

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	鶴本 智大
学位授与の日付	2023年3月31日	
論文名	植物のUV-Bに対する波長応答特性の解明	
論文審査委員	主査	太田 大策
	副査	横井 修司
	副査	稲田 のりこ
	副査	岡澤 敦司

論文要旨

緒論

植物はUV-Bを感知し、ストレス応答、病害応答、フェノール性化合物の合成など、様々な応答を誘導する。これらの応答の一部は、280 nm付近に極大吸収を持つUV-B受容体蛋白質、UVR8によって誘導される。これまでのUV-Bに対する植物の生理応答の研究では、ピーク波長が310 nm付近で半値幅が30 nm以上もある広帯域UV-Bランプや、ピーク波長が310 nm付近の狭帯域UV-Bランプなど、UVR8の極大吸収から外れた光源が用いられている。また、アントシアニンなどのフェノール性化合物の代謝に対するUV-B領域内の波長ごとの影響について解析された事例はないことから、任意のピーク波長を半値幅が10 nm程度で照射できるUV-LEDを光源に用いて研究を行った。これまでに、シロイヌナズナの実生にピーク波長が270 nmから10 nm刻みで310 nmまでのUV-LED光を $2.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の照度で15分間照射し、24時間暗所栽培した後、520 nmに吸収を有する代謝物をHPLCで分析した結果、280 nmおよび290 nm UV-LED光照射時にその含量が有意に増加することが明らかとなった。このように、同じUV-B領域内でも520 nmに吸収を有する代謝物の検出量は波長毎に異なる変化を示したことから、本研究では、シロイヌナズナにおけるUV-B領域の特定の波長に対する特異的反応と、実用植物における狭波長UV-Bの効果을明らかにすることを目的とした。

第一章 シロイヌナズナの 280 nm と 310 nm UV-LED 光に対する応答

任意の狭波長 UV-B を照射できる UV-LED を用いて、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0) に異なるピーク波長の UV-LED 光を同じ照度で照射したところ、同じ UV-B 領域でも HPLC 分析において 520 nm に吸収を有する代謝物含量の変化が波長毎に異なっていた。また、UVR8 の極大吸波長である 280 nm にピーク波長を有する UV-LED 光照射によって 520 nm に吸収を有する代謝物の検出量が最も増加した。そこで、本章では、異なる UV-B 波長に対するシロイヌナズナの応答の全体像を把握することを目的として研究を行なった。UVR8 の極大吸収である 280 nm UV-LED と、UVR8 の吸収が少なく、かつ、これまでの研究で多く用いられている UV-B ランプと同じピーク波長を有する 310 nm UV-LED を用いて、これらの光源に対するシロイヌナズナの応答を明らかにするためにトランスクリプトームおよびメタボローム解析を実施した。14 日齢のシロイヌナズナに $2.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の各 UV-LED 光を 45 分間照射し、その直後および 2 日間暗所栽培後の植物中のトランスクリプトームの変動を RNA シーケンスにより解析した。後者のサンプルについては LC-MS および GC-MS によりメタボロームの変化も解析した。トランスクリプトーム解析では、非照射区と比較して発現量が 2 倍以上変化し、かつ t 検定の P 値が 0.05 未満となる遺伝子を有意に発現量が変動した遺伝子とした。その結果、280 nm および 310 nm UV-LED 光に対する遺伝子発現の変動パターンは大きく異なることが明らかになった。280 nm UV-LED 光照射直後および 2 日間暗所栽培後に変動した遺伝子数が 3,386 および 3,948 であった。一方、310 nm UV-LED 光では 1,277 および 96 と、両者で変動した遺伝子数に大きな違いがあり、両者に共通して増加および減少した遺伝子数も、照射直後では 261 および 487、照射後 2 日間暗所栽培後では 15 および 1 と少ないことが明らかになった。さらに、ジーンオントロジー (GO) エンリッチメント解析により、ストレス応答や病害応答など、これまでに知られている UV-B 応答の多くが 280 nm UV-LED 光照射でのみ誘導されることが明らかになった。また、メタボローム解析では、TCA 回路のほとんど全ての代謝物、および、ポリアミンであるスペルミジンおよび γ -アミノ酪酸が増加し、脂質ではセラミドの増加やフォスファチジルエタノールアミンの減少が、280 nm UV-LED 光照射により亢進されることが明らかになった。そこで、これらの代謝に関係する遺伝子の発現量を解析した。TCA 回路では、ほとんど全ての酵素遺伝子の発現量が増加していた。ポリアミンでは、スペルミジンおよび γ -アミノ酪酸を合成する酵素遺伝子や、スペルミンおよびスペルミジンを分解する酵素遺伝子の発現量が増加していた。脂質では、3 つのセラミド分解酵素遺伝子の 1 つである *LOH2* や、*LOH2* の過剰発現との関連が示されている過敏感反応型プログラム細胞死のマーカー遺伝子、さらにはフォスファチジルエタノールアミンの加水分解酵素遺伝子の発現量が増加していた。このように、代謝変動と遺伝子発現変動のプロファイルはよく一致していた。一方、UV-B 応答の典型例として知られる、アントシアニンなどのフェノール性化合物の代謝においては、280 nm UV-LED 光照射により上流のフェニルプロパノイド生合成は誘導されるものの、フラボノイドなどの下流の生合成は両 UV-LED 光照射では誘導されなかった。さらに、UVR8 シグナルの中心的な役割を果たしている転写因子 *HY5* について、両 UV-LED 光照射によりその遺伝子発現量が増加するにも関わらず、フラボノイド生合成に関与する転写因子の遺伝子発現プロファイルは両者で異なっていた。これらの結果から、

先行研究で報告されている UV-B ランプによるフェノール性化合物の生合成の誘導は、複数のシグナル伝達によって誘導されていると考察した。

第二章 シロイヌナズナの UVR8 遺伝子改変株の 280 nm UV-LED 光に対する応答

本研究で明らかとなった 280 nm UV-LED 光照射により誘導される応答と UVR8 シグナルの関係を明確にするため、UVR8 の過剰発現株および欠損株を作出した。トランスクリプトームおよびメタボローム解析により、遺伝子の発現量と代謝物の変化に相関が見られたポリアミン代謝の γ -アミノ酪酸産生経路に着目し、その代謝関連遺伝子の発現量を定量した。作出した過剰発現株、欠損株および野生株の全ての系統で、280 nm UV-LED 光の照度の増加と共に各遺伝子発現量の増加傾向が見られたことから、280 nm UV-LED 光照射によるポリアミン代謝の亢進は UVR8 シグナルには起因しないことが明らかになった。前章の GO エンリッチメント解析で、280 nm UV-LED 光照射により、多くのストレス応答に関わる遺伝子の発現量が増加することが明らかになったことから、280 nm UV-LED 光照射による γ -アミノ酪酸の増加は、UVR8 シグナルが関与しないストレス応答によるものと考察した。

第三章 ブドウ果皮のフェノール性化合物に対する高照度 UV-B の効果

実用植物の UV-B 応答の研究には、大阪の重要な農作物の一つであるブドウを使用した。ブドウ果皮に含まれるフェノール性化合物であるレスベラトロール含量は品種に関係なく UV-C 照射により著しく増加し、ある照射量で最大となる。UV-B でも、照射量と共にレスベラトロール含量は増加するがその増加量は僅かである。これまでに、サマーブラック品種に 3.6 kJ/m² の UV を照射した場合、UV-C でレスベラトロール含量が 4.6 倍増加するのに対し、UV-B では 1.2 倍しか増加しないことが報告されている。しかし、UV-B では増加量が最大となる照射量を解析した事例がないことから、高照射量の UV-B がブドウ果皮中のレスベラトロール含量に与える効果を明らかにすることを目的に、ピーク波長を 290 nm に持ち、UV-B 以外の波長を殆ど含まない UV-LED 光を照射後、HPLC によるレスベラトロール分析とトランスクリプトームおよびメタボローム解析を実施した。収穫後のマスカットベリーA 品種に、照度が 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ の 290 nm UV-LED 光を照射量が 22,500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (約 9 kJ/m²) および 225,000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (約 90 kJ/m²) になるように照射し 2 日間暗所保管すると、非照射区と比較してレスベラトロール含量はそれぞれ 2.1 倍および 9.0 倍に増加した。また、シャインマスカットおよびデラウェア品種に照射量が 225,000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ の 290 nm UV-LED 光を照射すると、レスベラトロール含量がそれぞれ 3.0 倍および 27.6 倍に増加し、品種に関係なく、UV-C 照射と同様の著しいレスベラトロール含量の増加を引き起こした。UV-B はブドウ果皮のフラボノールやアントシアニンを増加させることが知られているが、高照射量の 290 nm UV-LED 光を照射したマスカットベリーA 果皮の LC-MS によるメタボローム解析では、非照射区と比較してレスベラトロール以外に著しく増加したフェノール性化合物は特定できなかった。さらに、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析では、発現量が 5 倍以上変化した遺伝子を有意に変化する遺伝子として解析した結果、フラボノールおよびアントシアニンを含むフラボノイドの生合成に関係する遺伝子の発現量は増加しないことがわかった。一方、発現量が増加した遺伝子に含まれていた転写因子 8 個のうち、7 個は光やスト

レスに関係するものであり、また転写因子以外にもストレスに関係する遺伝子が 14 個含まれていたことから、高照射量の 290 nm UV-LED 光によるレスベラトロール含量の増加は、UV-C 照射と同様のストレス応答や、病害応答を活性化すると考察した。

結論

本研究により、シロイヌナズナの 280 nm および 310 nm UV-LED 光に対する応答性は大きく異なり、シロイヌナズナは同じ UV-B 領域の波長であっても、280 nm と 310 nm というわずか 30 nm のピーク波長の違いを識別していること、植物の UV-B 応答の多くが、280 nm UV-LED 光照射によって誘導されることが明らかになった。また、収穫後のブドウに高照射量の 290 nm UV-LED 光を照射することで、UV-C 照射と同様の著しいレスベラトロール含量の増加を引き起こすことが明らかになった。本研究により、波長域の狭い UV-LED の使用が、植物の UV-B 応答の新たな知見を得る有効な手段であることを証明するとともに、異なる波長の UV-LED の使用によって、植物の UV-B 応答の新たな知見を得るための実験系を確立した。また、異なる波長の UV-B 照射による収穫後の簡便な操作で、効率的に UV 応答を誘導することにより、作物中の機能性成分の種類と含有量の増減を効果的に制御する技術開発の可能性を示した。

審査結果の要旨

植物は UV-B を感知し、ストレス応答、病害応答、フェノール性化合物の合成など、様々な応答を誘導する。これらの応答の一部は、280 nm 付近に極大吸収を持つ UV-B 受容体蛋白質 UVR8 を介して誘導される。しかし、これまでの UV-B 光への応答反応の研究では、ピーク波長が 310 nm 付近で半値幅が 30 nm 以上もある広帯域 UV-B ランプや、ピーク波長が 310 nm 付近の狭帯域 UV-B ランプなど、UVR8 の極大吸収から外れた光源が用いられている。すなわち、従来の研究は UVR8 特異的な反応解析に適切な条件で実施されているわけではない。本研究では、まず狭波長の UV-B 照射実験系を確立し、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Col-0)、および実用植物としてブドウを供試して、異なる波長の UV-B に対する植物の応答を明らかにすることを目的とした。

第一章では、シロイヌナズナの 280 nm と 310 nm の UV-LED 光に対する特異的応答の存在を明らかにした。UVR8 の極大吸収である 280 nm UV-LED と、ピーク波長が 310 nm 付近の UV-B ランプと同じピーク波長を有する 310 nm UV-LED のそれぞれの照射に対するシロイヌナズナの応答を解析した。14 日齢のシロイヌナズナに両 UV-LED 光を 45 分間照射し、その直後と 2 日間暗所栽培後にトランスクリプトームとメタボロームの変動を比較した。トランスクリプトーム解析では、280 nm UV-LED 光と 310 nm UV-LED 光の照射によって発現量が変動した遺伝子の数と種類が大きく異なること、ストレス応答や病害応答など、従来から知られている UV-B 応答の多くが 280 nm UV-LED 光照射でのみ誘導されることを明らかにした。メタボローム解析では、280 nm UV-LED 光照射によって、TCA 回路のほとんど全ての代

謝物、ポリアミン関連代謝物の増加、脂質ではセラミドの増加やフォスファチジルエタノールアミンの減少を認めた。これらの代謝関連する遺伝子の発現量は代謝変動プロファイルと整合性が有ることが明らかとなった。また、280 nm UV-LED 光照射はフェニルプロパノイド生合成を誘導したが、その下流のフラボノイド生合成は、280 nm と 310 nm のいずれの UV-LED 光照射でも誘導されなかった。UVR8 下流のシグナル伝達経路において、フラボノイド生合成制御に必須の転写因子 *HY5* 発現量は両 UV-LED 光照射で増加したが、フラボノイド生合成に関与するその他の転写因子の発現プロファイルは両者で異なっていた。以上の結果から UV-B によるフェノール性化合物生合成の誘導には複数のシグナル伝達経路が関与することが明らかになった。

第二章では *UVR8* の過剰発現株および欠損株を作出し、280 nm UV-LED 照射に対する特異的応答と *UVR8* シグナルの関係を解析した。実験では、280 nm UV-LED 光照射による遺伝子の発現量と代謝物の変化に相関が見られたポリアミン代謝に着目した。*UVR8* 欠損株でも、280 nm UV-LED 光の照度の増加と共にポリアミン代謝関連遺伝子の発現量が増加したことから、280 nm UV-LED 光照射によるポリアミン代謝の亢進は *UVR8* を介していないことが明らかになった。前章の解析結果では、280 nm UV-LED 光照射で、多くのストレス応答遺伝子の発現量が増加したことから、280 nm UV-LED 光照射によるポリアミン代謝の亢進は *UVR8* シグナルが関与しないストレス応答であると考えられた。

第三章ではブドウ果皮のフェノール性化合物蓄積に対する高照度 UV-B 効果を調べた。ブドウ果皮のフェノール性化合物であるレスベラトロール含量は、品種に関係なく UV-C 照射により著しく増加し、UV-B 照射でもレスベラトロール含量は僅かに増加することがわかっている。収穫後のマスカットベリーA、シャインマスカット、およびデラウェア品種に、様々な条件で 290 nm UV-LED 光照射実験を行ったところ、レスベラトロール含量は 2.1 倍~27.6 倍に増加し、UV-C 照射と同様の著しいレスベラトロール含量が増加した。UV-B はブドウ果皮のフラボノールやアントシアニンを増加させることが知られているが、マスカットベリーA への高照射量の 290 nm UV-LED 照射では、果皮においてレスベラトロール以外に著しく増加したフェノール性化合物は特定できなかった。トランスクリプトーム解析では、フラボノールおよびアントシアニンを含むフラボノイドの生合成に関係する遺伝子の発現量は増加しないが、転写因子を含むストレス応答遺伝子の発現が増加することがわかった。高照射量の 290 nm UV-LED 光は、UV-C 照射と同様のストレス応答や、病害応答、レスベラトロール合成を活性化すると考察した。

本研究では、狭波長の UV-LED 照射による植物の UV-B 応答を精査するための実験系を確立し、植物の UV-B 応答に新規のシグナル伝達経路が存在することを明らかにした。また、異なる波長の UV-B 照射による収穫後の簡便な操作で効率的に UV 応答を誘導することにより、作物の代謝機能を効果的に制御する技術開発の可能性を示した。これらの成果は、植物生理学、代謝生化学、ならびに応用生命科学の発展、展開に貢献するとともに、作物の有用成分・機能性成分を収穫後に増強する技術開発にも貢献すると期待される。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。