

A 5 紫外線増加が生態系に及ぼす影響に関する研究

(4) 紫外線増加が野生植物に与える影響の評価に関する研究

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
中嶋信美

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	中嶋信美、玉置雅紀
生物圏環境部	分子生物学研究室	佐治 光・久保明弘・青野光子
	環境植物研究室	清水英幸
(委託先)	北海道東海大学	竹内裕一
	平成8～10年度合計予算額	28,583千円
	(平成 10年度予算額	9,514千円)

[要 旨]

白山のアキノキリンソウのうち山頂部の集団(ON)と登山口の集団(BD)に、UV-Bを照射したときの生理的な影響を検討した。1週間UV-B照射した場合BDでは葉面積成長阻害とUV-B照射量との間に負の相関が、ONでは葉面積成長阻害及びアントシアニンの蓄積とUV-B照射量との間にそれぞれ負および正の強い相関が認められ、BDよりも一定量のUV-Bに対して大きく反応する傾向があった。以上の結果から、BDとONではUV-Bに対して応答性が異なると考えられる。

札幌及び西表島において太陽光紫外線をキュウリ子葉に曝露しDNA損傷産物の形成が起るかどうか検討したところ、札幌より西表島での損傷産物量の方が多い傾向が見られた。さらに西表島において太陽放射によって形成されるDNA損傷量を追跡した結果、野外における太陽紫外線は、植物のDNAに損傷を与えるレベルであり、オゾン層破壊によってDNA損傷量が増加する可能性があることが確認された。

ハウキモロコシ芽生えの光回復酵素についても検討した。その結果、ハウキモロコシ芽生えにはCPDおよび6-4PPに対する別々の光回復酵素が存在し、CPD回復酵素の誘導は光により制御されていることが示唆された。光回復酵素活性の作用スペクトルを求めると400～420nmにピークが認められたが、この結果はこれまでに報告されている作用スペクトルとは異なり、高等植物のCPD光回復酵素は、他の生物とは異なるクロモフォーを持つ可能性が示唆された。紫外線によるフラボノイド合成の制御機構を解析するため、紫外線によってシロイヌナズナの2つのACCaseのうちどちらが紫外線で誘導されるかを検討した。その結果、acc1が主要な紫外線応答遺伝子であることを見いだした。

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; 280～320nm)が特異的に増加すると予測されている。しかし先進国においてはフロン等の削減が進み、今後オゾン層は緩やかに回復に向かうと予想されている一方、気象庁によると今後少なくとも30年はオゾン層の回復が見込めないとも言われている。いずれにしても、今後地上の植物は長期にわたっ

てUV-Bの影響を受けることになり、植物に悪影響が生じる可能性が指摘されている。こうした理由から、成層圏のオゾンが減少した時に増加する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。実験室レベルの実験では、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。しかしながらこれらは主として栽培品種を用いた研究であり、野外に生育している植物が紫外線に対してどのような反応を示すのかを研究した例は非常に少ない。

これまでの研究からUV-Bが植物に障害を引き起こす要因として、UV-Bによる光合成の阻害³⁶⁾、活性酸素の関与^{23), 37)}、DNA損傷による遺伝子の破壊^{6), 38), 39)}が知られている。植物はUV-Bの作用に対して、いくつかの防御反応を活性化することにより障害を免れていると考えられるが、実際の野外条件でそのような防御機構がどの程度働いているのか、どのように誘導されるのかなどの詳細は不明である。そこで本研究では野生植物に対する紫外線の影響をアキノキリンソウを用いて調べるとともに、実験植物を用いてフラボノイド系色素の紫外線による誘導機構、遺伝子損傷の光回復酵素の特性及び野外での活性について検討した。

2. 紫外線増加がアキノキリンソウ生育に及ぼす影響

(1) 研究目的

これまでの実験植物を用いた研究から、植物は主として3つの紫外線防御反応（フラボノイドの合成によるUV-Bの吸収、活性酸素消去系酵素の活性化による活性酸素の無毒化、光回復酵素によるDNA損傷の修復）により、UV-B照射による障害から免れていることが明らかにされている。しかし、実際に野外に生育している野生植物種がUV-Bに対してどのような反応を示すかはほとんど研究例がなく、これまで報告されている例としては、ハワイの山岳地帯に生育している植物に対してUV-B照射を行った結果、高度の高い地帯に生育している植物の方が生育阻害が少なかったというSullivanら³⁰⁾の実験が挙げられる。彼らの結果は、高度の高い地域に生育している植物ほどUV-Bに強いことを示唆している。

生態系に対するUV-B増加の影響を考える場合、高度の異なる地域に生育している植物が、紫外線に対する防御反応の強さに違いがあるかどうか明らかにすることは重要なことである。なぜなら、もし違いがあるとすると植物の分布に紫外線によるストレスが影響しているという可能性が出てくるからである。もしこのようなことが明らかになれば、オゾン層破壊によるUV-Bの増加によって、いくつかの植物種は現在生育している場所で、将来の生育に影響が出てくることを意味するからである。こうした理由から本研究ではSullivanら³⁰⁾の報告をもとに防御反応のレベルで検討を行った。研究材料として白山国立公園内に生育しているアキノキリンソウを選んだ。アキノキリンソウは白山登山口から頂上付近まで高度差1000m以上にわたって分布していることが知られている⁴⁰⁾が、それらは微妙に形態が異なっていることから、別の集団であると考えられる。しかし遺伝学的にはかなり近い関係にあることが示されているので、紫外線防御反応とは全く関係のない遺伝子の違いによる、2次的な影響をかなり少なくできると考えたからである。

本研究では、白山国立公園の高度の異なる地点に生育しているアキノキリンソウの種子を栽培して、人工高温室内でUV-B照射実験を行い、その影響を調べた。その結果、高度

の高い地点に生育している集団の方に、一定量のUV-B照射に対して強く防御反応が現れることが明らかになった。

(2) 研究方法

1996～1998年10月下旬に白山に登山し、標高1260m (BD)～2670m(ON)の8地点からアキノキリンソウ (*Solidago virgaurea*)の種子を採取した。採取した種子は国立環境研究所に持ち帰りデシケーター内で十分乾燥させたのち使用するまで4℃で保存した。種子はパーミキュライト:ピートモス:パーライト:小砂利 (2:2:1:1)の培養土に播種し、温度 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $70 \pm 5\%$ の自然光温室で発芽させた。肥料として4000倍希釈のHyponexを培養土が湿る程度に与えた。播種後21日目の幼苗を昼間(7:00～19:00) $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、夜間(19:00～7:00) $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度昼70%、夜間90%に制御した人工光型グロースチェンバーに移し、1日間新しい生育条件に慣らした。翌日午前7時からUV-B照射および肥料添加を開始したが、グロースチェンバー内の光合成有効放射は植物体上部で約 $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。UV-B照射は明期の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(HOYA UV-29)により照射光の290nm以下の波長をカットした。植物体上部でのUV-Bの強度は英弘精機MI-340で測定した。未照射区ではランプボックスのみを設置した。UV-B照射強度の調節は試料をランプの距離を変えることによって行った。照射中肥料として4000倍希釈のHyponexを1日置きに土が湿る程度に与えた。UV-B照射は2週間継続した。UV-B照射前、1週間目及び2週間目にそれぞれの実験区から5～20個体を採取し、植物体の地上部分を切り取り生重量を測定した後、アントシアニン量を測定するため植物体を0.リングのついたマイクロチューブに入れ、1mlの1%塩酸を含む90%メタノールを加え密閉した。4℃の冷暗所で1晩放置し、さらに暗所40℃で2時間保温して色素を抽出した。抽出液の518nmの吸光度を測定してアントシアニン量とした。葉面積の測定は第3葉を切り取り、白紙にセロテープで貼り付け、スキャナーで取り込んだ画像データをMacintosh NIH Imageを用いて測定した。光合成はクラーク型酸素電極を用いて測定した。クロロフィルの定量はアーノンの方法⁹⁾によって行った。

(3) 研究結果

BDとONの間にUV-B照射の影響がどのくらい異なるのかを検討するために 0.32Wm^{-2} のUV-Bを1日あたりに12時間照射し、照射開始後1週間目と2週間目に試料を採取し、葉面積、生重量、アントシアニンの蓄積を調べた。未照射区の葉面積はBDの場合1週間後には2倍になるが2週間後は1週間目よりやや大きい程度で大きな増加は認められなかった。これに対してONは直線的に成長した。UV-B照射区ではBD、ONとも未照射区よりも生育が抑制されており、未照射区に対する割合はBD、ONとも同程度であった。未照射区の生重量はBD、ONとも2週間目まで直線的に成長し、2週間目には3倍程度になった。UV-B照射区の生重量はBDでは、未照射区と大きな差はなかったが、ONでは照射1週間目に有意に増加が抑制されていた。しかし、その差も2週間目には認められなかった。アントシアニンの蓄積をみると、未照射区ではBD、ONとも2週間で大きな変化はなかった。UV-B照射区ではBD、ONとも未照射区よりも高い値となったが、1週間目ではONの方がBDよりも有意に多くのアントシアニンを蓄積していた。以上の結果から、BDとONでは生重量及びアントシアニンの蓄積

に差がみられたので、さらに詳しく検討するために各パラメーターのDose responseを調べた。UV-Bの照射強度として $0.15 \sim 1.0 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ の間の6段階を選びそれぞれ独自に実験をおこない、Dose responseを調べた。その結果BDでは葉面積生長とUV-B照射量との間に負の相関が認められたが、生重量及びアントシアニンの蓄積とUV-B照射量との間の相関性は低かった。一方ONの場合、葉面積及びアントシアニンの蓄積とUV-B照射量との間に、それぞれ負および正の強い相関が認められた。しかし生重量とUV-B照射量間の相関性は低かった。また、ONはBDよりも一定量のUV-Bに対して大きく反応する傾向があった。2週間照射した植物個体においても同様の相関が認められたが、一定量のUV-Bに対する反応性に大きな差は認められなかった。次に、UV-Bの光合成に与える影響を調べた。アキノキリンソウの光合成は人工光室に移すことにより5分の1程度に低下したが、1週間目にはBD、ONともUV-B照射した方が高い光合成活性を示した。しかしながらばらつきが大きく統計的な有意さはなかった。2週間目ではBD、ONとも未照射区と同じ値となった。

(4) 考 察

本研究では、野生植物のうち高度の異なる地域に生育している集団において、UV-Bに対する応答が異なるかどうかを、アキノキリンソウを例として調べた。その結果、少なくとも白山山頂付近に生育している集団と、登山口付近に生育している集団は、UV-Bに対する応答性が異なることが示された。今回調べたパラメーターのうち、葉面積成長はキュウリなどのいくつかの植物においてUV-Bによって抑制されることは知られているが、アキノキリンソウでも集団の違いに関わらず、同程度のUV-Bによる葉面積成長の抑制が起こることが示された。これらの結果から、UV-Bによる葉面積成長の抑制は、高等植物に共通して起こる応答である可能性があることがわかった。

UV-B照射1週間目において、生重量の成長抑制とUV-Bの照射量との間にONにおいては相関がみられたがBDでは相関がみられなかった。一方、アントシアニンの蓄積量に関してもUV-B照射量に対してONの方が高い相関を示すとともに相関直線の示す傾きも急になっていた。このことは1週間目まではBDよりONの方が一定量のUV-B照射で多くのアントシアニンを合成していることを示している。高等植物のアントシアニン合成経路を触媒する酵素のうちいくつかは紫外線によって発現が誘導される。さらに、この経路を活性化するとかなりの高エネルギー物質が消費される。以上のことから、ONの生重量の成長がUV-B照射1週間目の段階で抑制されている理由として、ONはより強いUV-B耐性を獲得するために、BDよりも多量のアントシアニンを作り、その結果、多くのエネルギーがアントシアニンの合成で消費されるため生重量の成長が抑制されたのだと考えられる。

本研究のアキノキリンソウに対するUV-B照射実験から、照射1週間目にBD、ONともにUV-B照射量と葉面積成長の阻害には相関性があることが、またONではUV-B照射量とアントシアニンの蓄積に強い相関関係があることが示唆された。さらにONは、一定量のUV-Bに対してBDより強く反応することが示された。Muraiら²⁹⁾はアキノキリンソウに除草剤のパラコート进行处理する実験から、白山地域の頂上付近に生息している集団の方がパラコートに耐性であること、頂上付近に生息している集団では、登山口付近に生息している集団よりも活性酸素消去系の酵素の一つであるスーパーオキシドジスムターゼが強く誘導されることを示している。UV-Bを植物に照射すると、細胞内で活性酸素が生成すると推定されている。

従って、本研究及び Muraiら²⁴⁾の研究を総合すると、白山地域に生息しているアキノキリンソウは、頂上付近に生育している集団の方が、登山口付近に生育している集団よりも、UV-B照射によってその防御反応が強く誘導されると考えられる。

3. 太陽紫外線により形成される植物のDNA損傷

(1) 研究目的

フロンガスなどの含塩素化合物の大気中への放出によるオゾン層の破壊は、MolinaとRowland²²⁾による研究以降、多くの研究者により研究が行われてきた。一般に、紫外線はその波長が短いほど生体に与える影響が大きいと考えられ、オゾン層破壊によるUV-B放射量の増加は農作物を含む陸上植物に大きな影響を及ぼすと考えられる²³⁾。生体を構成する物質である核酸やタンパク質などは紫外線を吸収し、その構造にさまざまな損傷を受けることが知られている。特に、遺伝情報を担う物質であるDNAの損傷は遺伝子の転写と複製に大きな影響を与え、その結果として生物に突然変異や細胞死をもたらすと考えられる。紫外線照射によるDNAへの直接的な損傷として、2種類の主要な損傷産物、cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct [(6-4)photoproduct] が知られている²¹⁾。これまでに、野外において植物に及ぼすUV-Bの影響を調べた研究はわずかしがなく、UV-Bの影響に関する知見の多くは温室や人工気象室のような植物育成チャンバーを用いて行われたものがほとんどである。これらの研究の多くでは紫外線の光源として殺菌灯や健康線灯が用いられているが、これらから放射される紫外線はその波長スペクトルが太陽紫外線とは大きく異なり、育成チャンバーで得られたデータをそのまま野外で育成する植物にあてはめて考えることはできない²²⁾。地表に到達するUV-Bはオゾン層のオゾン量に左右されるばかりでなく、他の日射成分と同様、太陽高度、雲の状況、局地的な大気汚染の状況の変化に伴い大きく変化するので、地表で観測されるUV-B量は、緯度、季節、時刻、天候、地域等により大きな相違がある。特に、日本におけるオゾン全量の南北差は大きく、気象庁の観測データによると沖縄地域のオゾン層の厚さは札幌の約1/2であり、紫外線量は札幌の約2倍である（オゾン層観測報告：1997、気象庁）。また、夏季の太陽からの全放射は緯度の違いから、沖縄地域は札幌の約1.05倍である。

以上のことから本研究では、オゾン層破壊に伴うUV-B放射量の増加が植物の遺伝子に及ぼす影響を明らかにする目的で、太陽からの全放射中にしめる紫外線の割合が異なる2地点、札幌と西表島（東海大学沖縄地域研究センター）において、野外でキュウリの黄化子葉に紫外線を曝露し、DNAに形成される損傷産物量の違いを比較し、さらに、形成されるDNA損傷量の経時変化を追跡した。

(2) 研究方法

キュウリ (*Cucumis sativus* L. cv. Hokushin) の種子は一晩流水中で吸水させた後、湿らせたペーパータオル（キムタオル）上に播種した。暗所、25℃で5日間生育させた黄化芽生えから子葉を切り取り、20mM KClおよび100μMのゼアチンを含む20mMリン酸カリウム緩衝液（pH 6.0）2.0mlで湿らせた濾紙の入ったステンレスシャーレ（直径5cm）中に子葉5ないし10枚を並べた^{36), 38), 40)}。シャーレを白色の閉鎖型アクリルケースに入れ、石

英板 ($5 \times 5 \text{ cm}^2$) で覆った。アクリルケース内に、 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ に設定した水を循環させ、シャレー内の温度を $25 \sim 30^\circ\text{C}$ に保った。紫外線曝露は、札幌（本学校地内、北緯 43° ）および、西表島（東海大学沖縄地域研究センター、北緯 24° ）にて行った。札幌では、1997年6月14日～9月8日、西表島では、1997年7月30日～8月16日及び1998年7月26日～8月8日の期間に行い、曝露と同時に、毎回、光合成有効放射量（photosynthetic photon flux density, PPF）を、光量子センサー（LI-COR）で測定した。また、曝露時間は、札幌と西表島での損傷産物量の比較の実験では10:30～13:30までの3時間、1日の損傷産物量の変化の実験では9:00～21:00までの12時間とした。DNAは¹⁴²の方法を参考に、多少の変更を加えてキュウリの子葉から抽出した³⁹⁾。得られたDNA標品の濃度は、DNA溶液 $10 \mu\text{l}$ に蛍光色素溶液（H33258 dye, $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ） 2.0 ml を混合し、高感度フルオロメーター（DQ200 DynA Quant™200 Fluorometer, Pharmacia Biotech）により蛍光強度を測定することにより求めた。

キュウリ子葉のDNA含有量の測定は Naitoら³⁹⁾の方法に従った。標準DNAに子牛胸腺DNAを用いて定量した。DNA損傷産物のELISA分析はTakeuchiら³³⁾の方法で行った。標準DNAには、bacteriophage lambda由来のDNA（ λ DNA；宝酒造）を用いた。損傷産物量は、 λ DNAと同じ量の損傷産物を形成するのに必要な260nmの紫外線量として表した。

（3）研究結果

札幌及び西表島において、紫外線を曝露した子葉では明らかなDNA損傷産物の形成が認められた。また、2地点で損傷産物量を比較すると同じレベルのPPFの時、札幌より西表島での損傷産物量の方が多い傾向が見られた。

西表島において、キュウリ子葉を1998年7月26日～8月8日の9:00から21:00まで太陽放射に曝露し、形成されるDNA損傷量の経時変化を追跡した。キュウリ子葉中のDNA量は12時間後および24時間後には、約1.06倍および1.30倍に増加した。実験期間中を通じPPFの値が40～50の間だったので、損傷産物量は9日間の平均値として表した。CPD量は13:30まではほぼ直線的に増加した。その後13:30から16:30の間ほぼ一定の値を示し、16:30から18:00まで急激に減少した。18:00以降はほぼ一定のレベルを保ち、その値は曝露前の値と比較して有意な差が見られた。また、翌朝9:00まで子葉を暗所に放置してもCPD量には大きな変化は見られず、(6-4) photoproductは9:00から10:30までの間増加し、その後ほぼ一定のレベルを保った。

（4）考 察

これまでに300以上の植物の種及び品種において植物に対するUV-B照射の影響が調べられ、このうちの約50%で生長阻害などの影響が報告されている⁴⁰⁾。しかし、これらの研究の多くは温室や育成チャンバーなどの室内実験の結果であり、野外で生育している植物で同様の反応が見られるとは限らない。これらのことを踏まえ、本研究では太陽からの紫外線放射量が異なる2地点、札幌と西表島において野外でキュウリ子葉に太陽紫外線を曝露し、DNAに形成される損傷産物〔CPDと(6-4) photoproduct〕の量的な違いを比較し、さらに、形成されるDNA損傷の経時的变化を追跡した。札幌および西表島の両地点において太陽紫外線に曝露した子葉では、明らかなDNA損傷産物の形成が認められ、太陽放射量の増加に

に伴い損傷産物量は増加した。また、2地点で損傷産物量を比較すると同じレベルの太陽放射量（PPF）の時、損傷産物量は札幌より西表島の方が多い傾向が見られた。これらのことより、野外における太陽紫外線は、植物のDNAに損傷を与えるレベルであること、ならびに、オゾン層破壊による紫外線放射量の増加に伴い、実際に野外においてもDNA損傷量が増加する可能性があることが確認された。DNA損傷形成のタイムコースを追跡した実験では、CPD量は13:30まではほぼ直線的に増加し、13:30から16:30の間はほぼ一定の値を示した。その後、16:30から18:00までに急激に減少した。18:00以降のCPD量の値は曝露前の値と比較して有意な差が見られ、また、翌朝9:00まで子葉を暗所に放置してもCPD量には大きな変化は見られなかった。これは、キュウリの暗修復活性が低いためと考えられる³⁹⁾。また、(6-4) photoproduct量は9:00から10:30までの間増加し、その後ほぼ一定のレベルを保った。この(6-4) photoproductとCPD形成のタイムコースの違いは、キュウリ黄化子葉における両者の光修復活性の違いによると考えられる。この点をより明らかにするためには、両者の光修復機構に関与する酵素系の性質を明らかにすることが重要と考えられる。

4. 高等植物における紫外線によるDNA損傷とその修復

(1) 研究目的

近年成層圏オゾン層の破壊に伴って増加するB領域紫外光（UV-B）の生物に及ぼす影響が懸念されている。UV-Bは植物に成長障害をはじめ様々な形態形成の異常を引き起こすが、その際の細胞内ターゲットとして、DNAの障害機構は最も致命的で重要な障害機構であると考えられる。DNAの損傷の主要なものはピリミジンダイマーの生成であるが、シクロブタン型（CPD）、6-4型（6-4PP）、ジュワー型等が知られている。しかし生物はこれらの損傷に対する修復機構を持っていることが、大腸菌や酵母等の微生物や動物細胞における研究から明らかになってきて³²⁾、損傷にはある程度の抵抗性があるものと考えられるようになった。植物においても、シロイヌナズナ²⁶⁾、アルファルファ²⁷⁾、ダイズ³²⁾、コムギ⁴³⁾、キュウリ³⁹⁾、トウモロコシ³³⁾、イネ¹²⁾でDNA損傷の修復が観察され、光回復機構がその主経路であると考えられるようになった。しかしながら高等植物における光回復酵素の知見はあまりにも少なく、その活性の成長時期における変動や環境条件と光回復酵素の関係については、わずかにシロイヌナズナ²⁶⁾やインゲン³⁵⁾、カラシナ⁸⁾、ホウキモロコシ¹⁴⁾等で報告があるだけである。そこで本研究では植物の光回復酵素の基本的性質の解明を行った。

(2) 研究方法

ホウキモロコシ（*Sorghum bicolor* Moench, Acme Broomcorn）は、種子を24℃流水中で24時間吸水させた後、パーミキュライトに播種し、24℃暗黒下で3日間およそ7cmに達するまで育成した。その後、UV-A/blue（FL40S-BLB, Toshiba, 2本、カラーD FL40S-BF, National, 2本、距離50cm）を9時間照射して光回復酵素を誘導した。ホウレンソウ（*Spinacia oleracea* L.）は、ネイキッド処理したスイコウメイト用種子14号（積水化成工業）を使用した。直径7cmの植物培養用ポットにパーミキュライト（細粒）を底から6cm程度まで敷き詰め、水道水で十分に灌水した。ここにホウレンソウの種子を、1ポット当たり25粒程度播種し、種子が見えなくなる程度にパーミキュライトをかけた後、水道水で表面

を湿らせ、パーミキュライトが浮かないように表面を軽く押さえた。播種したポットを20℃に空調してあるインキュベーターへ置き、スイコウメイト（積水化成工業）を与え育成した。植物の生育には、植物育成灯（National FL 40S PG 40W）を用い、20℃のインキュベーター内で12時間 12時間の明暗周期で照射した。光回復酵素は以下のように抽出した。2 gのハウレンソウ葉に30%硫酸アンモニウムを含む3.2mlの抽出液（200mM Tris HCl pH 7.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol）を加え、ホモジナイザーで15秒破碎した後、2重にしたガーゼで濾過した。その後、濾液に40%飽和となる様に硫酸アンモニウムを加え、水中で攪拌した後、10000rpm（9000g）で遠心し、上清を移し取った。この上清に60%飽和となる様に硫酸アンモニウムを加え、水中で10分間攪拌した後10000rpm（9000g）で遠心し、上清を取り除いた。この硫酸分画により得られた沈殿をReaction Buffer（100mM Tris HCl pH 7.6, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol）に溶かし、1.6mlにした。活性の測定には、この抽出液を0.5ml取り、Reaction Bufferで平衡化したセファデックスG-25ミニカラム（φ0.8×5cm）で遠心脱塩した後、DEAE試料前処理カートリッジ（Mサイズ、東ソー）に通し、核酸成分を除いたものを粗酵素液として用いた。粗酵素液、1mlあたり1.25gの植物体相当量の試料が含まれている。酵素液のタンパク量は、Smithら³²⁾の方法に従い、Bovine serum albumin（BSA）をスタンダードとしてBCA Protein Assay試薬（Pierce社）を用いて定量した。ホウキモロコシの場合には、3cmの切片20本を1サンプル（400ng）とし、1mlの抽出液中で石英砂を加えて磨砕した。磨砕液を、遠心（1800g, 10min）し、上澄みを上記と同様にセファデックスG-25ミニカラムにかけて脱塩し、粗酵素液とした。粗酵素液を用いてさらに部分精製を以下に行った。粗酵素液中のタンパク質をブルーセファロースカラム（φ1.5×8cm、Pharmacia）に吸着させ、NaCl濃度0.1~1.5Mの直線グラジエントで溶出した。溶出液を2mlずつ分取し、各フラクションの280nmにおける吸収および酵素活性を測定した。活性部を集め、光回復酵素標品とした。光回復酵素のin vitroでの活性測定は、酵素標品（または粗酵素液）をピリミジンダイマーを含む基質DNAに加え、回復光を照射した（未照射区は暗黒下）後、DNA中に残ったピリミジンダイマー量を、ELISAにより測定して求めた。ホウキモロコシからのトータル RNAの抽出は Guanidinthiocyanate法で行った。さらに oligo dT Dynabeadsを用いて、polyA-RNAを単離した。これをテンプレートに、M-MulV Reverse transcriptase, Tag polymeraseにより、RT-PCRを行った。プライマーには、シロイヌナズナのCPD光回復酵素遺伝子³⁾をもとに、ショウジョウバエやその他これまで報告されているType II遺伝子^(37,43)で保存されており、なおかつ青色光受容体遺伝子^(2,27,28)とでホモロジーの低い部分を選んで化学合成したオリゴヌクレオチドを用いた。RT-PCRにより増幅されたDNAの塩基配列は、キャピラリーシクエンサー310（Applied Biosystems）を用いて決定した。

（3）研究結果

ホウキモロコシ芽生えを実験材料として、UV-B照射によって形成されたCPDおよび6-4PPの光回復を、in vivoおよびin vitroで調べた。UV-B照射で生じたCPDと6-4PPは回復光照射下では非常に速い回復を示した。In vitro活性測定で、CPDおよび6-4PPの両者に対する活性が見られた。暗黒芽生えにUV-Aの前照射を行うと、CPDの光回復酵素活性が上昇した

が、6-4PPの回復酵素は前照射の影響を受けなかった。活性上昇のタイムコースから、この酵素活性の上昇は酵素の光による活性化によるものではなく、酵素のde novo合成によるものだと考えられる。CPD光回復酵素 mRNAの発現レベルを調べたところ、UV照射により増加した。ハウレンソウを用いて、成長ステージと光回復酵素活性の変動について調べた。ハウレンソウ各葉の出葉は、子葉が播種後5日目、播種後第1葉が10日目、第2葉が播種後20日目である。それぞれの葉の採取開始は、子葉では播種後7日目、第1葉では播種後12日目、第2葉では播種後22日目とし、1日毎に粗抽出液中の酵素活性を調べた。ハウレンソウ葉の生重量あたりの光回復酵素活性は、実験に用いたすべての葉で出葉後の数日間が最も高く、その後葉の成長が続くにも関わらず、時間の経過に伴って活性は低下していった。高い光回復活性を示した播種後12日目の第1葉、および活性の低い播種後20日目の子葉で、UV-B照射によるDNA損傷の形成量を比較したところ、形成されるCPD量は、両葉で差がなかった。そこでこれらの葉におけるin vivoでの光回復速度を比較した。60分のUV-B照射でCPDを形成し、その後回復光としてUV-B/blueを照射し、それぞれにおけるCPDの減少を調べた。播種後12日目の第1葉では修復が見られたが、播種後20日目の子葉での修復は見られなかった。

次に、ハウキモロコシの光回復酵素遺伝子のクローニングを試みた。これまで報告されているType II遺伝子の塩基配列の中で保存されている塩基配列を化学合成し、PCRのプライマーとし、ハウキモロコシpolyA⁺ RNAからRT-PCRを行い、増幅されたDNAの塩基配列を決定した。想定されるアミノ酸配列は、シロイヌナズナをはじめとする他のType IIの遺伝子と非常に高いホモロジーを示した。

高等植物のCPD光修復酵素についてはその遺伝子解析から、Type IIのグループに属するものであると考えられているが、そのクロモフォーについてはわかっていない。また、その作用スペクトルも報告されていない。そこで、硫安分画、セファデックスG-25カラムおよびブルーセファロースカラムで精製したハウキモロコシ光修復酵素標品を用いて、ハウキモロコシ光回復酵素のピリミジンダイマーに光回復に対する波長依存性を調べた。まず、400nmの単色光を用いて、3つの光強度で20分～120分照射し、CPD光修復反応においてReciprocity-Lawが成り立つかどうかを調べた。実験した範囲の照射光強度および照射時間においては、光修復活性は光強度ではなく光量に依存して増加しReciprocity Lawが成り立っていた。そこで、以後の照射時間は60分と設定し、320nm～480nmの単色光照射により、それぞれの波長における光量-反応曲線を作成した。CPDの光修復には、360～440nmの波長域の光が有効であり、440nmより長波長側の光は修復に利用されないことがわかった。光量-反応曲線の傾きより、光修復酵素の作用スペクトルを求めると、400～420nmにピークが認められた。

(4) 考 察

本研究によってハウキモロコシ芽生えには、CPDおよび6-4PPに対する別々の光回復酵素が存在しており、CPD回復酵素の誘導は光により制御され、同じく光により誘導されるフラボノイド合成と共に、高等植物のUV防御システムとしてUV環境への適応に重要な役割を果たしていることが示唆された。

光回復酵素活性のin vitro測定で高い活性を示したものは、in vivoでもダイマーの修

復を示したが、in vitroで低い活性を示したものでは、in vivoでダイマーの修復が見られなかったことは、抽出した粗酵素液で見られた活性が実際の生体内での修復能力を示すものであることを示している。各葉毎の光回復酵素は、活性の高い期間が非常に短かった。葉の成長が続くにもかかわらず光回復酵素活性の低下が始まることについては、例えば子葉の活性が落ち始める頃、第1葉が出葉してくるので、これにより子葉の役割が終わったためだと考えられる。あるいは、新しい葉が出来ると古い葉に陰を作ってしまうため紫外線が当たらなくなり、古い葉は光回復酵素を合成する必要がなくなったからかも知れない。しかしながら第1葉、第2葉の出葉後の活性に比べて、子葉の出葉直後の光回復酵素活性はかなり低い。このような若い植物ではフラボノイド等のUV防御物質の蓄積量も少ないことが予想され、発芽後の初期に受ける紫外線ほど植物に大きな影響を与えることになると思われる。

本研究でホウキモロコシのCPD光回復酵素遺伝子はTypeIIのグループに属することが明らかとなった。これまでにいくつかの生物でCPD光回復酵素の遺伝子が報告されているが、そのそのアミノ酸配列の相同性から、大腸菌や酵母、ラン藻に見られるTypeIとショウジョウバエ、メダカ等に見られるTypeIIの2つのグループに分けられている³⁴⁾。最近になって、高等植物では初めてシロイヌナズナでCPD光回復酵素遺伝子がクローニングされ、TypeIIのグループに属することが報告された³⁵⁾。他の数種の高等植物のCPD光回復酵素遺伝子の部分解析の結果⁷⁾との比較から、高等植物は、広くTypeIIのCPD光回復酵素を持っていることが示唆された。高等植物CPD光回復酵素のクロモファーについての報告がなかった。本研究で得られたホウキモロコシのCPD光修復酵素の作用スペクトルは、これまでに報告されている他のCPD光回復酵素の作用スペクトル^{283, 333, 442)}とは一致しなかったことから、高等植物のCPD光回復酵素は、これらの光回復酵素とは異なるクロモファーを持つ可能性が示唆された。

5. シロイヌナズナにおけるアセチルCoAカルボキシラーゼの遺伝子の紫外線応答

(1) 研究目的

植物に紫外線を照射すると二次代謝が誘導される。二次代謝産物のなかでもフラボノイド類は強い紫外吸収をもち、紫外線に対する防御物質であることを示唆している。事実、フラボノイド類を欠く変異体は紫外線に感受性であることが知られている¹⁹⁾。フラボノイド類の合成経路にはいくつかの調節部位がある。そのうちで最も初期の調節酵素と考えられるのが細胞質型アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)であり¹⁹⁾、その性質や役割などは調べられている²⁸³⁾。エンドウの葉においては、ACCaseが紫外線で誘導されること、およびその後で紫外線吸収物質が合成されることがわかっている¹⁷⁾。このACCaseの厳密で迅速な調節が、植物の紫外線適応を理解する鍵の一つであると考えられる。そこで本研究ではACCaseの遺伝子の発現調節を調べるため、シロイヌナズナのACCaseのmRNAの変動を、酵素量とフラボノイドの変動と比較した。

(2) 研究方法

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* cv. Col 0)をパーミキュライトにまき 30 50

日、開花するまで育てた。温度は22℃、24時間の連続光を照射した。開花しはじめた植物体に紫外線を照射し、ロゼット葉のうち葉緑素計（ミノルタ）のSPAD値が25以上40未満のものを集め、これらからタンパク質、RNAおよびフラボノイドを抽出した。生育光源には紫外線吸収膜付蛍光ランプ昼白色FL 20S・N・SDL・NU（東芝）を用い、強度は $30 \mu\text{mole s}^{-1} \text{m}^{-2}$ であった。紫外線源は健康線用蛍光ランプFL 20S・E（東芝）で、1 mm厚のマツナミS-1111を2枚もちいてUV-Cをカットした。植物に照射した強度は、UV-A領域で 220mW m^{-2} 、UV-B領域で 170mW m^{-2} であった。組織を液体窒素で凍結して乳鉢で粉にしてから、生重量10mgあたり $100 \mu\text{l}$ の1%塩酸90%メタノール溶液で抽出し、656、530および325nmの吸光度を測定した。これらはそれぞれクロロフィルの吸収のピーク（656nm）、アントシアニンのピーク（530nm）と、アントシアニンを含むフラボノイドのピークである（325nm）。OD530/OD656およびOD325/OD656の値を統計的に処理して、実験開始時の値との相対値をグラフにプロットした。組織を液体窒素で凍結して乳鉢で粉にしてから、生重量10mgあたり $100 \mu\text{l}$ の50mM Tris-Cl, 2% (v/v) SDSを加え5分間攪拌した。懸濁物を12000gで2分間遠心し、総タンパク質を得た。タンパク質20 μg をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。膜上のビオチンタンパク質をstreptavidine-peroxydase conjugate（シグマ）とECLウエスタンブロットングキット（アマシャム）で発光させ、フィルムに露出して検出した。このフィルムの画像をプリントグラフ（アトー）でとりこみ、NIH ImageプログラムでACCaseを定量し、統計的に処理して実験開始時の値との相対値をグラフにプロットした。ACCaseにはacc1とacc2の二種類の遺伝子がある。これらは高い相同性を持つので、お互いの転写物を区別して定量するためにRNase protection assay (Current protocols in molecular biology) を用いた。全RNAはisogen（ニッポンジーン）を用いて抽出した。使用したプローブはacc1とacc2の515ntの相同な領域で、それぞれ89.5%の相同性を持っていた。³²PでラベルしたRNAプローブと、シロイヌナズナの全RNA 5 μg とをハイブリダイズし、40℃でRNaseT1処理して、分解されなかったプローブをBAS2000（フジ）で定量し、統計的に処理して実験開始時の値との相対値をグラフにプロットした。

（3）研究結果

実験開始時のacc1とacc2の転写物は、いずれも同程度の低い値であった。ところが紫外線照射の後に数時間以内にacc1とacc2の転写が誘導された。特にacc1は照射開始後3時間と20時間ほどの二つのピークが現れ、強く誘導された。acc1とacc2は同方向につながってゲノム上に存在しているが、これらのうちacc1が主要な紫外線応答遺伝子であるようだ。ACCaseのタンパク質のレベルも照射後8時間くらいでピークをむかえ、その後には下がる傾向がある。アントシアニンなどのフラボノイドは単純に増加していったプラトーに達した。これらの物質は二次代謝の最終産物であり、あまりターンオーバーしないものと考えられる。

（4）考察

本研究から二つのACCase遺伝子が別個に制御されていることは明らかであり、おそらくacc1のみが関連するトランス因子があるのだろう。こうしたトランス因子が、一種類で早い反応と遅い反応の両方に関与するのか、あるいは数種類のトランス因子が紫外線反応

にかかわるのかは興味を持たれるところである。遺伝子のストレス応答に速い反応と遅い反応がみられる場合がしばしば見られるが、この実験系でのacc1の反応もこれらと同じようなメカニズムでおきているのだろう。mRNAとタンパクのレベルのピークには数時間のずれがあった。このずれが生じる原因は不明であるが、これらは単純に蓄積量を見ているので、それぞれの合成速度を必ずしも反映していない可能性はある。タンパク質のレベルにさらに遅い反応があるかどうかはもっと時間を延長して調べる必要がありそうだ。

本研究の結果から、紫外線によるACCaseの誘導は植物の紫外線耐性獲得に重要な役割を持つと考えられるが、紫外線耐性の効果が期待できるのは色素合成のあとであろう。色素合成がプラトーに達したのは30時間ほどであるので、シロイヌナズナは数日のうちに紫外線に馴化できる可能性をもっている。色素合成がプラトーに達してからmRNAのレベルは照射以前には戻らなかった。おそらくタンパク質のレベルでも同様であると考えられる。紫外線を照射し続けるかぎり、植物はフラボノイドなどの物質合成にコストを払い続けるのだろう。

6. まとめ

本研究ではアキノキリンソウを材料として、紫外線の野生植物への影響を調べた。その結果、実験植物と同様に野外に生育している植物でも、紫外線によって葉面積成長の阻害が起こることを明らかにした。また、高度の異なるところに生育している集団では、紫外線に対する応答が異なることを明らかにした。次に、太陽光紫外線によって植物に遺伝子損傷物質が蓄積する事、その生成量は太陽光に占めるUV-Bの比率に依存することを明らかにした。

以上の結果から、オゾン層の破壊によってUV-Bが増加することで、植物の遺伝子に突然変異が蓄積する可能性が出てきた。今後は、太陽光紫外線でどの程度遺伝子の変異が蓄積するのかを明らかにする必要がある。本研究では、紫外線に対する防御反応の誘導機構を解析するため、植物の光回復酵素の性質を明らかにした。その結果、これまで報告されている動物や微生物のものとは色素の構造が異なる可能性を明らかにした。また、フラボノイド合成を調節しているACCaseに、紫外線で特異的に誘導されるアイソザイムが存在することを明らかにした。

7. 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。

8. 引用文献

- (1) Ahmad M. and Cashmore, A.R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* has characteristics of a blue light photoreceptor. *Nature* 366: 162-166.
- (2) Ahmad M. and Cashmore, A.R. (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol. Biol.* 30: 851-861.

- (3) Ahmad M., Jarillo, J.A., Klimczak, L.J., Landry, L.G., Peng, T., Last, R.L. and Cashmore, A.R. (1997) An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 199-207.
- (4) Ahmad M., Jarillo, J.A. and Cashmore, A.R. (1998) Chimieric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10: 197-208.
- (5) Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiol.* 24: 1-15
- (6) Britt, A. B., Chen, J. J., Wykoff, D. and Michell, D. (1993) A UV-sensitive mutant of *Alabidopsis* defective in the repair of pyrimidine-pyrimidinone (6-4) dimer. *Science* 261: 1571-1574.
- (7) Buchholz, G., Ehmann, B. and Wellmann, E. (1995) Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). *Plant Physiol.* 108: 227-234.
- (8) Buchholz, G., Batschauer, A., Goss, J. and Wellmann, E. (1997) Molecular cloning of a putative photolyase gene from maize. 7Th Congress of the European Society Photobiology Stresa (Italy).
- (9) Cannon, G.C., Hedrick, L.A. and Heinhorst, S. (1995) Repair mechanisms of UV induced DNA damage in soybean chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 29: 1267-1277.
- (10) Eker, APM., Kooiman, P., Hessels, JKC. and Yasui A. (1990) DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* 265: 8009-8015.
- (11) Hada, M., Buchholz, G., Hashimoto, T., Nikaido, O. and Wellmann, E. (1999) Photoregulation of DNA photolyase in broom *Sorghum* seedlings. *Photochem. Photobiol.* (in press)
- (12) Hidema, J., Kumagai, T., Sutherland, J.C., and Sutherland, B.M. (1996) Ultraviolet B-sensitive rice cultivar deficient in cyclobutyl pyrimidine dimer repair. *Plant Physiol.* 113: 39-44.
- (13) Honda, H., and Hirai, A. (1990) A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Jap. J. Breed.* 40: 339-348.
- (14) Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H. and Todo, T. (1997) Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* 45: 535-548.
- (15) Kim, S-T., Malhotra, K., Ryo, H., Sancar, A. and Todo, T. (1996) Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase. *Mutat. Res.* 363:97-104.
- (16) Konishi, T. and Sasaki, Y. (1994) Compartmentalization of two forms of acetyl-CoA carboxylase in plants and the origin of their tolerance toward herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3598-3601.
- (17) Konishi, T., Kamoi, T., Matsuno, R., Sasaki Y. (1996) Induction of cytosolic acetyl-coenzyme A carboxylase in pea leaves by ultraviolet-B irradiation. *Plant Cell Physiol* 37: 1197-1200.
- (18) Langer, B. and Wellmann, E. (1990) Phytochrome induction of photoreactivating enzyme in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Photochem. Photobiol.* 52: 861-863.

- (19) Li, J., Ou-Lee, T.-M. (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.
- (20) Malhotra, K., Kim, S.-T., Batschauer, A., Dawut, L. and Sancar, A. (1995) Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34:6892-6899.
- (21) Mitchell, D.L. (1988) The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. *Photochem. Photobiol.* 48: 51-57.
- (22) Molina, M.J., and Rowland, F.S. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* 249: 810-812.
- (23) 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.
- (24) Murai, R., Yamagishi M., Takumi S. and Murai, K. (1997) Differential activities and transcripts levels of superoxide dismutase in two *Solidago virgaurea* populations from different altitudes. *Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll.* 5: 9-16
- (25) Naito, K., Tsuji, H., and Hatakeyama, I. (1978) Effects of benzyladenine on DNA, RNA, protein, and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to benzyladenine according to leaf age. *Physiol. Plant.* 43: 367-371.
- (26) 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.
- (27) Quate, F.E., Takayanagi, S., Ruffini, J., Sutherland, J.C. and Sutherland, B.M. (1994) DNA damage levels determine cyclobutyl pyrimidine dimer repair mechanisms in alfalfa seedlings. *Plant Cell* 6:1635-1641.
- (28) Sancar, G.B., Jorns, M.S., Payne, G., Fluke, D.J., Rupert, C.S. and Sancar, A. (1987) Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum. *J. Biol. Chem.* 262: 492-498.
- (29) Sasaki, Y., Konishi, T. (1995) The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol* 108: 445-449.
- (30) Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia A.K. and Gartner, F.H. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- (31) Sancar, A. and Sancar, G.B. (1988) DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 29-67.
- (32) Stapleton, A.E. (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358.
- (33) Stapleton, A.E., Thornber, C.S. and Walbot, V. (1997) UV B component of sunlight causes measurable damage in field-grown maize (*Zea mays* L.): Developmental and cellular heterogeneity of damage and repair. *Plant Cell Environ.* 20: 279-290.
- (34) Sullivan, J.H., Teramura, A.H. and Ziska, L.H. (1992) Variation in UV B sensitivity in plants from 3,000-m elevation gradient in Hawaii. *Am. J. Botany* 79: 737-743

- (35) Takahashi, S., Nakajima, N., Shimizu, H., Kamada, H., Bae, G-Y., Ishizuka, K., Nikaïdo, O. and Kondo, N. (1995) Determination of cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA from UV B irradiated cucumber leave. *Environ. Sci.*, 9(4), 461-466
- (36) Takeuchi, Y., and Amino, S. (1984) Analysis of UDP-sugar content in cucumber cotyledons in relation to growth rate. *Plant Cell Physiol.* 25: 1589-1593.
- (37) 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.
- (38) Takeuchi, Y., Ikeda, S., and Kasahara, H. (1993) Dependence on wavelength and temperature of growth inhibition induced by UV B irradiation. *Plant Cell Physiol.* 34: 913-917.
- (39) Takeuchi, Y., Murakami, M., Nakajima, N., Kondo, N. and Nikaïdo, O. (1996) Induction and repair of damage to DNA in cucumber cotyledons irradiated with UV B. *Plant Cell Physiol.* 37: 181-187.
- (40) Takeuchi, Y., Saito, M., Kondo, N., and Sugahara, K. (1985) Inhibition of zeatin-induced growth of cucumber cotyledons by sulfite ions. *Plant Cell Physiol.* 26: 123-130.
- (41) Taylor, R.M., Nikaïdo, O., Jordan B.R., Rosamond, J., Bray, C.M. and Tobin, A.K. (1996) Ultraviolet-B-induced DNA lesions and their removal in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Cell Environ.* 19: 171-181.
- (42) Teramura, A.H. (1983) Effects of ultraviolet-B radiation on the growth and yield of crop plants. *Physiol. Plant.* 58: 415-427.
- (43) Tevini, M. (1994) Physiological changes in plants related to UV B radiation. In *Stratospheric Ozone Depletion / UV B Radiation in the Biosphere*. Edited by Biggs, R.H. and Joyner, M.E.B. pp. 37-56. Springer-Verlag, Berlin.
- (44) Todo, R., Ryo, H., Takemori, H., Toh, H., Nomura, T. and Kondo, S. (1994) High-level expression of photorepair gene in *Drosophila* ovary and its evolutionary implications. *Mutat. Res.* 315: 213-228.
- (45) Yasui, A., Eker, APM., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M. and Oikawa, A. (1994) A new class of DNA photolyases present in various organisms including placental mammals. *EMBO J.* 13: 6143-6151.
- (46) 米山競一、水野昭憲、東野外志雄、上馬康生、野崎英吉、野上達也、四手井英一 千木容白山山系における高山植物の多様性解明と遺伝子資源の保全法の確立に関する研究調査結果報告書(1995) pp.23