照射による傷害として、核酸の損傷や光合成活性の低下を調べた。DNA の損傷産物である CPD の蓄積量は、*pqr1* では野生型より少なかった。これは *pqr1* で多く蓄積している UV-B 域吸収色素による遮蔽効果の結果と考えられる。また、光合成

活性の指標となる Fv/Fm の低下も野生型より減少していて、*pqr1* が UV-B に対して耐性であることがわかった。

UV-B の遮蔽効果を持つアントシアニンの蓄積量は *pqr1* で多く、さらに UV-B 照射に伴う蓄積量増加の割合も *pqr1* の方が野生型より多かった。フラボノイド合成系の鍵酵素の mRNA 量を調べたところ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼは野生型とほぼ変わらなかったのに対して、カルコン異性化酵素とカルコン合成酵素は、UV-B 照射後、*pqr1* の方が野生型より mRNA 量が増加していた。

活性酸素の除去に関わる酵素群について調べてみると、*pqr1* ではストロマに局在する葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの mRNA 量が野生型よりも多く、UV-B 照射後の mRNA 量も多かった。また、スーパーオキシドジスムターゼについても、葉緑体局在型酵素の活性が UV-B の照射前後ともに野生型より高かった。これらの結果から、*pqr1* では葉緑体で野生型より高い活性酸素除去活性を保有していて、そのためにパラコート耐性になっていると考えられる。

*pqr1* についてマッピングを行い原因遺伝子の特定を行ったところ、同変異体では 1 番染色体上の *CEO1* 遺伝子で塩基置換が起こり、新たに終始コドンが形成されていることがわかった。*CEO1* は酵母中に導入すると酵母が活性酸素耐性になる遺伝子として単離され、核局在性タンパク質をコードしていて、転写因子と結合し転写調節を行うことが示唆されている (Belles-Boix ら、2000)。

活性酸素を発生するオゾン曝露に対する感受性を調べたところ、*pqr1* は野生型より感受性が高かった。さらに、オゾンの曝露を止め、清浄な空気に戻しても損傷の拡大が進み、アポトーシス様の細胞死を起こした。同様な反応が *rcd1* (Overmyer ら、2000) で報告されているので相補性テストを行ったところ、*PQR1* は *RCD1* と同一遺伝子座であることがわかった。

以上の結果より、*PQR1* はストレス・シグナル経路を構成していて、*pqr1* ではストレスを与えていない状態でもストレスへの防御機構が構成的に発動してしまい、本来ストレスが加わってから誘導が起こるフラボノイド化合物などの UV-B の遮蔽効果を持つ物質の蓄積と、活性酸素の発生源の葉緑体における活性酸素除去酵素活性の増加が起こり、その結果 UV-B 照射に対して耐性となると考えられる。本研究の結果では、色素による UV-B の遮蔽効果により、発生する活性酸素量そのものが減少していると考えられるため、活性酸素除去酵素の増加が UV-B 耐性に与える効果を十分に評価することができなかったが、高等植物の UV-B 照射に対する耐性獲得のために、UV-B の遮蔽が有効な手段であることが結論できた。

以上のとおり、著者は高等植物の UV-B 耐性における *PQR1* 遺伝子の役割について新知見を得たものであり、植物のストレス耐性の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は博士 (地球環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。