

## A-5 紫外線増加が生物に及ぼす影響の評価

### (3) 紫外線による遺伝子損傷蓄積量の評価方法に関する研究

独立行政法人 国立環境研究所

生物生物多様性研究プロジェクト

分子生態影響評価研究チーム 中嶋信美・玉置雅紀

生物圏環境領域

分子生態毒性研究室 佐治 光・久保明弘・青野光子

北海道東海大学工学部 竹内裕一

平成 11～13 年度合計予算額 12,235 千円

(うち、平成 13 年度予算額 3,304 千円)

[要旨] オゾン層破壊による太陽光紫外線の増加が植物の遺伝子に与える影響を評価するためのマーカー遺伝子の探索を行い、大腸菌の Cytosine deaminase (codA) 遺伝子が有効であることを確認した。この遺伝子を植物体内で発現するように改変し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia) に導入した。5-Fluorocytocine (5-FC) 感受性の形質転換体を得た。形質転換体 400 個体に 2 ヶ月 UV-B 照射したものと、照射しなかった個体から、採取した種子を採取し、5-FC 抵抗性の個体数を調べたところ、非照射区の種子から 10,000 個体あたり 1.7 個体、0.2 W/m<sup>2</sup> 照射区から 10,000 個体あたり 2 個体の 5-FC 抵抗性系統が選抜された。現在これらの個体の codA に変異が入っているか検討中である。

キュウリ子葉に紫外線 UV-C (254 nm) および UV-B (280～320 nm) を時間別 (0～24 時間)、強度別に照射し、活性酸素種の一つである過酸化水素の蓄積と酸化的 DNA 損傷産物である 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 形成の関連性について検討を行った。その結果、UV-B 及び UV-C のどちらを照射しても、キュウリ子葉に過酸化水素と 8-OHdG の蓄積が見られた。これらの蓄積は照射量に依存することが明らかとなった。以上の結果から、植物は UV-B 照射を受けると細胞内で過酸化水素が生成し、その作用で DNA が酸化されて損傷を受けるものと考えられる。

[キーワード] オゾン層、遺伝子組換え、突然変異、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine、過酸化水素

#### 1. はじめに

近年オゾン層破壊によって増加した紫外線がどのような影響を植物に与えるかについて生理・生化学的に研究されている。その結果、紫外線は遺伝子に損傷を与えるが、通常それらの遺伝子損傷は速やかに修復され、紫外線による遺伝子損傷の修復は主として光回復酵素 (DNA photolyase) によって行われていることが解明されてきた<sup>1)</sup>。また、紫外線によって活性酸素分子種が生成し、それが植物に悪影響を与え

ていることが予測されている。動物においては活性酸素によって遺伝子の本体である DNA が損傷を受け、8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)などが生成する事が示されているが、植物に紫外線を照射したときに 8-OHdG が生成するかどうかについてはほとんど研究されていない<sup>10)</sup>。一方、太陽光の紫外線を浴び続けた植物は、紫外線照射量が閾値を超えると遺伝子損傷を修復できず、突然変異として後代に伝わると予想されるが、オゾン層破壊によりどの程度突然変異が起こり、そのうちの程度が次世代に伝わるのかも未知である。オゾン層の破壊によって地表面に到達する紫外線量が増加し、植物の遺伝子の突然変異率が上昇するとすれば、生態系に深刻な影響を与える可能性がある。これを調べるためには、植物の紫外線による突然変異の蓄積量および次世代への伝達量を定量的に調べる方法を開発する必要がある。本研究は植物の遺伝子損傷修復機構及び紫外線量と突然変異の定量的関係を明らかにする目的で、遺伝子損傷が突然変異として子孫にどの程度伝わるのかをモニターするための植物を作製することを目的とした。また、紫外線照射した植物で 8-OHdG が蓄積するかどうかを調べた。

## 2. 紫外線による遺伝子損傷蓄積量の評価方法に関する研究

### (1) 研究目的

最近の気象庁の発表によるとオゾン層の破壊は今後 30 年間は進行すると予測されている。近年オゾン層破壊によって増加した紫外線がどのような影響を生物に与えるかについて生理・生化学的に研究された。その結果、多くの生物で紫外線防御のための色素を持っており、紫外線に強い生物ではその含量が紫外線照射によって増加することが明らかとなっている<sup>2)</sup>。また、紫外線は遺伝子に損傷を与えるが、通常それらの遺伝子損傷は速やかに修復される。紫外線による遺伝子損傷の修復は主として光回復酵素によって行われていることが示されている<sup>3)</sup>。しかしながら、生体内に残った遺伝子損傷は突然変異として後代に伝わることとなるが、オゾン層破壊によりどの程度突然変異が起こるのかはほとんど明らかとなっていない。本研究では紫外線に対する反応が比較的良く調べられている高等生物として、植物を材料として遺伝子損傷が突然変異として子孫にどの程度伝わるのかをモニターするため指標植物の開発を行うことを目的とした。

### (2) 研究方法

突然変異の検出感度はゲノムの大きさにしめるモニター遺伝子の大きさに比例すると考えられるので、モニター遺伝子をゲノムサイズのできるだけ小さい植物に多コピー導入する必要がある。以上の観点から植物としてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia)、モニター遺伝子として、大腸菌のシトシンデアミナーゼ(*codA*)を用いて指標植物の作製を行った。*codA* はシトシンをウラシルへ変換する酵素で、5-fluorocytosine(5-FC)が存在すると、これを 5-fluorouracil(5-FU)に変える。5-FU は RNA 合成を阻害するため、*codA* の活性が高い生物は 5-FC 存在下では生育

が阻害される。従って、指標植物のゲノム上の *codA* に変異がおこり *codA* の活性が失われた種子のみが 5-FC を含む培地で生育可能となる。また、紫外線によって突然変異を誘発した直後に植物体から DNA を抽出し、*codA* 活性を失った大腸菌にその DNA を導入後、5-FC を含む培地で選抜することで、紫外線照射直後の個体に生じる変異を定量的に測定することが可能と考えられる。

カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に 大腸菌由来の *codA* を配置し、カナマイシン耐性プラスミドである pCRII に導入した(pCOD)。pCOD を制限酵素 HindIII で切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ植物遺伝子導入用ベクター pBI-Hm3 に導入した(pCODHm3)。pCODHm3 をアグロバクテリウムを介して *In planta* 法でシロイヌナズナに導入した。形質転換体の選抜はカナマイシンを含む MS 培地で行った。5-FC 感受性試験は 50~250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 5-FC およびカナマイシンを含む MS 培地で行った。

*codA* がモニター遺伝子として有効であるかどうかを検討するため、pCOD の *codA* の一部を欠失させたプラスミドを作製した(pCOD $\Delta$ BanIII)。pCOD $\Delta$ BanIII を *codA* が欠損している大腸菌変異株 TKL-10 に導入し、250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  の 5-FC を含む培地上でコロニー形成を観察した。次に TKL-10 に pCOD を導入した菌を作製し、これに殺菌灯の紫外線を照射後、250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  の 5-FC を含む培地で選抜し 5-FC 耐性のコロニーを数えた。

*codA* を導入した組み換え体の種子をロックウールに約 800 粒播種し春化处理したのち、400 粒ずつ、2 つに分け紫外線照射区、対照区とした。対照区には 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$  の白色光を 1 日 14 時間照射しながら、温度 23  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 70 % で生育させた。紫外線照射区は対照区と同じ条件で 0.7  $\text{W}/\text{m}^2$  あるいは 0.2  $\text{W}/\text{m}^2$  の UV-B (Toshiba FL-20 に U-290 ガラスフィルターで UV-C を除去した光) を明期に連続照射した。それぞれの処理は種子が形成されるまで 2 ヶ月間おこなった。また、葉での突然変異を検出するためにそれぞれの 1 週間 UV-B 照射した植物から DNA を抽出し、*codA* を増幅するプライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を pBI221 とライゲーションした。その後 *codA* 変異株である、大腸菌 TKL-10 へトランスフォーメーションしてアンピシリン耐性かつ 5-FC 耐性のコロニーを選抜した。

### (3) 結果・考察

#### ① 大腸菌を使ったモデル実験

pCOD と pCOD $\Delta$ BanIII をそれぞれ、TKL-10 に形質転換し、それぞれをカナマイシンのみの培地及び 5-FC とカナマイシンを含む培地で選抜し、出現したコロニーの数と形質転換効率を検討した。その結果、pCOD $\Delta$ BanIII を形質転換した場合にはどちらの培地でもコロニーが出現したが、pCOD を形質転換した場合 5-FC を含む培地ではコロニーの形成が見られないか、生育が阻害されていた。このときの形質転換効率は  $5\times 10^5\cdot\mu\text{g}^{-1}$  であった。次に pCOD を持つ TKL-10 をプレート 1 枚あたり  $6.5\times 10^5$  cells になるように 5-FC とカナマイシンを含む培地に塗布し、一定量の

紫外線を照射し、照射量に対して 5-FC 耐性のコロニーがどの程度形成されるかを検討した。その結果、0~30 J·m<sup>-2</sup>まではほぼ照射量に比例して 5-FC 耐性コロニーの数が増加し、それ以上の照射量では減少した。

## ② codA の植物への導入

100 個体のシロイヌナズナに In planta 法により pCODHm3 を導入し、ハイグロマイシンによる選抜を行ったところ、1 個体の形質転換体を得られた。この形質転換体の葉から DNA を抽出してサザンハイブリダイゼーション法で codA が導入されていることを確認した。導入遺伝子のコピー数を調べるため、上記形質転換体から得られた種子 60 粒をカナマイシンの培地で発芽させた。その結果、カナマイシン耐性のものが 44 個体、感受性ものが 16 個体得られた。この分離比はほぼ 3:1 であることから、得られた形質転換体に codA は 1 コピーだけ導入されていると結論した。さらに自家受粉により codA をホモに持つ形質転換体(F2)を作製した。F2 の種子を、カナマイシンを含む MS 培地に播種したところ、発芽した全ての個体がカナマイシン耐性を有していた。次に、この種子の 5-FC 感受性を調べた。カナマイシンを含む MS 培地に 5-FC の濃度を 50、100、250 µg/ml に変えて T2 世代の種子を播種し 5-FC 感受性と耐性の個体数を調べた。その結果 100 µg/ml で選抜すると 5-FC 耐性と感受性の比が 3:1 になったことから、突然変異の選抜には 100 µg/ml が良いと考えられた。次に PCR COD1 を 2 世代育て、種子を大量に採取した。PCR COD1 の植物体 400 個体に紫外線照射を行った。2 ヶ月照射した時点で種子を回収したところ、非照射区では約 30,000 粒、0.7 W/m<sup>2</sup> の場合約 5,000 粒、0.2 W/m<sup>2</sup> の場合約 10,000 粒の種子を得られた。これらの種子を 5-FC を含む選抜培地で選抜した。その結果、非照射区の種子から 5 個体、0.7 W/m<sup>2</sup> 照射区から 0 個体、0.2 W/m<sup>2</sup> 照射区から 2 個体の 5-FC 抵抗性系統が選抜された。現在これらの個体の codA に変異が入っているか検討中である。

## ③ 葉に生じた変異の検出

PCR COD1 の植物体から DNA を抽出して、PCR で増幅し pBI221 とライゲーション後大腸菌変異株 TKL-10 に導入し、アンピシリン含む培地上でコロニー形成を観察した。その結果、アンピシリン耐性コロニーは 1 µg あたり 2,000 個しか出現しなかった。次に 同じ DNA をよく形質転換に利用されている JM109 に導入したところ、アンピシリン耐性コロニーは 1 µg あたり 200,000 個出現した。これらのコロニーに codA が導入されているかどうか PCR で確認したところ、調べた 16 個のコロニーすべてに codA の存在が確認できた。以上の結果、TKL-10 への形質転換効率を上げる努力をすれば、実験系が確率できる可能性が高い。

## 3. 紫外線照射による過酸化水素の蓄積と酸化的 DNA 損傷の形成

### (1) 研究目的

近年、hydroxyl radical( $\text{HO}\cdot$ )、superoxide anion( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、singlet oxygen( $^1\text{O}_2$ )、hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ )のような活性酸素種 [reactive oxygen species, ROS] の生体内における役割が注目されている。ROSは通常の細胞代謝の間細胞内に存在するだけでなく、さまざまな環境ストレスによって細胞内に生成し、植物の環境ストレスに対するシグナル伝達に普遍的に関与すると考えられている<sup>3)</sup>。一方、細胞内における過剰なROSの蓄積は脂質の過酸化による膜の機能障害を誘発し、また細胞内DNA塩基に酸化損傷を与え、突然変異を誘導するということが示唆されている。

植物に対する紫外線照射も酸化ストレスを誘導するという間接的な証拠が報告されている。紫外線照射は、脂質過酸化物の濃度を上昇させ<sup>6), 14), 22)</sup>、活性酸素消去系酵素のmRNAレベルおよび活性を上昇させる<sup>17), 19), 21), 23), 26)</sup>。しかし、紫外線を照射された植物体での活性酸素量の変動を測定した研究例はほとんどない<sup>6)</sup>。紫外線による直接的なDNA損傷産物の代表的なものにcyclobutane pyrimidine dimerやpyrimidine-pyrimidone-6-4-photoproductが<sup>16)</sup>、間接的なDNA損傷としては、酸化的DNA損傷があげられる。8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)は、DNA塩基の一種であるdeoxyguanosine(dG)の8位の炭素部分が活性酸素の一種であるhydroxyl radical( $\text{HO}\cdot$ )の攻撃を受け、酸化を受けたものと考えられている<sup>13)</sup>。この8-OHdGが細胞内DNAに存在することにより、複製の際にDNA塩基の読み間違いが生じ、突然変異誘発の原因となると考えられている<sup>20), 27)</sup>。8-OHdGに関する研究は動物組織において数多く存在し、特に医学の分野での研究が盛んである。大気汚染<sup>5)</sup>などにより細胞内にROSが発生し、そのROSによりDNA塩基の酸化(8-OHdGなど)が生じ、突然変異が誘発され、皮膚ガンを発症するということが示唆されている<sup>11), 4), 7), 9), 15)</sup>。動物においてはこのような報告が多数存在するが、植物では8-OHdGについての研究例はほとんどなく、オゾンにさらした植物における8-OHdG形成が報告されているのみである<sup>10)</sup>。8-OHdGが植物組織細胞内に存在することによりどのような影響を遺伝子に及ぼすかはまだ不明であり、またどのような除去・修復機構が植物細胞に存在するかということも明らかにされていない。本研究では、キュウリ子葉に紫外線UV-C(254 nm)およびUV-B(280~320 nm)を時間別(0~24時間)、強度別に照射し、ROSの一種である過酸化水素の蓄積と酸化的DNA損傷産物である8-OHdG形成の関連性について検討を行った。

## (2) 研究方法

HPLC分析に用いた標準物質、4種類のデオキシリボヌクレオシドおよび8-OHdGはSigma Chemical Co.および和光純薬工業(株)から購入した。植物材料は25℃の流水中で一晩吸水させたキュウリ種子をポット(f7 cm×6 cm)に蒔き、25℃に設定された温室において、子葉が約1.5 cmになるまで育成し、UV照射の材料として用いた。

キュウリ芽生えへのUV照射は25℃に設定された恒温室で行なった。UV-Cの光源としては、殺菌灯(GL15, Toshiba)を、UV-Bの光源としては健康線灯(TL 20 W/12

RS, Philips)をそれぞれ用いた。UVの強度は、UVメータ(DRC-100X, Spectronics Co.)を用いて測定した。UV照射後、子葉を切り取り、過酸化水素定量と8-OHdG分析まで-80℃で冷凍保存した。

過酸化水素の抽出はPatterson et al.(1984)の方法<sup>18)</sup>に準じて行なった。キュウリ子葉3枚を液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いてよくすりつぶし、活性炭0.1g、5%(w/v) TCAを0.7ml加え2mlプラスチック遠心管に移し、15,000 rpm、4℃で15分間遠心分離を行った。上清をメンブレンフィルター( $f_0.22 \mu\text{m}$ )でろ過し、 $\text{NH}_4\text{OH}$ でpHを7.0に中和した後、水で容積を50mlに調整した。試料を2分し、一方(500  $\mu\text{l}$ )に、catalase 溶液(50 unit/ml) 5  $\mu\text{l}$ を加え、30℃で10分間放置した。もう一方の試料(500  $\mu\text{l}$ )には、100℃で20分間加熱することにより不活性化したcatalase 溶液を加えた。両溶液の過酸化水素濃度を測定し、その差から子葉中の過酸化水素含有量を求めた。

過酸化水素の定量はルミノメータ(Lumat LB 9507, EG&G Berthold)を用いて、Warm and Laties(1982)の方法<sup>29)</sup>で行なった。サンプル50  $\mu\text{l}$ に0.2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ (pH 9.5)に溶解した0.5 M luminol 溶液50  $\mu\text{l}$ を加え、1.2秒後に0.2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ (pH 9.5)に溶解した0.5 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  溶液100  $\mu\text{l}$ を加えた。サンプルへの試薬の添加は自動的に行なった。0.5 M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を加えた後から測定開始までの時間は1秒間とし、測定時間は5秒間とした。

8-OHdG分析のためのキュウリ子葉からのDNA抽出は、Doyle and Doyle(1990)<sup>9)</sup>による方法をHada et al.(1996)<sup>12)</sup>が改変したCTAB法を用いて行った。空気中の酸素によるサンプルの酸化を避けるために、窒素置換した真空グローブボックス中で操作の大半を行った。キュウリ子葉1枚を1ml CTAB 溶液〔2% CTAB (w/v), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTAを含む100 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.0〕中で乳鉢、乳棒を用いてよくすりつぶし、2mlのプラスチック遠心管に移した。0.2ml CTAB 溶液で乳鉢、乳棒を洗い、その洗液も同じ遠心管へ移し、65℃で30分間放置した。室温になるまで冷ました後、15,000 rpm、4℃で10分間遠心分離を行った。上清1mlを別の2ml遠心管に移し、1mlのchloroform: isoamylalcohol (24:1, v/v)を加え懸濁した。15,000 rpm、4℃で5分間の遠心分離を行い、上清0.9mlを1.5mlプラスチック遠心管へ移し、冷却したisopropanol 0.6mlを加え懸濁した。-80℃で10分間放置した後、15,000 rpm、4℃で10分間(以下同様)遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿を0.8ml ethanolで洗浄した後、真空デシケーター中で乾固した。

得られたDNAサンプルを0.2ml TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解し、10  $\mu\text{l}$  RNase(10 mg/ml, Nippon Gene)を加え、37℃で30分間放置し、RNAを分解・除去した。溶液に0.12ml 20%(w/v)polyethyleneglycol 6,000 溶液を加え懸濁し、遠心分離を行った。上清を除去し、沈殿に0.5ml ethanolを加え懸濁し、-80℃で10分間放置した後、遠心分離を行った。上清を除去した後、得られたDNAを上記の方法と同様に乾固し、0.2ml TEに溶解した。子葉3枚分のDNA溶液を1本の2mlプラスチック遠心管へ移し、60  $\mu\text{l}$  3 M sodium acetate と体積の2倍量の冷却したethanolを加え軽く混合し、-20℃で一晩放置した。その後、12,000 rpm、

4 °Cで30分間遠心分離を行い、沈殿を70% ethanolで洗浄し、8-OHdG分析用のDNAサンプルとした。

得られたDNAは前述の方法で乾固し、10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)50 µlに溶解した。0.5 M sodium acetateに溶解した6 unitのnuclease P1 [10 µl, 和光純薬工業(株)]を添加し、37 °Cで30分間放置した後、7.5 µl alkaline phosphatase (1 unit/µl, Nippon Gene)と0.4 M Tris-HCl緩衝液(pH7.5)72.5 µlを添加し、さらに37 °Cで1時間放置した<sup>25)</sup>。酵素処理後のDNA加水分解物はメンブレンフィルター(f0.22 µm)でろ過し、速やかに8-OHdG分析を行った。

8-OHdGとdGの分析は山口と葛西(1994)の方法<sup>26)</sup>に準じ、電気化学検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ED)システムを用いて行った。分離カラムとして、Ultrasphere ODSガードカラム(4.6 mm×4.5 cm, Beckman)を接続したUltrasphere ODS分離カラム(4.6 mm×25 cm, Beckman)を用いた。HPLCにインジェクトするサンプル量は20 µlとした。溶出は7% methanolを含む10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液で行い、流速は1.0 ml/minとした。dGの定量はUV検出器 [875-UV, 日本分光工業(株)]を用いて行った。8-OHdGの定量は分析セル(Model 5011, esa)を接続した電気化学検出器(Coulochem II, esa Inc.)を用いて酸化還元モードで行った。DNA中の8-OHdG量は10<sup>5</sup>個dGあたりの8-OHdGの量として(8-OHdG/dG×10<sup>5</sup>)として表した。

### (3) 結果と考察

#### ① 8-OHdGと4種類のデオキシリボヌクレオシドのHPLCによる分離

8-OHdGと4種類のデオキシリボヌクレオシドの分析はUV検出器 [875-UV, Intelligent UV/VIS Detector, 日本分光工業株(株)]と電気化学検出器(Coulchem II, esa Inc.)によって行った。2.5×10<sup>-2</sup> mM濃度の4種類のデオキシリボヌクレオシド標準サンプル(混合液)20 µlをHPLCにインジェクトし、その分離を検討した。UV検出器の測定波長は254 nmとした。4種類のデオキシリボヌクレオシドは、dC、dG、dT、dAの順で溶出し、dGのretention timeは10分前後であった。前述の測定条件では、4種類のデオキシリボヌクレオシドは電気化学検出器においては検出できなかった。20 pmol/ml濃度の8-OHdG標準溶液20 µlをHPLCにインジェクトし、同様に分析を行なった。UV検出器における分析では8-OHdGのピークは得られなかった。電気化学検出器における分析においては、15分前後に8-OHdGのピークが得られ、UV検出器によるデオキシリボヌクレオシドの分析のクロマトグラフと比較して、そのretention timeはdTの直後であることが明らかになった。

#### ② 8-OHdG標準曲線

0~100 pmol/ml濃度の8-OHdG標準溶液を用いて、電気化学検出器の検出感度の検討と8-OHdG標準曲線の作成を行った。8-OHdGの分析において、広範囲の濃度にわたる直線性が得られた。さらに10分の1の濃度である10 pmol/mlまでの範

圃においても検討を行った。この範囲においても直線性が得られ、およそ 20 fmol までの分析が可能であることが分かった。このことにより、8-OHdG の電気化学検出器による分析感度は非常に高いものと考えられる。

### ③ UV-C を照射したキュウリ子葉における過酸化水素の蓄積と 8-OHdG 形成

25 °C に設定した恒温室で、キュウリ芽生えに UV-C を  $2.5 \text{ W m}^{-2}$  の強度で 0~24 時間連続照射し、子葉中の過酸化水素量の変化を調べた。過酸化水素量は子葉一枚あたりの量として  $\mu\text{mol/cotyledon}$  と表現した。過酸化水素量は時間とともに増加し、24 時間でほぼ 1.7 倍になった(図 1)。UV-C(254 nm)を照射した芽生えの子葉から DNA を抽出し、8-OHdG の分析を行なった。2.5  $\text{W m}^{-2}$  の強度の UV-C を照射した子葉の DNA では、図 2 に示すように、8-OHdG のピークが検出され、植物組織においても UV-C 照射による 8-OHdG の形成が確認された。UV-C 照射による 8-OHdG 形成のタイムコースを図 3 に示す。照射 6 時間目までは 8-OHdG 量は顕著な変化を示さなかったが、6~12 時間目において 8-OHdG 量は大きく増加し、24 時間目までにさらに増加した。照射 24 時間後の 8-OHdG 形成量は照射 0 時間と比較すると約 4 倍に増加した。

次に、殺菌灯と芽生えの距離を変えることにより、4 段階(0、0.7、1.7、2.7  $\text{W m}^{-2}$ )UV-C 強度で 12 時間の連続照射を行い、子葉中の過酸化水素量と 8-OHdG 形成量を調べた。過酸化水素量は照射する UV-C の強度が大きいほど増加し、2.7  $\text{W m}^{-2}$  の強度で照射した子葉では、0  $\text{W m}^{-2}$  のものと比較すると、2 倍弱に増加した(図 4)。8-OHdG の形成量も UV-C の強度が大きいほど増加し、2.5  $\text{W m}^{-2}$  の強度で照射した子葉では、0  $\text{W m}^{-2}$  のものと比較すると、約 3 倍に増加し(図 5)、蓄積した過酸化水素量と高い相関が見られた。

### ④ UV-B を照射したキュウリ子葉における過酸化水素の蓄積と 8-OHdG 形成

25 °C に設定した恒温室で、キュウリ芽生えに UV-B を  $4.0 \text{ W m}^{-2}$  の強度で 0~24 時間連続照射し、子葉中の過酸化水素の量を調べた。子葉 1 枚あたりの過酸化水素量は照射 6 時間目までは増加が観察されなかったが、6~12 時間の間に約 1.2 倍まで増加し、その後 24 時間目までほぼ一定の値を示した(図 6)。さらに、キュウリ子葉に  $4.5 \text{ W m}^{-2}$  強度の UV-B を 0~24 時間連続照射を行い、DNA を抽出し 8-OHdG の分析を行った。UV-B を照射のタイムコースを図 7 に示す。UV-B 照射 6 時間目までは 8-OHdG 量に大きな変化は見られなかったが、その後直線的に増加し、24 時間の照射の後には、8-OHdG 量は照射開始時の約 9 倍にまで増加した。次に、光源である健康線灯と芽生えの距離を変えることにより、4 段階の(0、1.5、2.5、4.5  $\text{W m}^{-2}$ )UV-B 強度で 12 時間の連続照射を行い、子葉中の過酸化水素量と 8-OHdG 量を調べた。過酸化水素量は照射する UV-B の強度が大きいほど増加する傾向が見られ、4.5  $\text{W m}^{-2}$  の強度で照射した子葉では、0  $\text{W m}^{-2}$  のものと比較すると、約 35 % 増加した(図 8)。8-OHdG 量は UV-B 強度に依存して増加し、0  $\text{W m}^{-2}$  のものと比較すると 4.5  $\text{W m}^{-2}$



の強度で照射したものでは約3倍の8-OHdG量が確認された(図9)。

8-OHdGは、活性酸素の一種であるhydroxyl radical(HO $\cdot$ )によりdGの8位の炭素部分が酸化を受け、形成されたものと考えられている。過酸化水素以外の活性酸素は、hydroxyl radicalも含め生体内での寿命は極めて短く、組織から抽出し測定することは非常に困難である。そこで本研究では、活性酸素発生の指標として、紫外線を照射したキュウリ子葉から過酸化水素を抽出し、定量した。その結果、UV-CおよびUV-B照射により子葉中の過酸化水素量が増加することを見出した。また、DNA水溶液とキュウリ子葉において、UV-CおよびUV-B照射によりDNAの酸化的損傷の指標である8-OHdGが形成されることが明らかになった。生体内ではさまざまな活性酸素消去系が働いていると考えられるが、過酸化水素量が増加する条件下では、DNA塩基の酸化が起こることが立証された。

UV-Cは波長254 nmの単波長光なのに対し、健康線灯を光源とするUV-Bは波長280 nm以上の領域に幅広いスペクトルを持つ。そのため両者の単純な比較はできないが、過酸化水素量に対する影響はUV-Bに比べUV-Cの方が大きく、8-OHdG形成量に対する影響はUV-Bの方が大きい傾向が認められた。今後、単波長紫外線を用いて、過酸化水素量および8-OHdG量に対する紫外線照射の影響の波長依存性について詳細に検討する必要がある。また今後、形成された酸化的損傷がDNAの複製や転写にどのような影響を与えるのか、また損傷がどのような機構で除去・修復されるのか明らかにしていくことが重要と思われる。

#### 4. 本研究により得られた成果

本研究は紫外線による遺伝子の突然変異を検出するための植物を育種する目的で、大腸菌のcodAをマーカーとしてシロイヌナズナに導入した。その結果、5-FCを含む培地での生育状態から、マーカー遺伝子のcodAに変異が入ったと思われる個体を選抜できるようになった。しかし、変異の頻度が低いために、統計的な解析ができるだけの変異体を選抜できなかった。そのためには、葉の生育ではなく、根の生育などを指標とする、より簡便な選抜法を検討する必要がある。また、新しいDNA損傷物質である8-OHdGがUV-B照射によって植物体内に生成することを証明した。紫外線照射によって8-OHdGが生成することを示したのは本研究がはじめてである。

#### 5. 引用文献

- 1) Britt et al. 1997. Genetic analysis of DNA repair in plants. In *Plants and UV-B* edited by Lumsden, P. Cambridge University Press UK, pp. 77-94.
- 2) Bornman, J.F., Reuber, S., Cen, Y-P. and Weissenbock 1997. Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In *Plants and UV-B* edited by Lumsden, P. Cambridge University Press UK, pp. 157-170.

- 3) A.-H.-Mackerness, S. and Jordan, B.R. 1999. Changes in gene expression in response to ultraviolet-B induced stress. In M. Pessarakli, ed., *Handbook of Plant and Crop Stress*, Marcel Dekker, New York, pp. 749-768.
- 4) Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B. and Kulesz-Martin, M.F. 1992. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Carcinogenesis* 13: 2003-2007.
- 5) Calderon-Garciduenas, L., Wen-Wang, L., Zhang, Y., Rodriguez-Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderon, A. and Santella, R.M. 1999. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environ. Health Perspect.* 107: 469-474.
- 6) Dai, Q., Yan, B., Huang, S., Liu, X., Peng, S., Miranda, M.L.L., Chavez, A.Q., Vergara, B.S. and Olszyk, D.M. 1997. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 101: 301-308.
- 7) Davies, R.E. and Forbes, P.D. 1986. Effect of UV radiation on survival of non-haired mice. *Photochem. Photobiol.* 43: 267-274.
- 8) Doyle, J.F. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- 9) Fiala, E.S., Conaway, C.C. and Mathis, J.E. 1989. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with hepatocarcinogen 2-nitropropane. *Cancer Res.* 49: 5518-5522.
- 10) Floyd, R.A., West, M.S., Hoggest, W.E. and Tingey, D.T. 1989. Increased 8-hydroxyguanine content of chloroplast DNA from ozone-treated plants. *Plant Physiol.* 91: 644-647.
- 11) Floyd, R.A. 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4: 2587-2597.
- 12) Hada, M., Tsurumi, S., Suzuki, M., Wellmann, E. and Hashimoto, T. 1996. Involvement and non-involvement of pyrimidine dimmer formation in UV-B

- effects on *Sorghum bicolor* Moench seedlings. *J. Plant Physiol.* 148: 92-99.
- 13) Kasai, H. and Nishimura, S. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12: 2137-2145.
  - 14) Kramer, G.F., Norman, H.A., Krizek, D.T. and Mirecki, R.M. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30: 2101-2108.
  - 15) Kuchino, T., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. and Nishimura, S. 1987. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at the adjacent sites. *Nature* 327: 77-79.
  - 16) Mitchell, D.L. 1988. The relative cytotoxicity of (6-4)photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem. Photobiol.* 48: 51-57.
  - 17) Murali, N.S., Teramura, A.H. and Randall, S.K. 1988. Response differences between two soybean cultivars with contrasting UV-B radiation sensitivities. *Photochem. Photobiol.* 48: 653-657.
  - 18) Patterson, B.D., MacRae, E.A. and Ferguson, I.B. 1984. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium(IV). *Anal. Biochem.* 139: 487-492.
  - 19) Rao, M.V., Paliyath, G., Osmrod, D.P. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
  - 20) Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged DNA base 8-oxodG. *Nature* 349: 432-434.
  - 21) Strid, A. 1993. Alteration in expression of defense genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiol.* 34: 949-953.

- 22) Takeuchi, Y., Fukumoto, R., Kasahara, H., Sakaki, T. and Kitao, M. 1995. Peroxidation of lipids and growth inhibition induced by UV-B irradiation. *Plant Cell Rep.* 14: 566-570.
- 23) Takeuchi, Y., Kubo, H., Kasahara, H., and Sakaki, T. 1996. Adaptive alterations in the activities of scavengers of active oxygen in cucumber cotyledons irradiated with UV-B. *J. Plant Physiol.* 147: 589-592.
- 24) Warm, E. and Laties, G.G. 1982. Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* 21: 827-31.
- 25) Wei, H., Cai, Q. and Rahn, R.O. 1996. Inhibition of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genestein. *Carcinogenesis* 17 :73-77.
- 26) Willekens, H., Camp, W.V., Montagu, M.V., Inze, D., Langebartels, C. and Sandermann, Jr.H. 1994. Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiol.* 106: 1007-1014.
- 27) Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigman, J. M. 1990. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effect of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29: 7024-7032.
- 28) 山口 雷蔵・葛西 宏 1994. 8-OHdG の測定「活性酸素実験プロトコール」秀潤社 pp.213-228.

[国際共同研究等の状況]

なし

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表

- ① T. Fujibe, K. Watanabe, N. Nakajima, Y. Ohashi, I. Mitsuhashi, K.T. Yamamoto and Y. Takeuchi: *J. Plant. Res.* 113,1112, 387-394 (2000) Accumulation of athogenesis-related proteins in tobacco leaves irradiated with UV-B.
- ② Y. Takeuchi, Y. Iida, N. Nakajima and O. Nikaido: *Environ. Sci.* 13, 3, 351-355

(2000) Formation of DNA lesions in cucumber cotyledons exposed to solar UV radiation.

- ③ M. Hada, Y. Iida and Y. Takeuchi: *Plant Cell Physiol*, 41, 5, 644-648 (2000)  
Action spectra of DNA photolyases for photorepair of pyrimidine dimers in Sorghum and cucumber.
- ④ M. Hada, K. Hino and Y. Takeuchi: *Plant Cell Physiol*. 42, 784-787 (2001)  
Development of UV defense mechanisms during growth of spinach seedlings.
- ⑤ S. Takahashi, N. Nakajima, H. Saji and N. Kondo: *Plant Cell Physiol*. 43: 342-349 (2002) Diurnal Change of cucumber CPD photolyase gene (CsPHR) expression and its physiological roles in growth under UV-B irradiation.
- ⑥ T. Matsuyama, M. Tamaoki, N. Nakajima, N. Aono, A. Kubo, S. Moriya, T. Ichihara, O. Suzuki and H. Saji (2002) : *Environ. Pollut.* 117:191-194. cDNA microarray assessment for ozone-stressed *Arabidopsis thaliana*.
- ⑦ N. Nakajima, S. Takahashi, M. Tamaoki, A. Kubo, M. Aono and H. Saji: *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.* 36: 301-307 (2001): Effects of UV-B radiation on seedlings of two *Solidago virgaurea* populations from the Mt. Hakusan area of Japan.

(2) 口頭発表

- ① 秦 恵, 竹内裕一 : 第 46 回日本植物学会北海道支部大会(1999)「植物の DNA 損傷光修復酵素」
- ② 唐沢宏之, 澤海秀保, 竹内裕一 : 日本植物学会第 63 回大会(1999)「UV-B を照射したキュウリ子葉における Peroxidase の誘導」
- ③ 奈良晃, 竹内裕一 : 日本植物学会第 63 回大会(1999)「UV-B 照射したタバコ葉における傷害の発現とエチレン生成の誘導」
- ④ 大木崇, 網野真一, 竹内裕一 : 日本植物学会第 63 回大会(1999)「タバコ BY-2 培養細胞の細胞周期に対する紫外線の影響」
- ⑤ 秦 恵, 芸林圭, 栗原邦子, 竹内裕一 : 第 6 回日本光生物学協会講演会(1999)「キュウリの DNA 損傷光修復酵素」
- ⑥ 竹内裕一 : 基礎生物学研究所大型スペクトログラフ研究会(2000)「キュウリ子葉の DNA 光修復酵素の作用スペクトルと光誘導」
- ⑦ 秦 恵, 芸林圭, 栗原邦子, 竹内裕一 : 日本植物生理学会 2000 年度年会(2000)「キュウリ子葉における DNA 光修復酵素の性質と光誘導」
- ⑧ Fujibe, T., Takeuchi, Y. and Yamamoto, K.T. : COE-IGE International Symposium (2000) "Effects of sucrose in growth medium on UV-B-induced damages in *Arabidopsis* leaves"
- ⑨ Hada, M. and Takeuchi, Y. : COE-IGE International Symposium(2000)"DNA photolyases in higher plants"

- ⑩ 藤部貴宏, 竹内裕一, 山本興太朗: 日本植物生理学会 2001 年度年会(2001)「シロイヌナズナの UV-B 照射による葉の損傷に対する培地に添加したショ糖の影響」
- ⑪ 高橋真哉, 中嶋信美, 玉置雅紀, 近藤矩朗: 日本植物生理学会 2000 年度年会(2000)「キュウリからの光回復酵素 cDNA クロンの単離と発現解析」
- ⑫ Takahashi, S., Nakajima, N. and Kondo, N.: COE-IGE International Symposium(2000) "Expression and physiological significance of photolyase in cucumber plant"
- ⑬ 高橋真哉, 中嶋信美, 近藤矩朗, 渡辺正勝: 日本植物生理学会 2001 年度年会(2001)「キュウリ CPD 光回復酵素(CsPHR)の光による発現誘導」
- ⑭ 渡邊かおり, 竹内裕一: 日本植物学会第 64 回大会(2001)「紫外線による酸化的 DNA 損傷の形成」
- ⑮ 五百城幹英, 高橋真哉, 中嶋信美, 近藤矩朗: 日本植物学会第 64 回大会(2001)「キュウリ光回復酵素遺伝子のクローニングとその解析」

(3) 出願特許  
なし

(4) 受賞等  
なし

(5) 一般への公表・報道等  
なし

(6) その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

オゾン層減少による紫外線の増加が生態系にどのようなインパクトを与えるのかを評価することは、この分野ではオゾン層の観測と並んで環境省のやるべき重要な研究である。なぜならば、万が一オゾン層が現在提示されているモデルどおりに回復しなかった場合には、環境省は、その影響についての公式見解を明らかにする必要に迫られるからである。本研究も含めて、生物への影響や生態系への影響をある程度正確に評価するためには、時間をかけて地道な調査研究をする必要がある。今後は関係学会やインターネットなどを通じて、影響評価研究の重要性をアピールして行きたい。

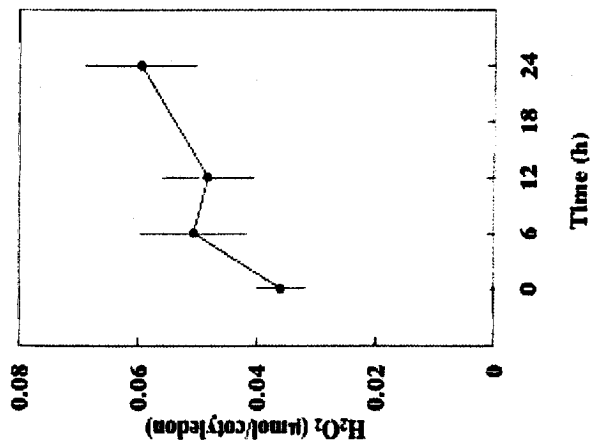


図1 UV-C(254 nm)を照射したキユウリ子葉における過酸化水素蓄積のタイムコース。25 °Cの恒温室中で殺菌灯を光源に用い、キユウリ芽生えに2.5 W m<sup>-2</sup>のUV-Cを図中の時間連続照射した。図中の値は、4サンプルの平均±標準偏差

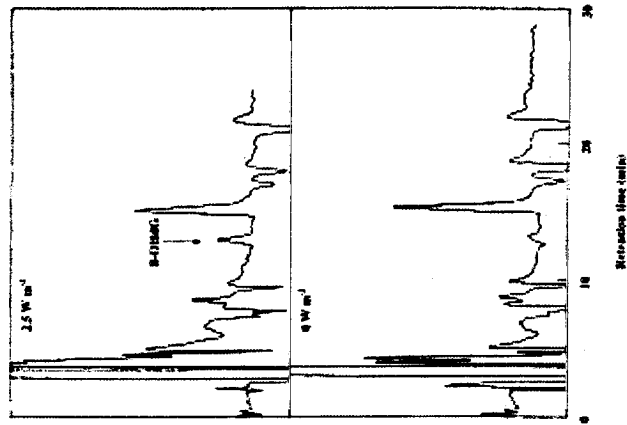


図2 UV-C(254 nm)を照射したキユウリ子葉から抽出したDNAの加水分解物のHPLC-EDクロマトグラム25 °Cの恒温室中で殺菌灯を光源に用い、0(下)又は2.5(上) Wm<sup>-2</sup>の強度のUV-Cを24時間キユウリ芽生えに照射した。8-OHdG ピークを↓で示した。

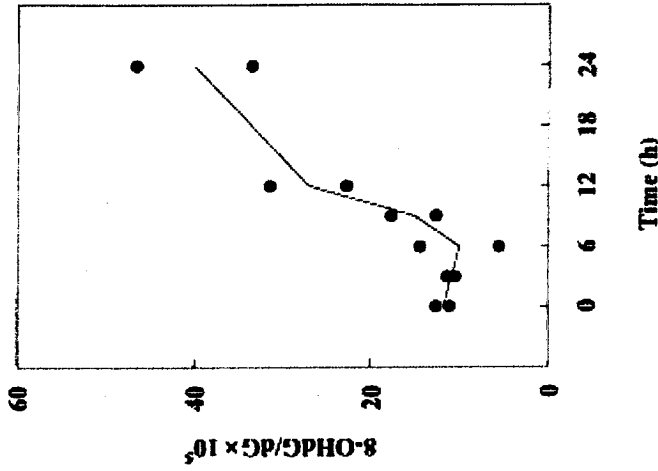


図3 UV-C(254 nm)を照射したキユウリ子葉における8-OHdG形成のタイムコース。25 °Cの恒温室中で殺菌等を光源に用い、キユウリ芽生えに2.5 Wm<sup>-2</sup>のUV-Cを図中の時間連続照射した。

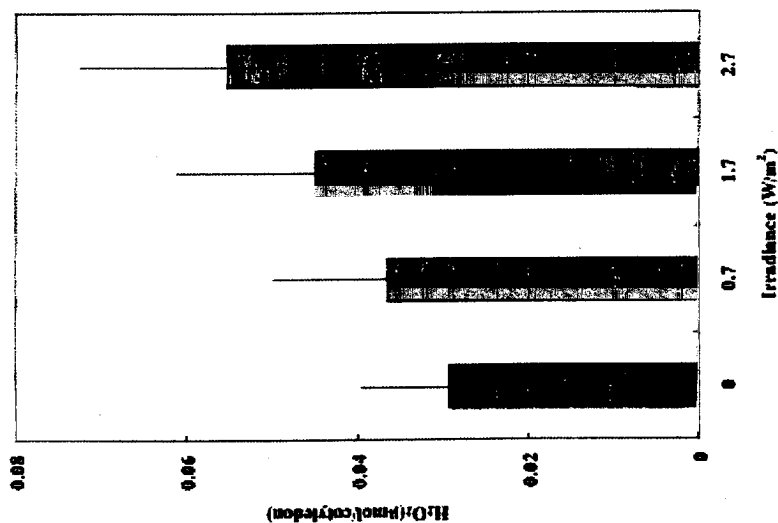


図4 種類の強度のUV-C(254 nm)を照射したキュウリ子葉における過酸化水素の蓄積 25 °Cの恒温室中で殺菌灯を光源に用い、キュウリ芽生えに図中の強度のUV-Cを12時間連続照射した。図中の値は4サンプルの平均±標準偏差

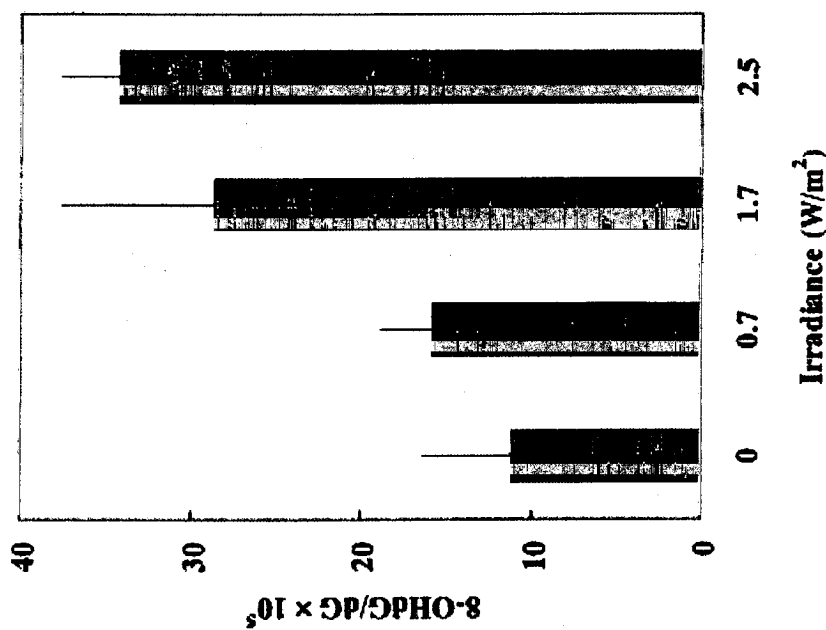


図5 種類の強度のUV-C(254 nm)を照射したキュウリ子葉における8-OHdG形成。25 °Cの恒温室中で殺菌灯を光源に用い、キュウリ芽生えに図中の強度のUV-Cを12時間連続照射した。図中の値は3サンプルの平均±標準偏差

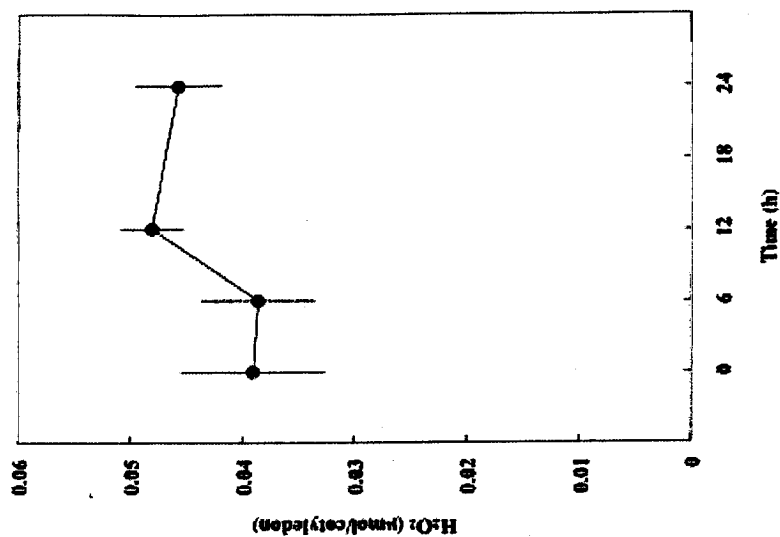


図6 UV-Bを照射したキュウリ子葉における過酸化水素蓄積のタイムコース。25 °Cの恒温室中で殺菌等を光源に用い、キュウリ芽生えに4.0 Wm-2のUV-Bを12時間連続照射した。図中の値は4サンプルの平均±標準偏差



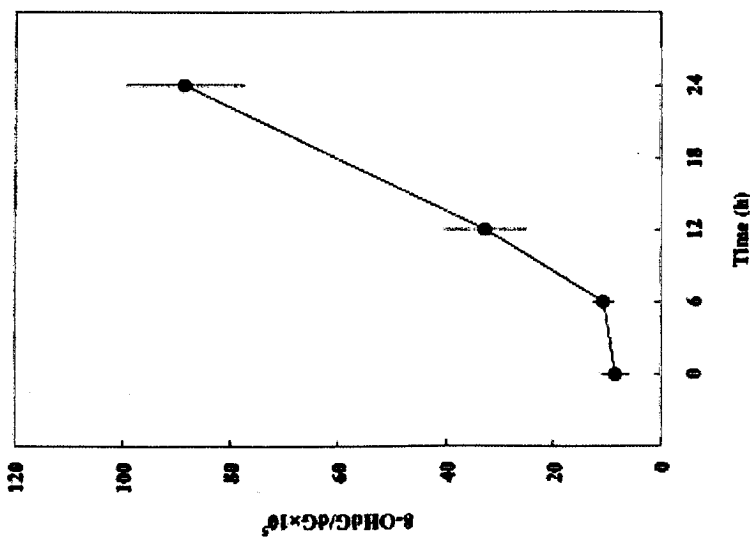


図7 UV-Bを照射したキュウリ子葉における8-OHdG形成のタイムコース。25℃の恒温室中で殺菌灯を光源に用い、キュウリ芽生えに4.5 W m<sup>-2</sup>のUV-Bを図中の時間連続照射した。図中の値は、3サンプルの平均±標準偏差

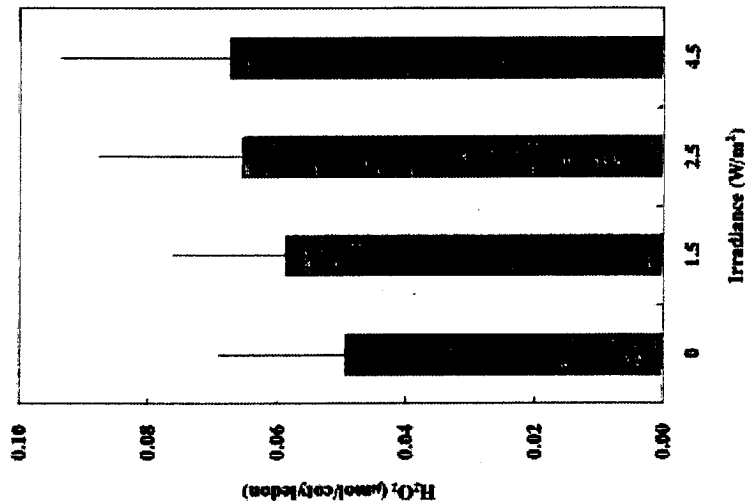


図8 種類の強度のUV-Bを照射したキュウリ子葉における過酸化水素蓄積。25℃の恒温室中で殺菌灯を光源に用い、キュウリ芽生えに図中の強度のUV-Bを12時間連続照射した。図中の値は、10サンプルの平均±標準偏差

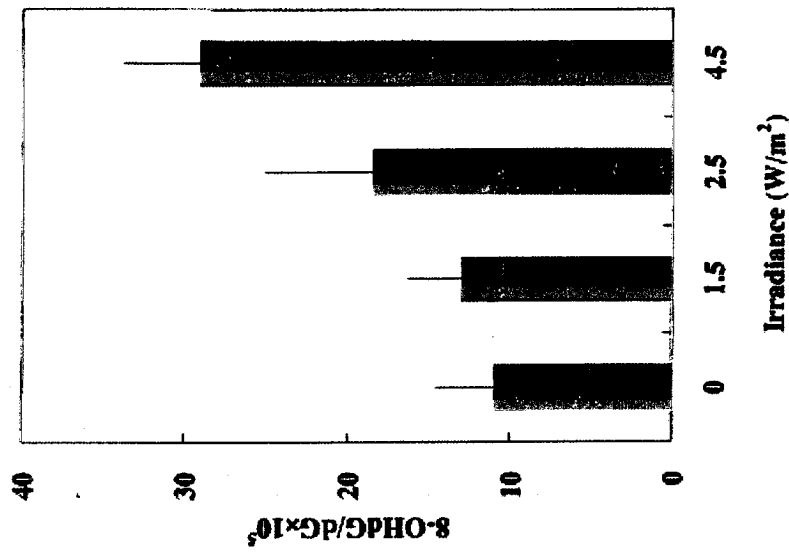


図9 種類の強度のUV-Bを照射したキュウリ子葉における8-OHdG形成。25℃の恒温室中で殺菌等を光源に用い、キュウリ芽生えに図中の強度のUV-Bを12時間連続照射した。図中の値は4サンプルの平均±標準偏差