

# ■ イオンビームで誘発したシロイヌナズナの紫外線耐性突然変異

イオンビーム植物遺伝子研究グループ

■ 田 中

淳 ■

## UV-B Resistant Mutations in *Arabidopsis thaliana*

Atsushi TANAKA

Research Group for Plant Genes

UV-B resistant mutations in *Arabidopsis thaliana* have been induced by ion beam irradiation. Four true-bred resistant lines were obtained in M<sub>4</sub> lines derived from 1,280 M<sub>1</sub> seeds. The 1.5-2 times higher growth of these mutants compared to wild type were observed under UV-B irradiation. From root bending assay in the light or dark condition, it is suggested that these mutants have high ability of photoreactivation and/or dark repair of UV-B-induced damages.

### 1. 紫外線によるダメージ

ヒトだけでなく、生物では紫外線を受けると日焼け反応や細胞性免疫抑制など様々な障害が起きる。特に細胞の中に存在する DNA は紫外線を吸収しやすく、致命的なダメージを受けることとなる。紫外線はその波長によって、UV-A (320~400 nm), UV-B (280~320 nm), UV-C (200~280 nm) の3つに大別さ

れる。290 nm 以下の紫外線は、オゾン層や大気の吸収・散乱を受けて地表に到達しない。地表に到達する太陽光線は波長約 300 nm より長波長の連続スペクトルからなっており、紫外線として UV-A と UV-B の長波長部分を含むことになる。一方、紫外線を吸収した DNA ではその塩基間にピリミジンダイマー (図 1) が生成されることによって、DNA の複製を行うことができず、細胞死に至るといわれている。DNA の分

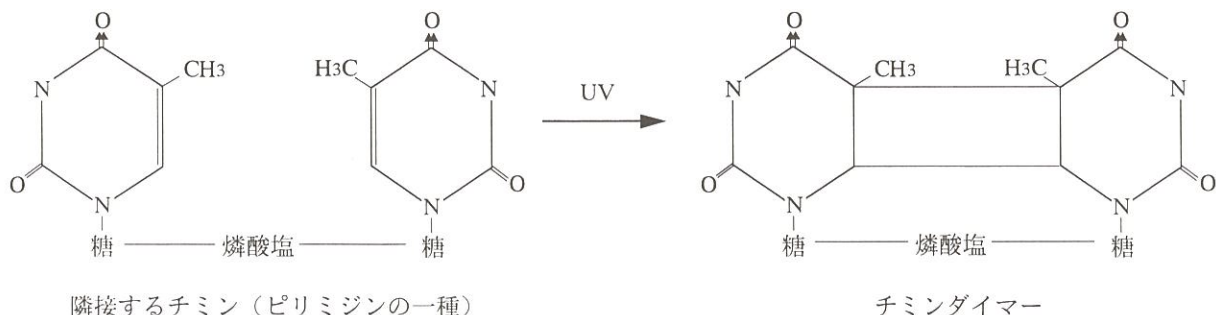


図 1 紫外線による細胞 DNA の変化

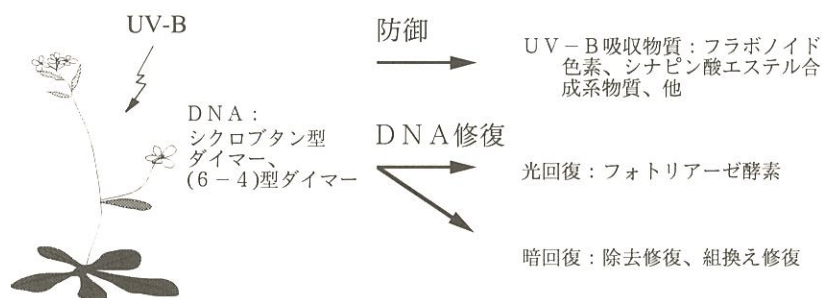


図2 シロイヌナズナの UV-B に対する防御と DNA 修復

光吸収測定による結果から、ピリミジンダイマーの生成は 260 nm 付近の波長領域に極大をもつことがわかっており、すなわち比較的短波長領域で生じやすい。従って、実際の環境中で最も有害な紫外線として UV-B が注目されることになる。近年、フロンガスによるオゾン層破壊が問題になっているが、オゾン層の破壊に伴い UV-B の増加が見られ、これにより生態系の変化等の悪影響が生じると考えられており、植物では成長阻害が危惧されている。日本国内では有意のオゾン量の減少は観測されていないものの、オゾン全量が 1% 減少すると UV-B 量が 2% 近く増加することが報告されている<sup>1)</sup>。

## 2. 植物における紫外線損傷と修復の研究

図2に示すように、植物に UV-B が照射されると DNA に 2 種類のピリミジンダイマーであるシクロブタン型ダイマーと (6-4) 型ダイマーが約 3 対 1 の比率で生じる。これは直接的な致死損傷ではないが細胞の増殖などを抑制することにより、植物の成長を阻害する。植物はそれに対応するために防御や修復のシステムを持っている。シロイヌナズナは、主にフラボノイド色素等により UV-B を吸収して損傷を緩和させるとともに、フォトリアーゼ酵素による光回復と除去修復・組み換え修復による暗回復によって生成されたピリミジンダイマーを除去することが分かってきた<sup>2-4)</sup>。シロイヌナズナではこれらが全て機能していると考えられ、紫外線に比較的強い植物である。従って、シロイヌナズナの野生株から、化学変異原や中性子線等の放射線を用いて紫外線感受性の突然変異体を数多く作出することによって、紫外線損傷の修復に関

する研究が進められているが、耐性を示す突然変異は知られていない。

紫外線に耐性を示す突然変異を作出することは、植物の損傷・修復のメカニズムの解明や、オゾン層破壊に伴う UV-B 増加に適応する植物の育成に有用である。我々のグループではイオンビームという新しい突然変異原を用いて耐性株を作出し、育種への利用と紫外線耐性の機構を調べていこうと考えている。イオンビームは局所的にエネルギーを付与するため、DNA レベルで大きな構造変化を誘発することが予測され、誘発される突然変異は他の変異原によるものとは質的に異なる可能性がある。イオンビームを植物の改変に用いるのは世界的にも例が少ないが、イオンビームがガンマ線などとは異なった突然変異を起こすことが分かりはじめてきた<sup>5)</sup>。なお、シロイヌナズナの特徴とイオンビームの照射効果については参考文献<sup>6)</sup>を参照されたい。

## 3. 紫外線耐性突然変異体

シロイヌナズナの野生株 Columbia の乾燥種子に炭素イオンビームを 150 または 200 Gy 照射し (M1 種子)、1 試験区 200 粒程度をプランターで育成して次代 (M2) を得た。次にこの M2 種子を播種後 10 日目から UV-B を 1 日当たり 10 時間、10~13 kJ/m<sup>2</sup> の線量率で 10~20 日間照射し、生育の良いものを選抜して通常的环境下で生育させ、系統ごとに M3 種子を得た。用いた UV-B 線量は、野生株の成長が非照射のそれと比べて 30~10% 程度になる線量であり、日本の春や秋の積算線量に近い値である。次に、紫外線の連続照射によって生ずる非遺伝的な適応を避けた

め、得られた M3, M4 を通常環境下で育成するとともに、一部の種子を用いて UV-B を照射し、さらに選抜を行った。結果的に 1280 粒の M1 種子から得た 5100 個体の M2 から、一次選抜で 27 系統、さらに 2, 3 次選抜で 4 つの耐性系統を得た。図 3 (A) には野生

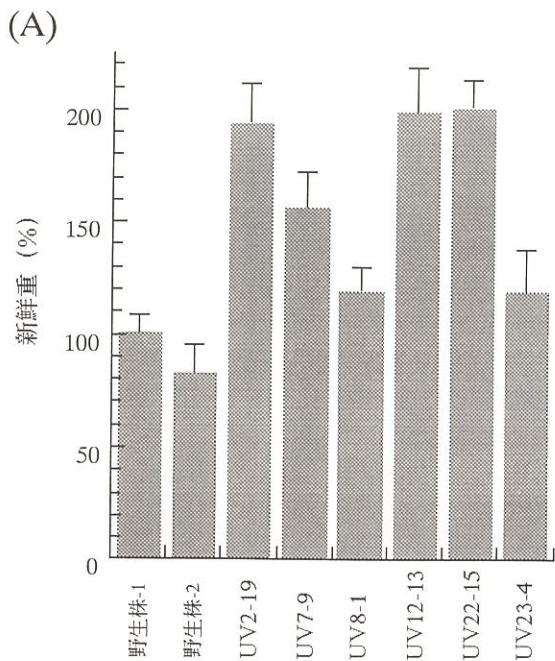


図 3 紫外線照射下における播種 1 ヶ月後の植物体の成長  
A: M4 選抜における新鮮重の比較  
B: 野生株 (上) と耐性突然変異株 UV12-13 (下)

株及び M3 で選抜に残った 6 系統の UV-B 照射による播種後 1 ヶ月目の成長量を示した。選抜した系統を試料番号で表した、UV8-1 や UV23-4 の系統は野生株と比べて大きな差は認められないが、残る 4 系統では有意に新鮮重が重く、抵抗性があると考えられた。図 3 (B) は野生株と耐性株 (UV12-13) の成長を比較したものだが、耐性株は地上部の生育だけでなく、根の成長も良好であることがわかる。

#### 4. 耐性株の特徴

得られた 4 系統はいずれも成長では紫外線耐性を示したが、その要因は明らかでない。そこでこれらの光回復・暗回復能を調べるため、次のような根の屈曲分析と呼ばれる実験を行った。種子を垂直な寒天プレート上で発芽させ、光回復では  $7 \text{ kJ/m}^2$ 、暗回復では  $3 \text{ kJ/m}^2$  の UV-B を短時間照射したのち、プレートを直角に回転させ、明所または暗所で 3 日間培養し、根の屈曲後の伸長を観測した。図 4 にその 1 例を示すが、野生株、UV2-19 とともに非照射のものでは屈曲後の根の伸長が見られるのに対して、照射した野生株では根の伸長が著しく阻害された。胚軸の屈曲についても差異が認められ、非照射では胚軸の屈曲が両者に見られるのに対して、照射した野生株ではほとんど屈曲が見られなかった。これらの結果と UV-B 吸収物

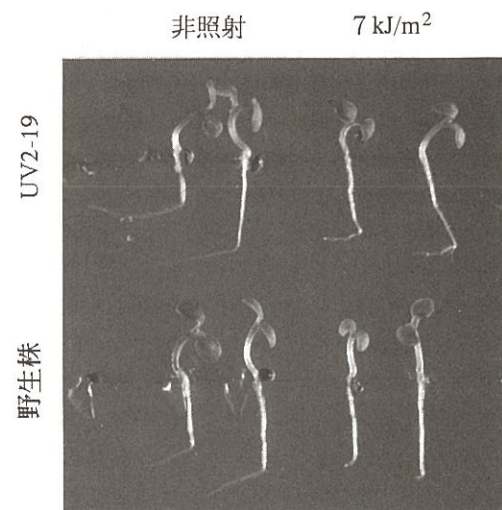


図 4 明所での根の屈曲分析

表1 紫外線耐性系統の特徴

	系統				
	野生株	UV 2-19	UV 7-9	UV 12-13	UV 22-15
明回復	+	++	+	++	+++
暗回復	+	+	++	+	+++
UV-B 吸収物質	+	+	+	+	+
耐性以外 の形質	無	無	無	毛の形態 異常	成長遅延,開 花遅延,丸葉

質量を吸光度で測定した結果を表1にまとめた。明回復能はUV 2-19, UV 12-13とUV 22-15が野生株に比べて高いことが明らかとなった。特にUV 22-15では7kJ/m<sup>2</sup>の照射を行ってもほとんど根の伸長抑制が見られない、という強い耐性を示した。暗回復ではUV 7-9とUV 22-15とが高い修復能を持つことが示唆された。一方、UV-B吸収物質はいずれの突然変異株も野生株と同程度の量を生産していることがわかった。従って、UV 22-15を除く他の系統は、明回復または暗回復のいずれかの能力が優れたことにより、紫外線耐性を獲得したと考えられる。UV 22-15はどちらの能力も非常に高いといえるが、この系統は生育が遅いという特徴もあり、何が原因でこのような強い紫外線耐性を獲得したのか、興味が持たれるところである。

## 5. 今後の進展

最近、ショウジョウバエで(6-4)型ダイマーの修復酵素であるフォトリアーゼ遺伝子の構造が解明された<sup>7)</sup>。この酵素のアミノ酸配列はシクロブタン型ダイマーのフォトリアーゼの配列と相同性が高く、またヒ

トにも類似した遺伝子が存在する可能性が示唆された。植物においても光の信号を受けとる青色光受容体と構造が似ていることがわかった。このように、今後紫外線損傷に係わる修復遺伝子の単離とその機能の解明、さらには生物種間での遺伝子分化や進化についての研究がますます進められると考えられる。今回作出した耐性突然変異株についても、どういった酵素による修復能の向上なのかを明らかにしつつ、遺伝子の単離を進めていきたい。

## 参考文献

- 1) 産業と地球環境, 産業技術会議(株)編集(1993), pp 137-144.
- 2) J. Li, et al.: The Plant Cell, 5 (1993) 171.
- 3) J. Chen, D. L. Mitchell, and A. B. Britt: The Plant Cell, 6 (1994) 1311.
- 4) A. B. Britt, et al.: Science, 261 (1993) 1571.
- 5) 永富 他, 育種学雑誌, 46 (suppl. 1) (1996) 152.
- 6) 田野: 基礎科学ノート, 3 (1996) 2.
- 7) T. Todo, et al.: Science, 272 (1996) 109.

