

## 紫外線による植物の DNA 損傷と回復

北海道東海大学工学部生物工学科 竹内裕一

近年地球環境の悪化が人々の関心を集めているが、そのうちの一つに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成層圏オゾン層の破壊があげられる。オゾン量の減少は、太陽からの紫外線放射のうち波長 290~320 nm の UV-B と言われる領域の地表面への到達量を特異的に増加させ、<sup>1)</sup> 人類に皮膚癌の増加を始めとする健康被害をもたらすと考えられている。一方、植物はその生存にエネルギー源としての太陽光が不可欠であり、その光の中には必然的に紫外線が含まれているため、植物はその一生の間、常に紫外線ストレスにさらされ続けていると言える。その面において、衣服や帽子などにより紫外線を防御できる人類に比べ、紫外線量の増加は植物にとってより深刻な影響をもたらす可能性がある。UV-B を実験的に植物に照射すると生長を阻害し、農作物ではその収量や品質を低下させること、また UV-B に対する植物の感受性・抵抗性には大きな種間差や品種間差があることが知られているが、そのメカニズムの解明や定量的な影響評価はほとんど行われていないのが現状である。<sup>2)</sup>

紫外線の生物影響の標的分子として、古くから DNA が注目され研究が行われてきたが、最近またオゾン層の破壊と関連して多くの研究例が報告されている。前述のように、オゾン全量の減少は波長 290~320 nm 領域の紫外線の放射量を特異的に増加させ、もし仮にオゾン層の半分が破壊されても、地表には 290 nm 以下の波長の紫外線はオゾンなどに非常に効率よく吸収されるため地表には到達しない。そのため、オゾン層の破壊の生物への影響を定量的に明らかにするためには、波長 290~320 nm の紫外線の影響を研究しなければならない。紫外線は一般的にその波長が短いほど生物に対する影響は大きい、従来主に研究が行われてきた殺菌灯を光源とした波長 254 nm の紫外線と UV-B 領域とは量的だけではなく、質的にも生物に対する影響が異なることが明らかにされつつある。<sup>3)</sup>

紫外線による DNA 損傷産物のうち、量的にもっとも多いのは、シクロブタン型ピリミジンダーマー (cyclobutane pyrimidine dimer, 以下 CPD と略す) で、量的に多いだけでなく、化学的に安定で解析しやすい、特異的に作用する酵素が存在し解析に利用できるなどの理由で研究が進んでいる。しかし 1982 年の報告以来、大腸菌で突然変異を誘発しやすい損傷として、(6-4)photoproduct (pyrimidine-(6-4)-pyrimidine photoproduct) の存在が注目されるようになってきた。(6-4)photoproduct は CPD の 1/10 から 1/20 程度の量の DNA 中で生成し、その生成の作用スペクトルは 260 nm に極大を持ち、CPD のそれと短波長側と長波長側を除きほぼ一致している。また (6-4)photoproduct は、中波長から長波長の紫外線により Dewar 型の photoproduct に異性化することが 1987 年に見いだされている。従来これらの損傷産物の定量がさまざまな方法で試みられてきたが、その検出感度や特異性に問題点が指摘されていた。最近、これら 3 種類の損傷産物のそれぞれに特異的な単クローン性抗体が作製され、紫外線による DNA 損傷産物の生成とその回復機構に関する研究に用いられている。<sup>4)</sup>

紫外線による DNA 損傷産物の生成は微生物でも、動物細胞でも、植物細胞でも本質的には同様であると考えられるが、回復過程には大きな差異が存在すると思われる。微生物や動物細胞における回復機構については他の総説を参照されたい。<sup>5)</sup> 植物は前述のように、その生育に太陽光が必要であり、紫外線による DNA 損傷を修復する機構が生存に不可欠であると考えられるが、その研究はあまり進んでいないのが現状である。

DNA 損傷の修復は一般的に可視光線によって促進され、光回復 (光活性化) と呼ばれる。植物においても、トウモロコシの花粉、ニンジン、タバコ、水生植物などで報告があり、photolyase と呼ばれる酵素によると考えられる。photolyase は、その分子内に 2 つの色素 (一つは FADH<sub>2</sub> であり、他の一つは pterin または deazaflavin である) を含む酵素で、光のエネルギーを吸収し、CPD を元のピリミジン 2 分子に変換する。photolyase に関する研究は大腸菌などでは進展しているが、植物では最近 (1993 年) やっと遺伝子がカラシナから単離されたところである。(6-4)photoproduct の修復も光によって促進されることがシロイヌナヅナとキュウリの黄化子葉で見いだされているが、それがショウジョウバエで見いだされたような (6-4)photoproduct に特異的な photolyase によるのかなど詳細は不明である。また、光照射下においては (6-4)photoproduct から Dewar 型の photoproduct への異性化がおこっていると考えられるが、明所における (6-4) photoproduct の減少と異性化との関連は不明である。

植物においても、暗所での DNA 損傷の回復は認められる。暗所において、シロイヌナヅナでは CPD に比べ (6-4)photoproduct の修復の方が速いが、キュウリの黄化子葉では両者の修復速度はほぼ同じである。植物においても、暗所における修復は大腸菌などと同じように除去修復によると考えられるが、この種の違いによる修復

速度の差がどのような機構によるかなど、今後の研究が待たれる。

この植物の違いによる修復活性の違いは光回復にも見られ、また植物の齢、生育条件（暗所か明所か、紫外線を受けたことがあるか）などにより修復活性が変化することが知られている。植物におけるDNA損傷からの回復機構の研究は、まだ始まったばかりとも言えるが、このような植物種の違いや生育条件の違いによる修復活性の差は、修復活性の高い品種の選抜や遺伝子工学的的手法による新品種の作出の可能性を示唆している。オゾン層の破壊によるUV-B放射量の増加に適応した農作物の作出の方向性に関連して、この分野の研究の進展が期待される。

- 1) Molina, M. J. and Rowland, F. S.: *Nature*, **249**, 810 (1974).
- 2) 竹内：植物の化学調節，30，印刷中（1995）。
- 3) Stapleton, A. E.: *Plant Cell*, **4**, 1353 (1992).
- 4) 松永ら：放射線生物研究，**24**，139 (1989).
- 5) Sancar, A. and Sancar, G. B.: *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 29 (1988).

## 温度調節型遺伝子発現ベクターのバイオプロセスへの応用

ヘキストジャパン(株)医薬生産本部バイオ生産部 杉本俊二郎

有用物質を生産する目的で種々の調節型ベクターが構築されその応用例が多数報告されている。クローニングした遺伝子の発現量を調節する方法には大別すると遺伝子コピー数を制御する方法と、遺伝子転写活性を制御する方法の2通りある。宿主域も大腸菌のみならず酵母や哺乳動物細胞あるいは昆虫細胞にまでその応用が広がっている。ここでは遺伝子転写活性を温度で調節するタイプ（以下温度調節型遺伝子発現ベクターと総称する）のバイオプロセスへの応用について最近の話題を紹介する。

温度調節型遺伝子発現ベクターの利点は、誘導物質あるいは抑制物質などの化学物質を添加し遺伝子発現を調節する系と比較して、遺伝子の発現量が温度という物理的な操作因子により思いどおりに調節できることにある。もちろん温度を下げることにより発現をいったん停止し、その後再び温度を上げて発現することもできる。この特性は、遺伝子産物そのものが目的物である場合（生理活性タンパク質あるいはペプチド）のみならず、代謝産物が目的物である場合にも代謝経路の酵素遺伝子（群）をクローニングし発現調節することで生産性を改善することもでき、非常に有効で応用範囲が広いといえる。一方このような利点に対し、温度を操作することにより宿主細胞の増殖速度やタンパク質合成速度なども変動するので、その影響も同時に考慮しなければならない。すなわち、温度調節型遺伝子発現ベクターのバイオプロセスへの応用には、遺伝子発現の生物学的な面と培養工学的な面の両面を検討する必要がある。

杉本ら<sup>1)</sup>は、大腸菌を宿主としてλファージの温度感受性リプレッサー遺伝子  $cI_{857}$  と  $P_R$ - $P_L$  タンデムプロモーターにより構成される発現システムを用いて、このプロモーター下流に接続したβ-ガラクトシターゼ遺伝子の発現と温度との関係を検討し、β-ガラクトシターゼに特異的なmRNAの合成とβ-ガラクトシターゼ活性が培養温度により調節できることを確認した。次に、この温度調節型発現ベクターの特性を利用するべく、大腸菌によるフェニアラニンの生産プロセスをとりあげた。まず、フェニアラニン生合成経路の調節酵素であるDAHPシターゼとコリスメイトムターゼ-P-プレフェネイトデヒドラターゼをコードする *aroF* と *pheA* 遺伝子をそれぞれ  $P_R$  および  $P_L$  プロモーター下流にクローニングし、培養温度とフェニアラニン生産量、mRNA量および生菌数の関係を検討した。さらに、回分培養あるいは熱交換型(PHE)培養槽とジャーファーメンターを連結した循環培養装置を用いて、クローニングした遺伝子の発現量を菌体の増殖阻害がおこらない範囲内で制御し、一定温度での培養と比較してフェニアラニン生産が約10倍向上することを報告している。<sup>2)</sup>

大嶋ら<sup>3)</sup>は、 $P_R$ - $P_L$  タンデムプロモーターの制御下で大腸菌由来のガラクトキナーゼ遺伝子が発現する組換えプラスミドを構築した。このプラスミドには、温度感受性リプレッサー遺伝子  $cI_{857}$  もクローニングされているので培養温度により遺伝子発現を制御できる。高濃度培養を可能にし効率的に遺伝子産物を生産する条件を決定するため、培養温度を培養途中で変化させ、遺伝子産物の生産を誘導する二段階培養を試みたところ、最初34°Cで培養を行い、対数増殖後期に培養温度を42°Cへと昇温することによって効率的な生産が可能となった。

堤ら<sup>4)</sup>も、温度感受性リプレッサー  $cI_{857}$  を有する大腸菌に  $P_R$  プロモーターの下流にβ-ガラクトシターゼ遺伝子を連結したプラスミドを導入し、単槽回分培養における遺伝子産物の効率的生産のための温度変化方式について検討している。