

A-5 紫外線の増加が植物等に及ぼす影響に関する研究

(1) 植物の紫外線に対する防御機構に関する研究

②植物における紫外線障害の修復機構に関する研究

研究代表者 国立環境研究所 地域環境研究グループ 新生生物評価研究チーム 近藤矩朗
環境庁 国立環境研究所

地域環境研究グループ	新生生物評価研究チーム	近藤矩朗・佐治光・中嶋信美
生物圏環境部	環境植物研究室	清水英幸
(委託先)	神戸女子大学	橋本 徹
	平成5～7年度合計予算額	45,106千円
	(平成7年度予算額)	16,139千円)

[要 旨]

UV-Bによる植物の成長阻害のメカニズムを明らかにすることを目的として、肥料を与えたキュウリと与えないキュウリにUV-B照射をしたときに、第一本葉が受ける影響を比較した。肥料添加を行うと、第一本葉の成長は促進されたが、UV-B照射により成長が顕著に低下し、その効果は窒素で最も大きかった。UV-B照射により第一本葉の光合成活性が低下し、アスコルビン酸ペルオキシダーゼの活性は増加した。この結果は、UV-B照射を受けた第一本葉において活性酸素が発生している可能性を示唆しており、光合成活性低下に活性酸素が関与していると思われる。UV-B照射により第一本葉のサイトカイニンに対する感受性が低下した。また、肥料添加による成長促進物質の増加がUV-B照射により抑制された。これらの結果より、肥料添加を行ってUV-B照射したときの第一本葉の面積成長低下は、サイトカイニンなどの植物ホルモンに対する感受性の低下や、ホルモン活性の低下によって引き起こされたと考えられる。

紫外線量の増加が植物に及ぼす影響の一つにDNA損傷がある。DNA損傷産物のうちシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)、(6-4)型光産物(6-4PP)の修復活性をキュウリ、ホウキモロコシ、ホウレンソウで調べた。キュウリでは暗修復活性はほとんど検出できなかったが、ホウキモロコシでは検出された。ホウキモロコシではDNA損傷とアントシアニン合成の阻害に関連が見られた。CPD及び6-4PPの光修復活性はどの植物でも検出され、その性質は微生物で報告されているものと類似していた。また、ホウレンソウ葉緑体には光修復活性が検出されなかった。将来、UV-B抵抗性の分子遺伝学的な解析をするため、UV-B感受性突然変異体を単離した。

[キーワード] 成長阻害、植物ホルモン、DNA修復、光修復、突然変異体

1. 序

近年、人為起源のクロロフルオロカーボンなどの大気中への大量放出により、成層圏のオゾン層が破壊され、地表に到達する紫外線(UV-B; 280～320 nm)が増加すると予測されている。地上に到達する紫外線の増加により、植物に悪影響が生じる可能性が指摘され、紫外線を植物に照射した時の障害等に関する研究が行われてきた。その結果、実験室レベルで多くの植物に成長阻害や可視障害が生じること、植物種や実験条件によって障害の程度に大きな差があることが明らか

にされている。一方、野外条件において UV-B を増加させた実験では、必ずしも阻害的な影響ではなく、環境条件の違いによって、促進的影響が出ることも示されている。UV-B による植物の障害を引き起こす要因として、UV-B による光合成の阻害、活性酸素の毒性などが報告されている。また、UV-B によって DNA が損傷を受けることが知られている。DNA が損傷を受ければ植物は大きな影響を被る可能性があるが、植物は損傷した DNA を修復する機能を持っており、致命的な被害を免れている。UV-B に対する植物の感受性は様々な要因によって変動する。主な原因として、UV-B とともに照射される可視光や UV-A の強さ、リン肥料、乾燥などが報告されている。本研究では UV-B による植物の成長阻害の仕組みや阻害の程度を決めている要因及び DNA 損傷修復の性質について述べることを目的とする。

2. 紫外線によるキュウリ第一本葉の成長阻害の仕組み

(1) 研究目的

地上に到達する UV-B 放射量の増加により動植物にとって悪影響が生じると考えられ、様々な実験が行われている。UV-B に対して感受性の高い植物を用いて UV-B 照射を行うと、収穫量減少、成長低下、可視障害発現、光合成活性の低下などが生じることが報告されている¹⁾。しかし、ダイズの収穫に対する UV-B の影響を野外で 6 年間にわたって調べた実験では、同一品種でも実験年によって影響が異なっており、実験年による降水量などの環境条件の違いが UV-B の影響を左右していると考えられている²⁾。UV-B の影響を左右する要因として現在までに、可視光の強さ³⁾、UV-B⁴⁾、温度⁵⁾、水⁶⁾などが挙げられている。したがって、植物の UV-B に対する影響のメカニズムを明らかにするためには、まずどのような環境条件下でどれくらいの影響が生じるのか明らかにする必要がある。

UV-B 照射による植物の障害のメカニズムとして、光合成活性の低下⁷⁾及び活性酸素の関与⁸⁾などが報告されている。また、UV-B 照射により植物ホルモンの分解や酸化等の不活性化が起こっている可能性が指摘されている¹⁰⁾。

本研究では、キュウリの第一本葉の成長に対する UV-B 照射の影響を調べ、影響の程度を左右する要因について検討したところ、肥料を十分に添加したキュウリでは UV-B 感受性が高く、成長が顕著に阻害されることを見いだした。この実験条件のもとで、UV-B 照射がキュウリ第一本葉の成長に及ぼす影響と成長を支配するいくつかの生理活性との関連を調べ、UV-B 照射による成長阻害のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

(2) 研究方法

①植物材料

植物材料としてキュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Hokushin) の幼植物体を用いた。1.8 l あたり 5 g のマグアンプ K(N:P₂O₅:K₂O=6:40:5, W. R. Grace Co., Tennessee, U.S.A.) と、11.5 g の苦土石灰を混合した人工培養土 (ピートモス:パーミキュライト:パーライト:小砂利=4:4:2:1, v/v) を詰めたプラスチックポット (7 × 11 cm) に播種し、温度 25 ± 0.5 °C、相対湿度 70 ± 5 % に制御した自然光型ガラス温室で生育させた。

② UV-B 照射及び肥料添加

播種後 7 日目に、昼間 (7:00 ~ 19:00) 20 ± 0.5 °C、夜間 (19:00 ~ 7:00) 15 ± 0.5 °C、相対湿度 70 ± 3 %に制御した人工光型グロースチェンバーに移し、UV-B 照射、肥料添加を開始した。チェンバー内の光合成有効放射は紫外線ランプ下の植物体上部で約 $300 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ (メタルハライドランプ; BOC ランプ、三菱電機) であった。UV-B 照射は明期の間中の 12 時間行った。UV-B 照射用光源として健康線用蛍光灯 (FL20SE、東芝) を用い、フィルター (カッティングシート 000C、中川ケミカル) により照射光の 290 nm 以下の波長をカットした⁷⁾。植物体上部での UV-B の強度は約 0.1W/m^2 であった。対照区ではランプボックスのみを設置した。肥料は 0.1 % (v/v) ハイポネックス (The Hyponex Co. Inc., Ohio, U.S.A.) を用い、2 日に 1 回、1 ポットあたり約 50 ml ずつ与えた。また、ハイポネックスの代わりに、窒素として 40 mM 硝酸カリウム、リンとして pH 7 に調整した 10 mM リン酸カリウム緩衝液、カリウムとして 15 mM 塩化カリウムを別々に添加した実験も行った。肥料添加を行わない処理区では、純水を 2 日に 1 回、1 ポットあたり約 50 ml ずつ与えた。

第一本葉の成長の指標として主に葉面積成長を用いたが、葉の縦×横の値と葉面積の実測値との間に下に示す関係があり ($r=0.99$)、葉面積をこの式に従い求めた。

$$\text{葉面積 (cm}^2\text{)} = 0.858 \times \text{葉の縦の長さ (cm)} \times \text{横の長さ (cm)} - 0.796$$

③ 光合成活性の測定

第一本葉から直径 1.2 cm のリーフディスクを打ち抜き、50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0)、25 mM 炭酸水素ナトリウムを含む反応溶液 4 ml が入った容器内に入れ、20 °C で酸素電極を用いて暗黒下での酸素吸収速度、光照射下 ($300 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$) での酸素放出速度を測定した¹¹⁾。リーフディスクの生重量を測定して生重量あたりの総光合成速度を求めた。

④ アスコルビン酸ペルオキシダーゼ活性の測定

キュウリの第一本葉を切り取り、1 mM アスコルビン酸ナトリウム、20 % ソルビトール (w/v) を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) を葉生重 1 g あたり 5 ml 加え破碎した。反応混液は、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.5 mM アスコルビン酸ナトリウム、0.1 mM 過酸化水素、粗酵素液を含み、反応は過酸化水素の添加により開始し、アスコルビン酸の酸化を 290 nm の吸光度の減少で追跡した。タンパク質量は Bradford の方法¹²⁾ で測定した。

⑤ ベンジルアデニンの添加による第一本葉の成長の測定

ベンジルアデニン (BA) による第一本葉の成長の測定は以下の方法で行った。UV-B、肥料添加処理開始後 7 日目のキュウリ第一本葉から直径 1.0 cm のリーフディスクを打ち抜き、以下の条件で 6 日間培養した¹³⁾。20 mM KCl、1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) に BA を溶かし、濾紙を敷いた直径 9 cm のシャーレに 3 ml 入れ、濾紙の上にリーフディスクを並べ、昼間 20 °C、夜間 15 °C、明期 12 時間 ($100 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$) の条件で培養した。培養開始前後のリーフディスクの生重量を測定した。

⑥第一本葉抽出物の成長促進活性の測定

肥料添加処理開始後7日目のキュウリ第一本葉から打ち抜いたリーフディスクを試験材料に用いて、第一本葉からの抽出物の成長促進活性を調べた。UV-B、肥料それぞれを9日間処理したキュウリ第一本葉5gを、20mlの80%エタノールで2回抽出した。抽出液を乾固させを3mlの20mM KCl、1mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ を含む20mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)で残渣を溶かし培養液とした。培養液はそれぞれ直径9cmのシャーレにいれ、⑤と同じ条件で培養し、リーフディスクの生重量の増加を調べて抽出液の成長促進活性とした。

(3) 研究結果

肥料を添加したものは無添加のものに比べて生重量、乾重量、葉面積のいずれの成長も顕著に増大した。UV-B照射により肥料添加区での第一本葉の葉面積、生重量、乾重量が有意に減少したが、肥料無添加地区では、UV-B照射による第一本葉の成長の有意な減少は見られなかった。葉の厚さの指標となるSLWの値は、肥料添加の有無に関係なくUV-B照射により優位に増加した。葉面積の経時的变化を見ると肥料無添加区では、UV-B照射による葉面積成長の低下が処理期間中を通してわずかであった。肥料添加区では、第一本葉展開初期(処理開始後7日目から9日目)からUV-B照射による葉面積成長の低下が顕著に現れ、処理開始後13日目には大きな葉面積成長の差が生じた。

ハイポネックスの代わりに窒素、リン、カリウムそれぞれを別々に添加した場合、どれも純水のみを添加した場合と比較して成長が促進され、また、UV-B照射による葉面積成長の阻害の割合が増加した。特に窒素肥料を与えた場合の影響が大きかった。

光合成活性は処理開始後7日目では、肥料添加区でUV-B照射により優位に低下した。処理開始後10日目、13日目では、UV-B照射により光合成活性が低下する傾向が見られたが7日目のような有意な差ではなかった。肥料無添加区では、光合成活性が減少する傾向が見られたが有意な差ではなかった。

APXの活性は処理開始後7日目、10日目では、UV-B照射により顕著に増加したが、肥料添加の有無で活性の増加の程度に大きな差が見られなかった。

低濃度BA溶液と比べて 10^{-5} Mや 10^{-4} Mの高濃度BA溶液で培養したとき、UV-B照射を行っていない第一本葉のリーフディスクの生重量が大きく増加し、特に肥料添加区のリーフディスクの生重量の増加が著しかった。一方、UV-B照射区のリーフディスクは、高濃度BA溶液で培養しても生重量の増加の程度はBAを与えない場合と変わらなかった。

各処理区の第一本葉のエタノール抽出物を含む溶液でキュウリ第一本葉のリーフディスクを培養した結果、リーフディスクの生重量は、UV-B照射を行っていない肥料添加区の抽出物により特異的に増加した。他の3処理区の抽出物では、抽出物を含まない溶液で培養した場合と生重量の増加に差が見られなかった。

(4) 考 察

UV-B感受性に対する肥料の影響を検討したところ、肥料添加を行った場合に、UV-B照射によりキュウリ第一本葉の葉面積成長、生重量、乾重量の有意な減少が見られ、特に窒素肥料の影響が大きかった。また、肥料添加区においてUV-B照射により生じる葉面積成長の低下は、特に

第一本葉展開初期から見られた。したがって、肥料添加区で UV-B 照射により生じる成長の差は、主に第一本葉展開初期に受けた影響が原因であると推測される。一般に、UV-B に対する植物の感受性の違いはフラボノイド含有量の違いによると考えられている¹⁴⁾。しかしながら、肥料の添加の違いに関わらず、第一本葉のフラボノイド含有量に差は認められなかった。

肥料添加区において UV-B 照射により第一本葉の乾物成長が低下し、光合成活性も低下した。したがって、第一本葉の乾物成長の低下は光合成活性の低下によると考えられる。酸素電極を用いて測定したリーフディスクの光合成活性は、光合成電子伝達系と炭酸固定系の両方を含めた全体の光合成活性を反映している。光合成電子伝達系の光化学系 II の活性を反映しているクロロフィル蛍光を測定したところ、UV-B 照射によりほとんど阻害されなかった。したがって、UV-B によるキュウリ第一本葉の光合成阻害は主に炭酸固定系の阻害によるものと思われる。

本研究において、UV-B 照射により肥料添加したキュウリ第一本葉の成長が阻害されたが、肥料添加により促進された部分が阻害されたと考えることができる。肥料として与えた硝酸は、亜硝酸そしてアンモニアに順次還元されてアミノ酸に取り込まれる。したがって、UV-B が窒素代謝系を阻害することにより成長を阻害する可能性が考えられる。UV-B は *in vivo* 硝酸還元活性を阻害することはなくむしろ促進した。また、亜硝酸やアンモニアの蓄積は認められなかった。これらの結果は、UV-B によるキュウリ第一本葉の成長阻害に窒素代謝系の阻害は関わっていないことを示唆している。しかしながら、UV-B による障害に窒素代謝系阻害が関与しているかどうかについてはさらに詳細な研究が必要であろう。

UV-B による植物の障害には活性酸素の関与が示唆されている⁹⁾。UV-B 照射により活性酸素消去系酵素の一つである APX 活性が生じていることが示唆された。活性酸素の一つで APX の気質である過酸化水素は、光合成炭酸固定系カルビン回路の光活性化酵素を阻害することが知られている¹⁵⁾。したがって、今回の第一本葉乾物成長低下には、光合成炭酸固定系の活性酸素による阻害が関係していると考えられる。

肥料添加による第一本葉の成長促進や UV-B 照射による第一本葉の葉面積成長の低下には、細胞の成長に関与している植物ホルモン、特にサイトカイニンの合成、分解などが関係していることが考えられる。本研究では UV-B 照射による第一本葉のサイトカイニンに対する感受性が変化するかどうか、そして、葉に含まれる成長促進物質の活性が変化するかどうか検討した。肥料添加したキュウリ第一本葉のリーフディスクは BA に対して高い感受性を示したが、UV-B 照射により BA に対する感受性は低下した。また、UV-B 照射を行っていない肥料添加区からのエタノール抽出物は顕著な成長促進効果を示したが、他の処理区の抽出物には成長促進作用は見られなかった。従って、UV-B 照射を行っていない肥料添加区の葉では成長促進活性が高く、また、サイトカイニンに対する感受性が高いことが明らかになった。これらが肥料添加区での UV-B による葉面積成長低下の主な要因であると考えられる。今後は、UV-B 照射によって起こる葉面積成長低下と、サイトカイニンやオーキシンなどの植物ホルモンとの関係について詳しく検討する必要がある。

3. 紫外線による植物 DNA の損傷と修復に関する研究

(1) 研究目的

植物はB領域(280-320 nm)紫外線(UV-B)によって種々な影響を受ける。この中にはアントシアニンやその他のフラボノイドの合成誘導、徒長防止など、植物の生育にとって有益なものも含まれるが、細胞や組織の破壊、オルガネラの異常形態、光合成の低下、細胞内イオンの漏出、成長阻害など有害なものが多い¹⁶⁾。

特にDNAは、その吸収帯の長波長側がUV-Bの波長帯と重なるためUV-Bを吸収し、DNA鎖上の隣接するピリミジン塩基を光化学的にシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)やピリミジン(6-4)ピリミジノン光産物(6-4PP)、さらにジューワ型光産物に変える。このようなDNA損傷の量は106塩基対当たり数個と、極めて少ない¹⁷⁾が、この傷が存在するとDNAの複製を妨げ、細胞分裂に支障を引き起こす。また、この傷がDNAの遺伝子領域に生じると遺伝子の正常な発現を阻害することになる。しかし、このようなDNAの傷は、通常、光修復酵素とエンドヌクレアーゼによってそれぞれ光修復と切除修復が行われることが、微生物や動物組織において明らかにされている。しかし植物においては研究がその緒に着いたばかりであって、シロイヌナズナ芽生え^{18)、19)}、アルファルファ芽生え¹⁷⁾のDNAに対するUVの効果が調べられているに過ぎない。移動可能なヒトや動物と異なり、植物は野外において太陽光紫外線を避けることができないので、UV-BによるDNAの損傷と修復の問題は特に重要である。

本研究はDNA損傷と植物の受けるUV-B傷害との関連を調べる目的で、UV傷害を受けやすいホウキモロコシ、キュウリのDNA損傷の生成と修復の特性について検討した。このほか、野外で育成された緑化ホウレンソウについても実験を行い、細胞核のDNAおよび葉緑体のDNAの損害と修復を調べた。さらに、DNAの損害と修復機構の分子生物学的解析に供するため、遺伝学的取扱に便利なシロイヌナズナからUV-B感受性の高い系統の選抜と突然変異体の作出を試みた。

(2) 研究方法

① 植物材料および栽培条件

ア. キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Hokushin) 黄化子葉及び緑葉へのUV-B照射実験

キュウリ黄化子葉へのUV-Bの照射は以下のように行った。播種後5日間25℃暗所で生育させたキュウリの黄化芽生えより切り取った子葉を材料として用いた。ゼアチンを含むリン酸緩衝液で湿らせた濾紙をステンレスシャーレの中に入れ、その上に子葉を並べ、290 nm以下の波長の紫外線を除去するため、上をガラスフィルターで覆った。シャーレを健康線ランプ(東芝健康線ランプFL20S-1)の下に置き、子葉にUV-Bを照射した。

キュウリ緑葉は(1.(2)②参照)人工光型グロースチェンバーで1日間キュウリを育成した後、明期の中央の1.5、4時間あるいは、明期の間中の12時間UV-Bを照射した。これを3日間繰り返し、毎日UV-B照射直後に第一葉を切り取り液体窒素で凍結した。1.5時間照射のものについては、照射後4時間白色光のもとにおいた後に凍結した試料も作成した。試料は凍結乾燥後、DNA抽出までデシケーターに保存した。照射したUV-Bのスペクトルはスペクトロラジオメーターで測定した。

また、紫外線影響の波長による違いを調べるため単色光の照射による実験を行った。植物材料は同じくキュウリの芽生えを用いた。キュウリは、温度25℃、相対湿度70%に調節した自然光ガラス温室で、播種後10日間栽培した。その後、岡崎の基礎生物学研究所に移して紫外線単色光の照射実験を行った。基礎生物学研究所では明期12時間、暗期12時間とし20℃で育成した。

明期には蛍光灯を用いて可視光の照射を行い、その光強度を 20 klux とした。単色光の照射は明期の中間の 4 時間に行った。単色光として 290、300、310 nm の 3 波長を選んだ。各波長について 4 段階の紫外線強度を設定した。紫外線を照射しない対照区 (control) も設定した。この条件で 3 日間栽培し、3 回目の単色光照射の後 20 時間で第一本葉を切り取り、液体窒素で凍結した後凍結乾燥し DNA 抽出までデシケーターに保存した。

イ. ホウキモロコシ黄化芽生えへの UV-B 照射実験

ホウキモロコシ (*Sorghum bicolor* Moench, Acme broomcorn) は神戸大学農場 1991 年産を用いた。UV 照射は、3 日間冷暗黒芽生え (7cm) に、水平方向から行った。ホウキモロコシ芽生えでは、UV-B 以外に赤色光でもフィトクロムを介してアントシアニン合成が誘導される²⁰⁾ので、フィトクロム関与の合成を除くため UV 照射の直後に遠赤色光 (FR) を十分量 ($80 \mu \text{mol/m}^2 \times 180\text{s}$) 照射し、UV 光の効果のみを得た。対照には FR のみを照射した。UV 光源は K-295(1/4 値幅: 295-345 nm, ピーク波長: 311 nm)(東芝健康線ランプ FL20S-E+Hoya 石英ガラスフィルター)、K-295 にビニルフィルム (南国、三菱化成) をかけた K-300(1/4 値幅: 300-350 nm、ピーク波長: 311 nm)、および BLB-325(東芝ブラックライト FL20S-BLB)(1/4 値幅: 325-385 nm、ピーク波長: 350 nm) の 3 種を用いた。FR は、遠赤色光ランプ (FL20S-FR-74) にアクリル板 (デラグラス A900、旭化成) をかけて得た。

ウ. ホウレンソウ緑葉への UV-B 照射実験

ホウレンソウ (*Spinacea oleracea*) は市販のものを用いた。ホウレンソウ緑葉に UV-B を 30 分照射し直ちに葉緑体及び核を単離した。光修復実験の際には UV-B 照射直後に UV-A から青色光を 120 min 照射した。

②植物材料からの DNA の抽出

DNA は CTAB 法で抽出した²¹⁾。試料を 65℃ に暖めておいた $2 \times \text{CTAB}^*1$ とともに摩砕し、そのまま 65℃ で 30 分間インキュベートした。摩砕液に等量のクロロホルムを加えて 10 分間攪拌し、摩砕液をチューブに移した。室温で 5 分間、 $8000 \times g$ で遠心分離を行い、上清を別のチューブに移し、液量を測定した。1/10 量の 10% CTAB と等量のクロロフィルムを加えてよく攪拌した後、室温で 5 分間、 $8000 \times g$ で遠心分離を行った。上清を別のチューブに移し、液量を測定した。上清に等量の CTAB 沈殿緩衝液^{*2}を加え、10 分間攪拌し、室温で 5 分間 $8000 \times g$ で遠心分離を行った。上清を捨て、得られた沈殿に STE^{*3}を加えて溶かし、2.5 倍量の 99.5% エタノールを加えてよく攪拌した後、0℃ 5 分間 $17,000 \times g$ で遠心分離を行った。上清を捨て、沈殿に 70% エタノールを加えて攪拌し、0℃ で 5 分間、 $17,000 \times g$ で遠心分離を行った。上清を捨てた後、沈殿を真空乾燥させ、滅菌水に溶かした。RNase A を $5 \mu \text{g/ml}$ になるように加え、室温で 30 分間インキュベートし、RNA を分解した。続いて 0.6 倍量の、20% ポリエチレングリコール・2.5 M NaCl を加えてよく攪拌し、30 分間氷上に置いた後、0℃ で 10 分間、 $17,000 \times g$ で遠心分離を行った。上清を除き、沈殿を 70% エタノールで洗浄後真空乾燥させ、滅菌水に溶かして DNA 試料とした。DNA の濃度は 260 nm の吸収で測定した。DNA 試料は -20℃ で保存した。

③ ELISA 法

ELISA は Mori らの方法²²⁾に従って行った。ポリ塩化ビニール製のマイクロタイター平底プレートの各ウェルに 1% 硫酸プロタミン水溶液を 50 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベートした後、プレートを純水で 3 回洗い、乾燥させて使用するまで室温で保存した。適度な濃度 (TDM-2 の場合 0.2 μ g/ml, 64M-2 の場合 3 μ g/ml) になるように PBS^{*4}を用いて希釈した DNA を、10 分間 100 $^{\circ}$ C で熱処理し DNA を変性させた後、氷上に 15 分間冷却した。試料は各ウェルにつき 50 μ l ずつ加え (各試料につき 3 ウェル使用した)、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートして乾燥させた。乾燥後、プレートを 0.05% Tween 20 を含む PBS (PBS-T) で 2 回洗い、150 μ l の 1% NCS 溶液をのせ、37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートし非吸着部位に対しブロッキングを行った。PBS-T で 3 回洗い、100 μ l の一次抗体溶液 (TDM-2 または 64M-2, in PBS) を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗い、100 μ l のビオチンで標識した二次抗体溶液 (anti-mouse IgG, no.62-6340, Zymed, in PBS) を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした。PBS-T で 3 回洗い、100 μ l のペルオキシダーゼとストレプトアビジンの結合物 (HRP-streptavidin, No.43-4352, Zymed, in PBS) を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした。最後に PBS-T で 1 回、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) で 1 回洗い、100 μ l の基質溶液 (0.4 mg/ml o-phenylene diamine, 0.007% H₂O₂) を各ウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。50 μ l の 2 M H₂SO₄ を各ウェルに加え反応を停止し、490 nm の吸収を測定した。DNA 損傷産物の標準試料は基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを用いて 10 μ g/ml の λ DNA 溶液に 0 ~ 10 J/m² の範囲で 260 nm の単色光を照射したものをを用いた。

*1 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1%(w/v) CTAB, 1%(v/v) 2-mercaptoethanol

*2 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, 1%(w/v) CTAB

*3 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl

*4 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.2, 0.15 M NaCl

④アントシアニンの定量

アントシアニンは、照射後、芽生えを暗黒 24 $^{\circ}$ C で 24 時間保ち、第一節間の着色部約 40 mm を切り取り、20 本を 6 ml の 1% 塩酸-メタノールに入れ、24 時間暗黒 4 $^{\circ}$ C でアントシアニンを抽出した。抽出液の 528 nm と 650 nm の吸光度差をアントシアニン量とした。

⑤光修復酵素の部分精製

100 g のハウレンソウの緑葉を 200 ml の抽出液 (200 mM Tris-HCl pH7.6 100 mMNaCl, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM Dithiothreitol) とともに磨砕し、遠心分離によって上清を得、45 ~ 80% の硫酸分画を行い沈殿を得た。沈殿を 45% 飽和硫酸を含むクロマト A 液 (100 mM Tris-HCl, pH7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) にとかし、同液で平衡化したトヨパール HW-65 カラムにかけ素通り画分を集め、80% 飽和硫酸とし酵素を沈殿させた。沈殿をクロマト B 液 (50 mM Tris-HCl pH7.6, 50 mMNaCl, 0.5 mM EDTA) に溶かした。次に同液で平衡化したセファデックス G-25 カラムで脱塩したのち、同液で平衡化した DEAE トヨパールカラムにかけ素通り画分を回収し、80% 飽和硫酸の沈殿に

して濃縮した。

⑥ UV-B 感受性突然変異体の単離

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* L. Henyh) の栽培突然変異体の選抜は「仙台シロイヌナズナ種子保存センター (SASSC)」に保存されている色素突然変異体、約 320 系統及び形態突然変異体、約 180 系統、及び Ethylmethane sulfonate (EMS) 処理した M3 種、約 1500 株について行った。種子を無機栄養及びマイコスタチン (30 mg/ml) を含む 1% 寒天培地にまき 4℃、暗所にて 2、3 日低温処理した。黄化芽生えを使用する場合は、低温処理後、23℃明所に約 30 時間おいて発芽誘導を行い、その後暗所 23℃に移し 3 日間生育させた。緑化芽生えを用いる場合は、低温処理後 23℃、明期 16 時間暗期 8 時間の条件下で 7 日間生育させた。UV 感受性を判断する際、非感受性の対照として野生型 (*Landsberg erecta*, An1, En2 の 3 系統) を、感受性の対照として、UV-B 感受性突然変異体 C250 (*uvr1*¹⁸) を用いた。中間の感受性を示す系統として C250 の親系統である D120 (*tt5*) を用いた。

(ア) 選抜法 (黄化芽生えの場合) : 4 日間暗所生育の植物に UV-B を 23℃で 5~20 分照射した。その後暗所に 1 日置き、芽生えの障害の状態を観察した。これを明所に移し、6 日後、再度観察した。胚軸が軟化または糸状化した個体を数えることにした。

(イ) 選抜法 (緑化芽生えの場合) : 7 日間上記のように生育させた芽生えに UV-B を 23℃で 20~60 分間照射した。照射後 1 日暗所におき、再び明所に移し、子葉が黄化した個体、子葉が萎縮した個体、胚軸が軟化、糸状化した個体を数えた。以上について白色光の光強度は 1200 μ W/cm²、UV-B の光強度は 1.2 mW/cm²であった。290 nm 以下の波長の光をフィルター (南国、三菱ノービ、QLM) でカットした。

(3) 研究結果

① UV-B 照射による DNA 損傷産物の形成と修復

ア. キュウリ黄化子葉での DNA 損傷産物の形成

キュウリの黄化子葉に UV-B を照射した時、CPD と 6-4PP の生成量は、照射 20 分まではほぼ直線的に増加した。UV-B と同時に白色光を照射する (+WL) と照射しない場合 (-WL; PPF, 4 μ mol/m²/s) に比べ、CPD 生成量は約 50% に減少したが、6-4PP の生成量の減少は 20% 以下であった。

UV-B を照射するときの温度の影響を氷上および 15-30℃の範囲で検討した。CPD と 6-4PP の生成量は氷上と 15℃では大きな差はみられなかったが、15-30℃の範囲で温度が上昇すると増加する傾向が認められた。-WL と +WL における CPD の生成量の差は 25℃で最大で、それより低温および高温の温度域では低下した。6-4PP の生成量は、氷上から 25℃の温度範囲では -WL と +WL において殆ど差がみられなかったが、30℃以上では -WL に比べ +WL では若干増加した。

イ. キュウリ黄化子葉での DNA 損傷産物の修復

子葉に UV-B を照射した後、暗所また白色光照射下で培養し、DNA 損傷産物量の経時変化に

ついて検討した。25℃暗所で培養した場合、CPD および 6-4PP は 24 時間で約半分に減少した。しかし、培養期間中における DNA 量の変化を検討したところ、暗所、24 時間で子葉 1 枚あたりの量は約 1.8 倍に増加することが明らかになった。このことから、キュウリ子葉の暗所における修復活性は非常に低いと考えられる。これに対し、明所では、CPD は 15 分で、6-4PP は 4 時間で、それぞれほぼ半量が修復された。

この光に依存した修復過程において、照射する白色光の強度および培養温度の影響を検討した。CPD および 6-4PP ではその修復速度が異なるため、UV-B を 15 分照射した後に、CPD では 30 分、6-4PP では 6 時間子葉を培養した。これら DNA 損傷物の修復量は照射した白色光の強度に依存して増加した。CPD の修復率も 6-4PP の修復率もほぼ同じ光強度依存性を示した。培養温度を 15℃から 35℃の範囲で変えて培養したところ、25-30℃で修復活性が高く、それよりも低い温度や高い温度では修復量が減少した。

ウ. キュウリ芽生えにおける DNA 損傷産物の形成

キュウリ芽生えに時間を変えて紫外線を照射した結果、シクロプタン型ピリミジン二量体の生成量は照射日数によって必ずしも一定でないことが認められた。日目では 1.5 時間や 4 時間といった短時間の紫外線照射の方が 12 時間の長時間の紫外線照射よりもピリミジン二量体の蓄積量が多かったが、2 日目、3 日目では 1.5 時間の照射では蓄積量が減少し、4 時間の照射では 2 日目が最小となって 3 日目で再び増加する一方、12 時間の照射では日を追って増加した。また、1.5 時間 UV-B 照射した後、白色光下に置いたものではピリミジン二量体の蓄積は見られず、白色光の照射によって DNA 損傷が修復されたものと思われる。

波長の異なる単色光の照射では、短波長側でシクロプタン型ピリミジン二量体の蓄積量が増加し、特に 290 nm で蓄積量が多かった。310 nm ではほぼ対照区と同程度の蓄積量であった。

エ. ホウキモロコシ黄化芽生えにおける DNA 損傷産物の形成と修復

ホウキモロコシ暗黒芽生えにおいては、CPD も 6-4PP も、光修復のみならず暗黒化でも非常に早い修復がみられた。光修復に有効な波長を、青色光および UV-A 光で比較したところ、青色光に比べて UV-A 光の方が効果的であったので、修復光には、UV-A 光を用いることにした。UV-B 照射に先立って UV-B ~ 白色光または UV-A ~ 白色光を 2 時間照射し、その後 UV-B 照射 (5 分) を行い、光修復の速度を比較した。前照射を行ったものでは、行わないものに比べて CPD の修復が早かった。前照射に用いた 2 種の光源間では、差がなかった。従って、前照射の効果は UV-A ~ 白色光にあると思われる。一方、6-4PP の修復は、前照射の影響を受けなかった。この結果より、ホウキモロコシ芽生えにおいて CPD と 6-4PP の光修復酵素は別であり、CPD の光修復酵素は光により誘導されることが示唆された。実際に前照射をしたものでは酵素活性が上昇しているのかどうかを確認するため、暗黒で育てた芽生えと、UV-A ~ 白色光または赤色光で前照射をした芽生えから粗抽出物を得て、光修復の酵素活性の有無を調べた。UV-A ~ 白色光で前照射をしたものだけに、CPD 光修復の酵素活性が検出された。

オ. ホウキモロコシ黄化芽生えでのアントシアニンの合成と DNA 損傷産物の形成

波長特性の異なる 3 種の光源 (K-295, K-300, BLB-325) を用いてアントシアニン合成の誘導と阻

害を調べた。K-295 と K-300 の場合 $20 \mu \text{ mol/ m}^2/\text{s}$ の光強度で照射時間を 10 秒から 10 分まで変えて照射光量を調節した。BLB-325 の場合も同様に $60 \mu \text{ mol/ m}^2/\text{s}$ の光強度で照射時間を 20 秒から 20 分まで変えて光量を調節した。K-295 と K-300 は低光量ではアントシアニン合成誘導効果は等しかった。しかしアントシアニン合成の阻害が現れ始める光量は、K-295 では 2 mmol/ m^2 であったのに対し、K-300 では 6 mmol/ m^2 であった。このように短波長側のわずか 5 nm の違いにより、アントシアニン合成の阻害に大きな差がでることは注目に値する。一方 300 nm 以下の波長を殆ど含まない BLB-325 では、K-300 によって誘導される最高レベル以上のアントシアニンが誘導される高い光量 (72 mmol/ m^2) まで光量を高くしてもアントシアニン合成阻害は全く認められなかった。

このアントシアニン誘導実験において照射後直ちに一部の植物を凍結し、CPD および 6-4PP を測定した。CPD は K-295 でも K-300 でも 2 相より成る光量-応答曲線に沿って形成された。しかし同じレベルの CPD を形成するのに光源 K-300 は K-295 の約 3 倍の光量を必要とした。BLB-325 光源では CPD は全く検出できなかった。6-4PP も CPD と同様に光量と波長に依存して形成された。

カ. UV-B 照射による葉緑体 DNA 損傷と修復

ハウレンソウ葉を UV-B 照射した場合、葉緑体 DNA における CPD の形成量は核 DNA の場合より少なく、核 DNA に対して 70% 程度しか生じなかった。しかし 6-4PP は葉緑体 DNA から核 DNA から同程度生成した。抽出した DNA を UV-B 照射した実験でも同様の結果が得られたので、CPD 生成における相違は核 DNA と葉緑体 DNA の構造的相違による可能性が高い。

UV-B 照射したハウレンソウ葉をさらに青色光で照射した場合、核 DNA においては CPD も 6-4PP も青色光照射前よりわずかではあるが減少したが、葉緑体 DNA ではこの減少は起こらなかった。単離した葉緑体でも葉緑体 DNA の損傷の光修復はみられなかった。

UV-B 照射によってハウレンソウ葉に生じた DNA 損傷が核 DNA においては青色光照射によって減少することが観察されたが、この DNA 光修復機構を究明する第一歩として、ハウレンソウ緑葉の光修復酵素の精製を試みた。光修復酵素の活性はハウレンソウ緑葉から中性緩衝液で容易に抽出できた。このことはこの酵素が水溶性蛋白質よりなることを示唆している。45% 飽和硫酸中でトヨパールカラムにも吸着しなかった。中性ではカチオンとして挙動するものと思われる。以上の精製操作によって、かなりの量の挟雑タンパク質は吸着除去されたが、酵素活性の顕著な衰退は観察されなかった。また、精製途上の酵素試料は、すべて、CPD および 6-4PP の光修復酵素活性を示した。

② UV 感受性突然変異体の単離

UV 感受性突然変異として 13 株を選抜、単離し、2~4 代の世代を繰り返して単純化した。これらの内訳は、SASSC の色素突然変異体から 9 株、形態突然変異体から 1 株および M3 植物から 3 株であった。単離した系統の感受性の度合いと傷害の特徴を表-1 に示した。これらは、

(a) 明所生育の緑化芽生えおよび暗所生育の黄化芽生えの両方で感受性を示す系 (M356, M3144, JF165, JVI61, JV205)

(b) 緑化芽生えで高い感受性を示す系統 (JV157, JVI67, JV318)

(c) 黄化芽生えで高い感受性を示す系統 (M3123, JV151-2, JV169, JV184, JV203) の3種類に分かれた。

黄化芽生えでは、感受性系統の胚軸は、UV照射によって軟化して萎れ、さらに時間が経ると脱水が起こって細い糸状になった。子葉や成長点が傷害を受けていないものでは、照射後、明所に置かれて数日経つと子葉の下部から新しい根が発生した。

緑化芽生えでは、UVへの反応は、子葉が緑のまま萎縮するもの、子葉が白化するもの、胚軸が軟化または糸状化するもの、など系統によって傷害の徴候は異なっていた。

照射するUVの強度を調節するため、白色寒冷紗を用いた。感受性系統の寒冷紗により約半数の系統は、遮光によるUV強度の減少とともに傷害率が低下した。しかし、光強度に依存せず、一定の傷害率を維持している系統 (JV157の黄化芽生え) もあった。また、黄化芽生えでは、寒冷紗2枚によって遮光された低い光強度 (0.6 mW/cm²) でも高い傷害率を示す系統が多かった (M3123, JV151-2, JV203, JV205)。

表-1 シロイヌナズナの紫外線感受性突然変異系統

系統	緑化芽生え	黄化芽生え	
WT (La er)	-	-	UV-B照射は、緑化芽生えの場合20～30分、黄化芽生えの場合5～20分行き、3～5回の実験により傷害率を判定した。傷害の判定は次のa, b, cのUV-B効果によって行った。 a: 子葉が白化した。b: 子葉が萎縮して縮れた。c: 胚軸が軟化または糸状化した。 +++: さわめて高感受性(傷害率90%以上) ++: 高感受性(傷害率66%以上) +: やや感受性(傷害率50%以上) -: 非感受性(傷害率50%以下) WT: 野生型、M: EMS処理M3植物より選抜した系統、JF: 形態突然変異体、JV: 色素突然変異体。
WT (An1)	-	+c	
WT (En2)	-	-	
C250	+++bc	+++c	
D120 (tt5)	++c	+c	
M356	+++a	+++c	
M3123	++a	+++c	
JF165	++a	++c	
JV151-2	+a	+++c	
JV157	++bc	+c	
JV161	+++bc	+++c	
JV167	+++ab	++c	
JV169	+a	++c	
JV184	+ab	++c	
JV203	+b	++c	
JV205	+++ab	+++c	
JV318	++ac	+c	

(4) 考 察

本研究により植物にも微生物と同様なDNA損傷の光修復機構が存在することが示された。キユウリ黄化子葉の実験から、CPDは大腸菌などのほかの生物とほぼ同様の光修復酵素によって

光修復を受けることが示された。また、植物の 6-4PP に特異的な光修復機構については殆ど知見がなかったが本研究により、キュウリの子葉において 6-4PP の光修復課程の光強度および温度依存性が CPD のそれと極めて類似していることが示された。これらの結果から、6-4PP も CPD の光修復酵素と類似した酵素により修復される可能性が示唆される。

ホウキモロコシ芽生えにおいては、非常に早い暗修復および光修復がみられ、UV-A ~ 白色光で前照射をすると CPD の光修復酵素の誘導が起こることがわかった。これはキュウリと異なる結果であり、暗修復も含めた DNA 損傷修復の機構は植物種によって微妙に異なっていることを示唆している。ホウキモロコシでは DNA 損傷物質の蓄積が、紫外線吸収色素の一つであるアントシアニン合成阻害と関係している可能性が示唆された。本研究では CPD 及び 6-4PP の絶対量を測定していないのでどのちらの損傷物がアントシアニン合成の阻害に関与するかについては討論することができない。

単離葉緑体を用いた実験から、紫外線光照射によって生じる DNA 損傷とその修復は、核と葉緑体で異なったメカニズムが存在するものと思われる。このことを更に確かめるためには、実験条件の改善、特に自家栽培ホウレンソウの使用と照射実験中の鮮度保持の改善が必要である。また光修復機構の存在は光修復酵素の組織内分布と関係するものと思われる。そこで研究の第一段階として酵素の単離精製を試みた。今後さらに酵素を高度精製して抗体を調製することができれば、光修復酵素の免疫学的検出定量が可能となろう。

シロイヌナズナの UV 感受性突然変異体は SASSC の色素突然変異から多く選抜された。このことは、色素生成に変異を持つ突然変異体は UV によって傷害を受けやすいことを示唆している。これらの中には、芽生えの時にほとんど葉緑体を持たないもの (JV157) やクロロフィルアントシアニンなどのフィルター機能が低下したものや、フラボノイドなどの UV 吸収色素が少ないことによる、二次的な効果によるものも含まれていると思われる。

黄化芽生えでは高い感受性を示すが、緑化芽生えで感受性が低下する系統が多く見られた。これは黄化胚軸ではフィルター機能が働かず、UV 作用によって急速に原形質膜または液胞膜の透過性が変化したために脱水状態に陥ったことによると思われる。

今回単離した UV 感受性系統の中で、C250 を越える高い感受性を示したものはなかった。C250 は、アントシアニン欠損により UV 感受性になった D120 (tt5) から誘導された突然変異体で、UV によって引き起こされたピリミジンダイマーの修復機能を欠損したものである¹⁸⁾。したがって、C250 は、これら 2 つの機能が欠損した突然変異体といえる。本研究で単離した突然変異体で、C250 にほぼ匹敵する感受性系統として、M356, M3144, JV161, JV205 が上げられる。これらはいずれもアントシアニンを持っているので(ただし、M3144 の種子は茶色と黄色のまだらとなっている)、少なくともこの色素のフィルター機能を欠くために感受性になったものではないと考えられる。これらの系統の UV 感受性の機能解析は今後の問題である。

4. まとめ

本研究により、キュウリ第一本葉の葉面積成長阻害が活性酸素による光合成の阻害、植物ホルモンに対する感受性の低下およびその生成の抑制による可能性が指摘された。また、植物に UV-B 照射すると DNA 損傷物質が蓄積するが、修復活性によって速やかに修復されが、その修復様式は植物種によって微妙に異なることが明らかとなった。UV-B 照射による DNA 損傷が成長

阻害や可視障害とどのような関係にあるのか、本研究の段階ではまだ十分明らかとする事ができなかった。しかし、UV-B照射により葉緑体DNAも損傷を受けており、葉緑体自身にそれを修復する活性が検出できなかったことは、UV-Bによる光合成活性の低下にDNA損傷が関与する可能性を示唆している。

本研究はすべて実験室内で育成された植物を用い、実験室内で行われた。その結果、UV-B増加の植物への影響を評価する一つのたつき台的な研究としてまとめることができた。従って、これらの結果をそのまま野外の植物に適用するにはまだ検討の余地は多いが、野外における今後の研究への一つの指針となるものと考えられる。

5. 謝 辞

本研究で使用したモノクローナル抗体は金沢大学薬学部 二階堂修教授よりご供与頂いた。二階堂教授の好意なくしては、この研究は成り立たなかったと思われる。ここに深く感謝の意を表す。

6. 引用文献

- 1) Teramura, A. L. (1983) Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.* 58: 415-427.
- 2) Teramura, A. L., Sullivan, J. H. and Lydon, J. (1990) Effects of UV-B radiation on soybean yield and seed quality: a 6-year field study. *Physiol. Plant* 80: 5-11.
- 3) Cen, Y. P. and Bormman, J. F. (1990) The response of bean plants to UV-B radiation under different irradiances of background visible light. *J. Exp. Bot.* 41: 1489-1495.
- 4) Tezuka, T., Yamaguchi, F. and Ando, Y. (1994) Physiological activation in radish plants by UV-A radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 24: 33-40.
- 5) Takeuchi, Y., Ikeda, S. and Kasahara, H. (1993) Dependence on wavelength and temperature of growth inhibition induced by UV-B radiation. *Plant Cell Physiol.* 34: 913-917.
- 6) Sullivan, J. H. and Teramura, A. H. (1990) Field study of the interaction between solar ultraviolet-B radiation and drought on photosynthesis and growth in soybean. *Plant. Physiol.* 92: 141-146.
- 7) Takeuchi, Y., Akizuki, M., Shimizu, H., Kondo, N. and Sugahara K. (1989) Effects of UV-B (290-320 nm) irradiation on growth and metabolism of cucumber cotyledon. *Physiol. Plant.* 76: 425-430.
- 8) Murai, N. S., Teramura, A. H. and Randal, S. k. (1988) Response difference between two soybean cultivars with contrasting UV-B radiation sensitivities. *Photochem. Photobiol.* 48: 653-657.
- 9) 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 Reports* 14: 566-570.
- 10) 近藤矩朗 (1994) 成層圏オゾン層破壊による紫外線増加の植物への影響。
大気汚染学会誌 29: A102-A110.
- 11) 清水英幸、清水明、古川昭雄、戸塚績 (1982) 蘚苔類の生長と生理機能に関する研究：
(1) 酸素電極による光合成、呼吸測定法について。 *蘚苔地衣雑報* 9: 81-84.
- 12) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

- utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 13) Takeuchi, Y., Nihira, J., Kondo, N. and Tezuka, T. (1985) Change in nitrate-reducing activity in squash seedlings with NO₂ fumigation. *Plant Cell Physiol.* 26: 1027-1035.
 - 14) Tevini, M., Braun, J. and Fieser, G. (1991) The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 53: 329-333.
 - 15) Tanaka, K., Kondo, N. and Sugawara, K. (1982) Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 999-1007.
 - 16) Hashimoto, T. (1994) UV-B effects on plants-the present knowledge and prospect for future studies. In: K. Takemoto and S. Nishioka (ed.), *Proc. Tsukuba Ozone Workshop-Global Environment Tsukuba ' 94*, pp.134-145 Center for Global Environment Research, Tsukuba, Japan.
 - 17) Quite, F. E., Sutherland, B. M. and Sutherland, J. C. (1992) Quantitation of pyrimidine dimers in DNA from UVB-irradiation alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *Appl. Theor. Electrophoresis* 2: 171-175.
 - 18) Britt, A. B., Chen, J. J., Wykoff, D. and Michell, D. (1993) A UV-sensitive mutant of *Arabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidinone (6-4) dimer. *Science* 261: 1571-1574.
 - 19) Pang, Q. and Hays, J. B. (1991) UV-B-inducible and temperature -sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 95: 536-543.
 - 20) Yatsuhashi, H., Hashimoto, T. and Shimizu, S. (1982) Ultraviolet action spectrum for anthocyanin formation in broom sorghum first internodes. *Plant Physiol.* 70: 735-741.
 - 21) Lichtenstein, C. P. and Draper, J. (1985) Genetic engineering of plants. In *DNA cloning part II* p67-119 IRL Press, Oxford, UK.
 - 22) Mori, T., Nakane, M., Hattori, T., Matsunaga, T., Ihara, M. and Nikaido, O. (1991) Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem. Photobiol.* 54:225-23.